

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten und Kontrollgruppen

Für die Untersuchungen wurden die Patienten der Medizinischen Klinik – Abteilung für Onkologie und Hämatologie der Charite, CCM - sowie gesunde freiwillige Probanden rekrutiert. Nach ausführlicher Aufklärung gaben sie ihre schriftliche Einwilligung, 70ml Blut zwecks der HLA-Typisierung (10ml) und Bestimmung des Immunstatus (60ml) zu spenden. Die ausgewählten Patienten befanden sich in sehr unterschiedlichen Phasen ihrer Erkrankung und Therapie. Die nähere Patientencharakterisierung ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Das Gesamtkollektiv der Studie umfasste 42 Personen, geteilt in 3 Gruppen.

(1) Brustkrebspatienten: zu Beginn wurden 32 Patienten HLA-typisiert, davon waren 22 HLA A2+ und 10 HLA A2-. Die Bestimmung des Immunstatus wurde für 19 HLA A2+ und 5 HLA A2- Patienten durchgeführt, die restlichen 8 Patienten waren entweder nicht mehr in der Ambulanz erreichbar oder zogen ihre Einwilligungserklärungen zurück.

(2) Patienten, die unter anderen Karzinomen leiden (Bronchial-Ca, Colon-Ca, Merkel-Zell-Ca): 6 Patienten, davon 4 HLA A2+ und 2 HLA A2-.

(3) 2 HLA A2+ und 2 HLA A2- gesunde Probanden, s. Tabelle 2.2

Die erste Gruppe bildete das Hauptkollektiv, die zweite und dritte Gruppe dienten als Kontrollen. Die HLA-Typisierung wurde serologisch vom Institut für Gerichtsmedizin, Charite, CCM durchgeführt.

Tab. 2.1 Charakteristika der Patienten

Nr.	HLA TYP	Alter/ Geschlecht	Karzinom	Stadium am Beginn der Messung	Bisherige pharmakologische Therapie
1	A2+	77/ w	Mamma	pT1pN1M1 G3	H, B
2	A2+	35/ w	Mamma	cT2cN1M0 G2	C
3	A2+	82/ w	Mamma	pT1pNxM1 G2	C
4	A2+	76/ m	Mamma	cT2cN1M1 Gx	B
5	A2+	53/ w	Mamma	pT1pN1M1 Gx	C, H
6	A2+	63/ w	Mamma	pT3pN1M1 G2-3	C
7	A2+	68/ w	Mamma	pT1pN0M1 G3	C
8	A2+	60/ w	Mamma	pT4pN1M1 G3	B
9	A2+	75/ w	Mamma	pT3pN1M1 G2-3	C, H
10	A2+	45/ w	Mamma	cT3cN1M0 G3	C
11	A2+	33/ w	Mamma	cT3cN0M0 G2	C
12	A2+	76/ w	Mamma	pT1pN0M1 G2	C
13	A2+	50/ w	Mamma	pT2pN0M1 G2-3	H, B
14	A2+	71/ w	Mamma	pT4pN1M1 G2	H
15	A2+	60/ w	Mamma	pT2pN1M1 G2-3	I, B
16	A2+	52/ w	Mamma	pT1pN1M1 G3	B
17	A2+	39/ w	Mamma	cT2cN0M0 G1	C
18	A2+	44/ w	Mamma	pT1pN2M0 G3	C
19	A2+	66/ m	Mamma	cT4cNxM1 Gx	B
20	A2-	61/ w	Mamma	cTxNxM1 Gx	B
21	A2-	61/ w	Mamma	pT4pN1M1 G2	C
22	A2-	63/ w	Mamma	pT1pN0M1 G3	C
23	A2-	71/ w	Mamma	pT3pN1M1 G2	C
24	A2-	50/ w	Mamma	pT1pN1M1 G3	B
25	A2+	74/ m	Bronchial	pT2 N2-3 M1	C
26	A2+	65/ m	Bronchial	pT4 N1-3 M1	C
27	A2+	66/ m	Bronchial	pT2 N1-3 M1	C
28	A2-	73/ m	Colon	x	C
29	A2-	78/ m	Colon	x	C
30	A2+	64/ w	Merkel-Zell Karzinom	x	x

C- Chemotherapie , H – Hormontherapie, B – Bisphosphonate , I – Immuntherapie (Trastuzumab),
x – keine Angabe in dieser Kategorie möglich

Tab. 2.2 **Charakteristika der gesunden Probanden**

Nr.	Alter/ Geschlecht	HLA Typ
31	26/ m	A2+
32	28/ m	A2+
33	28/ m	A2-
34	27/ m	A2-

