

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierung der Kulturbedingungen von T-Zellen
zur Anwendung im LDH-Release Assay

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Majd Abdulla

aus Syrien

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama
 2. Prof. Dr. med. T. Tonn
 3. Prof. Dr. med. A. Fauser

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
I-EINLEITUNG	6
I-1- T-Zellen (T-Lymphozyten)	6
I-1.1- Definition	6
I-1.2- Entwicklung von T-Zellen.....	6
I-1.3- Positive und negative Selektion von Thymozyten	7
I-1.4- T-Zellen-Subpopulationen.....	8
I-1.4.1- Zytotoxische T-Zellen (Killer T-Zellen) (CTLs)	8
I-1.4.2- T-Helfer-Zellen.....	8
I-1.4.3- T-Suppressive Zellen / T-Regulatorische Zellen.....	9
I-1.4.4- T-Gedächtnis-Zellen (T-memory-cells)	9
I-1.5-T-Zell-Aktivierung	10
I-1.5.1- Zytokinprofile und T-Zell-Aktivierung.....	10
I-1.5.2- Ko-Stimulierung der T-Zell-Aktivierung	11
I-1.5.3- Dendritische Zellen (DC)	12
I-1.6- T-Zellen und adoptive Immuntherapie.....	12
I-1.7- Allgemeines zur Kulturbedingungen von T-Zellen.....	12
I-1.7.1- Kulturmedien für T-Zellen und andere mononukleäre Blutzellen.....	12
I-1.7.2- Interleukin-2 (IL2)	13
I-1.7.3- Interleukin-7 (IL7)	13
I-1.7.4- Mercaptoethanol	14
I-2- Das HLA-System	14
I-3- Grundlagen der verwendeten Methoden zur Evaluation der Kulturbedingungen und der Zytotoxizität der T-Zellen	15
I-3.1- Durchflusszytometrie.....	15
I-3.1.1- Definition	15
I-3.1.2- Prinzip.....	15
I-3.1.3- Einstellung und Auswertung.....	16
I-3.2- Apoptose	18
I-3.3- Das Prinzip der Messung der zytotoxischen Aktivität der CTLs mittels LDH-Release Assay.....	20
II- ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	22
III- MATERIAL UND METHODEN	24
III-1- Material	24
III-1.1- Geräte und Software.....	24
III-1.2- Chemikalien.....	24
III-1.3- Verbrauchsmaterialien.....	25
III-1.4- Lösungen	26
III-1.5- Verwendete Medien, Stammlösungen und Puffer	26
III-1.5.1- 1x Phosphate buffered solution (PBS).....	26
III-1.5.2- Annexin Puffer-Lösung zur Apoptosemessung.....	26
III-1.5.3- Substrate-Lösung zum LDH-Release-Ansatz.....	26

III-1.5.-4- Trypanblau-Lösung zur Vitalität- und Zellzahlbestimmung	27
III-1.5.5- Basis-Nährmedien für T-Zellen und für den Zell-Mix (DC+T-Zellen)	27
III-1.5.6- Nährmedium für REH-Zellen.....	27
III-1.5.7- Nährmedium für Patientenblasten	28
III-1.5.8- Basis-Nährmedien für DC.....	28
III-1.5.9- Medium zum LDH-Release-Ansatz.....	28
III-1.6-Verwendete Zellen	28
III-1.6.1- TEL-AML1-positive ALL-Blasten.....	28
III-1.6.2- TEL-AML1-negative ALL-Blasten.....	28
III-1.6.3- T-Lymphozyten.....	28
III-1.6.4- Dendritische Zellen (DC).....	29
III-2-Methoden	29
III-2.1- Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	29
III-2.2- Isolierung von T-Zellen	29
III-2.3- Kultivierung von T-Zellen zur Apoptosemessung.....	30
III-2.4- Apoptosemessung von T-Zellen.....	30
III-2.5- LDH-Freisetzungstest (Zytotoxizität-Assay)	31
III-2.5.1- Präparation von Patientenblasten.....	32
III-2.5.1.1- Präparation von Patientenblasten aus peripherem Blut	32
III-2.5.1.2- Isolierung von Patientenblasten aus Knochenmark	32
III-2.5.1.3- Kultivierung von Patientenblasten.....	32
III-2.5.1.4- Einfrieren von Patientenblasten.....	33
III-2.5.2- Kultivierung von REH-Zellen	33
III-2.5.3- Ansatz der DC und der T-Zellen (Tag 0).....	33
III-2.5.3.1- Ansatz der T-Zellen	33
III-2.5.3.1-a- Versuche mit kryokonservierten Patientenblasten und mit REH-Zellen	33
III-2.5.3.1-b- Versuche mit frischen Patientenblasten	34
III-2.5.3.2- Differenzierung von DC aus den leukämischen Blasten	34
III-2.5.3.2-a- Aus REH-Zellen	34
III-2.5.3.2-b- Aus Patientenblasten	34
III-2.5.4- Sensibilisierung der T-Zellen	35
III-2.5.5- Lysetest (LDH-Freisetzungsmessung).....	36
III-2.6- Statistische Auswertung	37
IV-ERGEBNISSE	38
IV-1 – Ergebnisse der Kultivierung von T-Zellen und der Apoptose-Messung	38
IV-1.1- Vitalität.....	39
IV-1.2- Zellzahl.....	42
IV-1.3 - Frühapoptose	45
IV-1.4- Absolute Zellzahl / Frühapoptose	48
IV-1.5- Spätapoptose.....	50
IV-1.6 - Absolute Zellzahl / Spätapoptose.....	53
IV-2- Ergebnisse der durchgeführten LDH-Freisetzungsversuche	56
IV-2.1. LDH-Freisetzungsversuche mit REH-Zellen	56
IV-2.2. LDH-Freisetzungsversuche mit Anwendung von TEL-AML1-negativen Patientenblasten	59
IV-2.2.1-Versuchsgruppe mit kryokonservierten Patientenblasten	60
IV-2.2.2-Versuchsgruppe mit frischen Patientenblasten.....	60
V- DISKUSSION	63
V-1- Auswirkung von RPMI versus IMDM auf die kultivierten T-Zellen	63
V-2- Auswirkung von FBS versus HS auf die kultivierten T-Zellen.....	64
V-3- Auswirkung von Mercaptoethanol auf die kultivierten T-Zellen	65
V-4- Auswirkung der verwendeten Interleukine auf die kultivierten T-Zellen	66
V-5- Auswirkung von HDI auf die zytotoxische Aktivität der kultivierten T-Zellen.....	67

V-6- Die autologe versus die allogene Stimulierung der kultivierten CTLs	68
V-7- Die unspezifische Stimulierung der kultivierten CTLs.....	68
VI- SCHLUSSFOLGERUNG	69
VII- ZUSAMMENFASSUNG	70
LITERATURVERZEICHNIS	72
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
TABELLENVERZEICHNIS.....	81
FORMELVERZEICHNIS	82
DANKSAGUNG	83
LEBENS LAUF	84
PUBLIKATION	85
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	86

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Activation-induced cell death
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
APCs	Antigen presenting cells
CD	Cluster of differentiation
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, macrophage
CMB	Culture Medium Background
CTLs	Cytotoxic lymphocyte
DC	Dendritic cells
DLN	Draining lymph nodes
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetales bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
Flt3-L	Ligand für den Flt3-Tyrosinkinase-Rezeptor
FSC	Forward scatter
GCP	Good Clinical Practice
G-CSF	Granulocyte – colony stimulating factor
GM – CSF	Granulocyte, macrophage – colony stimulating factor
Gy	Gray
HA	Human Albumin
HDAC	Histone deacetylase
HDI	Histone deacetylase inhibitors
HLA	Human Leucocyte Antigen
HS	Human Serum
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Media
IFN- γ	Interferon γ
INT	Tetrazoliumsalsz
LAK	Lymphokin activated Killer cells
LDH	Lactate - dehydrogenase
Merc	β -Mercaptoethanol

MHC	Major Histocompatibility complex
MNCs	Mononuclear cells
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PBS	Phosphate buffered solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RPMI	Roswell Park Memorial Institut-Medium
SCF	Stem cell factor
SEM	Standard error of the mean
SSC	Side scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Tumor growth factor β
TGK	TNF- α + GM-CSF + SCF (c-kit-Ligand)
TH	T-Helfer-Zellen
TILs	Tumour infiltrating t-cells
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRBV	T-cell receptor beta (variable region)
T (reg)	T-Regulatory cells
TSA	Trichostatin A
Val	Valproinsäure
VCC	Volume Correction Control

I-Einleitung

I-1- T-Zellen (T-Lymphozyten)

I-1.1- Definition

T-Zellen spielen neben den B-Lymphozyten und den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) eine zentrale Rolle bei der erworbenen Immunantwort. Sie sind die Hauptvertreter der zellvermittelten spezifischen Immunität [1]. Der Name leitet sich vom Reifungsort dieser Zellen im Thymus ab; im Gegensatz dazu reifen B-Lymphozyten im Knochenmark. Es werden mehrere Unterarten der T-Zellen unterschieden, die unterschiedliche Funktionen im Immunsystem wahrnehmen.

T-Lymphozyten können mit Hilfe spezieller T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf ihrer Oberfläche, körperfremde Antigene erkennen. Anders als die von B-Lymphozyten produzierten Antikörper erkennen T-Lymphozyten aber keine ungebundenen Antigene, sondern nur solche, die ihnen mittels MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen vorgezeigt werden [2].

I-1.2- Entwicklung von T-Zellen

Die T-Lymphozyten stammen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [3]. Diese wandern vom Knochenmark in den Thymus ein und werden nun als Thymozyten bezeichnet. Thymozyten entwickeln sich im Thymus durch unterschiedliche Reifungsstadien zu funktionellen antigenspezifischen T-Lymphozyten [4]. Der Thymus besteht aus mehreren von Trabekeln begrenzten Läppchen, die ihrerseits in einen äußeren Bereich (Cortex) und einen zentralen Bereich (Medulla oder Mark) unterteilt werden (Abbildung 1). Die hämatopoetischen Vorläuferzellen gelangen über Transmigration durch die Endothelzellen der Blutgefäße in den Cortex, wo sie mit ihrer linienspezifischen Ausreifung beginnen. Im weiteren Verlauf des Reifungsprozesses wandern diese Zellen über den Cortex in das Mark des Thymus. Parallel zu dieser Wanderung erfolgt die Ausdifferenzierung der Thymozyten, bis die reifen T-Zellen aus dem Thymus schließlich in die Peripherie auswandern [1]. Über die differenzielle Oberflächenexpression der Korezeptoren CD4 und CD8 werden verschiedene Untergruppen von Thymozyten unterschieden, die die wichtigen Reifungsstadien dieser Vorläuferzellen innerhalb des Thymus definieren. Das früheste intrathymische Entwicklungsstadium ist einerseits durch das gleichzeitige Fehlen der CD4- und CD8-Expression charakterisiert (doppelt negative CD4⁻CD8⁻ Thymozyten), und andererseits durch den Mangel vom T-Zell-Rezeptor-Komplex

(TCR/CD3) gekennzeichnet [5,6]. Aus den doppelt-negativen Thymozyten entwickeln sich im Cortex die sogenannten doppelt-positiven $CD4^+CD8^+$ Thymozyten, die den T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR/CD3) erwerben. Aus diesen doppelt-positiven Thymozyten und durch einen zweistufigen Selektionsvorgang entwickeln sich die reifen sogenannten einfach-positiven $CD4^+CD8^-$ bzw. $CD4^-CD8^+$ T-Zellen, die schließlich in die Peripherie emigrieren (Abbildung 1). $CD4^+$ T-Zellen sind zumeist Helfer-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen sind Killer- oder Suppressor-Zellen.

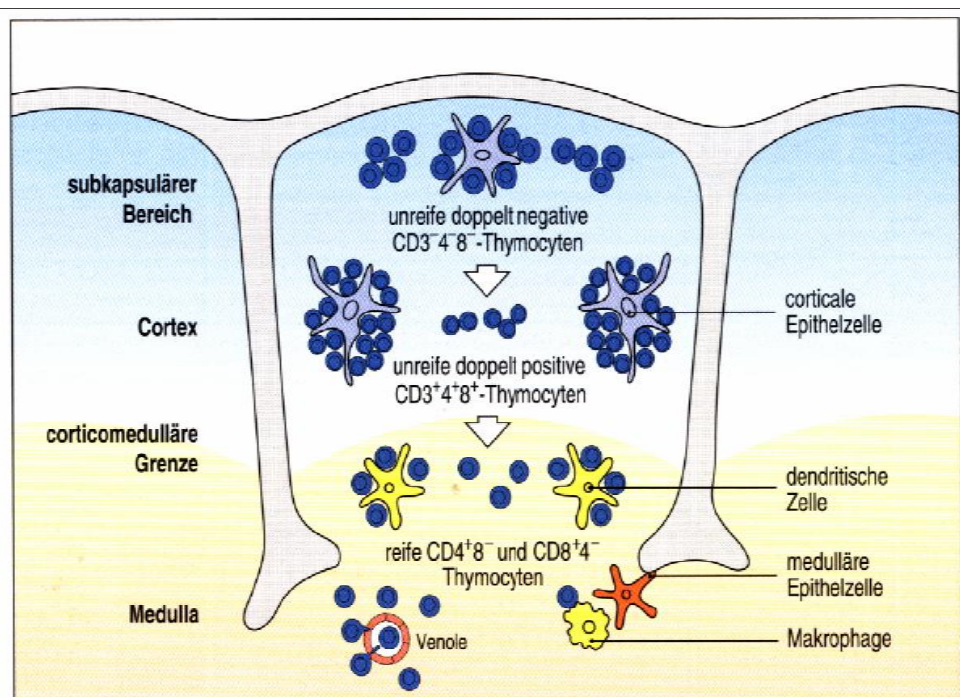


Abbildung 1 Reifungsstadien der Thymozyten [7].

I-1.3- Positive und negative Selektion von Thymozyten

Die positive Selektion ist der Vorgang, bei dem diejenigen Thymocyten, deren TCR die mit eigenen oder fremden Peptiden verbundenen Self-MHC-Moleküle bindet, überleben. Alle anderen Zellen, die keine Affinität für das Self-MHC aufweisen, sterben ab. Mit diesem Schritt werden also alle nicht Self-MHC-restringierten T-Zellen (self-MHC restriction process) eliminiert [8]. Die negative Selektion führt zur Eliminierung oder Inaktivierung potentiell autoreaktiver Zellen, deren TCR mit hoher Affinität an Eigenpeptid-Antigene in Verbindung mit Self-MHC-Molekülen bindet. Somit sind die reifen T-Zellen eigentolerant und Self-MHC-restringiert [9].

Viele Immunologen gehen davon aus, dass die positive Selektion zuerst [10], d.h. beim Eintritt der T-Zellen in den Cortex durch Kontakt mit Epithelzellen [11] und die negative Selektion anschließend beim Durchwandern des Markes (an der Übergangszone zwischen dem Cortex und dem Mark) [10] durch Kontakt mit Knochenmark-abhängigen Zellen stattfindet [1].

I-1.4- T-Zellen-Subpopulationen

Nach funktionellen Gesichtspunkten werden T-Lymphozyten unterteilt in:

I-1.4.1- Zytotoxische T-Zellen (Killer T-Zellen) (CTLs)

Zytotoxische T-Zellen lysieren virusinfizierte Zellen, Tumorzellen sowie transplantierte Zellen. Auf der Oberfläche der CTLs befinden sich T-Zell-Rezeptoren und CD8-Moleküle. CD8-Moleküle binden nur an MHC-Proteine der Klasse I (s. I-2). Kommt das CD8-Molekül mit einem MHC-Protein der Klasse I in Kontakt und passt das an MHC-Molekül gebundene Antigen in den T-Zellrezeptor der CD8-T-Zelle, wird die naive zytotoxische T-Zelle zur Synthese und Sekretion von Perforin stimuliert [12] (s. I-1.5). Perforin durchlöchert die Zellmembran der antigentragenden Zelle. Durch die Perforation treten die Ionen, Enzyme usw. aus dem Zellinnern aus und die Zelle stirbt ab.

I-1.4.2- T-Helfer-Zellen

Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle als Helfer sowie als Auslöser oder als Verstärker der adaptiven Immunantwort [13]. T-Helfer Zellen werden durch akzessorische Zellen (antigenpräsentierende Zellen) aktiviert. Da T-Helfer-Zellen den CD4+-Komplex besitzen, werden sie auch als CD4+-T-Lymphozyten bezeichnet [1]. CD4-Moleküle binden nur an MHC-Proteine der Klasse II (s. Kapitel I-2). Kommt das CD4-Molekül mit einem MHC-Protein der Klasse II in Kontakt und passt das an MHC-Molekül gebundene Antigen in den T-Zellrezeptor der CD4-T-Zelle, wird die naive T-Helfer-Zelle aktiviert [12] (s. I-1.5).

T-Helfer-Zellen können in zwei Haupt-Subpopulationen unterteilt werden [14]:

TH1-Zellen: sind bei der bakteriellen und viralen Abwehr von Bedeutung [15,16]. Sie schütten Zytokine (IFN- γ (Interferon γ)) aus, durch die die Makrophagen zur Phagozytose aktiviert werden. [17] Die Vermehrung und die Differenzierung der CTLs werden auch durch TH1 Zellen gefördert [13].

TH2-Zellen: sind bei der allergischen Reaktion und der parasitären Abwehr von Bedeutung [16]. Durch ausgeschüttete Zytokine (IL4 und IL10) veranlassen sie B-Lymphozyten, sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu differenzieren (IgE-Antikörperproduktion) [18].

I-1.4.3- T-Suppressive Zellen / T-Regulatorische Zellen

T-Suppressive Zellen sind CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen. Sie vermitteln die Suppression der Immunantwort durch Inhibierung der kostimulatorischen Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen und durch Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine [19].

Suppressive CD4⁺-T-Zellen werden T-Suppressive oder T-Regulatorische Zellen (T-reg) genannt. T(reg) exprimieren CD25, daher sind sie CD4⁺ CD25⁺. CD4⁺ CD25⁺ T-Suppressive Zellen werden durch eine spezifische TCR-Stimulierung ohne Proliferation aktiviert. Aktivierte T(reg) inhibieren durch den Zell-Zell Kontakt die Proliferation und die Funktion der aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen [20].

Zwei andere Populationen von T-Zellen, die auch eine immunsuppressive Aktivität haben, wurden unter CD4⁺-T-Zellen identifiziert: Tr1 (T-Regulatorische Zellen Typ 1) und TH3 Zellen. Diese Zellen sind entweder CD25⁻ oder CD25^{low}. Tr1 produzieren IL10 und TGF- β (tumor growth factor β) und funktionieren suppressiv durch diese Zytokine [21]. TH3 produzieren hauptsächlich TGF- β und funktionieren suppressiv durch dieses Zytokin [22].

Antigenspezifische CD8⁺-Suppressor Zellen wurden im Blut allotransplantierte Patienten ohne Abstoßungsreaktionen festgestellt [19]. Sie üben ihre immunsuppressive Aktivität durch Inhibierung der kostimulatorischen Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen aus [19].

T-Suppressive Zellen spielen eine zentrale Rolle sowohl bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz als auch bei der Regulation der Immunantwort [13,23]. Die Erhöhung der Anzahl dieser Zellen und/oder die Förderung ihrer suppressiven Funktion könnte der Therapie der Autoimmunerkrankungen und präventiv der Verhinderung der Abstoßung der Allotransplantate dienen. T-Suppressive Zellen, die in-vitro mit Alloantigenen stimuliert werden, verhindern die akute und die chronische Abstoßung der Allotransplantate bei Mäusen [13,24].

I-1.4.4- T-Gedächtnis-Zellen (T-memory-cells)

Beim erstmaligen Kontakt mit einem Antigen kommt es zur primären Immunantwort. Hierbei wandeln sich naive CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen in T-Immunoblasten um. Diese differenzieren

sich zu aktivierten CD4+- oder CD8+-T-Zellen (Effektor-T-Zellen) und zu CD4+- oder CD8+-T-memory-cells [2]. Diese T-Gedächtnis-Zellen sind langlebig. Erfolgt ein neuer Kontakt mit diesem Antigen, so kommt es durch die Gedächtnis-Zellen zu einer schnelleren und stärkeren Reaktion. Die Gedächtnis-Zellen wandeln sich in T-Immunoblasten zurück und veranlassen die sekundäre Immunantwort.

I-1.5-T-Zell-Aktivierung

I-1.5.1- Zytokinprofile und T-Zell-Aktivierung

Die reifen T-Zellen verlassen den Thymus als naive T-Lymphozyten, die über das Blut in die sekundären lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten) kommen, wo sie zwischen Blut und Gewebe migrieren [12]. Kommt ein naiver T-Lymphozyt mit einer antigenpräsentierenden Zelle in Kontakt, lagert sich der T-Zell-Rezeptor des naiven T-Lymphozyten an den MHC-Protein-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle an, wenn das MHC zu dem T-Zellrezeptor komplementär ist. Dann transformiert sich der T-Lymphozyt zu einem T-Immunoblasten (T-Effektorzelle). Anschließend entstehen aus einem Immunoblasten zahlreiche aktivierte T-Lymphozyten. Diese aktivierten T-Lymphozyten bilden einen Klon, und sind für das vom naiven T-Lymphozyt erkannte Antigen spezifisch [2]. Generell haben APCs die Fähigkeit, endogene Proteine mittels MHC-I-Moleküle und exogene Proteine über MHC-II-Moleküle zu präsentieren. Diese Fähigkeit, Antigene auf beide MHC-Komplex Klassen (I -bzw. II) zu präsentieren, ermöglicht sowohl eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen als auch von T-Helfer-Zellen (Abbildung 2). T-Helfer-Zellen können nach dieser Aktivierung in Abhängigkeit von ihrer Zytokinumgebung in zwei Typen von Effektorzellen differenzieren. Das von DC und Macrophagen sezernierte IL12 stimuliert T-Helfer-Zellen, in T-Helfer-Zellen des Typ 1 (TH1) zu differenzieren und das von sogenannten NK T-Zellen (Natürliche Killer T-Zellen) sezernierte IL4 stimuliert T-Helferzellen, in T-Helfer-Zellen des Typ 2 (TH2) zu differenzieren [25]. TH1-Zellen können durch IL10 der TH2-Zellen inhibiert werden [26] und TH2-Zellen können durch IFN- γ der TH1 inhibiert werden [2].

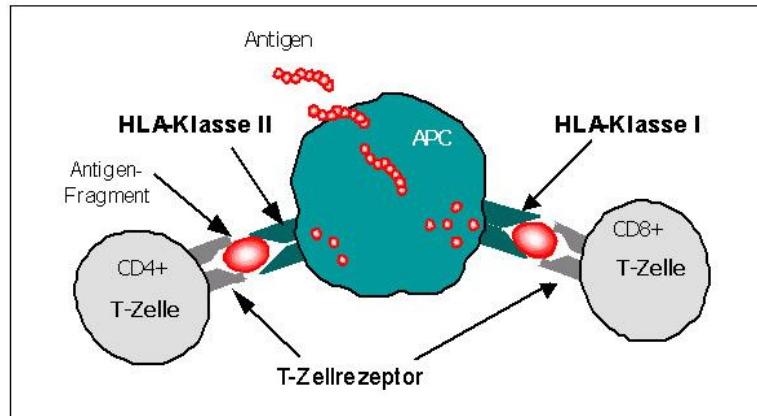


Abbildung 2 Antigenpräsentierende Zellen (APCs) prozessieren aufgenommene Antigene und präsentieren Bruchstücke auf der Zelloberfläche an HLA-Moleküle gekoppelt den T-Zellen [27].

I-1.5.2- Ko-Stimulierung der T-Zell-Aktivierung

In den sekundären lymphatischen Organen interagieren APCs über verschiedene Adhäsionsmoleküle mit den T-Zellen [25]. Die Interaktion der APCs mit den T-Zellen wird durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptoren (TCR) an den MHC-Peptid-Komplex stabilisiert, welches das erste Signal für die Aktivierung der T-Zellen darstellt [12]. Ein zweites kostimulatorisches Signal ist unbedingt erforderlich, um die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen zu ermöglichen. Dieses Signal wird durch die Interaktion von B7-Molekülen (CD80/86) auf APCs mit CD28 auf T-Zellen übermittelt (Abbildung 3) [28]. Zu den kostimulatorischen Signalen zählen auch die von verschiedenen Immunzellen sezernierten Zytokine [2].