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Megafuge 3.0R	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Labor-Technik Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Wasserbad	Grant, Cambridge
Vortex	Bender und Hobein, Zürich
Gefrierschrank (-20° C)	
Kühlschrank	
Pipetten 10,50,200,1000 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenrohrchen 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturflaschen 25,75 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturplatten 96-well	Greiner, Ammerbuch
Flachbodenplatten 48-Loch	Falcon BD, Heidelberg
Rundbodenplatten 48-Loch	Biochrom, Berlin
Facs-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen

Falcon-Röhrchen 50ml	Falcon BD, Heidelberg
Tubes 15ml, 50ml	Falcon BD, Heidelberg
Einmalspritzen 10ml, 20ml	Braun, Melsungen
Butterfly-Kanülen	

2.1.3 Lösungen und Puffer

Heparin -Natrium	Braun, Melsungen
Lymphoprep	Biochrom, Berlin

PBS	NaCl 8g
	KCl 0.2g
	KH ₂ PO ₄ 0.2g
	NaH ₂ PO ₄ 1.44 g
pH 7.2, 1 l ddH ₂ O	

FACS-Puffer	1x PBS
	1% FKS
	0.1% NaN ₃

Trypanblau - Lösung	Trypanblau 1,28 g
	NaCl 8,5g

2.1.4 Medien und Zusätze

RPMI	Biowhittaker, Verviers, Belgien
X-Vivo 20	Cambrex, New Jersey, USA
DMEM	Biowhittaker, Verviers, Belgien
FCS (10% fetales Kalbserum)	Sigma, München
BSA	Polysciences Inc., Warrington
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

2.1.5 Kits

a) MHC-Tetramere

<u>Epitop</u>	<u>Antigen</u>	<u>Hersteller</u>
ILAKFLHWL	Telomerase	Proimmune, UK
STAPPVHNV	MUC1	Proimmune, UK
SLYNTVATL	HIV gag	Proimmune, UK

Alle Komplexe waren mit Phycoerythrin (PE) markiert.

b) Interferon- γ Sekretionsassay, Detection Kit Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,

bestehend aus:

- IFN- γ Fang-Reagenz (Catch reagent) – CD45-spezifischer Ak
- IFN- γ Detektions-Antikörper (Detection Antibody)

2.1.6 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Speziesspezifität</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-CD8	human	BD
Anti-CD3	human	BD
Anti-CD8-FITC	human	BD
2. Antikörper	mouse	BD

2.1.7 Peptide

Beide zur Stimulation eingesetzte Peptide wurden im Institut für Biochemie, Charité, CCM, Berlin synthetisiert. Sie wurden in 20 %DMSO gelöst und mit PBS auf eine Konzentration von 6,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Sie wurden bei -20°C gelagert.

<u>Epitop</u>	<u>Antigen</u>	<u>HLA-Restriktion</u>
STAPPVHNV	MUC1	HLA A2+
ILAKFLHWL	Telomerase	HLA A2+

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme

Zuerst wurde von Patienten 10 ml Blut abgenommen und dem Institut für Gerichtsmedizin, CCM, Berlin zur HLA-Typisierung gegeben. Bei der nächsten Visite des Patienten in der Ambulanz der Klinik erfolgte die zweite Blutabnahme. Das mittels drei 20ml Spritzen entnommene, heparinisierte Blut wurde immer am gleichen Tag aufgearbeitet. Vor der nachfolgenden Isolierung wurde das Blut nicht länger als 4 Stunden unter Raumtemperatur aufbewahrt.

Alle Arbeitsschritte mit Blut und mit Zellkulturen erfolgten an der Sterilbank. Zu keinem Zeitpunkt der Experimente wurden die Zellen eingefroren.

2.2.2 Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem Blut

Die Isolierung der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Basis für diese Trennung der mononuklearen Zellen ist der Dichteunterschied zwischen ihnen und anderen Blutbestandteilen. Aufgrund der höheren Dichte sinken die Erythrozyten durch das Ficoll, ein ungeladenes Sucrose-Polymer, nach unten, während die PBMC oberhalb der Ficoll-Schicht bleiben.