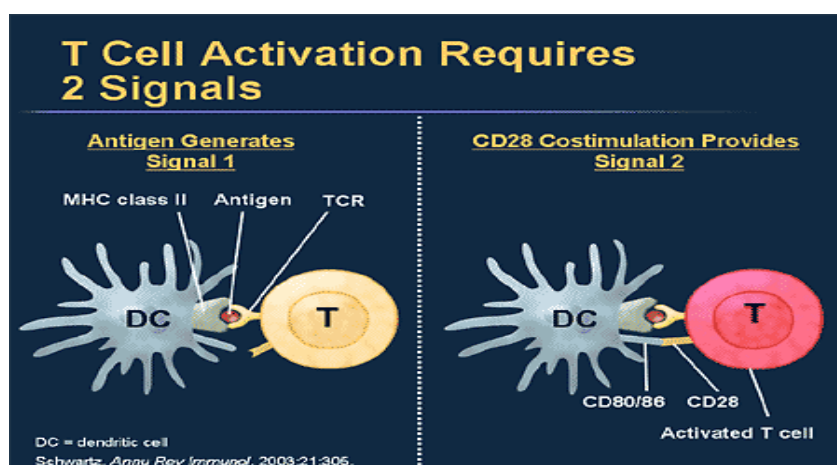


Abbildung 3 T-Zellen brauchen zwei Signale um aktiviert zu werden 1- Antigen-induziertes Signal.

2- C28-kostimulatorisches Signal [29].

I-1.5.3- Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen wurden nach ihrem charakteristischen mikroskopischen Erscheinungsbild mit zahlreichen zweigförmigen Ausläufern benannt [30]. Sie gelten als die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen [31], die in hohem Maße MHC-I- und -II Moleküle und kostimulatorische Signalmoleküle exprimieren [32]. Ihre Aufgabe ist es, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen, zu prozessieren und diese mittels MHC-I- und MHC-II-Moleküle naiven T-Zellen zu präsentieren, womit sie eine primäre oder sekundäre T-Zellvermittelte Immunantwort induzieren [33]. Nur im Rahmen dieser Antigenpräsentation können T-Zellen ausreichend aktiviert werden [33]. Mittels Ausschüttung von Zytokinen werden die T-Zellen zusätzlich angelockt. Somit nehmen die DC in den nicht-lymphatischen Geweben eine „Wächterfunktion“ wahr [34].

I-1.6- T-Zellen und adoptive Immuntherapie

Die adoptive Immuntherapie mit antigenspezifischen T-Zellen stellt eine viel versprechende Therapie für Tumorpatienten und für Patienten mit bestimmten viralen Erkrankungen wie z.B. Epstein-Barr virus (EBV) dar [35,36]. Autologe oder allogene T-Zellen werden isoliert und in vitro in der Gegenwart von IL2 und den tumor- oder virusspezifischen Antigenen expandiert und aktiviert. Diese Zellen (CTLs) können transfundiert werden, um eine effektive therapeutische Antitumor –bzw. Antivirusaktivität zu erzielen [35,37].

I-1.7- Allgemeines zur Kulturbedingungen von T-Zellen

I-1.7.1- Kulturmedien für T-Zellen und andere mononukleäre Blutzellen

Mononukleäre Blutzellen werden in vitro in einem mit fetalem bovinem Serum (FBS) oder gepooltem Human Serum (HS) supplementierten Medium (normalerweise Roswell Park Memorial Institut-Medium (RPMI 1640) oder Iscove's modified Dulbecco's Media (IMDM) kultiviert. Zellen, die für den klinischen Einsatz verwendet werden, müssen in endotoxin- und möglichst Antibiotika-freien Medien kultiviert werden, um allergische Reaktionen zu vermeiden [38]. Die Anwendung von tierischen Seren ist auch für den klinischen Einsatz der kultivierten Zellen ungeeignet, da nichthumane Proteine immunogen und mit dem Risiko einer Übertragung tierpathogener Viren oder Prionen verbunden sind [39]. Für den klinischen Einsatz kultivierter Zellen können spezifische serum-freie Kulturmedien verwendet werden, die kommerziell für bestimmte Zelltypen (wie LAK-Zellen (Lymphokin activated Killer cells), TILs (tumour infiltrating t-cells) oder CD34+ Zellen) hergestellt werden [38,40].

Für die Unterstützung des Wachstums und/oder der Aktivität der biologischen Funktionen der kultivierten Zellen werden normalerweise Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren [wie z.B. G-CSF (granulocyte – colony stimulating factor), GM-CSF, IL3 und SCF für hämatopoetische Vorläuferzellen, IL2 für LAK-Zellen und TILs, IL4, TNF- α , Flt3-L und GM-CSF für DC] zu den Kulturmedien zugegeben. Für den klinischen Einsatz kommen nur nach GCP (Good Clinical Praxis) hergestellte, rekombinante humane Wachstumsfaktoren in Frage [38].

I-1.7.2- Interleukin-2 (IL2)

Historisch wurde IL2 als T-Zellen-Wachstumsfaktor bezeichnet und für die in-vitro Kultivierung von T-Zellen verwendet [38]. IL2 fördert die klonale Expansion und Differenzierung von reifen T-Zellen. Es wird hauptsächlich von TH1 produziert. Seine Targetzellen sind TH1, TH2, CTLs, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten [38].

IL2 induziert eine vorübergehende Immunantwort, da nach der klonalen Expansion ein AICD (activation-induced cell death) folgt. Inzwischen wird IL2 bei der Immuntherapie der Tumoren (z.B. Karzinome, Leukämien und Melanome) eingesetzt. Dadurch kann eine antitumorspezifische zytotoxische T-Zellantwort bzw. eine tumorzytotoxische Reaktion von NK-Zellen, Monozyten / Makrophagen induziert werden [38].

I-1.7.3- Interleukin-7 (IL7)

IL7 wird von Stromazellen produziert und übt eine essentielle physiologische Funktion im Rahmen der Lymphopoese und bei der Homöostase dieser Zellen im peripheren Gewebe aus. IL7 wirkt gemeinsam mit anderen Signalen als Differenzierungsfaktor in der Ausreifung von CD4+/CD8+Thymozyten zu reifen CD4+ -bzw. CD8+ T-Zellen. Während der späteren Stadien der initialen T-Zellreifung fungiert dieses Zytokin als Proliferationsfaktor [41].

Ausgehend davon, dass rund die Hälfte der T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen IL7-Rezeptoren exprimieren [38], könnte man von einer Rolle des IL7 bei der Stimulierung der ausreifenden T-Zellen zu T-Effektorzellen sprechen. IL7 kann auch eine in-vitro Proliferation der humanen T- und B-Zellen induzieren [38].

Darüber hinaus kann IL7 den programmierten Zelltod von reifen T-Zellen durch die Hochregulation der antiapoptotischen Moleküle inhibieren. Dies ist vor allem von Bedeutung,

um während der Kontraktionsphase einer erfolgreich abgelaufenen Immunantwort einige der spezifisch aktivierten T-Zellen vor Apoptose zu schützen und sie dem Pool an T-Gedächtniszellen zuzuführen. Dadurch fördert IL7 das Überleben und die homöostatische Expansion von naiven T-Zellen und T-memory-cells. Auf diese Weise kann eine langlebige und funktionell intakte Population von Gedächtniszellen geschaffen und erhalten werden [41].

I-1.7.4- Mercaptoethanol

Mercaptoethanol wird für das Wachstum und das Überleben von Maus-Lymphozyten in-vitro verwendet [42]. Es fördert die zelluläre Aufnahme von Cystin aus dem Medium und die zelluläre Freisetzung von Thiolen (SH-Gruppen) ins Medium, die eine antioxidative Funktion der Lymphozyten gewährleisten [42].

I-2- Das HLA-System

Der humane Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC), dessen Genprodukte auch als humanes Leukozytenantigen (HLA) bezeichnet werden, ist am kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert [12]. Diese DNA-Region läßt sich in verschiedene Genorte unterteilen: Die HLA-Klasse-I-Genorte (HLA-A, -B, -C) kodieren für HLA-Klasse-I-Antigene bzw. Merkmale, die mit quantitativen Unterschieden an allen kernhaltigen Zellen des Organismus vorhanden sind. An Retikulozyten und auch an reifen Erythrozyten sind einige HLA-Klasse-I-Merkmale feststellbar. Die HLA-Klasse-II-Genorte (HLA-DR, -DQ, -DP) kodieren für HLA-Klasse-II-Merkmale, die im Gegensatz zu HLA-Klasse-I-Merkmale nicht an allen Zellen des Organismus nachweisbar sind. Sie sind an antigenpräsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen) sowie an einigen Endothel- und Epithelzellen zu finden. Die HLA-Klasse-III-Genorte kodieren für Komplementproteine, TNF- α u.a. [12].

Die Bestimmung der Typen des HLA-Systems besitzt eine große klinische Bedeutung für die Spenderauswahl bei Organ- und Stammzelltransplantation, bei Thrombozytentransfusionen sowie für die Diagnostik einiger Krankheiten [1].

I-3- Grundlagen der verwendeten Methoden zur Evaluation der Kulturbedingungen und der Zytotoxizität der T-Zellen

I-3.1- Durchflusszytometrie

I-3.1.1- Definition

Die Durchflusszytometrie ist eine optische Methode zur Analyse der Fluoreszenz- und Streulicht-Eigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Dabei werden Antigene oder andere Komponenten auf der Oberfläche oder innerhalb der Zelle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Diese Analysetechnik zeichnet sich durch eine hohe Messgenauigkeit aus und lässt eine gute Aussagekraft über zelluläre Vorgänge zu. Sie erlaubt als Meßmethode durch die Messung mehrerer Parameter wie Größe und Granularität sowie bestimmter Anfärbetechniken von Zellbestandteilen eine Eingrenzung der gesuchten Zellpopulation und deren quantitativer Erfassung [43].

I-3.1.2- Prinzip

Das Prinzip der Untersuchung mittels eines Durchflusszytometers beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, die vom Durchflusszytometer gemessen werden können.

Dazu werden Zellen, die sich in einer Suspension befinden, durch ein Ansaugsystem in eine Kapillare geleitet, wo sie vom fokussierten Lichtstrahl (Argonlaser) einer Lichtquelle beleuchtet werden. Es wird gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen den Meßpunkt an einer definierten Stelle passieren. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie in Abhängigkeit von ihren physikalischen Eigenschaften das Licht (die Fluoreszenzsignale) mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut: Die Lichtstreuung ist im Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Lichtstrahls am größten (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter (FSC)), welches eine indirekte Bestimmung für die Zellgröße erlaubt. Ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (im 90° Winkel des einfallenden Lichtstrahls) (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter (SSC)), welches eine indirekte Bestimmung für die Granularität, Membranfaltung und äußere Form erlaubt [43].

Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlen verstanden. Fluoreszierende Fluorochrome, absorbieren Lichtenergie über einen weiten für sie jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich. Häufig verwendete Fluorochrome sind grün fluoreszierende Fluoreszein isothiocyanat (FITC) und das orange-rot

fluoreszierende Phycoerythrin (PE). Die Farbstoffe werden entsprechend ihrer Emissionswellenlänge in bestimmten Fluoreszenzkanälen gemessen [43].

Für jede einzelne Zelle werden also am Durchflusszytometer folgende Parameter gemessen:

1- Die Streulichtemissionen:

- Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC).
- Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC).

2- Die Fluoreszenz:

- Fluoreszenz 1 (FL1) (FITC-Fluoreszenz).
- Fluoreszenz 2 (FL2) (PE-Fluoreszenz).

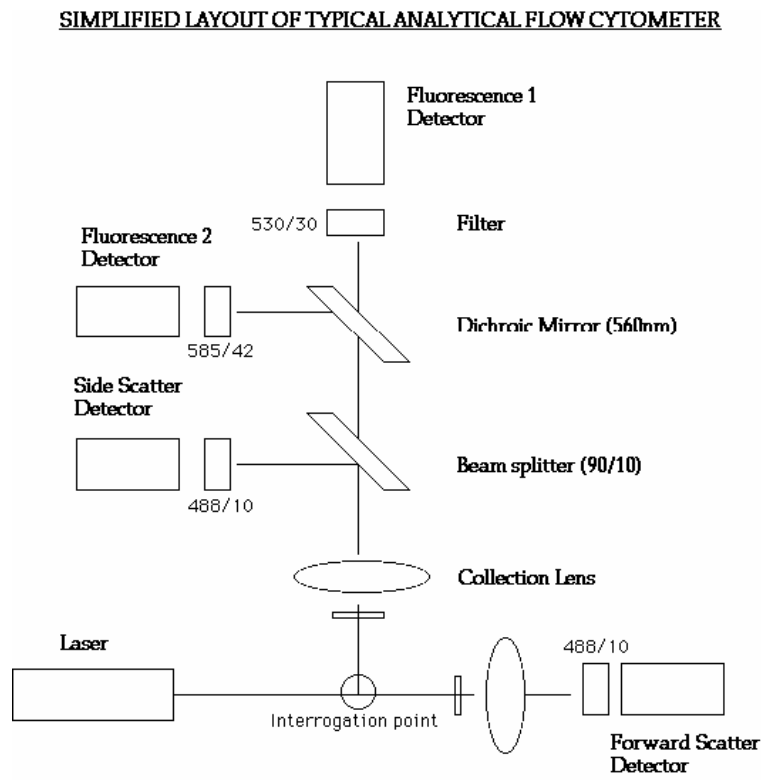


Abbildung 4 Prinzip der Durchflusszytometrie [44].

I-3.1.3- Einstellung und Auswertung

Die Voraussetzung für die korrekte Identifizierung relevanter Zellpopulationen ist eine exakte Einstellung des Gerätes anhand einer ungefärbten Negativkontrolle vor der eigentlichen Messung. Hierbei erfolgt zunächst eine Anpassung der physikalischen Parameter SSC und FSC sowie ein Nullabgleich der Fluoreszenzkanäle zum Ausschluß von unspezifischer Fluoreszenz (z.B. Autofluoreszenz der Zelle). Die Proben werden in einem Koordinatensystem nach ein oder

zwei Parametern gegeneinander aufgetragen. Daraus ergibt sich bei nur einem Parameter ein Histogrammplot, in welchem die Häufigkeitsverteilung im jeweiligen Fluoreszenzkanal abgebildet wird. Bei zwei gegeneinander aufgetragenen Parametern ergibt sich ein sogenannter Dot Plot, in welchem jede Zelle durch einen Punkt repräsentiert wird [43].

Die Auswertung der erfassten Daten erfolgt per Computer mit einem entsprechenden Programm (Cell Quest™ Pro). Dazu wird zunächst die Verteilung der Zellen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften in einem FSC-SSC-Koordinatensystem dargestellt (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) (Abbildung 5). In diesem sogenannten Dot Plot repräsentiert jeder Punkt ein Fluoreszenzereignis. Das Festlegen eines Analysenfensters (Gate) mit der bestimmten Zielpopulation im FSC-SSC-Koordinatensystem wird als (Gating) bezeichnet und erlaubt die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzen in einem weiteren Diagramm (Abbildung 6). Die Lage dieses Analysenfensters wird manuell vom Auswerter bestimmt. Bei der Datenerfassung der Fluoreszenzen in einem weiteren Dot Plot wird Fluoreszenz 1 (FL1: FITC) gegen Fluoreszenz 2 (FL2: PE) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wird in dieses Diagramm durch das Computerprogramm ein Quadrant gesetzt, das es erlaubt, Zellen als doppelt positiv, einfach positiv oder doppelt negativ zu definieren (Abbildung 6). Der prozentuale Anteil der in einem Großquadrant befindlichen Zellen wird automatisch von der Software berechnet [43].

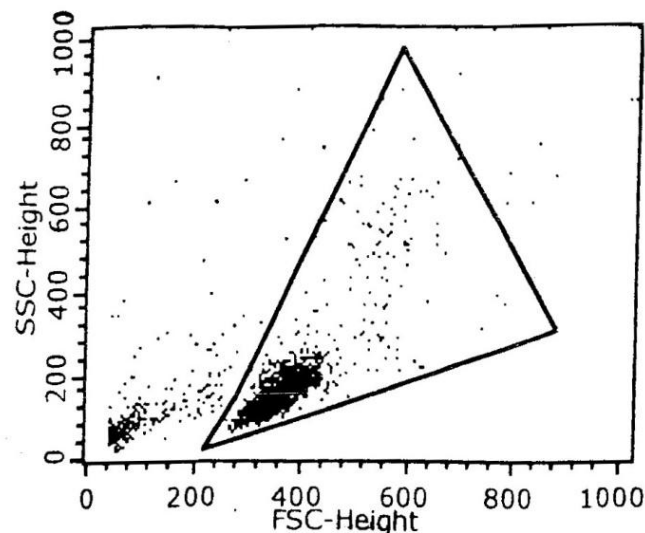


Abbildung 5 Darstellung der Zellen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften in einem FSC-SSC-Koordinatensystem mit dem Festlegen eines Analysenfensters (Gate).

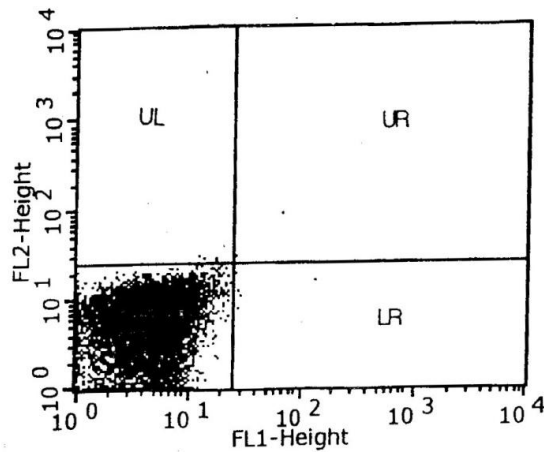


Abbildung 6 Darstellung der im Analysenfenster (Gate) festgelegten Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzen FL1, FL2 und der Quadrant-Statistik bei der Auswertung der mit dem Durchflusszytometer erfassten Daten.

UL (Upper Left): einfach positive Zellen für FL2. **LL (Lower Left):** doppelt negative Zellen; negativ für FL1 und FL2.

LR (Lower Right): einfach positive Zellen für FL1. **UR (Upper Right):** doppelt positive Zellen; positiv für FL1 und FL2.

I-3.2- Apoptose

Apoptose ist der physiologische Zelltod, der der Beseitigung der Zellen, die alt, mutiert, verletzt, virusinfiziert oder schädlich für den Organismus sind, dient [45]. Apoptose kann über verschiedene Wege eingeleitet werden, die im Prinzip in der Aktivierung der Caspase-Signalwege münden und zu den typischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle (Schrumpfung des Zytoplasmas bzw. Schrumpfung und Fragmentierung des Zellkerns) führen [46].

Dieser programmierte Zelltod führt zum Auftreten verschiedener Merkmale: zuerst verliert die Zellmembran ihre PS-Asymmetrie (PS, Phosphatidylserin), wodurch Phosphatidylserinreste nicht nur auf der inneren, sondern auch auf der äußeren Zellmembran exprimiert werden (Abbildung 7). Diese biochemische Veränderung der Zellmembran ist generell Caspase-abhängig [47,48]. Diese Zellmembranänderungen gelten als Merkmal des frühen Stadiums der Apoptose. Dadurch können sich Proteine wie Annexin V, das die Eigenschaft hat, sich an Phospholipiden zu binden, an die Oberfläche der Zelle binden (an das Phosphatidylserin). Das Annexin V wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Annexin-FITC) (FITC, Fluorescein isothiocyanat). Dadurch kann es zum Nachweis der Frühapoptose am Durchflusszytometer verwendet werden [46,49]. Im späteren Stadium der Apoptose kommt es zu anderen Zellveränderungen wie Schrumpfung des Zellkerns und Fragmentierung der DNA und schließlich zur Auflösung der gesamten Zelle. Caspasen wandern in den Zellkern ein, wo sie

beginnen, DNA-Regulationsproteine abzubauen, so dass das Chromatin fragmentiert wird. Dabei wird auch die DNA zerstört. Diese DNA-Fragmentierung gilt als Merkmal des späten Stadiums der Apoptose [50]. Propidiumiodid (PI) ist ein Vitalfarbstoff, der sich an die freien DNA-Strukturen anlagern kann. Dadurch kann es zum Nachweis der Spätapoptose mit Übergang zur Nekrose am Durchflusszytometer verwendet werden [46].

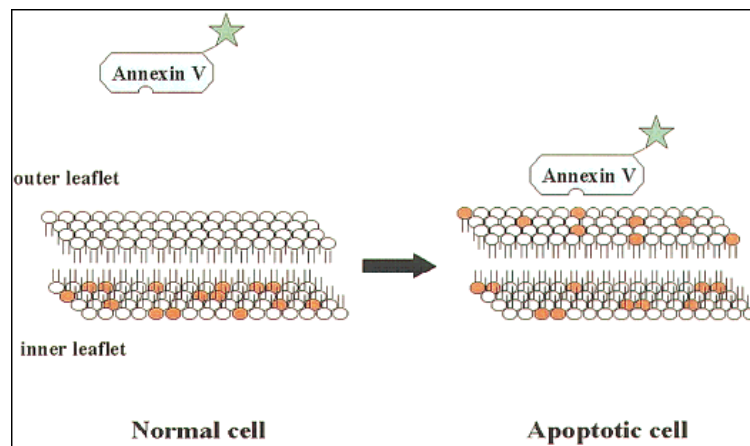


Abbildung 7 Verlust der PS Asymmetrie während der frühen Phase der Apoptose [46].

Während sich doppelt positive Zellen (Annexin-FITC und PI-positiv) in der späten Phase der Apoptose befinden, sind die Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, nur Annexin-FITC positiv, da die Zellen in diesem Stadium der Apoptose über eine funktionell intakte Zytoplasmamembran verfügen, wodurch PI nicht ins Zellinnere hineingelassen wird. Nekrotische Zellen sind nur PI-positiv. Lebende intakte Zellen sind doppelt negativ (Annexin-FITC und PI-negativ) [49] (Abbildung 8).

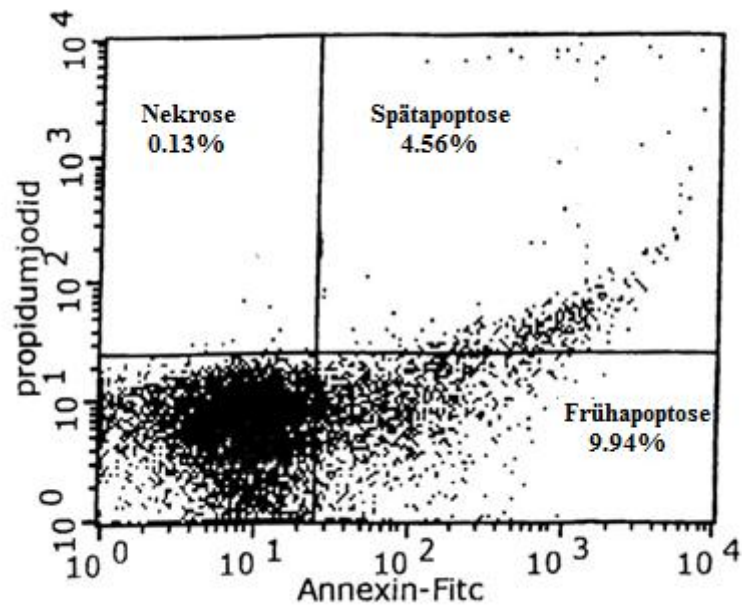


Abbildung 8 Darstellung der Fröhapoptose, Spätapoptose und Nekrose am Durchflusszytometer.

UL (Upper Left): einfach positive Zellen für PI. **LL (Lower Left):** doppelt negative Zellen; negativ für Annexin- FITC und PI.

LR (Lower Right): einfach positive Zellen für Annexin- FITC. **UR (Upper Right):** doppelt positive Zellen; positiv für Annexin- FITC und PI.

I-3.3- Das Prinzip der Messung der zytotoxischen Aktivität der CTLs mittels LDH-Release Assay (LDH-Freisetzungstest)

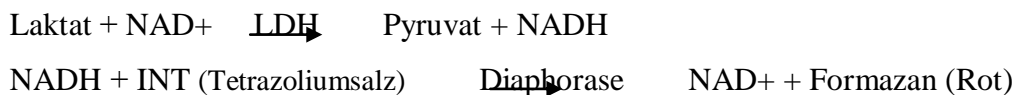
Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt und bestimmte Vorgänge im Stoffwechsel der Zellen ermöglicht. Sie ist für die Umwandlung von Laktat in Pyruvat bzw. von Pyruvat wieder in Laktat verantwortlich und reflektiert einen zentralen Schritt im Energiestoffwechsel der Zellen, der bei der Verbrennung von Zucker wichtig ist [51, 52].

Es gibt fünf Isoenzyme der LDH im menschlichen Körper: LDH-1, LDH-2 in Herz, Erythrozyten und Niere, LDH-3 in der Lunge und im Lymphsystem und LDH-4, LDH-5 in der Leber und im Skelettmuskel [51, 52]. Eine Erhöhung der Aktivität der LDH im Blut bedeutet, dass über das normale Maß Zellen zugrunde gegangen sind. Man kann dann anhand der Bestimmung der LDH-Isoenzyme erwägen, welches Organ als Herkunft der LDH-Erhöhung in Betracht kommen könnte. Eine Erhöhung von LDH-1 kann z.B. auf einen Herzinfarkt hinweisen, dagegen würde eine Erhöhung der LDH-5 anzeigen, dass ein Leberschaden vorliegt. Weil die LDH auch in Erythrozyten anzutreffen ist, ist der Anstieg der Serumaktivität dieses Enzyms neben anderen Parametern wie Bilirubin oder Retikulozyten ein wichtiger Indikator für hämolytische Anämien [51, 52].

Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym, für das eine intakte Zellmembran nicht durchlässig ist, aber eine geschädigte Zellmembran lässt es in die extrazelluläre Flüssigkeit durch [53]. Demfolge kann man durch die Bestimmung der extrazellulären Freisetzung von LDH die Integrität der Zellmembran bzw. die zelluläre Lyse genau messen. Für diesen Zweck wird der LDH-Freisetzungstest (LDH-Release Assay) verwendet. Dieser Zytotoxizitätstest basiert auf einer Freisetzung von LDH aus dem Zytoplasma von Target-Zellen (wie z.B. Tumorzellen), die durch Effektorzellen (CTLs) lysiert werden, zum Nachweis der Zell-Lyse und zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen [53].

In-vitro lässt sich nach der zellulären Lyse die freigesetzte LDH im Zellüberstand nachweisen. Es wurde dazu das Kit Cyto Tox 96® der Firma Promega (Madison, USA) verwendet.

Die generellen chemischen Reaktionen von diesem Assay sind Folgende:



In der ersten Reaktion wird Laktat durch die Laktatdehydrogenase zum Pyruvat oxidiert, NAD^+ wird dabei zu NADH reduziert. In der zweiten Reaktion wird das Tetrazoliumsalz „INT“ durch das Enzym Diaphorase zu einem Formazansalz reduziert. Dabei tritt einen Farbumschlag von Gelb nach Rot auf. Die Farbintensität kann dann mittels Mikroplatten-Photometer bei 490 nm gemessen werden. Die Menge vom vorhandenen LDH korreliert mit der gemessenen Farbintensität. Je höher die gemessenen Werte der Farbintensität bzw. der LDH-Konzentrationen sind, desto stärker ist die Zell-Lyse der Target-Zellen bzw. die Zytotoxizität der Effektorzellen [53].

II- Zielstellung der Arbeit

Zu den neuen Strategien der Immuntherapie bei akuten Leukämien zählt die Generation dendritischer Zellen (DC) aus leukämischen Blasten und die Stimulation zur Bildung einer spezifischen Immunantwort [54]. Es werden Tumorantigene, die sich in den ausgereiften DC weiterhin nachweisen lassen, als Fremdeiweiß von den DC präsentiert. Dadurch können andere Zellen des Immunsystems (zytotoxische T-Zellen, CTLs) gegen die ursprünglichen Leukämiezellen sensibilisiert werden. Eine zusätzliche Beladung von DC mit Tumormaterial ist nicht notwendig, da DC Leukämie-assoziierte Antigene (wie z.B. TEL-AML1)¹ exprimieren.

Für das Monitoring der Effizienz dieser neuen Strategie der Immuntherapie wird die lytische Aktivität der T-Zellen erfasst [1]. Für die Bestimmung dieser Aktivität gilt das Chromium-Release Assay als Standardmethode [60,61,62,63,64,65]. Bei diesem Test werden die Target-Zellen mit Cr-51 markiert und mit CTLs inkubiert. Als Folge werden die Target-Zellen lysiert und die Gammastrahlung durch die Freisetzung von Cr-51 gemessen.

Ein zweiter schneller und kostengünstiger Test ist das LDH-Release Assay (Laktatdehydrogenase-Release Assay) [62,64]. Dieser Test basiert auf der Freisetzung von LDH aus dem Zytoplasma von Target-Zellen, die durch CTLs lysiert werden. Je höher die Konzentration der freigesetzten LDH ist, desto stärker ist die Zell-Lyse der Target-Zellen bzw. die Zytotoxizität der Effektorzellen (CTLs). Das LDH-Release Assay ist genauer als das Chromium-Release Assay, da die Markierung der Target-Zellen mit Cr-51 zu Veränderungen oder Schaden dieser Zellen führen kann. Darüber hinaus ist die spontane Freisetzung von LDH weniger als die von Cr-51 [64,65]. Außerdem ist das LDH-Release Assay einfacher in der Handhabung als das Chromium-Release Assay, da das Chromium-Release Assay nur in Isotopenlaboren unter Einhaltung strenger Sicherheitsmaßnahmen und Schulung der Mitarbeiter durchgeführt werden darf [62,63,65]. Ein Nachteil des LDH-Release Assays ist aber die LDH-Freisetzung sowohl von den Target-Zellen als auch von den CTLs. Somit ist die Spezifität der gemessenen Zytotoxizität nicht gesichert. Bei einer hohen Spontanlyse (LDH-Ausschüttung der CTLs) bleiben die Ergebnisse fraglich. Eine hohe Spontanlyse der T-Zellen könnte durch die Verbesserung der Kulturbedingungen dieser Zellen vermieden werden. Aus diesem Grunde sollten die

¹ Die Translokation t(12; 21) zählt zu den häufigsten (20-30%) und wichtigsten genetischen Veränderungen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kindesalter [54]. Als Folge dieser Translokation entsteht das TEL-AML1-Fusionsprotein [55], das die hämatopoetische Differenzierung blockiert [56,57]. TEL-AML1-Fusionsprotein kann als spezifisches Targetantigen für die ALL fungieren [58,59].

Kulturbedingungen von T-Zellen optimiert werden, um die Aussagekraft dieses Testes zu verbessern. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Kulturbedingungen (Interleukin-2 (IL2), Interleukin-7 (IL7), Roswell Park Memorial Institut-Medium (RPMI), Iscove's modified Dulbecco's Media (IMDM), fetales bovines Serum (FBS), Human Serum (HS) und β -Mercaptoethanol (Merc)) verglichen und unterschiedliche Parameter (Vitalität, Zellzahl, Früh- und Spätapoptoseraten und absolute Zellzahl der früh- und spätapoptotischen T-Zellen) bestimmt. Die zytotoxische Aktivität der unter den besten Bedingungen kultivierten T-Zellen wurde dann mittels LDH-Release-Test untersucht.

III- Material und Methoden

III-1- Material

III-1.1- Geräte und Software

Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, San Jose, CA
Gamma-Counter	STS Braunschweig Germany
Inkubator	Heraus Instruments, Berlin
Lichtmikroskopie	Hund Wetzlard /Walover S / Victor Rocker Berlin Germany
Lichtmikroskopie	Wild M20 Switzerland
Elisa-Reader für Mikrotiterplatten	MR 5000, Dynatech Laboratories, Denkendorf, Germany
Sicherheitswerkbank	Heraus Instruments, Berlin
Software FACS Analysen	Becton Dickinson, San Jose, CA
Vortexer	VORTEX-GENIE2 / Scientific Industries BOHEMIA-USA
Wasserbad	Julabo 6A Seelbach Germany
Zentrifuge	Heraus / Thermo Scientific / Megafuge 1.0 Germany
Zentrifuge	Heraus /Thermo Scientific / Varifuge 3.OR Germany

III-1.2- Chemikalien

Annexin V Assay	BD Bioscience Pharmingen, San Diego
- Annexin V Binding Puffer (10x)	
- Annexin V – FITC	
- Propidium Iodide staining solution	
- Purified Recombinant Annexin V	
β -Mercaptoethanol (Merc)	Sigma – Aldrich, Steinheim
DMSO 33%ig (Dimethylsulfoxid)	Apotheke Charitè Campus Virchow-Klinikum, Berlin, D
Fetal Bovin Serum (FBS)	HyClone, Utah
Flt3-Ligand	Pepto Tech, St. Katharinen, Germany
GM – CSF	Pepto Tech, St. Katharinen, Germany
Humanalbumin	Baxter Heidelberg Germany
Human Serum	Institut für Transfusionsmedizin-Charite-Berlin
IL 2	PeptoTech, St. Katharinen, Germany
IL 3	PeptoTech, St. Katharinen, Germany
IL 4	PeptoTech, St. Katharinen, Germany

IL 7	PeptoTech, St. Katharinen, Germany
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kit CytoTox 96® LDH-Release Assay	Promega (Madison, USA, WI)
L – Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (1M)	Charite, Campus Virchow – klinikum, Apotheke
Penicillin-Streptomycin Lösung	Biochrom AG, Berlin
SCF	Pepto Tech, St. Katharinen, Germany
TNF- α	Pepto Tech, St. Katharinen, Germany
Trichostatin A (64 nM)	Sigma Aldrich, Dreieich, Germany
0, 5 % Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Valproinsäure	Sigma Aldrich, Dreieich, Germany

III-1.3- Verbrauchsmaterialien

Butterfly	Multyfly® Set Sarstedt Nümbrecht Germany
Deckgläser	Menzel-Glaser 22x22
Desinfektionsmittel	B/Braun Melsungen Germany
FACS Röhren (5 ml Rundboden Röhren)	BD Falcon™ USA
Falconröhren (15 ml, 50 ml)	BD Falcon™ USA
Falcon Einmalpipetten(5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon® USA
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm®Ulm Germany
Kryoröhren Cryo Tube (1ml)	Nunc A/S, Roskilde, DK
Mikropipetten (10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer – Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Pipettierhilfe	Easypet Eppendorf, Hamburg
20 ml Spritzen	BD Discardit™ II /Spain
50 ml Spritzen	B/Braun Melsungen Germany
Spritzennadel Kanula 20G 1½	BD Microlance™ 3 Spain
0,2 μ m syringe filter (steril) (Disposable Filter)	Sartorius AG, Göttingen
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt Nümbrecht Germany
6-well Platten, Flachboden mit Deckele	Becton Dickinson Falcon® USA
24-well Platten, Flachboden mit Deckel	Becton Dickinson Falcon® USA

96-well Platten, Rundboden mit Deckel	Sarstedt USA
96-well Platten, Flachboden mit Deckel	Sarstedt USA
Handzähler	UPGREEN Counters Taiwan
Zellkulturflaschen (50 ml, 250ml)	Falkon® / Becton Dickinson Labware England

III-1.4- Lösungen

Bicoll – Trennlösung	BioChrom AG, Berlin, Germany
FACS Flow (Elektrolytlösung)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
IMDM	Gibco Invitrogen, Grand Island (NJ)
RPMI 1640 Medium (1x) mit Phenolrot	Biochrom AG Berlin Germany
RPMI 1640 Medium (1x) ohne Phenolrot	Biochrom AG Berlin Germany
StemSpan 3000	Stem cell Technologies, Vancouver, BC

III-1.5- Verwendete Medien, Stammlösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen, Nährmedien und Puffer wurden wie folgt angesetzt:

III-1.5.1- 1x Phosphate buffered solution (PBS)

Stammlösung: 20x Phosphate buffered solution (PBS):

80g Natriumchlorid

2g Kaliumchlorid

2g di-kaliumdihydrogenphosphat

14,4g di-Natriumhydrogenphosphat

auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

Um 1x PBS herzustellen, wurde die Stammlösung mit destilliertem Wasser 1:20 verdünnt

III-1.5.2- Annexin Puffer-Lösung zur Apoptosemessung

Annexin-V Binding Puffer wurde mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt und auf Eis inkubiert.

III-1.5.3- Substrate-Lösung zum LDH-Release-Ansatz

12 ml Puffer wurden kurz vor Gebrauch in die Substratflasche zugegeben und nach dem Gebrauch wurde die übrige Menge bei -20°C gelagert.

III-1.5.4- Trypanblau-Lösung zur Vitalität- und Zellzahlbestimmung

0,5%-ig Trypanbau-Lösung wurde mit 1x PBS 1:10 verdünnt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

III-1.5.5- Basis-Nährmedien für T-Zellen und für den Zell-Mix (DC+T-Zellen)¹

III-1.5.5-1- auf phenolrotfreies RPMI basierende Medien (RPMI, Roswell Park Memorial Institut-Medium):

a- RPMI 10% FBS (FBS, fetales bovine serum):

40 ml RPMI, 4 ml FBS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

b- RPMI 5% HS (HS, Human Serum):

40 ml RPMI, 2 ml HS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

c- RPMI 5% HS + Merc (Mercaptoethanol):

40 ml RPMI, 2 ml HS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin, 0,038 µl/ml Merc (1,43 M).

III-1.5.5-2- auf phenolrotfreies IMDM basierende Medien (IMDM, Iscove's modified Dulbecco's Media):

a- IMDM 10% FBS:

40 ml IMDM, 4 ml FBS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

b- IMDM 5% HS:

40 ml IMDM, 2 ml HS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

c- IMDM 5% HS + Merc:

40 ml IMDM, 2 ml HS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin, 0,038 µl/ml Merc (1,43 M).

III-1.5.6- Nährmedium für REH-Zellen

RPMI 10% FBS (mit Phenolrot):

40 ml RPMI, 4 ml FBS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

¹ Alle Nährmedien wurden sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

III-1.5.7- Nährmedium für Patientenblasten

StemSpan 5% HS:¹

40 ml StemSpan, 2 ml HS, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

III-1.5.8- Basis-Nährmedien für DC

1- RPMI 10% FBS (mit Phenolrot): s.o.

2- Stemspan 5% HS: s.o.

III-1.5.9- Medium zum LDH-Release-Ansatz

RPMI 5% HA (ohne Phenolrot) (HA, Human Albumin):

40 ml RPMI, 2 ml HA, 10 µl/ml L-Glutamin (2 mM), 1 µl/ml Penicillin/Streptomycin.

III-1.6-Verwendete Zellen

- Als Studienmaterial dienten in der vorliegenden Arbeit folgende Zellen:

III-1.6.1- TEL-AML1-positive ALL-Blasten

Hierzu wurden REH-Zellen² verwendet. Diese Zellen wurden von American Tissue Culture Collection (Manassas, VA) gekauft.

III-1.6.2- TEL-AML1-negative ALL-Blasten

Diese wurden aus dem peripheren Blut oder aus dem Knochenmark ALL-Patienten in der Kinder Klinik / Virchow Klinikum / Charite-Berlin gewonnen.

III-1.6.3- T-Lymphozyten

Diese wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert oder autolog aus den Patientenblasten in-vitro generiert.

¹ StemSpan ist ein serum-freies Medium für die Kultivierung und Expansion der hämatopoetischen und der leukämischen Zellen und für die ex-vivo Generierung und Kultivierung von DC [66,67].

² REH-Zellen sind humane t(12; 21) [TEL/AML1]-positive ALL-Zell-Linie (Pre B-cell ALL) [54].

III-1.6.4- Dendritische Zellen (DC)

Diese wurden ex-vivo mit Anwendung verschiedener Wachstumsfaktoren und Nährmedien sowohl aus REH-Zellen als auch aus den Patientenblasten differenziert (s. Kapitel III-2.5.3.2).

III-2-Methoden

III-2.1- Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Suspension gebracht. 10µl von der Zellsuspension wurden entnommen und mit 10µl einer Trypanblaulösung vermischt. 10µl dieses Gemisches wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Dadurch stellen sich die lebenden Zellen als Schießscheibenähnliche Ringe mit heller Mitte (farblos) dar, wohingegen sich die toten Zellen ganz mit dem Trypanblau anfärben. Alle lebenden und toten Zellen wurden in zwei der vier großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer mäanderförmig ausgezählt. Die Zellzahl der Zellsuspension und die Vitalität wurden dann folgendermaßen berechnet:

Formel 1 Zellzahl/ml = ausgezählte Zellzahl aus 2 großen Quadraten x Verdünnungsfaktor x 10E4

Formel 2 Gesamtzellzahl = (Zahl der lebenden Zellen + Zahl der toten Zellen) / ml x Volumen

Formel 3 Vitalität = (Zahl der lebenden Zellen / Gesamtzellzahl) x100

III-2.2- Isolierung von T-Zellen

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut gesunder Spender mittels Dichtgradientenzentrifugation isoliert. 50-100 ml venöses Blut wurden in eine heparinisierte 50 ml-Spritze abgenommen. Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:1 mit 1x PBS verdünnt. In sterile 50 ml-Falkon-Röhrchen wurden jeweils 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Auf die Ficoll-Lösung wurden vorsichtig jeweils 20 ml der Mischung aus Blut und 1x PBS geschichtet, so dass sich zwei Phasen bildeten. Die befüllten Falkon-Röhrchen wurden bei 1800 U/min für 35 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer größeren Dichte sedimentieren die Erythrozyten am Boden des Röhrchens als Pellet, während sich die MNCs (mononuclear cells) in der Grenzzone zwischen Plasma und Ficoll als weißlicher bis roter Ring (buffy coat) sammeln (Abbildung 9). Die Schicht mononukleärer Zellen wurde herauspipettiert, in ein 50 ml-Falkon-Röhrchen überführt, mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt, und bei 2200 U/min

für 7 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das gewonnene Pellet wurde zur Abtrennung anhaftenden Ficolls mit 20-30 ml 1x PBS gewaschen und bei 2200 U/min für 7 Minuten mit Bremse zentrifugiert und dann nochmal mit 15 ml 1x PBS gewaschen und bei 1000 U/min für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (Thrombozytenwaschschritt). Das Zellpellet wurde dann in 20 ml RPMI-Nährmedium resuspendiert und in einer 5%-igen CO₂ Atmosphäre bei 37°C in Kultur für zwei Stunden gebracht. Nicht adhärente Zellen wurden anschließend in ein 50 ml-Falkon-Röhrchen herauspipettiert und bei 2200 U/min für 7 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Dann wurden sie mit 20 ml PBS gewaschen und für 7 Minuten bei 2200 U/min mit Bremse zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS resuspendiert und die Zellzahl und die Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

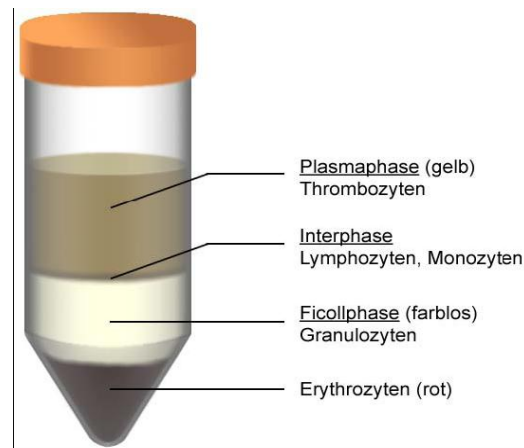


Abbildung 9 MNCs Isolierung mittels Dichtgradientenzentrifugation [67].

III-2.3- Kultivierung von T-Zellen zur Apoptosemessung

Die aus peripherem Blut isolierten T-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/Well (3×10^6 Zellen/2ml Medium) unter einer sterilen Werkbank in 6-Well-Platten angesetzt und für 8 Tage im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert.

An den Tagen 2 und 7 wurden die kultivierten T-Zellen mit 500 µl Medium + Glutamin + ILs gefüttert. An den Tagen 3 und 5 wurden T-Zellen mit 1 ml Medium + Glutamin + ILs gefüttert (nach dem Abernten der Hälfte der Zellen zur Apoptosemessung s. Kapitel III-2.4).

III-2.4- Apoptosemessung von T-Zellen

Die Apoptosemessung der isolierten T-Zellen erfolgte mittels Annexin-V Färbung wie folgt:

- Am Tag 0 wurde die Apoptose der isolierten T-Zellen gleich vor der Kultivierung gemessen.

- An den Tagen 3 und 5 wurde die Hälfte der kultivierten T-Zellen abgeerntet und die Apoptose gemessen.
- Am Tag 8 wurden alle übrigen T-Zellen abgeerntet und die Apoptose wurde gemessen.

Annexin-Puffer und Annexin wurden im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und in Eis vorgekühlt. T-Zellen wurden aus den Kultur-Wells in entsprechend nummerierte FACS-Röhrchen abgeerntet und bei 1500 U/min für 7 Minuten mit Bremse abzentrifugiert und dann zwei mal mit 1 ml PBS gewaschen und bei 1500 U/min für 7 Minuten mit Bremse abzentrifugiert, danach wurden die Zellen in 1 ml vom vorgekühlten Annexin-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellzahl und die Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und Zellkonzentrationen von je 1×10^6 Zellen/ml in entsprechend nummerierte FACS-Röhrchen hergestellt (Suspensionsmaterial war Annexin-Puffer). Um die Zellmix-Kontrolle zur FACS-Einstellung herzustellen, wurden aus jedem FACS-Röhrchen 100 μ l Zellsuspension herauspipettiert und in einem FACS-Röhrchen zusammengemischt. Davon wurden 100 μ l in ein FACS-Röhrchen für die Annexin-Blockade-Kontrolle abgefüllt. Von jeder Zellsuspension wurden andere 100 μ l für den Versuchsansatz in entsprechend nummerierte FACS-Röhrchen gegeben und dann zusammen mit der Zellmix-Kontrolle auf Eis inkubiert. 10 μ l vom vorgekühlten Annexin (-80°C) wurden zur Annexin-Blockade-Kontrolle zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 2,5 μ l Annexin-FITC zur Annexin-Blockade-Kontrolle und zu den auf Eis inkubierten Zellsuspensionen (bis auf die Zellmix-Kontrolle) im Dunkeln zugegeben und alle Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Annexin-Puffer und 2,5 μ l Propidium Iodid zu allen Zellsuspensionen (bis auf die Zellmix-Kontrolle und die Annexin-Blockade-Kontrolle) im Dunkeln zugegeben, auf Eis inkubiert und die Apoptose wurde unmittelbar am Durchflusszytometer gemessen. Die Analyse und Auswertung der gewonnenen Daten wurden mit einem entsprechenden Computerprogramm (CellQuest™ Pro) vorgenommen.

III-2.5- LDH-Freisetzungstest (Zytotoxizität-Assay)

Dieser Zytotoxizitätstest basiert auf einer Freisetzung von LDH aus dem Zytoplasma der durch die Effektorzellen lysierten Target-Zellen (Tumorzellen) zum Nachweis der Zell-Lyse. Die freigesetzte LDH wird photometrisch im Überstand gemessen. Als Target-Zellen wurden TEL-

AML1 negative ALL-Patientenblasten und REH-Zellen eingesetzt. Als Effektorzellen wurden mittels DC vorstimulierte CTLs (zytotoxische T-Zellen) eingesetzt.

Die Vorbereitung für LDH-Freisetzungsmessung erfolgte folgendermaßen:

III-2.5.1- Präparation von Patientenblasten

III-2.5.1.1- Präparation von Patientenblasten aus peripherem Blut

Die aus dem peripheren Blut gewonnenen Blasten wurden über Ficoll isoliert und in Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei 1500 U/min für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in StemSpan 5% HS oder RPMI 5% HS resuspendiert. Zellzahl und Vitalität wurden dann bestimmt.

III-2.5.1.2- Isolierung von Patientenblasten aus Knochenmark

Das in der Kinderklinik gewonnene Knochenmark wurde unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:1 mit RPMI 5% HS verdünnt. In zwei sterile 15ml-Falkon-Röhrchen wurden jeweils 5 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Auf die Ficoll-Lösung wurde vorsichtig jeweils die Hälfte des verdünnten Knochenmarks geschichtet, so dass sich zwei Phasen bildeten. Die befüllten Falkons wurden bei 1800 U/min für 35 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde herauspipettiert, in 15 ml Falkons überführt, mit 10 ml RPMI 5% HS zweimal gewaschen und bei 2000 U/min für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das gewonnene Pellet in 1 ml RPMI 5% HS resuspendiert und die Zellzahl sowie die Vitalität wurden bestimmt.

III-2.5.1.3- Kultivierung von Patientenblasten

Teil 1: 1/6 der Gesamtzellzahl zur DC-Differenzierung ohne die Gegenwart von HDIs (Histone Deacetylase Inhibitoren)¹.

Teil 2: 1/6 der Gesamtzellzahl zur DC-Differenzierung in der Gegenwart von HDIs.

Teil 3: 3/6 der Gesamtzellzahl zur autologen T-Zellen-Generierung (zukünftige Effektorzellen).

¹ HDACs (histone deacetylase) führen zur Unterdrückung der Gentranskription (einschließlich Genen, die an Hämatopoese teilnehmen (wie AML1-Gen)), indem die Chromatinstruktur in eine kondensiertere für Transkriptionsfaktoren weniger zugängliche Form gepackt wird [69]. HDI (wie z.B. Trichostatin A (TSA) und Valproinsäure (Val)) funktionieren als Anti-Krebs Wirkstoffe [70], indem sie diese Hemmung von der Gentranskription abbrechen und damit die hämatopoetische Re-Differenzierung unterstützen [71,72,73].