Das von den Patienten entnommene, heparinisierte Blut wurde 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt und jeweils 30 ml davon in einem 50ml Falcon Rohrchen mit 15ml Ficoll (Lymphoprep, Dichte $\rho=1,077$ g/ml) unterschichtet. Anschließend wurde dieser Ansatz 30 Minuten lang bei 2000 rpm ohne Bremse bei 20° C zentrifugiert. Als Resultat bekam man eine zwischen der Erythrozyten/Granulozyten-Schicht und dem Medium lokalisierte, milchige Interphase, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Aus dieser Interphase wurden vorsichtig die mononukleären Zellen mit einer Einwegpipette angesammelt und in ein neues 15 ml Falcon Rohrchen gegeben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde wiederholt mit RPMI 1640 verdünnt, zweimal bei 1200 rpm gewaschen (um die Anzahl der ungewünschten Thrombozyten zu reduzieren). Das am Boden des Zentrifugationsröhrchens sich befindende, lymphozytenreiche Pelet wurde aufgesammelt, der Überstand wurde verworfen.

Anschließend wurden die Zellen in 15-20 ml RPMI aufgenommen, gezählt und in einer Kulturflasche im Brutschrank zwecks der Monozytenadhärenz über Nacht in einer 25 ml Kulturflasche gelagert.

2.2.3 Kultivierung der PBMCs

Die PBMCs wurden in RPMI Medium, versetzt mit 10 % FCS, 0,3 mg/ml L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/mL Streptomycin, kultiviert. Der Brutschrank war mit 5% CO₂/ 95 O₂ begast, die Temperatur betrug 37°C. Das Volumen des Mediums wurde so eingestellt, dass die mittlere Dichte der Lymphozyten 10⁶/ml betrug.

Über die Nacht adhärten die in der Kultur noch vorhandenen Monozyten an die Plastikoberfläche der Kulturschale, die Lymphozyten verblieben im Überstand und wurden am nächsten Tag mit Pipette aufgesammelt. Die Kulturflasche wurde noch zweimal vorsichtig gespült um alle nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die PBMCs wurden einmal mit PBS gewaschen und vor dem Einsetzen in die Assays nochmals gezählt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zuerst 10µl der homogenen Zellsuspension mit Trypanblau und PBS verdünnt (zum Ausschluss toter Zellen) und anschließend in einer Neubauer-Zellkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus der in vier Quadranten der Zahlkammer gezählter Zellzahl konnte unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens der Zellsuspension die Gesamtanzahl der Lymphozyten errechnet werden. Es wurde folgende Formel benutzt:

Gesamtzahl der Ausgangslösung = 0,25 x gezählte Zellzahl x 10⁴ x Verdünnungsfaktor x Volumen der Ausgangslösung in ml

Die Zahl der so gewonnenen Lymphozyten war sehr unterschiedlich. Manche Patienten waren auf Grund der parallel durchgeführten Chemotherapie leukopen. Aus 60 ml Blut konnten zwischen 5-15 * 10⁶ Zellen gewonnen werden.

2.2.5 Tetramer-Assay

Die Durchführung des Assays erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Proimmune). Die im Brutgasschrank kultivierten Lymphozyten wurden mit Waschpuffer gewaschen und erneut gezählt. Anschließend wurden die von einem Patienten stammenden Lymphozyten (meistens in der Gesamtanzahl von 5-10 * 10⁶ Zellen) auf 3 Löcher der 48 Wellplatte verteilt und in 50µl PBS resuspendiert. Somit befanden sich in jedem der drei Löcher ca. 1.5-3 * 10⁶ Lymphozyten in

jeweils 50 µl PBS resuspendiert. Als nächster Schritt erfolgte eine 20-minütige Inkubation dieses Ansatzes mit 10µl des MHC-Peptid-Komplexes und zwar mit a) MUC1-Tetramer (MHC-STAPPVHNV), b) Telomerase-Tetramer (MHC- ILAKFLHWL) oder c) HIV gag – Tetramer (MHC-SLYNTVATL). Jedes Loch wurde mit 10 µl des jeweiligen Tetramers versetzt. Die Inkubation erfolgte in der Dunkelheit, unter Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 50 µl PBS resuspendiert und mit dem anti-CD8 Antikörper gefärbt. Diese Inkubation dauerte 30 Minuten und erfolgte im Kühlschrank.

2.2.6 Interferon-gamma Assay

Antigenspezifische Zellen sezernieren nach einer Stimulation mit einem Antigen das Interferon- γ . Dieses kann an der Oberfläche der sezernierenden T-Zelle durch ein bipolarer Antikörperkomplex („catch reagent“), welches mit einem „Arm“ an die Oberfläche der Zelle sich anheftet und mit dem anderen „Arm“ das Zytokin „einfängt“, gebunden werden. Das gebundene Interferon- γ wird anschließend mit einem weiteren, PE-markierten Ak (detection antibody) gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Das Assay wurde anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt (Miltenyi Biotech).