Teil 4: 1/6 der Gesamtzellzahl wurden als zukünftige Target-Zellen in StemSpan 5% HS + Glutamin kultiviert oder alternativ eingefroren.

III-2.5.1.4- Einfrieren von Patientenblasten

Eine Zellsuspension von 20-30 Millionen Zellen in 850µl RPMI 5% HS wurde in einem Kryoröhrchen mit 150µl DMSO 33% ig bei -80°C eingefroren und gelagert.

III-2.5.2- Kultivierung von REH-Zellen

Die bei -80 °C gelagerten REH-Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dann wurden sie in 9 ml RPMI 10% FBS (mit Phenolrot) resuspendiert und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert, zweimal mit 1 ml RPMI 10% FBS gewaschen und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert. Danach wurden sie in 1 ml RPMI 10% FBS resuspendiert. Zellzahl und Vitalität wurden anschließend bestimmt. Daraufhin wurden die Zellen in 7 ml RPMI 10% FBS + Glutamin bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Zum Füttern wurde die Hälfte der Zellsuspension alle 2-3 Tage entnommen und durch RPMI 10% FBS + Glutamin + Penicillin/Streptomycin ersetzt.

III-2.5.3- Ansatz der DC und der T-Zellen (Tag 0)

III-2.5.3.1- Ansatz der T-Zellen

III-2.5.3.1-a- Versuche mit kryokonservierten Patientenblasten und mit REH-Zellen

HLA-gematchte T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender wurden mittels Dichtgradientenzentrifugation isoliert, in 20 ml RPMI 5% Human Serum + Glutamin oder RPMI 10% FBS+ Glutamin für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Dann wurden die nicht adhärenen Zellen für 7 Minuten bei 2200 U/min mit Bremse zentrifugiert, mit 20 ml PBS gewaschen und für 7 Minuten bei 2200 U/min mit Bremse noch einmal zentrifugiert. Danach wurden diese Zellen in 1 ml RPMI 5% Human Serum oder RPMI 10% FBS resuspendiert. Vitalität und Zellzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden sie in 7 ml Kulturmedium kultiviert (in einer 50ml- Kulturflasche) und im Brutschrank für 7 Tage inkubiert.

Das für die T-Zellen verwendete Kulturmedium bei den Versuchen mit kryokonservierten Patientenblasten war: RPMI 5% Human Serum + IL2 (70 ng/ml) + IL7 (5 ng/ml)+ Glutamin. Bei den Versuchen mit REH-Zellen waren die für T-Zellen verwendeten Kulturmedien:

- 1- RPMI 5% Human Serum + IL2 (70 ng/ml)+ Glutamin.
- 2- RPMI 5% Human Serum + IL2 (70 ng/ml)+ IL7 (5 ng/ml) + Glutamin.
- 3- RPMI 5% Human Serum + IL7 (5 ng/ml)+ Glutamin.
- 4- RPMI 10% FBS + IL7 (5 ng/ml) + Glutamin.

Die kultivierten T-Zellen wurden alle 2-3 Tage mit 1ml Medium gefüttert.

III-2.5.3.1-b- Versuche mit frischen Patientenblasten

In diesen Versuchen wurden autologe T-Zellen verwendet. Hierfür wurden die Patientenblasten in 7-9 ml RPMI 5% HS + IL2 (70 ng/ml)+ IL7 (5ng/ml) + Glutamin für 8-12 Tage kultiviert (in einer 50ml-Kulturflasche). Die kultivierten Zellen wurden alle 2-3 Tage mit 1ml Medium gefüttert.

III-2.5.3.2- Differenzierung von DC aus den leukämischen Blasten

III-2.5.3.2-a- Aus REH-Zellen

Die bereits im Brutschrank inkubierten REH-Zellen wurden aus der Kulturflasche in ein 50ml-Falkon abgeerntet und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert. Dann wurden sie mit 5 ml RPMI 10% FBS (mit Phenolrot) gewaschen und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert. Danach wurden sie in 1ml RPMI 10% FBS (mit Phenolrot) resuspendiert. Vitalität und Zellzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

REH Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/Well (5×10^5 Zellen/2ml) in zwei 6-Well-Flachboden-Platten angesetzt: einmal mit RPMI 10% FBS (mit Phenolrot) + TGK [10 μ l/ml (100ng/ml) TNF- α , 10 μ l/ml (100ng/ml) GM-CSF, 2 μ l/ml (20ng/ml) SCF (C Kit-ligand)] + Glutamin und einmal mit RPMI 10% FBS (mit Phenolrot) + TGK + TSA(64nM) + Glutamin. Die zwei 6-Well-Platten wurden im Brutschrank für 7 Tage bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Die kultivierten Zellen wurden alle 2-3 Tage mit 500 μ l Medium + Zytokine gefüttert.

III-2.5.3.2-b- Aus Patientenblasten

Die bei -80°C gelagerten Patientenblasten wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 9 ml StemSpan 5% HS resuspendiert und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 ml StemSpan 5% HS für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse

zentrifugiert. Danach wurden sie in 1 ml StemSpan 5% HS resuspendiert. Zellzahl und Vitalität wurden bestimmt. Die Patientenblasten wurden anschließend mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/Well (1×10^6 Zellen/2ml) in zwei 6-Well-Flachboden-Platten angesetzt: einmal mit StemSpan 5% HS + Cocktail 5 [25 ng/ml (2,5 μ l/ml) GM-CSF, 50ng/ml (5 μ l/ml) TNF- α , 50ng/ml (5 μ l/ml) Flt3-L, 50ng/ml (5 μ l/ml) SCF, 20ng/ml (2 μ l/ml) IL3, 10ng/ml (5 μ l/ml) IL4] + Glutamin, und einmal mit StemSpan 5% HS + Cocktail 5 + Val (von 250 nM bei den Versuchen mit kryokonservierten Blasten und von 500 nM bei den Versuchen mit frischen Blasten) + Glutamin. Die zwei 6-Well-Platten wurden dann bei 37°C mit 5% CO₂ im Brutschrank für 7 Tage bei den Versuchen mit kryokonservierten Blasten und für 8-12 Tage bei den Versuchen mit frischen Blasten inkubiert. Die kultivierten Zellen wurden alle 2-3 Tage mit 500 μ l Medium + Zytokine gefüttert.

III-2.5.4- Sensibilisierung der T-Zellen

DC (mit und ohne HDI) und 2/3 der kultivierten T-Zellen wurden je in ein 15 ml Röhrchen abgeerntet. Die abgeernteten T-Zellen wurden durch Medium ersetzt und die übrigen Zellen wurden für weitere 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Die abgeernteten DC wurden bei 30 Gy bestrahlt. Dann wurden sie und die geernteten T-Zellen für 7 Minuten bei 1500U/min mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden DC und T-Zellen je zweimal mit jeweils 1 ml RPMI 5 % Human Serum oder RPMI 10 % FBS (je nach dem für die T-Zellen verwendeten Kulturmedium) gewaschen und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in je 1ml RPMI 5 % Human Serum oder RPMI 10 % FBS resuspendiert. Die Vitalität und Zellzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. DC und T-Zellen wurden dann im Verhältnis 1:3 in einer 24-Well-Flachboden-Platte zusammengesetzt und auf 2 ml mit RPMI 5% Human Serum oder RPMI 10 % FBS ergänzt. Die 24-Well-Flachboden-Platte wurde im Brutschrank für 7 Tage inkubiert. Die Zell-Mix-Kulturen wurden 2 Tage nach dem Zell-Mix-Ansatz je nach der Zelldichte mit 500 μ l Medium (Zytokine: doppelte Menge (IL2:140 ng/ml, IL7:10 ng/ml)) + Glutamin oder mit 1 ml Medium (Zytokine: doppelte Menge) gefüttert. 3 Tage später wurden sie mit 500 μ l Medium (Zytokin-Basiskonzentration (IL2:70 ng/ml, IL7:5 ng/ml)) + Glutamin gefüttert.

III-2.5.5- Lysetest (LDH-Freisetzungsmessung)

Die T-Zellen und die durch DC stimulierten T-Zellen sowie die Target-Zellen (REH-Zellen, frische Patientenblasten)¹ wurden je in ein 15 ml Röhrchen abgeerntet und für 7 Minuten bei 1500 U/min mit Bremse zentrifugiert. Dann wurden alle Zellen je mit 1ml RPMI 5% HA zweimal gewaschen und bei 1500 U/min 7 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in je 1ml RPMI mit 5% HA resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Targetzellenkonzentration wurde auf 1×10^5 Zellen/ml in RPMI 5% HA eingestellt, je 50 μ l (5×10^3 Zellen) davon wurden in Wells einer 96-Well-Rundboden-Platte mit Deckel pipettiert. Dazu wurden 50 μ l der Effektorzellen-Suspension in verschiedenen Konzentrationen gegeben, um Effektor/Target (E/T)-Verhältnisse von 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1² zu erreichen (Effektorzellen-Experimental-Release-Wells).

Um die spontane Freisetzung von LDH aus den Target-Zellen zu erfassen, wurden Kontroll-Wells mit reinen Target-Zellen erstellt (50 μ l Target-Zellen Suspension + 50 μ l RPMI 5% HA /Well). Um die spontane Freisetzung von LDH aus den Effektorzellen zu erfassen, wurden Kontroll-Wells mit reinen Effektorzellen erstellt (50 μ l Effektorzellen Suspension + 50 μ l RPMI 5% HA/Well). Als Kontrolle für alle Wells (Target-Zellen-Spontan-Release, Effektorzellen-Spontan-Release, Effektorzellen-Experimentell-Release) wurden Wells mit reinem Medium (CMB) (Culture Medium Background) erstellt (100 μ l RPMI 5% HA/Well). Dann wurde die 96-Well-Rundboden-Platte im Brutschrank (bei 37°C mit 5% CO₂) für 4 Stunden inkubiert.

Je 15 μ l von der Lyselösung wurde in die Hälfte der Target-Zellen-Spontan-Release-Wells zugegeben und gemischt, um die Target-Zellen vollständig zu zerstören und die maximale Freisetzung von LDH aus den Target-Zellen zu erfassen. Als Hintergrundkontrolle für die Release-Proben wurden je 15 μ l von der Lyselösung zur Hälfte der reinen Medium-Wells zugegeben (VCC) (Volume Correction Control). Danach wurde die Rundboden-Platte eine Stunde im Brutschrank weiterinkubiert. Anschließend wurde sie für zwei Minuten bei 1000 U/min mit Bremse zentrifugiert. Je 50 μ l vom Überstand wurden in eine 96-Well-ELISA-Platte überführt und zu den Überständen wurden je 50 μ l Substratpuffer zugegeben. Die ELISA-Platte wurde 30 Minuten im Dunkeln bei Raum-Temperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l/Well

¹ Die kryokonservierten Patientenblasten wurden aus der -80 °C Truhe abgeholt und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dann wurden sie in 9 ml RPMI 5% HA resuspendiert.

² Bei den Versuchen mit frischen Patientenblasten waren die Verhältnisse von E/T: 25:1, 12,5:1, 6,25:1 und bei den anderen Versuchsgruppen waren dies Verhältnisse: 50:1, 25:1, 12,5:1.

von der Stopplösung gegeben und es wurde die Farbumschlagstärke von LDH-Substrat mit einem 490nm-Mikroplatten-Reader gemessen. Die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

Formel 4 Zytotoxizität % = $100 \times [(\text{Effektorzellen-experimentelle Freisetzung} - \text{Effektorzellen-spontane Freisetzung} - \text{Targetzellen-spontane Freisetzung}) / (\text{Targetzellen-maximale Freisetzung} - \text{Targetzellen-spontane Freisetzung})]$.

Effektorzellen-experimentelle Freisetzung = Effektorzellen-experimental-Release – CMB

Effektorzellen spontane Freisetzung = Effektorzellen spontan-Release – CMB

Targetzellen-spontane Freisetzung = Targetzellen-spontan-Release – CMB

Targetzellen-maximale Freisetzung = Targetzellen-maximal-Release – VCC

III-2.6- Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Microsoft Excel Version (2003, 2007) berechnet und graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem Students t – Test überprüft. Als signifikant wurde ein Unterschied bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($p < 0,05$) war.

IV-Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war Optimierung der Kulturbedingungen von T-Zellen für ihre Anwendung im LDH-Release Assay. Hierfür wurden T-Zellen in unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert und verschiedene Parameter (Vitalität, Zellzahl, Früh- und Spätapoptoseraten und die absolute Zellzahl der früh- und spätapoptotischen T-Zellen) bestimmt. Die besten gewonnen Kulturbedingungen wurden dann für T-Zellen im LDH-Freisetzungstest (mit Anwendung von REH-Zellen) verwendet. Im Rahmen einer Studie über die Rolle der HDIs bei der Erzeugung einer effektiven DC-Vakzine gegen akute Leukämien [74] hat unsere Arbeitsgruppe das LDH-Release Assay auch für die Evaluation der immunogenen Aktivität der in-vitro erzeugten DC verwendet. Hierbei wurden die Versuche mit Anwendung frischer oder kryokonservierter TEL-AML1 negativen Patientenblasten durchgeführt. Die Ergebnisse der von mir in dieser Studie durchgeführten LDH-Freisetzungsversuche werden in der vorliegenden Arbeit mitaufgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden auf zwei Ebenen dargestellt:

- 1- Ergebnisse der Kultivierung von T-Zellen in den verschiedenen Kulturbedingungen.
- 2- Ergebnisse der durchgeführten LDH-Freisetzungsversuche:
 - a- Mit Anwendung von REH-Zellen.
 - b- Mit Anwendung von TEL-AML1 negativen Patientenblasten (im Rahmen der erwähnten Studie [74]).

IV-1 – Ergebnisse der Kultivierung von T-Zellen und der Apoptose-Messung

T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels Dichtgradientenzentrifugation isoliert und in verschiedenen Kulturmedien (s. Teil: Material und Methoden) für 8 Tage im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die Apoptosemessung erfolgte durchflusszytometrisch an den Tagen 0, 3, 5 und 8 der T-Zellenkultivierung. Die Vitalität und die Zahl der kultivierten T-Zellen wurden jeweils mikroskopisch vor der Apoptosemessung bestimmt.

Insgesamt wurden 16 Versuche durchgeführt. Diese Versuche wurden in drei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe (IL2-Versuchsgruppe) wurden 5 Versuche durchgeführt, wobei IL2 (70 ng/ml) zu den Basis-Medien zugegeben wurde. In der zweiten Gruppe (IL7-Versuchsgruppe) wurden auch 5 Versuche durchgeführt, wobei IL7 (5 ng/ml) zu den Basis-Medien zugegeben wurde. In der dritten Gruppe (IL2+IL7-Versuchsgruppe) wurden 6 Versuche durchgeführt, wobei IL2 (70 ng/ml) und IL7 (5 ng/ml) zu den Basis-Medien zugegeben wurden. Die

Auswirkung dieser verschiedenen Kulturmedien und Zytokinen auf T-Zellen während der Kultivierungszeit wurde durch Bestimmung verschiedener Parameter (Zellzahl, Vitalität, Frühapoptose, Spätapoptose und absolute Zellzahl der früh- und spätapoptotischen T-Zellen) geprüft.

- Die untersuchten Parameter ergaben folgende Resultate:¹

IV-1.1- Vitalität

Die Vitalität der in RPMI-Medien kultivierten T-Zellen war signifikant höher als die der in IMDM-Medien kultivierten T-Zellen (Tabelle 1). Dies bedeutet, dass RPMI für die Vitalität der T-Zellen besser ist als IMDM. Zum Beispiel war die Vitalität von IL2-RHSM² am Tag 3 der T-Zellen-Kultivierung um mehr als 30% höher als die von IL2-IHSM ($p = 0.01$). Das Gleiche gilt für IL2+IL7-RHSM im Vergleich zu IL2+IL7-IHSM sowohl am Tag 3 ($p = 0.007$) als auch am Tag 5 ($p = 0.02$) der T-Zell-Kultivierung. Am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung war auch einen Unterschied von etwa 25% zugunsten von IL2-RHSM im Vergleich zu IL2-IHSM festzustellen ($p = 0.01$).

Die Vitalität von IL2+IL7-IHSM war um mehr als 15% niedriger als die von IL2+IL7-IHS ($p(\text{Tag}3) = 0.02$, $p(\text{Tag}5) = 0.04$, $p(\text{Tag}8) = 0.04$) (Tabelle 1). Dies bedeutet, dass Merc eine negative Auswirkung auf die Vitalität der T-Zellen hatte.

Die Vitalität von IL7-Versuchsgruppe war signifikant höher im Vergleich zur Vitalität von IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe. Das würde bedeuten, dass IL7 eine positive Auswirkung auf die Vitalität von T-Zellen hatte (Tabelle 1). Zum Beispiel war die Vitalität von IL7-IHS am Tag 3 der T-Zell-Kultivierung um etwa 18% höher als die von IL2-IHS ($p = 0.01$). Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war die Vitalität von IL7-RHSM um etwa 17% höher als die von IL2+IL7-

¹ Die in die Tabellen eingegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte der durchgeführten Versuche \pm ihre Standardabweichungen (SEM). Die Mindestzahl der verwendeten Werte zur Mittelwertberechnung ist 3 (einige Proben waren kontaminiert und wurden daher von den Berechnungen ausgeschlossen).

² RFBS = RPMI 10% FBS, RHS = RPMI 5% HS, RHSM = RPMI 5% HS + Merc, IFBS = IMDM 10% FBS, IHS = IMDM 5% HS, IHSM = IMDM 5% HS + Merc

RHSM ($p = 0.01$). Außerdem hatte IL7-IFBS am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung eine um etwa 24% höhere Vitalität als die von IL2-IFBS ($p = 0.04$).

Tabelle 1 Übersicht über die gewonnenen Werte der Vitalität (%) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8). a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) IMDM-Medien im Vergleich zu RPMI-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu HS+Merc-Medien, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, d: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe.

- Vitalität/Tag0: IL2- bzw. IL7-Gruppe: 97,6 %, IL2+IL7-Gruppe: 97,83 %.

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	87,2±3,2	79,4±5,2	77±4,4	69,4±6,4	60,6±6,8 a	44,8±12,4 a
	Tag 5	92,6±1,4	89,4±2,1	92,6±1,2	79,6±4,7 a	64,6±7,7 a	63±13,6
	Tag 8	75,6±2,7	77,2±2,7	75,6±7,9	57,8±6,4	68,8±5,1 b	50,8±8,5 a
IL7	Tag 3	94,8±1,4	92,3±2,4 c	89,5±3,9 c	79,8±4,1 a	78±4,4 a c	66,5±7,8
	Tag 5	93,3±3	89±3	94,3±1,5	81,5±4,9 a	82,8±3,9 a	70,8±3,5 a
	Tag 8	88,8±3,9 c	89,8±1,2 c	86,2±2,3	81,8±1,2 c	62,4±12,4	65,2±13
IL2 + IL7	Tag 3	85,8±3,6	89,3±2 d	89,3±3,6 d	62±6,6 a d	77,3±5 b	54,7±6,9 a d
	Tag 5	83,5±5,2	82,2±2,6	77,8±3,1 c d	65,2±7,9 a	59,3±6,5 a b	46,7±9,7 a
	Tag 8	81,5±4,1	81,8±4,2	77,2±4,2	78,2±4,4	78,8±4,5 b	55,8±9,9 a

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 10, 11, 12).

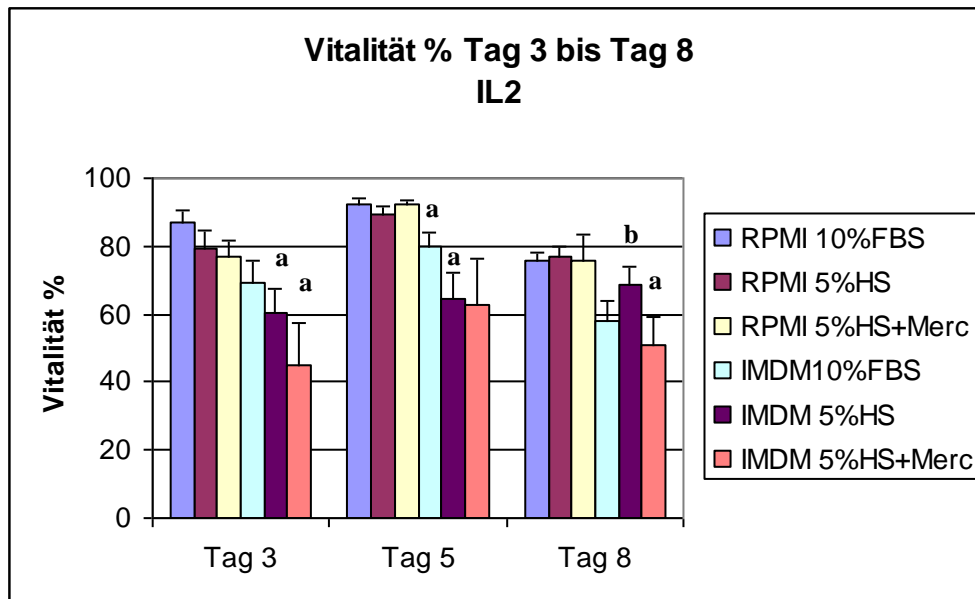


Abbildung 10 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied IMDM-Medien im Vergleich zu RPMI-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu HS+Merc-Medien.

Die Vitalität der T-Zellen von RPMI-Medien war signifikant höher als die von IMDM-Medien. Die Vitalität der T-Zellen vom IHSM (IMDM 5% HS + Merc) war signifikant reduziert im Vergleich zu der von IHS (IMDM 5% HS).

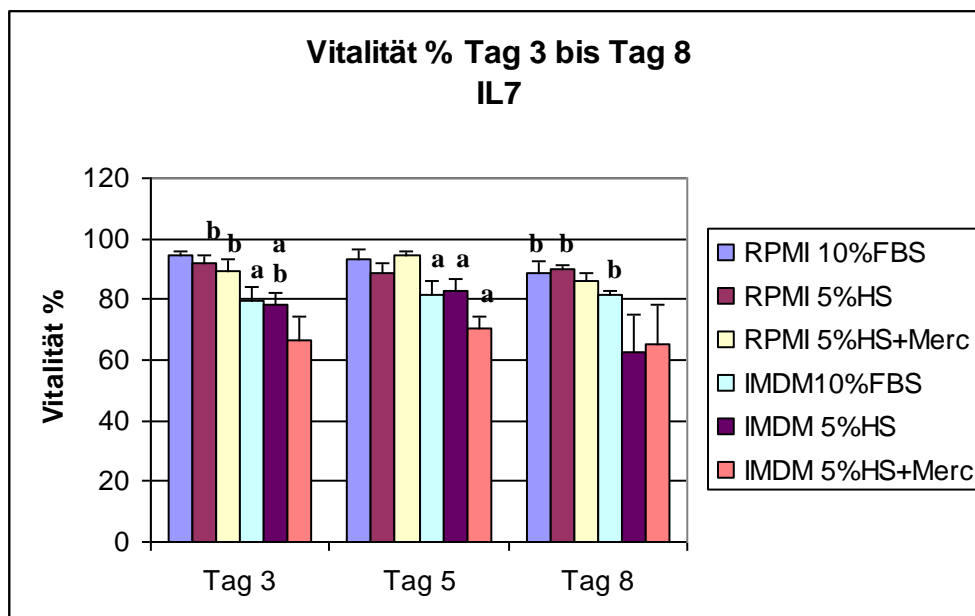


Abbildung 11 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied IMDM-Medien im Vergleich zu RPMI-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe.

Die Vitalität der T-Zellen von RPMI-Medien war signifikant höher als die von IMDM-Medien. Die Vitalität in dieser Versuchsgruppe war signifikant höher als die in der IL2-Versuchsgruppe (s.o.).