Zusätzliche Komponenten:

- Puffer (PBS + 0,5% BSA)
- Kulturmedium (RPMI 1640 + AB Serum)
- CD8-FITC
- Peptide

a) Stimulation

Zuerst wurden die PBMCs isoliert, mit PBS gewaschen und im Kulturmedium (0,15ml) in einer 96-Well Platte resuspendiert. Diese Verteilung garantierte die optimale Stimulationsdichte ($5 \cdot 10^6$ Zellen/cm²). Anschließend wurde 10 µg/ml des Peptids zugegeben und der Ansatz über 5 Stunden im Brutschrank (37°C) inkubiert. Ein Kontrollansatz beinhaltete Zellen und Medium, aber kein Stimulans.

b) Phase der Zytokinsekretion

In dieser Phase war es wichtig, schnell zu arbeiten und die Zellen gekühlt zu halten um die nicht-spezifische Bindung der Ak an die Zelloberfläche zu vermeiden. Die stimulierten Zellen wurden aufgesammelt und im auf 4-8°C abgekühlten PBS (10 ml) in einem 15 ml Tube gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 80µl des ebenfalls auf 4-8°C abgekühlten Kulturmediums resuspendiert und mit 20µl des IFN-γ Fang-Reagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde in das Tube 10ml des warmen (37°) Kulturmediums zugegeben und 45 Minuten im Wasserbad inkubiert, wobei das abgeschlossene Tube alle 5 Minuten geschüttet wurde.

c) Färben der Zellen mit Detektionsantikörper

Der Ansatz wurde wieder auf Eis gelegt. Die Tube wurde mit kaltem PBS aufgefüllt und 10 Minuten lang zentrifugiert (bei 4-8°C). Die so gewaschenen Zellen wurden in 80µl des kalten PBS Puffer resuspendiert. Es wurden 20µl des IFN- γ Detektions-Ak zugegeben sowie 10 µl des FITC-markierten CD8 Ak. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit 10 ml kaltem PBS abgewaschen, in FACS Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.7 Durchflusszytometrie

a) Prinzip

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung der Zellen durch quantitative Bestimmung ihrer Oberflächenstrukturen sowie intrazellulärer Proteine. Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden zuerst mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gefärbt. Anschließend werden sie perlenschnurrartig (vereinzelt durch hydrodynamische Fokussierung) durch einen gebündelten Laserstrahl geführt und in einer Durchflusszelle zur Eigenfluoreszenz angeregt.

Damit werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben, nach Rückkehr in das Ausgangsniveau emittierte Photonen sind proportional zur Menge der gebundenen Ak. Zusätzlich werden die von Zellen erzeugten Lichtbeugung und Lichtstreuung von Detektoren aufgefangen. Das Vorwärtsstreulicht (das in Richtung des

Laserstrahls gestreute Licht) korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) spiegelt die innere Struktur (Granularität) wider.

b) praktische Durchführung

Sowohl die im Tetramer-Test als auch die im IFN- γ Sekretionstest gefärbten Zellen wurden auf identische Weise analysiert. Sie wurden im FACS-Puffer resuspendiert und so auf mehrere FACS-Röhrchen verteilt, dass es nicht zur Stauung im FACS Calibur kommt.

Die zu erwartende niedrige Frequenz erzwang eine Analyse von zwischen 500 000 und 2 000 000 der PBMC per Probe. Es wurden ca.1000 Zellen pro Sekunde eingelesen. Zuerst wurde die Negativkontrolle analysiert (HIV beim Tetramer-Test, unstimulierte PBMC beim IFN- γ Sekretionstest). Im FSC/ SSC Diagramm wurde die Lymphozytenpopulation identifiziert und durch „gating“ eingegrenzt. Anschließend wurde die Auswertung mittels der Quadranten-Statistik auf die CD8+ Population beschränkt. Der Hintergrund wurde anhand der negativen Kontrolle quantifiziert und bei der Ausrechnung der Frequenzen abgezogen.

Von den 4 zu Verfügung stehenden Fluoreszenzkanälen wurden 2 genutzt: FL1 (für das Fluorochrom FITC) und FL2 (für PE). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der SPSS-Software. Mit dem U-Test nach Mann und Whitney wurden die unabhängigen Stichproben verglichen (HLA A2+ vs. HLA A2-Patienten; die gesunden Probanden vs. die Patienten).

Mit dem Wilcoxon-Test wurde die Signifikanzprüfung bei abhängigen Stichproben (bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Frequenzen bei gleichen Patienten) durchgeführt.