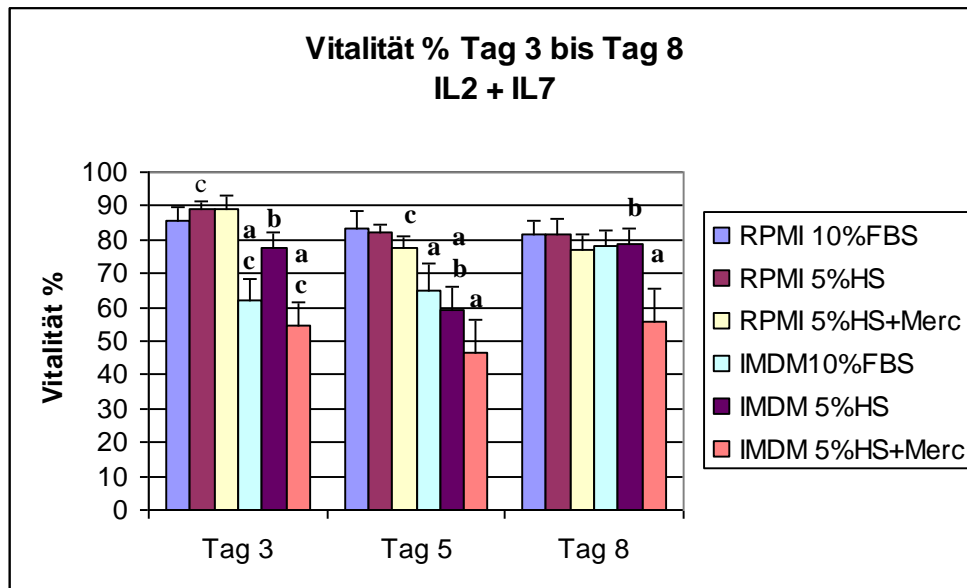


Abbildung 12 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied IMDM-Medien im Vergleich zu RPMI-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu HS+Merc-Medien, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe. **Die Vitalität der T-Zellen von RPMI-Medien war signifikant höher als die von IMDM-Medien. Die Vitalität der T-Zellen von IHSM war signifikant niedrig im Vergleich zu der von IHS. Die Vitalität in dieser Versuchsgruppe war signifikant niedriger als die in der IL7-Versuchsgruppe (s.o.).**

IV-1.2- Zellzahl

Die Zellzahl der verschiedenen verwendeten Medien innerhalb der drei IL-Versuchsgruppen war variabel (Tabelle 2). Dies deutet daraufhin, dass die verschiedenen untersuchten Kulturbedingungen innerhalb irgendeiner der IL-Versuchsgruppen keine bestimmte Auswirkung auf die Zellzahl hatten. Die Zellzahl von IL7-Versuchsgruppe war signifikant niedriger im Vergleich zu der von IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe. Am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die Zellzahl von IL7-RHS um gut 4-mal niedriger als die von IL2-RHS ($p = 0.0003$). Das gleiche gilt für IL7-IHS im Vergleich zu IL2-IHS ($p = 0.03$). Bemerkenswert ist auch, dass die Zellzahl von IL7-IHS um 11-mal niedriger als die von IL2+IL7-IHS war ($p = 0.02$) (Tabelle 2).

Die Zellzahl innerhalb der IL7-Versuchsgruppe hat von Tag 3 zu Tag 8 signifikant abgenommen (Tabelle 2). Die Zellzahl von Tag8-RFBS innerhalb dieser IL-Versuchsgruppe war z.B. nur halb so groß wie die von Tag3-RFBS ($p = 0.04$) (Tabelle 2).

Die Zellzahl innerhalb der IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe stieg von Tag 3 zu Tag 8 signifikant (nicht bei RFBS) (Tabelle 2). Das würde bedeuten, dass IL2 eine positive Auswirkung auf die Expansion der T-Zellen hatte, was bei IL7 nicht der Fall war. Innerhalb der

IL2-Versuchsgruppe war z.B. die Zellzahl von Tag8-RHS um fast 5-mal höher als die von Tag 3-RHS ($p = 0.003$). Außerdem war die Zellzahl von Tag8-IHS fast 7-mal höher als die von Tag 3-IHS ($p = 0.01$). Innerhalb der IL2+IL7-Versuchsgruppe sah es ähnlich aus, wobei z.B. die Zellzahl von Tag8-IHSM um 8-mal höher als die von Tag 3-IHSM war ($p = 0.01$). Außerdem war die Zellzahl von Tag8-RHS um 5-mal höher als die von Tag 3-RHS ($p = 0.03$). Das gleiche gilt für Tag8-IHS im Vergleich zu Tag3-IHS ($p = 0.01$).

Tabelle 2 Übersicht über die gewonnenen Werte der Zellzahl ($\times 10^4$) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8). a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu Tag 3, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 5, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, d: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe.

- Zellzahl/Tag0: 300×10^4 .

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	43,2±7,1	33,8±7,2	41,8±8,4	35±4,4	21,8±5	26,6±10,4
	Tag 5	36,8±5,7	49,2±6,7 a	55,4±8,7	34,6±3,5	32,8±10	34,8±10,9
	Tag 8	49,6±9 b	156,2±14,9 a b	89,8±27,3	43,4±10,2	143±30,1 a b	127,2±43,7
IL7	Tag 3	88,8±23,8	44,8±7,4 b c	47,5±7,3	39,8±8,7	41±9,4	40,3±9,3
	Tag 5	31,3±2,5	27,5±4 a b c	26,5±4,2	29,5±4,6	28,5±3,8	23,8±4,3
	Tag 8	40,6±5,4 a	37,4±6,9 b c	37,2±8,7	52±5,7	29,8±9,1 c	26,8±8,3 b
IL2 + IL7	Tag 3	65±9,2	60,2±9,5	71,2±11,9	47,3±14,1	56,33±12,1 c	35±7
	Tag 5	42±12,2 a c	79,7±17,1 d	57,2±14,7	28,7±4,5	26,50±3,8 a	23,3±4,9
	Tag 8	66,3±8,2 b d	322,8±90,1 a b	157,8±39,8 b	105,6±35,3 a b c	321,2±50,6 a b c d	231,6±44,2 a b d

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 13, 14, 15).

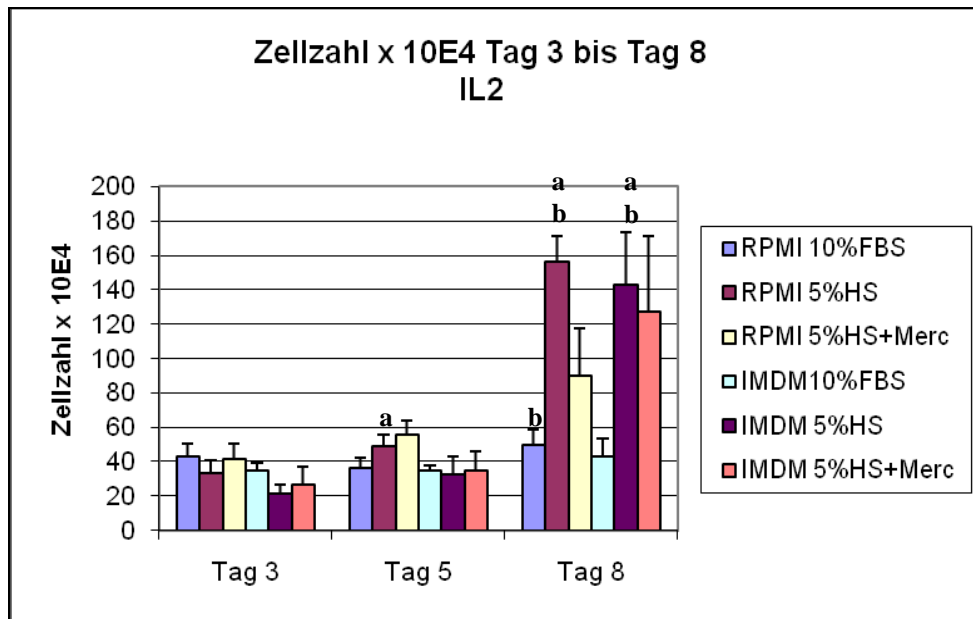


Abbildung 13 Grafische Darstellung der Zellzahl (x10E4) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 3, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 5. **Innerhalb dieser IL-Versuchsgruppe waren die Zellzahlwerte der verschiedenen verwendeten Medien variabel. Außerdem stieg die Zellzahl signifikant von Tag 3 zu Tag 8 an.**

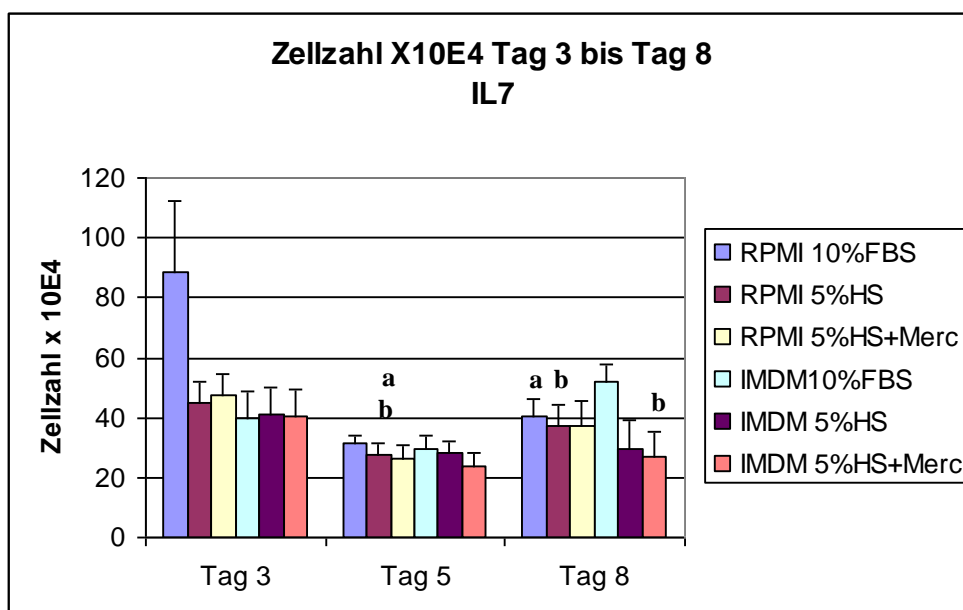


Abbildung 14 Grafische Darstellung der Zellzahl (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 3, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe. **In dieser Versuchsgruppe hat die Zellzahl von Tag 3 zu Tag 8 signifikant abgenommen. Die Zellzahl an den Tagen 5 und 8 war signifikant niedriger im Vergleich zu denen von IL2-Versuchsgruppe (insbesondere bei Verwendung von RHS-Medien) (s.o.).**

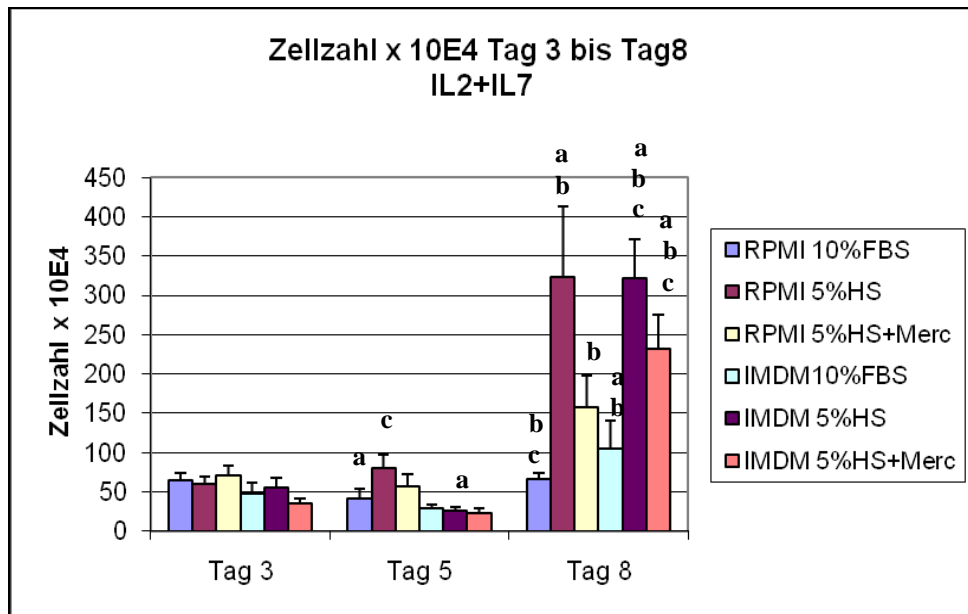


Abbildung 15 Grafische Darstellung der Zellzahl ($\times 10^4$) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 3, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 5, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe. **Die Zellzahl ist von Tag 3 zu Tag 8 signifikant angestiegen. Die Zellzahl in dieser Versuchsgruppe war teilweise signifikant höher als die in der IL7-Versuchsgruppe (s.o.).**

IV-1.3 - Frühapoptose

Die gemessenen Frühapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien (Tabelle 3). Das bedeutet, dass FBS im Gegensatz zu HS das Überleben von T-Zellen günstig beeinflusst. Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die Frühapoptose von IL2-RFBS fast halb so hoch wie die von IL2-RHS ($p = 0.002$). Das gleiche gilt für IL2-IFBS im Vergleich zu IL2-IHS am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung ($p = 0.04$).

Die Werte von IL2+IL7-Versuchsgruppe waren signifikant höher im Vergleich zu denen der IL2- und IL7-Versuchsgruppe (Tabelle 3). Am Tag 3 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die Frühapoptose von IL2+IL7-IFBS um etwa 10% höher als die von IL7-IFBS ($p = 0.03$). Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war die Frühapoptose von IL2+IL7-RHS auch um etwa 10% höher als die von IL2-RHS ($p = 0.04$). Das gleiche gilt am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung für IL2+IL7-IFBS im Vergleich zu IL2-IFBS ($p = 0.048$).

Die Werte von IL7-Versuchsgruppe sahen im Vergleich zu denen von IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe niedrig aus, aber es gab eigentlich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3).

Tabelle 3 Übersicht über die gewonnenen Werte der Frühapoptose (%) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8).
a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe.

- Frühapoptose/Tag0: IL2- bzw. IL7-Gruppe: 9,20%, IL2+IL7-Gruppe: 12,12%.

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	9,5±2,4	12±2,8 a	12,5±3 a	10,4±2,5	11,7±3,1	13,5±3,8
	Tag 5	12,7±2,9	23,6±3,2 a	21,9±3,4 a	12,4±3,6	19,7±3,1 a	22,5±3,4 a
	Tag 8	16±3,3	27,6±3,4 a	21,8±4	10,5±3	24,1±4,8 a	25,4±5,7
IL7	Tag 3	3,7±2,6	9,4±4	11,8±4	5,4±2,7	8,6±3,5	14,1±6,7
	Tag 5	10,4±3,5	15,6±5,7	18,1±5,7a	11,6±3,3	14±5,2	19,5±6,8
	Tag 8	16,8±3,7	14,6±5,9	24,5±4,7	14,3±1,7	17,28±4,30	24,4±7
IL2 + IL7	Tag 3	17±4	16,8±4,3	17,8±4,7	16,9±1,6 b c	18,8±4,3 b	21,3±4,6
	Tag 5	21,4±3,2	33,7±3,4 a b	28,1±3,9 a	15,7±1,9	21,7±4,7	24,81±5,29
	Tag 8	18,6±4	30,8±2,9	26,6±5	21,5±2,9 b	33,5±5,6 a	30,6±5,4 a

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 16, 17, 18).

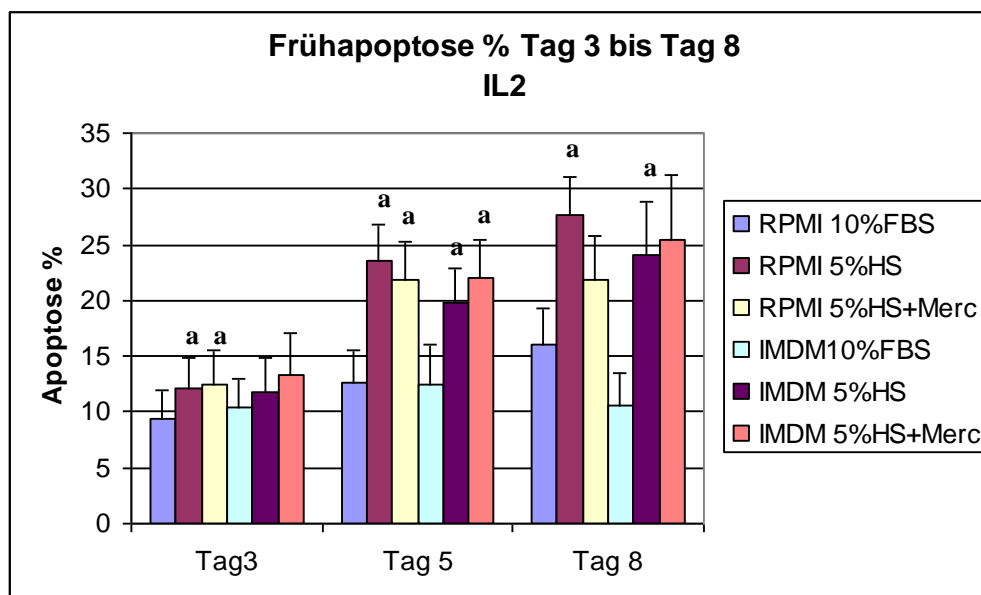


Abbildung 16 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien. **Die Frühapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien.**

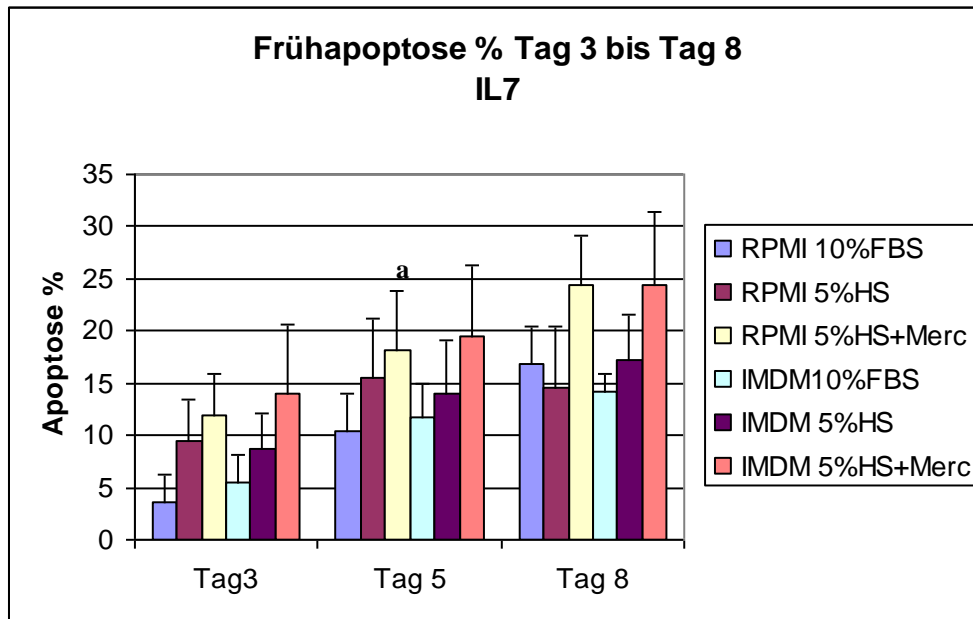


Abbildung 17 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien. **Die Frühapoptosewerte von FBS-Medien waren teilweise signifikant niedriger als die von HS-Medien. Die Frühapoptosewerte in dieser Versuchsgruppe waren ohne Signifikanz am niedrigsten im Vergleich zu denen in der IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe.**

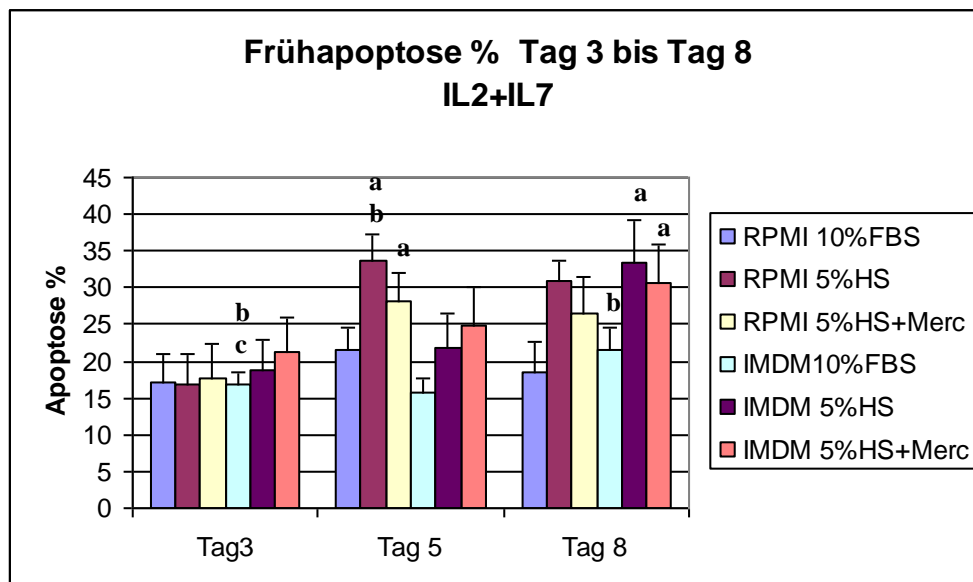


Abbildung 18 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe. **Die Frühapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien. Die Frühapoptosewerte in dieser Versuchsgruppe waren mit Signifikanz am höchsten im Vergleich zu denen in der IL2- und IL7-Versuchsgruppe (s.o.).**

IV-1.4- Absolute Zellzahl / Frühapoptose

Die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedriger als die von HS-Medien (Tabelle 4). Das würde bedeuten, dass FBS eine positivere Auswirkung auf das Überleben von T-Zellen hatte als das von HS. Am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von IL2-IFBS um 9-mal niedriger als die von IL2-IHS ($p = 0.04$). Das gleiche gilt für IL2+IL7-RFBS im Vergleich zu IL2+IL7-RHS ($p = 0.04$).

Die Werte von IL2+IL7-Versuchsgruppe waren signifikant höher im Vergleich zu denen der IL2- und IL7-Versuchsgruppe (Tabelle 4). Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von IL2+IL7-RHS um 7-mal höher als die von IL7-RHS ($p = 0.03$). Das gleiche gilt am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung für IL2+IL7-IFBS im Vergleich zu IL2-IFBS ($p = 0.03$).

Tabelle 4 Übersicht über die gewonnenen Werte der absoluten Zellzahl/Frühapoptose ($\times 10^4$) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8). a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe.

- Absolute Zellzahl der frühapoptotischen Zellen/Tag0: IL2- bzw. IL7-Gruppe: $27,61 \times 10^4$, IL2+IL7-Gruppe: $36,35 \times 10^4$.

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	4,7±1,8	4,3±1,7	5,4±2	3,8±0,9	2,8±1,1	6±2,9
	Tag 5	5,3±1,4	13,4±3,7	14±3,1 a	4,5±1,6	8,5±4,1	10,5±4,5
	Tag 8	8,7±2,8	41,4±4,9 a	23,5±11,2	4,2±1	38,4±13,6 a	42,8±24
IL7	Tag 3	3,3±2,5	4,5±2,5	6,5±2,9	2,5±1,7	3,74±1,78	7,6±3,8
	Tag 5	3,5±1,3	4,4±1,4	4,5±1,4	3,1±0,5	3,6±0,9	3,8±1,1
	Tag 8	7,4±1,9	6,9±3,4 b	11,8±3,8	7,4±1,1	7,7±1,8	10,7±4,2
IL2 +	Tag 3	11±2,5	8,9±2,2 a	11,1±3,5	7±1,4	10±2,9	7,8±1,5
	Tag 5	10,3±3,8	29,4±8,5 a c	18,6±7 a	4,9±1,1	6,2±1,2	7,4±2
	Tag 8	13,1±4,4 b	105,2±34,8 a	46,8±16,7 a	27,1±12,6 b	114,4±31,2 a c	79,3±22,8

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 19, 20, 21).

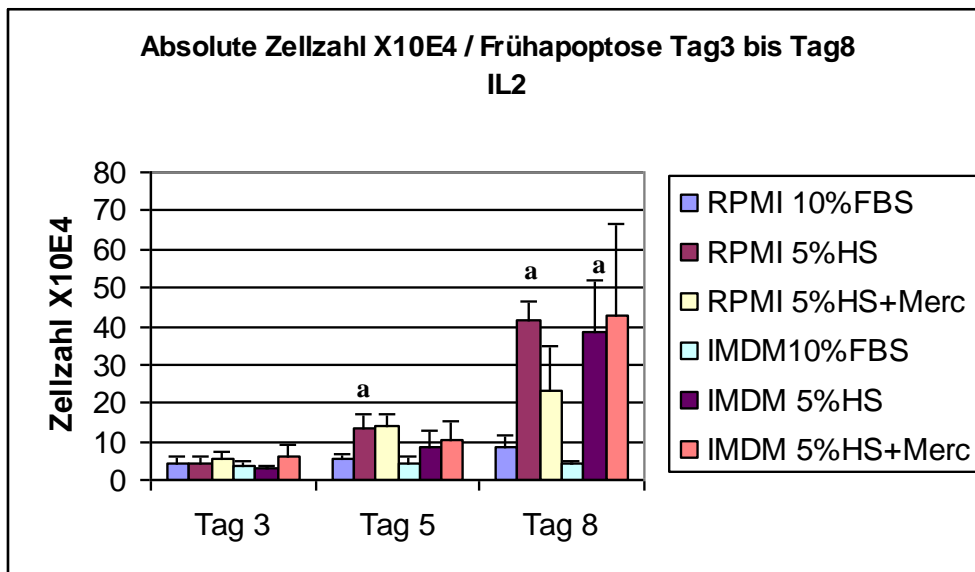


Abbildung 19 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3 -Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien. **Die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedriger als die von HS-Medien.**

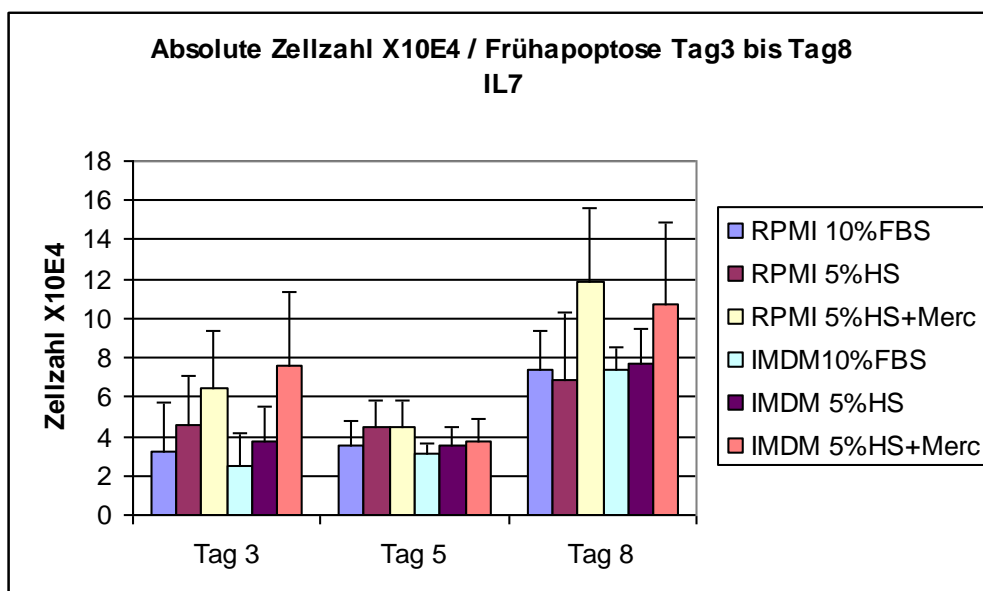


Abbildung 20 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

Die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war in dieser Versuchsgruppe insignifikant niedriger als die von HS-Medien.

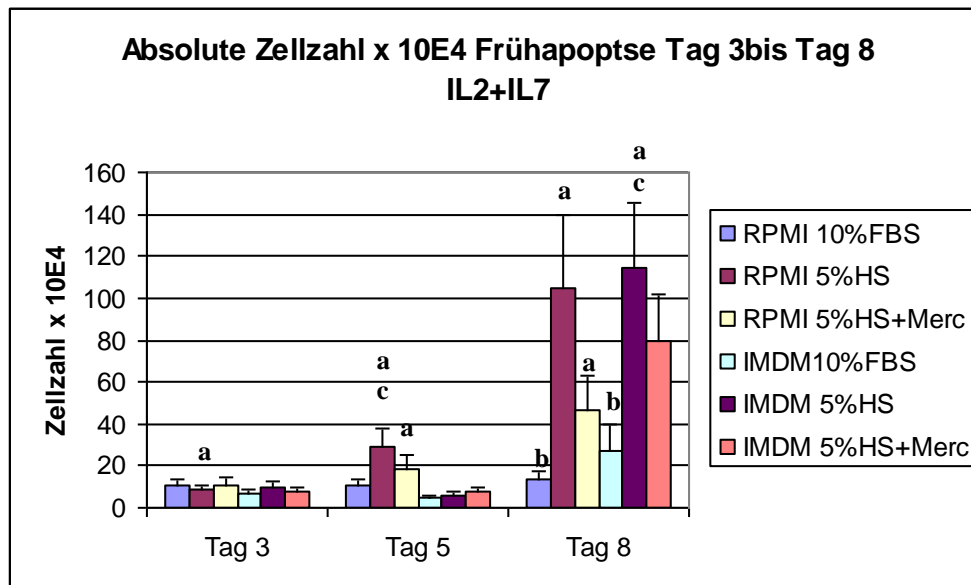


Abbildung 21 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose ($\times 10E4$) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe. **Die absolute Zellzahl der frühapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedriger als die von HS-Medien. Die Werte waren in dieser Versuchsgruppe mit Signifikanz am höchsten im Vergleich zu denen in der IL2- und IL7-Versuchsgruppe.**

IV-1.5- Spätapoptose

Die gemessenen Spätapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien (Tabelle 5). Es ist auch hier zu bedenken, dass FBS eine positivere Auswirkung auf das Überleben von T-Zellen hatte als das von HS. Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die Spätapoptose von IL2+IL7-RFBS halb so hoch wie die von IL2+IL7-RHS ($p = 0.003$). Das gleiche gilt am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung für IL2-IFBS im Vergleich zu IL2-IHS ($p = 0.01$).

Die Spätapoptosewerte von IL7- und IL2+IL7-Versuchsgruppe waren signifikant niedriger als die von IL2-Versuchsgruppe (Tabelle 5). Daraus könnte man schlussfolgern, dass IL7 eine positive Auswirkung auf das Überleben von T-Zellen hatte. Am Tag 5 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die Spätapoptose von IL2-RHS um 2-mal höher als die von IL7-RHS ($p = 0.02$). Das gleiche gilt für IL2-RHSM im Vergleich zu IL7-RHSM ($p = 0.01$). Auch am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung sahen die Ergebnisse ähnlich aus; die Spätapoptose von IL2-RHS war um 4-mal höher als die von IL7-RHS ($p = 0.001$) und die von IL2-RHSM war um 3-mal höher als die von IL7-RHSM ($p = 0.01$) und um 2-mal höher als die von IL2+IL7-RHSM ($p = 0.04$).

Ergebnisse

Tabelle 5 Übersicht über die gewonnenen Werte der Spätapoptose (%) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8).
a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe.

- Spätapoptose/Tag0: IL2- bzw. IL7-Gruppe: 10,10%, IL2+IL7-Gruppe: 6,21%.

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	6,4±2,4	7,8±1,8	7,2±1,3	6,3±1,1	8,2±1,6 a	10,5±2,6
	Tag 5	6,6±2,4	10,8±1,5	9,5±1,8	6,8±2,2	12,1±2,4 a	12,7±2,6 a
	Tag 8	8,9±2,1	13,1±2,5	11,3±2	7,9±2	18,4±1,6 a	13,6±1,1 a
IL7	Tag 3	6,6±1,6	6,5±2,2	6,9±2,2	6,5±1,6	6,1±1,8	5,2±1
	Tag 5	5,9±1	4,9±1,5 b	4,5±1,3 b	7,1±1,3	7,1±2 b	6,9±1,6 b
	Tag 8	6,1±1,1	3±1,6 a b	3,7±1,7 b	8,9±1,6	10±3,1	7,9±2,1 b
IL2 + IL7	Tag 3	3,2±0,7	4,5±1	4,5±0,9 a	3,7±0,2 b	4,8±1	5,4±1,1
	Tag 5	4,7±0,5	10,1±1,1 a	8,3±0,7 a	4,6±0,4	7,4±0,9 a	8,2±2,1
	Tag 8	5,6±1,2	7,3±1,6 a	5,5±0,7 b	6,5±0,6	9,9±1,1 b	8,4±1,4

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 22, 23, 24).

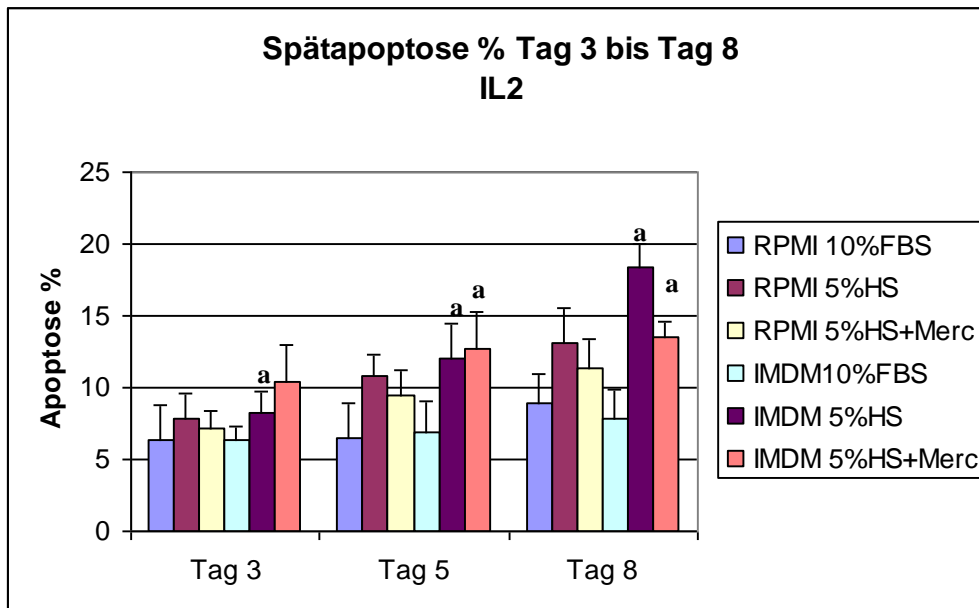


Abbildung 22 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien. **Die Spätapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien.**

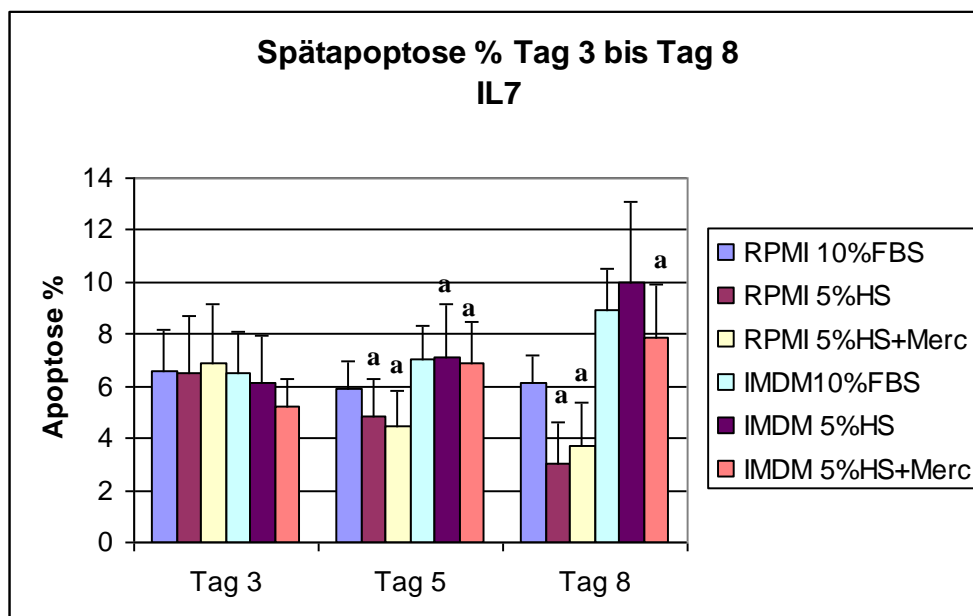


Abbildung 23 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe. **Die Spätapoptosewerte in dieser Versuchsgruppe waren signifikant niedriger als die von IL2- Versuchsgruppe (s.o.).**

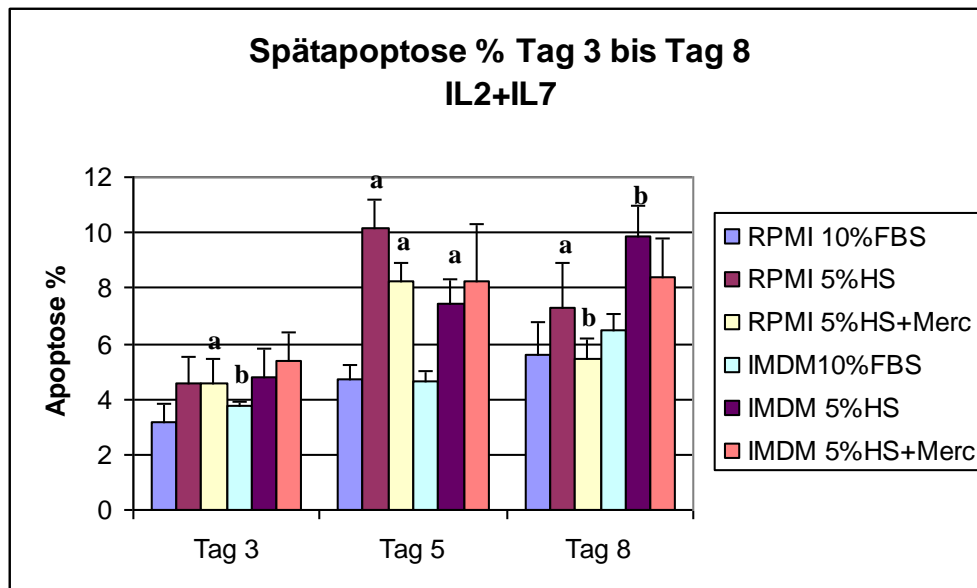


Abbildung 24 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe.

Die Spätapoptosewerte von FBS-Medien waren signifikant niedriger als die von HS-Medien. Die Spätapoptosewerte in dieser Versuchsgruppe waren signifikant niedriger als die von IL2- Versuchsgruppe (s.o.).

IV-1.6 - Absolute Zellzahl / Spätapoptose

Die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedriger als die der HS-Medien (Tabelle 6). FBS hatte auch hier im Vergleich zu HS eine positive Wirkung auf das Überleben von T-Zellen. Am Tag 8 der T-Zell-Kultivierung war z.B. die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von IL2-IFBS um 9-mal niedriger als die von IL2-IHS ($p = 0.01$). Zudem war die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von IL2+IL7-RFBS um 6-mal niedriger als die von IL2+IL7-RHS ($p = 0.03$).

Die Werte in der IL7-Versuchsgruppe waren signifikant niedriger als die von IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tabelle 6). Daraus könnte man zur Schlussfolgerung kommen, dass IL2 eine negative Auswirkung auf das Überleben von T-Zellen hatte. Am Tag 8 der T-Zellen-Kultivierung war z.B. die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von IL7-RHS um 15-mal niedriger als die von IL2-RHS ($p = 0.01$) und um 13-mal niedriger als die von IL2+IL7-RHS ($p = 0.046$).

Ergebnisse

Tabelle 6 Übersicht über die gewonnenen Werte der absoluten Zellzahl/Spätapoptose ($\times 10^4$) der 3 IL-Versuchsgruppen (Tag3-Tag8).
a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe, c: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe.

- Absolute Zellzahl der spätapoptotischen Zellen/Tag0: IL2- bzw. IL7-Gruppe: $30,29 \times 10^4$, IL2+IL7-Gruppe: $41,31 \times 10^4$.

IL	Tag	RPMI 10% FBS	RPMI 5% HS	RPMI 5%HS +Merc	IMDM 10% FBS	IMDM 5% HS	IMDM 5% HS +Merc
IL2	Tag 3	2,8 \pm 0,9	2,8 \pm 0,8	3,4 \pm 1	2,3 \pm 0,6	2 \pm 0,7 a	3,8 \pm 1,7
	Tag 5	2,4 \pm 0,7	6 \pm 1,4 a	5,2 \pm 0,6 a	2,6 \pm 0,9	5,3 \pm 2,3	6,1 \pm 2,4
	Tag 8	4 \pm 0,9	21,9 \pm 5,6 a	9,6 \pm 2,9 a	2,8 \pm 0,7	25,2 \pm 4,3 a	16,4 \pm 5
IL7	Tag 3	4,5 \pm 1,5	3,2 \pm 1,3	3,2 \pm 0,9	2,7 \pm 0,9	2,4 \pm 0,7	2,3 \pm 0,9
	Tag 5	2 \pm 0,5	1,3 \pm 0,4 b	1 \pm 0,2 b	2,2 \pm 0,7	2 \pm 0,6	1,6 \pm 0,6 a
	Tag 8	2,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,9 b	1,8 \pm 1,1	4,6 \pm 0,8	5 \pm 1,8	3,2 \pm 1 b
IL2 + IL7	Tag 3	2,1 \pm 0,5	2,6 \pm 0,7	2,8 \pm 0,7 a	1,8 \pm 0,5	2,6 \pm 0,8	2,1 \pm 0,5
	Tag 5	2,2 \pm 0,8	9 \pm 2,9 a c	5 \pm 1,5 a c	1,3 \pm 0,2	2,2 \pm 0,5	2,5 \pm 0,8
	Tag 8	3,8 \pm 0,8	19,1 \pm 4,1 a c	9 \pm 2,3	6,7 \pm 2,2	30,3 \pm 4,4 b c	22,2 \pm 5,6

Zur Vereinfachung sind die Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildungen 25,26,27).

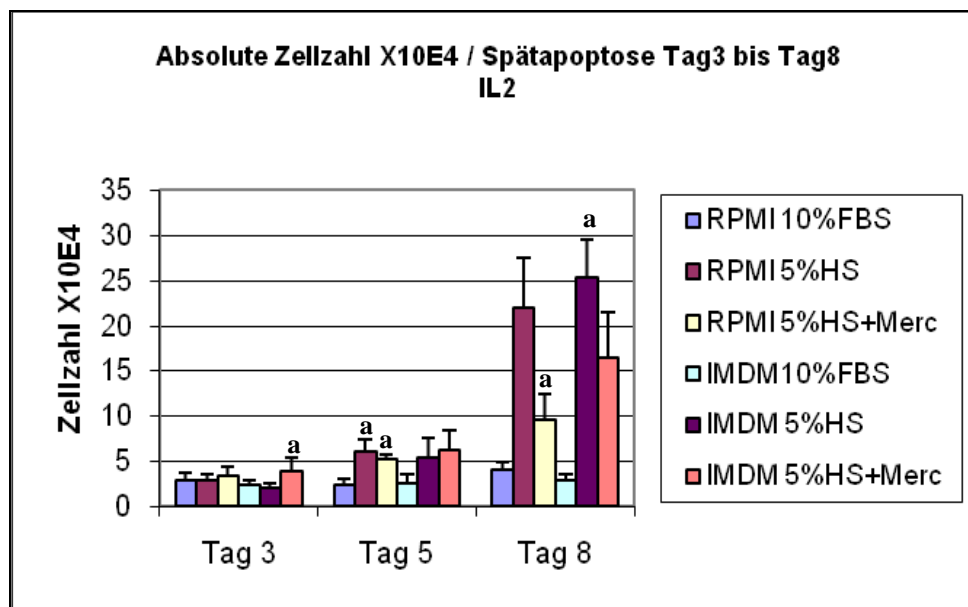


Abbildung 25 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose ($\times 10^4$) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien. **Die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedrig im Vergleich zu der von HS-Medien.**

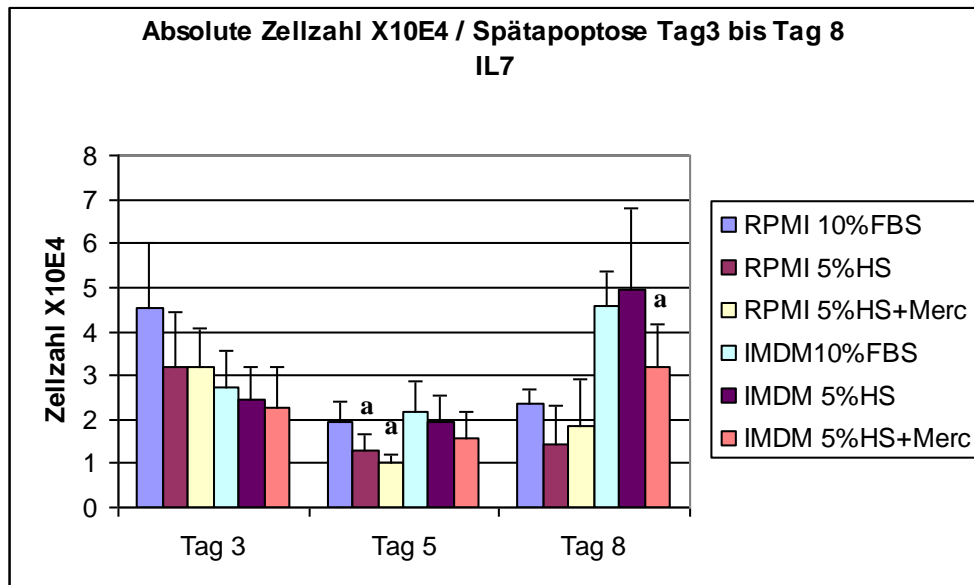


Abbildung 26 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL2-Versuchsgruppe. **Die Werte in dieser Versuchsgruppe waren mit Signifikanz am niedrigsten im Vergleich zu denen in der IL2- und IL2+IL7-Versuchsgruppe (insbesondere an den Tagen 5 und 8).**

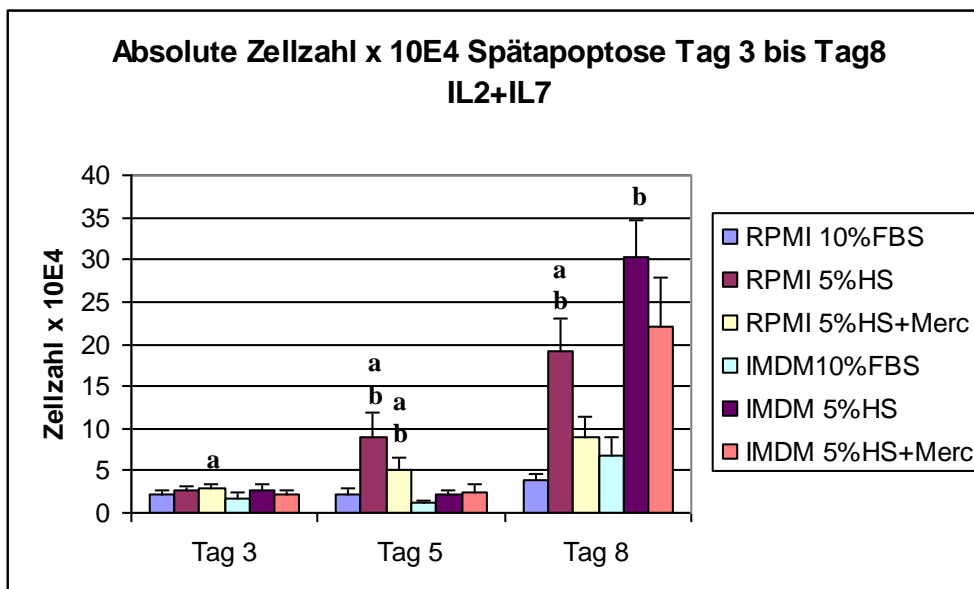


Abbildung 27 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).

a: signifikanter Unterschied im Vergleich zu FBS-Medien, b: signifikanter Unterschied im Vergleich zu IL7-Versuchsgruppe. **Die absolute Zellzahl der spätapoptotischen T-Zellen von FBS-Medien war signifikant niedriger im Vergleich zu der von HS-Medien. Die Werte in dieser Versuchsgruppe waren signifikant höher als die in der IL7-Versuchsgruppe (s.o.).**

IV-2- Ergebnisse der durchgeführten LDH-Freisetzungsversuche

IV-2.1. LDH-Freisetzungsversuche mit REH-Zellen

Anhand der gewonnenen Ergebnisse der Kultivierung und der Apoptosemessung von T-Zellen wurden IMDM- und Merc-Medien wegen ihrer negativen Auswirkung auf die Vitalität und Apoptose der T-Zellen nicht zum Einsatz für den LDH-Freisetzungstest verwendet. RFBS+IL7-Medium wurde wegen der guten Ergebnisse von FBS-Medien und IL7-Medien zu diesem Test verwendet. RPMI 5% HS-Medien wurden alle verwendet (RHS+IL2, RHS+IL7, RHS+IL2+IL7).

Hierfür wurden REH-Zellen + Zytokine (TGK) ± Trichostatin (TSA) zur DC-Differenzierung eingesetzt. HLA-gmatchte T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels Dichtgradientenzentrifugation isoliert. CTLs und REH-Zellen (Target-Zellen) wurden in Verhältnissen von 50:1, 25:1, 12.5:1 zusammengesetzt.

Insgesamt wurden 18 Versuche durchgeführt, die gemäß dem für T-Zellen verwendeten Kulturmedium auf 4 Gruppen geteilt wurden. In der ersten Gruppe wurde RPMI 5 % HS (ohne Phenolrot) + IL2 + Glutamin (IL2-RHS-Gruppe) verwendet ($n = 5$)¹. In der zweiten Gruppe wurde RPMI 5 % HS (ohne Phenolrot) + IL2 + IL7 + Glutamin (IL2+IL7-RHS-Gruppe) verwendet ($n = 5$)¹. In der dritten Gruppe kam RPMI 5 % HS (ohne Phenolrot) + IL7 + Glutamin (IL7-RHS-Gruppe) zum Einsatz ($n = 5$)² und bei der vierten Gruppe wurde RPMI 10 % FBS (ohne Phenolrot) + IL7 + Glutamin (IL7-RFBS-Gruppe) verwendet ($n = 3$)³. In jeder dieser vier Gruppen wurde die zytotoxische Aktivität der CTLs auf drei Ebenen gemessen: einmal mit DC-Stimulierung ohne die Gegenwart von TSA (= TGK), einmal mit DC-Stimulierung in der Gegenwart von TSA (= TGK + TSA) und einmal ohne DC-Stimulierung (nur mit Interleukin-Stimulierung) (= T-Zellen).

Die Werte der spezifischen Zytotoxizität (durch DC-Stimulation) des E/T-Verhältnisses von 25:1 in der IL2-RHS-Gruppe waren um 6% höher als die vom gleichen E/T-Verhältnis in der

¹ In einem dieser Versuche wurden die durch DC-(ohne TSA) stimulierten T-Zellen nicht verwendet, da sie verklumpt waren.

² In einem dieser Versuche wurde der Lyse-Test wegen Materialmangel nicht gemacht. Bei einem anderen Versuch wurde das E/T Verhältniss von 50:1 nicht angesetzt, da die Zellzahl der Effektorzellen sehr niedrig war.

³ In einem dieser Versuche wurde das E/T Verhältniss von 50:1 nicht angesetzt, da die Zellzahl der Effektorzellen sehr niedrig war.

IL2+IL7-RHS-Gruppe und um 10% höher als die von der IL7-RHS-Gruppe, aber ohne signifikante Unterschiede (Tabelle 7). Die Werte der spezifischen Zytotoxizität der E/T-Verhältnisse von 50:1 und 25:1 in der IL7-RHS-Gruppe waren um 1.5 bis 15% niedriger als die von der IL2-RHS-Gruppe und um 5 bis 13% niedriger als die von der IL2+IL7-RHS-Gruppe, trotzdem ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (Tabelle 7). Es kann sich daraus ergeben, dass IL2 eine positive Auswirkung auf die Zytotoxizität der T-Zellen hatte, was bei IL7 nicht festzustellen war. Bei den E/T-Verhältnissen von 50:1 und 25:1 waren die Werte der spezifischen Zytotoxizität in der IL7-RFBS-Gruppe um 6 bis 37% höher als die von der IL7-RHS-Gruppe, aber auch ohne Signifikanz. Außerdem waren die Werte der unspezifischen Zytotoxizität (der durch IL allein stimulierten T-Zellen) innerhalb aller 4 Gruppen (IL2-RHS, IL2+IL7-RHS, IL7-RHS, IL7-RFBS) auffallend hoch (4,1 bis 19,7%) (Tabelle 7). Dies spricht für eine unspezifische, zytotoxische Aktivität der T-Zellen. Die fehlenden statistischen Unterschiede sind aufgrund der niedrigen Anzahl der durchgeführten Experimente nachvollziehbar.

In der IL2-RHS-Gruppe war die zytotoxische Aktivität der mit HDI-TGK-DC stimulierten CTLs bei den E/T-Verhältnissen von 25:1 und 12.5:1 insignifikant höher als die der mit nur TGK-DC stimulierten CTLs (Tabelle 7). In der IL2+IL7-RHS-Gruppe war die zytotoxische Aktivität der mit HDI-TGK-DC stimulierten CTLs bei den E/T-Verhältnissen von 50:1, 25:1 und 12.5:1 insignifikant höher als die der mit nur TGK-DC stimulierten CTLs. Das Gleiche gilt für die IL7-RHS-Gruppe. Die zytotoxische Aktivität der mit nur TGK-DC stimulierten CTLs war in der IL7-RFBS-Gruppe beim E/T-Verhältnis von 25:1 insignifikant höher als die der mit HDI-TGK-DC stimulierten CTLs. Beim E/T-Verhältnis von 50:1 war die Zytotoxizität der mit HDI-TGK-DC stimulierten T-Zellen höher (Tabelle 7). Daraus läßt sich eine Tendenz der höheren CTL-Aktivität feststellen, wenn die Effektorzellen mit HDI-generierten DC stimuliert werden.

Tabelle 7 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit REH-Zellen.

TGK: TNF- α + GM-CSF + SCF (c-kit-Ligand), TSA: Trichostatin A, T-Zellen: durch IL allein stimulierte T-Zellen, HS: Human Serum, FBS: fetales bovine serum.

Versuchsgruppe	Effektorzellen : Targetzellen	50:1	25:1	12.5:1
IL2 / RPMI 5%HS (RHS-IL2)	TGK ¹ (n = 4)	19,3 \pm 9,3	14,1 \pm 9,2	6,1 \pm 2,2
	TGK+ TSA	14,4 \pm 6,5	21,5 \pm 13,5	8,6 \pm 3,6
	T-Zellen	13,8 \pm 2,9	14,9 \pm 4,9	9,5 \pm 3,1
IL2+ IL7 / RPMI 5%HS (RHS-IL2+IL7)	TGK ¹ (n = 4)	17,3 \pm 5,6	8,8 \pm 4	7,1 \pm 2,1
	TGK+ TSA	18,5 \pm 5,6	14,7 \pm 5,9	9,6 \pm 3,6
	T-Zellen	9,1 \pm 4	16,1 \pm 5,3	10,2 \pm 2,2
IL7 / RPMI 5%HS (RHS-IL7)²	TGK	4,3 \pm 2,7 (n = 3)	4,8 \pm 1,9 (n = 4)	5,6 \pm 1,8 (n = 4)
	TGK+ TSA	13,1 \pm 5,5 (n = 3)	10,6 \pm 5,3 (n = 4)	8,1 \pm 4,9 (n = 4)
	T-Zellen	19,7 \pm 6,4 (n = 3)	5,1 \pm 2,2 (n = 4)	9,9 \pm 5 (n = 4)
IL7 / RPMI 10%FBS (RFBS-IL7)³	TGK	10,9 \pm 7,7 (n = 2)	21,5 \pm 9,7	7,2 \pm 3,7
	TGK+ TSA	51,5 \pm 36,4 (n = 2)	5,7 \pm 2,7	5,8 \pm 3,9
	T-Zellen	10,1 \pm 7,1 (n = 2)	9 \pm 6,7	4,1 \pm 3,3

Die spontane LDH-Freisetzung der Effektorzellen von FBS-Medium war um 2 bis 3 fach höher als die von HS-Medium (Tabelle 8). Bei E/T Verhältnis von 12.5:1 z.B. war die Farbintensität der durch TGK-DC stimulierten Effektorzellen in FBS-Medium um 3 fach höher als die in HS-Medium ($p = 0.01$). Beim gleichen E/T Verhältnis war die Farbintensität der durch TGK+TSA-DC stimulierten Effektorzellen in FBS-Medium um mehr als 2 fach höher als die in HS-Medium ($p = 0.01$) (Tabelle 8). Es konnten keine Korrelationsanalysen mit den Resultaten der Apoptose durchgeführt werden, da die T-Zellen, die für Zellzahl, Vitalitätsbestimmung und Apoptosemessungen eingesetzt wurden, nicht für einen simultanen LDH-Freisetzungstest reichten.

Tabelle 8 Spontane Farbintensität der Effektorzellen (RFBS+IL7- und RHS+IL7-Gruppe / Versuchsgruppe mit REH Zellen).
 TGK: TNF- α + GM-CSF + SCF (c-kit-Ligand), TSA:Trichostatin A, T-Zellen: durch IL7 allein stimulierte T-Zellen,
 HS: Human Serum, FBS: fetales bovine serum. a: signifikanter Unterschied RHS+IL7 im Vergleich zu RFBS+IL7.

Versuchsgruppe		Effektorzellen : Targetzellen	Spontane Farbintensität der Effektorzellen
RPMI 10% FBS + IL7	TGK	50:1	1,090 \pm 0,12
		25:1	0,552 \pm 0,06
		12.5:1	0,355 \pm 0,02
	TGK+TSA	50:1	1,238 \pm 0,10
		25:1	0,701 \pm 0,05
		12.5:1	0,402 \pm 0,03
	T-Zellen	50:1	0,434 \pm 0,00
		25:1	0,289 \pm 0,05
		12.5:1	0,170 \pm 0,03
RPMI 5% HS + IL7	TGK	50:1	0,458 \pm 0,10
		25:1	0,203 \pm 0,03 a
		12.5:1	0,117 \pm 0,01 a
	TGK+TSA	50:1	0,580 \pm 0,14 a
		25:1	0,310 \pm 0,06 a
		12.5:1	0,157 \pm 0,03 a
	T-Zellen	50:1	0,305 \pm 0,06
		25:1	0,223 \pm 0,05
		12.5:1	0,104 \pm 0,02 a

IV-2.2. LDH-Freisetzungsversuche mit Anwendung von TEL-AML1-negativen Patientenblasten

Hier werden die Ergebnisse der von mir durchgeführten Versuche (im Rahmen der unter IV erwähnten Studie [74]) in Bezug auf das Thema der vorliegenden Arbeit dargestellt (Optimierung der Kulturbedingungen von T-Zellen zur Anwendung im LDH-Release Assay). Diese Versuche waren auf der Anwendung von kryokonservierten oder frischen TEL-AML1-

negativen Patientenblasten basiert. Das verwendete Kulturmedium für T-Zellen im Rahmen dieser Studie war RPMI 5 % HS (ohne Phenolrot) + IL2 + IL7 + Glutamin.

IV-2.2.1-Versuchsgruppe mit kryokonservierten Patientenblasten

HLA-gematchte T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels Dichtgradientenzentrifugation isoliert. Die kryokonservierten Patientenblasten wurden sowohl zur DC-Differenzierung als auch als Target-Zellen verwendet. In dieser Versuchsgruppe wurde Val (250 nM) als HDI verwendet (Val, Valproinsäure). CTLs und Patientenblasten (Target-Zellen) wurden in Verhältnissen von 50:1, 25:1, 12.5:1 zusammengesetzt.

Insgesamt wurden 5 Versuche durchgeführt. Die zytotoxische Aktivität der CTLs in dieser Gruppe wurde auf zwei Ebenen gemessen¹: einmal mit DC-Stimulierung ohne die Gegenwart von Val und einmal mit DC-Stimulierung in der Gegenwart von Val.

Die Zytotoxizitätswerte in dieser Gruppe waren sehr niedrig (0 bis 1,8%) (Tabelle 9). Das könnte daran liegen, dass die CTLs und DC nicht komplett HLA-identisch waren oder dass die Aktivität der kryokonservierten Blasten durch die Kryokonservierung beeinträchtigt wurde. Die zytotoxische Aktivität der mit HDI-Cocktail 5-DC stimulierten CTLs war insignifikant höher (1,1 bis 1,8%) als die der mit nur Cocktail 5-DC stimulierten CTLs (0%) (Tabelle 9).

Tabelle 9 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit kryokonservierten TEL-AML1-negativen Patientenblasten. Cocktail 5: TNF- α + GM-CSF + SCF (c-kit-Ligand) + IL3 + IL4 + Flt3-L, Val: Valproinsäure.

Effektorzellen : Targetzellen		50:1	25:1	12.5:1
IL2+ IL7 / RPMI 5%HS	Cocktail 5	0,0	0,0	0,0
	Cocktail 5+ Val 250 nM	0,0	1,8 \pm 1,0	1,1 \pm 0,7

IV-2.2.2-Versuchsgruppe mit frischen Patientenblasten

Wenn die Anzahl der präparierten Patientenblasten größer als 1×10^7 war, wurden sie frisch zur autologen DC- und T-Zellen-Generierung und als zukünftige Target-Zellen verwendet. Val (500

¹ Die Zahl der kultivierten T-Zellen hier war nicht ausreichend, um die zytotoxische Aktivität der CTLs ohne DC-Stimulierung zu bestimmen.

nM) wurde als HDI verwendet. CTLs und Patientenblasten (Target-Zellen) wurden in Verhältnissen von 25:1, 12.5:1, 6,25:1¹ zusammengesetzt.

Insgesamt wurden 5 Versuche durchgeführt. Die zytotoxische Aktivität der CTLs wurde auf drei Ebenen gemessen: einmal mit DC-Stimulierung ohne die Gegenwart von Val, einmal mit DC-Stimulierung in der Gegenwart von Val und einmal ohne DC-Stimulierung (nur mit der Interleukin-Stimulierung).

Die Zytotoxizitätswerte in dieser Versuchsgruppe mit frischen Patientenblasten (die autologe Gruppe) waren um 14 bis 60% höher als die in der Versuchsgruppe mit kryokonservierten Patientenblasten (die Fremdspender-Gruppe) (p = 0,03 bei Cocktail 5 mit E/T-Verhältnis von 25:1) (Tabellen 9, 10).

Tabelle 10 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit frischen TEL-AML1-negativen Patientenblasten. Cocktail 5: TNF- α + GM-CSF + SCF (c-kit-Ligand) + IL3 + IL4 + Flt3-L, Val: Valproinsäure, T-Zellen: durch (IL2+IL7) stimulierte T-Zellen.

Effektorzellen : Targetzellen		25:1	12.5:1	6.25:1
IL2+ IL7 / RPMI 5%HS (RHS-IL2+IL7)	Cocktail 5	60,8 \pm 13,1	20 \pm 15,2	22,8 \pm 10,8
	Cocktail 5+ Val 500 nM	17,9 \pm 14,6	14 \pm 7,7	32,7 \pm 18,1
	T-Zellen	14,5 \pm 11,9	14,3 \pm 10,7	22,5 \pm 8,3

Die zytotoxische Aktivität der mit nur Cocktail 5-DC stimulierten CTLs war hier teilweise insignifikant höher als die der mit HDI-Cocktail 5-DC stimulierten CTLs. Z.B. beim E/T-Verhältnis von 25:1 war die Zytotoxizität der mit nur Cocktail 5-DC stimulierten CTLs um 3 fach höher als die der mit HDI-Cocktail 5-DC stimulierten CTLs. Dagegen war die Zytotoxizität der mit nur Cocktail 5-DC stimulierten CTLs (22,8%) bei einem E/T-Verhältnis von 6.25:1 geringer als die der mit HDI-Cocktail 5-DC stimulierten CTLs (32,7%) (Tabelle 10).

IL2+IL7-Medium hatte Zytotoxizitätswerte von (7,1 bis 18,5%) in der Versuchsgruppe mit TEL-AML1-positiven REH-Zellen (Tabelle 7), von (0 bis 1,8%) in der Versuchsgruppe mit kryokonservierten TEL-AML1-negativen Patientenblasten (Fremdspender-Gruppe) (Tabelle 9)

¹ Die Zahl der Effektorzellen war hier nicht ausreichend, um ein Verhältnis E/T von 50:1 anzusetzen.

und von (14 bis 60,8%) in der Versuchsgruppe mit frischen TEL-AML1-negativen Patientenblasten (autologe Gruppe) (Tabelle 10). Die Werte der spezifischen Zytotoxizität der Versuchsgruppe mit frischen TEL-AML1-negativen Patientenblasten waren höher als die der Versuchsgruppe mit REH-Zellen und als die der Versuchsgruppe mit kryokonservierten TEL-AML1-negativen Patientenblasten mit Signifikanz beim E/T-Verhältnis von 25:1 in Konditionen ohne HDIs ($p = 0,02$, $p = 0,03$).

V- Diskussion

Ziel der Arbeit war Optimierung der Kulturbedingungen von T-Zellen, die im LDH-Release Assay eingesetzt werden, um ihre Spontanlyse zu reduzieren und die Aussagekraft dieses Assays zu verbessern. Hierfür wurden unterschiedliche Kulturbedingungen (Interleukin-2 (IL2), Interleukin-7 (IL7), Roswell Park Memorial Institut-Medium (RPMI), Iscove's modified Dulbecco's Media (IMDM), Fetales bovine serum (FBS), Human Serum (HS), β -Mercaptoethanol (Merc)) verglichen und verschiedene Parameter (Vitalität, Zellzahl, Früh- und Spätaoptoseraten und die absolute Zellzahl der früh- und spätaoptotischen T-Zellen) bestimmt. In LDH-Release Versuchen wurde die Auswirkung der besten gewonnenen Kulturbedingungen auf die zytotoxische Aktivität der T-Zellen untersucht.

V-1- Auswirkung von RPMI versus IMDM auf die kultivierten T-Zellen

In einer Publikation von Steven M.Lipson 1986 wurde festgestellt, dass die in IMDM kultivierten Lymphozyten 2 fach höher stimuliert wurden im Vergleich zu den in mit Serum supplementiertem RPMI kultivierten Lymphozyten [75]. In dieser Publikation wurden die Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert, IMDM war serumfrei, RPMI war mit 15% FBS supplementiert, die Ausgangszellzahl der kultivierten Lymphozyten war $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml, die Kultivierungszeit war 3-4 Tage, verschiedene Mitogene wie z.B. Phytohemagglutinin, Pokeweed-mitogen und Concanavalin A wurden zur Stimulierung von T-Zellen verwendet und zur Evaluation der verwendeten Kulturbedingungen wurde die [3H]thymidine-Bindungsaktivität der kultivierten Lymphozyten am Spektrometer gemessen. Die Apoptose und Vitalität der kultivierten Lymphozyten wurden nicht in dieser Publikation dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit hatten die verwendeten RPMI- und IMDM-Medien die gleichen Bedingungen, was ihren Inhalt von Seren und Zytokinen betrifft. T-Zellen wurden aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert. Die Ausgangszellzahl war $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml, zur Stimulierung von T-Zellen wurden IL2 und/oder IL7 verwendet, die Kultivierungszeit war 8 Tage und zur Evaluation der verwendeten Kulturbedingungen wurden die Zellzahl und Vitalität sowie die Apoptose der kultivierten T-Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

In der vorliegenden Arbeit war die Vitalität der in RPMI kultivierten T-Zellen signifikant höher als die der in IMDM kultivierten T-Zellen (Tabelle 1). Der höhere Salz- und Vitamingehalt in RPMI könnte eine größere Polarität der T-Zellen verursachen, wodurch sie eine bessere Fähigkeit zur Bildung von Zellklustern entwickeln und somit besser expandieren (Tabelle 11). Wegen der signifikant positiven Auswirkung von RPMI versus IMDM auf die Vitalität der T-Zellen und zur Vermeidung hoher Spontanlyseraten der T-Zellen sollte RPMI zur Anwendung im LDH-Release Assay IMDM bevorzugt kommen.

Tabelle 11 Salz- und Vitamingehalt von RPMI 1640 bzw. IMDM [76,77,78].

Salz- und Vitamingehalt mg/l		RPMI 1640	IMDM
Nicht organische Salze	NaCl	6000.00	4500.00
	KCl	400.00	330.00
	NaHCO ₃	2000.00	3024.00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	100.00	
	MgSO ₄		98.00
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1510.00	
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		125.00
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100.00	
	CaCl ₂		165.00
	KNO ₃		0.076
	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O		0.017
Vitamine	Biotin	0.20	0.013
	D-Ca Panthothenate	0.25	4.00
	Choline Chloride	3.00	4.00
	Folic Acid	1.00	4.00
	Inositol	35.00	7.20
	Pyridoxine.HCl	1.00	4.00
	Riboflavine	0.20	0.40
	Thiamine.HCl	1.00	4.00
	p-Aminobenzoic Acid	1.00	
	Cyanocobalamin	5 µg	
	Nicotinamide	1.00	
	Niacinamide		4.00
	Vitamin B12		0.013

V-2- Auswirkung von FBS versus HS auf die kultivierten T-Zellen

Block A. et al. (2008) sind zur Schlussfolgerung gekommen, dass HS eine positivere Auswirkung auf die in-vitro Expansion und Überleben von T-Zellen als FBS hat [79]. Hierbei haben Block A. et al. die Auswirkung von RHS und RFBS auf die In-vitro-Expansion und TRBV-Expression der T-Zellen geprüft. (TRBV, T-cell receptor beta (variable region)). Dafür

wurden T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert, dann wurden sie in-vitro in RPMI und in der Gegenwart von autologen FCs (feeder cells) (T-cells:FCs = 1:50) expandiert. RPMI wurde mit 10% FBS oder 10% HS supplementiert und während einer Kultivierungszeit von 28 Tagen wurden die kultivierten T-Zellen mit IL2 und CD3-Antikörper 3 mal restimuliert. Zur Evaluation der verwendeten Kulturbedingungen wurden sowohl die Expansionsaktivität der kultivierten T-Zellen (durch die Beobachtung der Kluster-Bildung mittels einer Phasen-Kontrast-Mikroskopie) als auch die während der Kultivierungszeit vorkommenden Veränderungen der TRBV (mittels Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction)) bestimmt. Die in RHS kultivierten T-Zellen hatten sowohl die höchste Expansionsaktivität als auch die niedrigsten Veränderungen der TRBV. Die Apoptose der kultivierten T-Zellen wurde nicht in dieser Studie gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass FBS signifikant Früh- und Spätapoptose der T-Zellen im Vergleich zu HS reduziert (Tabellen 3, 4, 5, 6). Das FBS kann aber T-Zellen unspezifisch stimulieren [75] und die T-Zell-Reaktion verfälschen, was die positiven Ergebnisse der Apoptosemessung von FBS-Medien in unserer Arbeit erklären könnte. Die signifikant höheren Werte der spontanen Lyse der Effektorzellen von FBS-Medium im Vergleich zu denen von HS-Medium können auch durch eine unspezifische Stimulierung durch in FBS enthaltene xenogene Proteine erklärt werden (Tabelle 8). Wegen der hohen Spontanlyse der CTLs in FBS-Medien im Vergleich zu HS-Medien sollte das HS zur Anwendung im LDH-Release Assay dem FBS bevorzugt kommen.

V-3- Auswirkung von Mercaptoethanol auf die kultivierten T-Zellen

Mercaptoethanol wird wegen seiner antiapoptotischen Wirkung für die in-vitro Kultivierung von Maus-Lymphozyten verwendet [42].

In einer Studie von Neumann.D et al. 1998 wurden Maus-Lymphoidzellen einer Pre-B-Zell-Linie zuerst in mit 10% FBS supplementiertem IMDM, in der Gegenwart von Mercaptoethanol (50µM) kultiviert und 3 mal pro Woche für eine Zelldichte von 2-2,5 x 10E5 Zellen/ml passagiert, dann wurden diese Zellen in Merc-Freiem IMDM kultiviert (nach einem Zentrifugations- und Waschprozess). Mittels der Trypanblau-Färbung konnte dann gezeigt werden, dass es nach der Entfernung von Mercaptoethanol aus dem Kulturmedium zu einem

schnellen Abfall der Anzahl der vitalen Zellen gekommen ist, wobei die vitalen Zellen nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden komplett verlorengegangen sind [80].

In der vorliegenden Arbeit hat die Vitalität der in Merc-Medien kultivierten T-Zellen signifikant niedrigere Werte erwiesen als die der in Merc-freien Medien kultivierten T-Zellen (insbesondere in IMDM-Medien) (Tabelle 1). Wegen seiner signifikant negativen Auswirkung auf die Vitalität der T-Zellen und zur Vermeidung hoher Spontanlyseraten der T-Zellen sollte Mercaptoethanol nicht zur Anwendung im LDH-Release Assay kommen.

V-4- Auswirkung der verwendeten Interleukine auf die kultivierten T-Zellen

In einer Studie von Jicha DL. et.al 1992 wurde gezeigt, dass die Auswirkung von IL7 auf die In-vitro-Expansion der T-Zellen signifikant höher als die von IL2 ist [81]. Hierbei wurden Mauslymphozyten für 60 Tage in mit 10% FBS supplementiertem RPMI-1640, in der Gegenwart von IL2 (100U/ml) allein oder von IL7 (100ng/ml) allein kultiviert. Die in IL7 kultivierten Lymphozyten konnten bis zum Tag 60 der Kultivierung expandiert werden, während die in IL2 kultivierten Lymphozyten nur bis zum Tag 43 der Kultivierung expandiert werden konnten. Die Apoptose der kultivierten Lymphozyten wurde dabei nicht gemessen. In dieser Studie von Jicha DL. et.al wurde auch die Auswirkung von IL2 allein, von IL7 allein, und von der Kombination der beiden Zytokinen auf die zytotoxische Aktivität der CTLs geprüft. Hierfür wurden die DLN (draining lymph nodes) 7 Tage nach einer Injektion von Tumorzellen in die Pfote gesammelt und in-vitro mit den Tumorantigenen restimuliert. Anschließend wurden sie in mit 10% FBS supplementiertem RPMI-1640 in der Gegenwart von IL2 (20U/ml) allein, von IL7 (100ng/ml) allein oder von beiden Interleukinen für 10 Tage kultiviert. Die zytotoxische Aktivität der CTLs wurde dann mittels Cr-51-Release Assay bestimmt. Die Zytotoxizitätsrate der in IL7 kultivierten CTLs war vergleichbar mit der Zytotoxizitätsrate der in IL2 kultivierten CTLs. Die in IL7 kultivierten CTLs zeigten jedoch eine Spezifität gegen die Target-Zellen, die man bei den in IL2 kultivierten CTLs nicht feststellen konnte. Die zytolytische Aktivität der in IL2+IL7 kultivierten CTLs war höher als die der in IL2 allein oder in IL7 allein kultivierten CTLs.

IL7 kann den programmierten Zelltod der reifen T-Zellen über die Hochregulation der antiapoptotischen Moleküle behindern [41]. IL2 kann den programmierten Zelltod der reifen T-Zellen über die Herunterregulation der antiapoptotischen Moleküle fördern [47]. Das korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der die Vitalitätswerte, Frühapoptosewerte, Spätapoptosewerte und absolute Zellzahl der frühapoptotischen und spätapoptotischen T-Zellen

von IL7-Medien signifikant mehr vitale bzw. weniger apoptotische Zellen ergaben als die von IL2- und IL2 + IL7-Medien (Tabellen 1, 3, 4, 5, 6).

In der vorliegenden Arbeit, in der die zytotoxische Aktivität der CTLs mittels LDH-Release Assay bestimmt wurde, beeinflusste IL2 die In-vitro-Expansion der T-Zellen, während IL7 eine geringere Rolle in diesem Zusammenhang spielte. Die Zellzahl von IL7-Medien war signifikant niedriger als die von IL2- und IL2 + IL7-Medien. Zellzahl von IL2-Medien ist signifikant von Tag 3 zu Tag 8 angestiegen, wohingegen die Zellzahl von IL7-Medien von Tag 3 zu Tag 8 abgenommen hat (Tabelle 2). Außerdem war die zytotoxische Aktivität der in IL7 allein kultivierten T-Zellen insignifikant niedriger als die der in IL2 allein oder in IL2+IL7 kultivierten T-Zellen. Es konnten keine Unterschiede zwischen der zytotoxischen Aktivität der in IL2 kultivierten CTLs und der der in IL2+IL7 kultivierten CTLs festgestellt werden (Tabelle 7). IL2 hatte im Gegenteil zu IL7 eine positive Auswirkung auf die Zytotoxizität der T-Zellen (ohne Signifikanz).

Wegen der signifikant positiven Auswirkung von IL7 auf die Vitalität der T-Zellen und der signifikant positiven Auswirkung von IL2 auf die In-vitro-Expansion dieser Zellen sollten IL2+IL7 zur Anwendung im LDH-Release Assay kommen.

V-5- Auswirkung von HDI auf die zytotoxische Aktivität der kultivierten T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit waren die Zytotoxizitätswerte der Versuchsgruppe mit TEL-AML1-negativen Patientenblasten in Bezug auf HDI nicht einheitlich (Tabellen 9, 10). In der Versuchsgruppe mit REH-Zellen wurde eine Tendenz der höheren CTL-Aktivität festgestellt, wenn die Effektorzellen mit HDI-generierten DC stimuliert worden waren. Signifikante Unterschiede konnten aufgrund der geringen Fallzahlen jedoch nicht gesichert werden (Tabelle 7). Das korreliert mit den Ergebnissen einer anderen Studie von Moldenhauer et al. 2004 [54], in der die Zytotoxizität der CTLs auch mittels LDH-Release Assay bestimmt wurde, wobei die Zytotoxizität der mit HDI-TGK-DC stimulierten CTLs $82,7 \pm 17,6\%$ (E/T-Verhältnis von 50:1) war, während die Zytotoxizität der mit TGK-DC stimulierten CTLs $36,8 \pm 13,4\%$ (E/T-Verhältnis von 50:1) war.

V-6- Die autologe versus die allogene Stimulierung der kultivierten CTLs

In der Versuchsgruppe mit autologen bzw. frischen Patientenblasten stammten DC und CTLs aus denselben leukämischen Blasten (d.h DC und CTLs waren HLA-identisch), wohingegen die CTLs in der allogenen bzw. kryokonservierten Versuchsgruppe zu HLA-gematchten fremden Spendern gehörten (d.h DC und CTLs waren in dieser Versuchsgruppe nur HLA-gmatcht und nicht identisch). Die Immunstimulierung von CTLs durch die autologen HLA-identischen DC ist stärker als ihre Stimulierung durch die allogenen HLA-gematchten DC. Das könnte die sehr niedrigen Zytotoxizitätswerte (0 bis 1,8%) der Versuchsgruppe mit allogenen Patientenblasten im Vergleich zu denen (14 bis 60,8%) der Versuchsgruppe mit autologen Patientenblasten erklären ($p = 0,03$) (Tabellen 9,10). Außerdem könnte die Aktivität der kryokonservierten Blasten durch die Kryokonservierung beeinträchtigt gewesen sein. Für eine bessere Aussagekraft des LDH-Freisetzungstestes sollten autologe, nicht kryokonservierte Zellen allogenen und kryokonservierten Zellen bevorzugt zur Anwendung kommen.

V-7- Die unspezifische Stimulierung der kultivierten CTLs

Bei der LDH-Freisetzungsmessung wurden die unspezifisch (durch IL) stimulierten CTLs als Kontrolle für die spezifisch (durch DC) stimulierten CTLs verwendet. Die Werte der zytotoxischen Aktivität dieser Kontrollzellen waren aber auffallend hoch (4,1 bis 19,7 %) (Tabelle 7). Eine Aktivierung dieser T-Zellen durch den Ernte- und Reaktivierungsprozess könnte als Grund dafür in Betracht gezogen werden.

VI- Schlussfolgerung

1. Die Konditionen mit IL7 alleine erhöhten die Vitalität der kultivierten T-Zellen und die Konditionen mit IL2 alleine erhöhten die Zahl und die Zytotoxizität dieser Zellen. Es sollte daher eine Kombination von IL2 und IL7 verwendet werden.
2. RPMI-Medien erhöhten die Vitalität der kultivierten T-Zellen im Vergleich zu IMDM-Medien und sollten daher zur Kultivierung dieser Zellen bevorzugt verwendet werden.
3. Mercaptoethanol reduzierte die Vitalität der kultivierten T-Zellen und sollte daher vermieden werden.
4. FBS reduzierte die Apoptoserate der kultivierten T-Zellen im Vergleich zu HS.
5. FBS erhöhte die Spontanlyse der CTLs im Vergleich zu HS. Deshalb sollte das HS zur Anwendung im LDH-Release Assay dem FBS bevorzugt kommen.
6. Autologe, nicht kryokonservierte Zellen sollten allogenen und kryokonservierten Zellen bevorzugt im LDH-Freisetzungstest zur Anwendung kommen.

VII- Zusammenfassung

Das LDH-Release Assay (Lactate-dehydrogenase-Release Assay) ist ein Zytotoxizitätstest, der auf der Freisetzung von LDH aus dem Zytoplasma von Target-Zellen, die durch die zytotoxische T-Zellen (CTLs) lysiert werden, basiert. Dieser Test ist genauer, schneller, einfacher in der Handhabung und kostengünstiger als das Chromium-Release Assay, welches als Standardmethode für die Bestimmung der T-Zellzytotoxizität gilt. Ein Nachteil der LDH-Release-Methode ist aber, dass die LDH sowohl von den Target-Zellen als auch von den CTLs freigesetzt wird. Somit ist die Spezifität der gemessenen Zytotoxizität nicht gesichert. Bei einer hohen Spontanlyse bleiben die Ergebnisse fraglich. Eine hohe Spontanlyse der T-Zellen könnte durch die Verbesserung der Kulturbedingungen dieser Zellen vermieden werden. Aus diesem Grunde sollten die Kulturbedingungen von T-Zellen optimiert werden, um die Aussagekraft dieses Testes zu verbessern. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung unterschiedlicher Kulturbedingungen (Interleukin-2 (IL2), Interleukin-7 (IL7), Roswell Park Memorial Institut-Medium (RPMI), Iscove's modified Dulbecco's Media (IMDM), fetales bovines Serum (FBS), Human Serum (HS) und β -Mercaptoethanol (Merc)) auf T-Zellen geprüft. Als Quelle für T-Zellen diente das periphere Blut gesunder Spender. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden T-Zellen isoliert. Nach der Kultivierung der isolierten T-Zellen in den verschiedenen untersuchten Kulturbedingungen, wurden die Vitalität, Zellzahl und Apoptose gemessen. Die besten Kulturbedingungen wurden zur Kultivierung von T-Zellen für die Untersuchung im LDH-Release Assay verwendet. Im LDH-Release-Test wurde auf die Zytotoxizität der kultivierten T-Zellen untersucht. Als Targetzellen wurden REH-Zellen oder frische bzw. kryokonservierte TEL-AML1-negative ALL-Patientenblasten eingesetzt. Als Effektorzellen dienten allogene T-Zellen, die man aus dem peripheren Blut gesunder HLA-gematchter Spender isolierte, oder autologe T-Zellen, die man aus den Blasten selbst in-vitro generierte.

Die Vitalität der T-Zellen war signifikant hoch bei IL7-Medien und RPMI-Medien. Dagegen war sie signifikant niedrig bei Mercaptoethanol-Medien. Die Apoptoseraten der T-Zellen waren signifikant niedrig bei IL7-Medien und FBS-Medien. IL2 hatte eine signifikant positive Auswirkung auf die in-vitro Expansion der T-Zellen und eine positive Auswirkung (ohne Signifikanz) auf die Zytotoxizität dieser Zellen. Die Spontanlyse der CTLs in FBS-Medien war signifikant höher als in HS-Medien. Die Zytotoxizitätswerte waren signifikant hoch, wo autologe, nicht kryokonservierte Zellen verwendet wurden. Nach unseren Befunden stellen

RPMI, IL2+IL7 und HS die besten Kulturbedingungen von T-Zellen dar. Darüber hinaus sollten im LDH-Freisetzungstest autologe und nicht kryokonservierte Zellen verwendet werden.

Literaturverzeichnis

1. Coico R, Sunshine G, Benjamini E. Immunology A Short Course, Fifth Edition, 2003.
2. Abbas A.K, Lichtman A.H. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System, Second Edition, 2006-2007
3. Spits H, Lanier LL and Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. Blood journal 1995, 85:2654-2670
4. Starr T.K, Jameson S.C and Hogquist K.A. Positive and Negative Selection of t-ells Annu.Rev.Immunol. 2003, 21:139-76.
5. Von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. Adv Immunol. Review. 2004, 84:201-38.
6. Michie AM, Zúñiga-Pflücker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. Semin Immunol. Review. 2002, 14(5):311-23.
7. <http://www.uni-kiel.de/immunologie/ag/kabelitz/DKWS0708/TZellen.pdf>.
8. Marrack P, Kappler J. Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. Curr Opin Immunol. Review. 1997, 9(2):250-5.
9. Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. Curr Opin Immunol. Review. 1995, 7(2):196-205.
10. Surh CD, Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. Semin Immunol. Review. 2005, 17(3):183-91.
11. Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. Nat Rev Immunol. Review. 2001, 1(1):31-40.
12. Reeves G, Todd I. Lectures Notes on Immunology, Fourth edition, 2000.
13. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008, 112(5):1557-69.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MV, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986, 136:2348-2357
15. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. Review. 1989, 7:145-73.

16. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell. Review.* 1994, 76(2):241-51.
17. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988, 240(4851):516-8.
18. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature.* 1993, 362(6417):245-8.
19. Kapp J.A. and Bucy R.P. CD8+ suppressor T cells resurrected. *Human Immunology.* 2008, 69:715-720.
20. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006, 25(2):195-201.
21. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997, 389(6652):737-42.
22. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL . Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994, 265(5176):1237-40.
23. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol. Review.* 2004, 22:531-62.
24. Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+regulatory T-Lymphocytes. *Nat Med.* 2008, 14:88-92.
25. Langenkamp A, Casorati G, Garavaglia C, Dellabona P, Lanzavecchia A, Sallusto F. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *Eur J Immunol.* 2002, 32(7):2046-54.
26. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989, 170(6):2081-95.
27. <http://www.imd-berlin.de/index.php?id=570>
28. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996, 14: 233-58.

29. http://images.google.de/imgres?imgurl=http://www.csa.com/discoveryguides/cancer/images/fig5.jpg&imgrefurl=http://www.csa.com/discoveryguides/cancer/review.php&h=427&w=570&sz=33&hl=de&start=8&um=1&usg=__kHYC_5UNmFirsPMO7IDPp8ZIupc=&tbnid=hgoheFaFNkfGsM:&tbnh=100&tbnw=134&prev=/images%3Fq%3Ddendritic%2Bcells%2Bpictures%26um%3D1%26hl%3Dde%26sa%3DX
30. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973, 137: 1142-62.
31. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991, 9: 271-96.
32. Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA. Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001, 97(9):2764-71.
33. Sundquist M, Johansson C, Wick MJ. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo. *APMIS. Review.* 2003, 111(7-8):715-24.
34. Chung NP, Chen Y, Chan VS, Tam PK, Lin CL. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histol Histopathol.* 2004, 19(1):317-324.
35. Hammer MH, Brestrich C, Mittenzweig A, Roemhild A, Sandra S, Subklewe M, Beier C, Kurtz A, Babel N, Volk H.D, and Reinke P. Generation of EBV-specific T Cells for Adoptive Immunotherapy: A Novel Protocol Using Formalin-fixed Stimulator Cells to Increase Biosafety. *J Immunother* 2007, 30:817–824
36. Rosenberg SA, Mulé JJ. Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery.* 1985, 98(3):437-44.
37. Morstyn G and Sheridan W, *Cell Therapy*, 1996.
38. Deleves PJ and Roitt IM. *Encyclopedia of Immunology*, second edition, 1998.
39. Merten O.W. Safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev. Biol.* 1999, 99:167-80.
40. Sandstrom CE, Miller WM, Papoutsakis ET. Serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. *Biotechnol Bioeng.* 1994, 43(8):706-33.
41. Wahn U, Seger R, Wahn V und Holländer G.A (Hrsg.). *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, 4 Auflage, 2005.

42. Pruett SB, Obiri N, Kiel JL. Involvement and relative importance of at least two distinct mechanisms in the effects of 2-mercaptoethanol on murine lymphocytes in culture. *J Cell Physiol.* 1989, 141(1):40-5.
43. <http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/Groettrup/Homepage/Skripte/Teaching/FA-CS-Vorlesung.pdf>
44. Abteilung Immunpathologie, Institut für Pathologie, Universität Bern. Anwendungen der Durchflusszytometrie. Praktikum Wintersemester 2006/2007. http://www.pathology.unibe.ch/Lehre/downloads/Immuno_II_Prakt_Corazza.pdf
45. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease. *The American journal of medicine.* 1999, Volume 107
46. Van Engeland M, Nieland L.J.W, Ramaekers F.C.S, Schutte B, and Reutelingsperger C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. Wiley-Liss, Inc. *Cytometry.* 1998, 31:1-9
47. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics.* 2001, 92:57-70.
48. Martin S.J, Finucane D.M, Amarante-Mendes G.P, Brien G.A, & Green D.R. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem.* 1996, 271:28753 – 28756.
49. Van Genderen H, Kenis H, Lux P, Ungethüm L, Maassen C, Deckers N, Narula J, Hofstra L & Reutelingsperger C. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nature Protocols.* 2006, 1(1).
50. Saraste A, Pulkki K. Review Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research.* 2000, 45:528–537.
51. Linnemann M, Kühl M. *Biochemie für Mediziner*, 5 Auflage, 1999.
52. Thomas L. *Labor und Diagnose*, Frankfurt/Main, TH-Books, 2005.
53. Matthew J. Allen and Neil Rushton. Use of the CytoTox 96(TM) Assay in Routine Biocompatibility Testing In Vitro. *Promega Notes Magazine.* 1994, 45, p.07.
54. Moldenhauer A, Frank R.C, Pinilla-Ibarz J, Holland G, Boccuni P, Scheinberg D.A, Salama A, Seeger K, Moore M.A.S, and Nimer S.D. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins *Journal of Leukocyte Biology.* 2004, 76:623-633.

55. Ozbek U, Sirma S, Agaoglu L, Yuksel L, Anak S, Yildiz I, Devecioglu O, Timur C, Meral A, Gedikoglu G. Prognostic significance of the TEL-AML1 fusion gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003, 25(3):204-8.
56. Downing J. R. The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance *Br. J. Haematol.* 1999, 106:296-308.
57. Downing J. R. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, 13:48-54.
58. Claxton D. F, McMannis J, Champlin R, Choudhury A. Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress *Crit. Rev. Immunol.* 2001, 21:147-155.
59. Ossenkoppele G. J, Stam A. G, Westers T. M, de Gruijl T. D, Janssen J. J, van de Loosdrecht A. A, Scheper R. J. Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemic dendritic cells. *Leukemia.* 2003, 17:1424-1426.
60. Niu Q, Zaho C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods.* 2001, 251:11-19.
61. Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods.* 1997, 200:199-201.
62. Korzeniewski C and Callewaert DM. An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods.* 1983, 64:313-320.
63. Jodi E. Goldberg, Steven W. Sherwood, Carol Clayberger. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and Two-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 1999, 224:1-9.
64. Decker T and Lohmann-Matthes M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods.* 1988, 15:61-69.
65. Bachy M, Bonnin-Rivalland A, Tilliet V, Trannoy E. Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. *Journal of Immunological Methods.* 1999, 230:37-46.

66. <http://www.biowish.com/system/uploadtechN/DC17I26EOD.pdf>
67. Bruserud O, Glenjen N, Rynningen A and Ulvestad E. In vitro culture of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells in serum-free media; a comparison of native ALL blasts, ALL cell lines and virus-transformed B cell lines. *Leukemia Research*. 2003, 27(5):455-464.
68. <http://www.leipziger-kubus.ufz.de/data/Immunsystem1597.pdf>
69. Biel M, Wascholowski V et al. Epigenetik – ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme. *Angew. Chem*. 2005, 117: 3248 – 3280.
70. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999, 96:4592-4597.
71. Wang J, Sauntharajah Y, Redner R. L, Liu J. M. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res*. 1999, 59:2766-2769.
72. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer O. H, Schimpf, A, Giavara S, Sleeman J. P, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci P. G, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001, 20:6969-6978.
73. Maeda T, Towatari M, Kosugi H, Saito H. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2000, 96:3847-3856.
74. Schmidt K, Seeger K, Scheibenbogen C, Bender R, Abdulla M, Süssmilch S, Salama A, Moldenhauer A. Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*. 2009, 85:563-573.
75. Lipson SM. Application of a serum-free medium in the growth and differentiation of human peripheral blood lymphocytes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1986, 4(3):203-14.
76. Biofluids, INC. ® - Finest in Cell Culture Products Since 1974.
77. Dubecco R. and Freeman G. *Virology* 1959, 8:396.
78. Iscove N.N. and Melchers F. *J. Experimental Medicine*, 147:923.

79. Block A, Rohde M, Erben U, Hammer M, Hummel M, Blunert K, Schultheiss HP, Volk HD, Noutsias M. Impact of cell culture media on the expansion efficiency and T-cell receptor Vbeta (TRBV) repertoire of in vitro expanded T cells using feeder cells. *Med Sci Monit.* 2008, 14(5): 88-95.
80. Neumann D, Zierke M, Martin MU. Withdrawal of 2-mercaptoethanol induces apoptosis in a B-cell line via Fas upregulation. *J Cell Physiol.* 1998, 177(1):68-75.
81. Jicha DL, Schwarz S, Mulé JJ, Rosenberg SA. Interleukin-7 mediates the generation and expansion of murine allosensitized and antitumor CTL. *Cell Immunol.* 1992, 141(1):71-83.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Reifungsstadien der Thymozyten.....	7
Abbildung 2 Interaktion zwischen APCs und T-Zellen	11
Abbildung 3 Kostimulatorische Signale der T-Zell-Aktivierung.	11
Abbildung 4 Prinzip der Durchflusszytometrie	16
Abbildung 5 Darstellung der Zellen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften in einem FSC-SSC-Koordinatensystem mit dem Festlegen eines Analysenfensters (Gate).	17
Abbildung 6 Darstellung der im Analysenfenster (Gate) festgelegten Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzen FL1, FL2 und der Quadrant-Statistik bei der Auswertung der mit dem Durchflusszytometer erfassten Daten.	18
Abbildung 7 Verlust der PS Asymmetrie während der frühen Phase der Apoptose.....	19
Abbildung 8 Darstellung der Frühapoptose, Spätapoptose und Nekrose am Durchflusszytometer.....	20
Abbildung 9 MNCs Isolierung mittels Dichtgradientenzentrifugation	30
Abbildung 10 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	41
Abbildung 11 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	41
Abbildung 12 Grafische Darstellung der Vitalität (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	42
Abbildung 13 Grafische Darstellung der Zellzahl (x10E4) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	44
Abbildung 14 Grafische Darstellung der Zellzahl (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	44
Abbildung 15 Grafische Darstellung der Zellzahl (x10E4) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	45
Abbildung 16 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	46
Abbildung 17 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	47
Abbildung 18 Grafische Darstellung der Frühapoptose (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	47

Abbildung 19 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) von der IL2 –Versuchsgruppe (Tag3 -Tag8).....	49
Abbildung 20 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	49
Abbildung 21 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).....	50
Abbildung 22 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	52
Abbildung 23 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	52
Abbildung 24 Grafische Darstellung der Spätapoptose (%) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	53
Abbildung 25 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) von der IL2-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	54
Abbildung 26 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) von der IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).	55
Abbildung 27 Grafische Darstellung der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) von der IL2+IL7-Versuchsgruppe (Tag3-Tag8).....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die gewonnenen Werte der Vitalität (%) (Tag3-Tag8).	39
Tabelle 2 Übersicht über die gewonnenen Werte der Zellzahl (x10E4) (Tag3-Tag8).....	42
Tabelle 3 Übersicht über die gewonnenen Werte der Frühapoptose (%) (Tag3-Tag8)..	45
Tabelle 4 Übersicht über die gewonnenen Werte der absoluten Zellzahl/Frühapoptose (x10E4) (Tag3-Tag8)..	48
Tabelle 5 Übersicht über die gewonnenen Werte der Spätapoptose (%) (Tag3-Tag8).....	50
Tabelle 6 Übersicht über die gewonnenen Werte der absoluten Zellzahl/Spätapoptose (x10E4) (Tag3-Tag8)..	53
Tabelle 7 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit REH-Zellen.	58
Tabelle 8 Spontane Farbintensität der Effektorzellen (RFBS+IL7- und RHS+IL7-Gruppe / Versuchsgruppe mit REH Zellen)	59
Tabelle 9 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit kryokonservierten TEL-AML1 negativen Patientenblasten.	60
Tabelle 10 Übersicht über die gewonnenen Zytotoxizitätswerte (%) der Versuchsgruppe mit frischen TEL-AML1 negativen Patientenblasten.....	61
Tabelle 11 Salz- und Vitamingehalt von RPMI 1640 bzw. IMDM.	64

Formelverzeichnis

Formel 1 Formel zur Berechnung der Zellzahl.....	29
Formel 2 Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl.....	29
Formel 3 Formel zur Berechnung der Vitalität der Zellen	29
Formel 4 Formel zur Berechnung der Zytotoxizität der Effektorzellen.....	37

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Transfusionsmedizin / Virchow Klinikum / der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

- Ich danke Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für seine hilfsreichen Anweisungen.
- Frau PD. Dr. Anja Moldenhauer danke ich sehr für die Vergabe des Themas und für ihre Betreuung.
- Frau Kerstin Schmidt und Frau Manuela Köppen danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.
- Ein großer Dank geht an alle Doktoranden der Arbeitsgruppe Moldenhauer.
- Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Seeger danke ich für die Überlassung der Patientenblasten.
- Mein Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikation

- Schmidt K, Seeger K, Scheibenbogen C, Bender R, **Abdulla M**, Süßmilch S, Salama A, Moldenhauer A. Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Leukocyte Biology*, March 2009, Volume 85: 563-573.

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Majd Abdulla, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Optimierung der Kulturbedingungen von T-Zellen zur Anwendung im LDH-Release Assay“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 30.05.12

Majd Abdulla