

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Spender

Die Evaluation der durchflußzytometrischen Methoden zum quantitativen T-Zell-Nachweis wurde mit MNZ von sechs gesunden IMP 58-66-reaktiven HLA-A2-positiven Spendern durchgeführt. Die Influenza-Peptid-Reaktivität wurde für jeden der Spender zuvor im IFN γ -ELISPOT-Assay gezeigt. Der HLA-Typ wurde serologisch durch den Mikrolymphozytotoxizitätstest im Gewebetypisierungslabor des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) bestimmt.

2.1.2 Patienten

In dieser Studie wurden MNZ von Melanompatienten untersucht, die an einem metastasierten Melanom erkrankt waren und aus deren Tumoren Melanom-Zelllinien kultiviert werden konnten. Die Patienten 2, 3, 4 und 6 wurden in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin im UKBF, Patienten Nr. 1, und 5 in der Klinik für Dermatookologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Mannheim behandelt. Das Blut wurde nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen. Informationen zum Krankheitsverlauf und zur Therapie der Patienten sind der **Tabelle 3.4** zu entnehmen.

2.1.3 Tumorzelllinien

Die Melanomzelllinien UKBF-MEL-11, -12a und SB-Mel der Patienten 2, 3 und 6 wurden in unserem Labor aus Melanom-Metastasen-Gewebe generiert. Die Linien UKRV-MEL-10, -17 und -14a der Patienten 1, 4 und 5 stellte uns großzügigerweise Prof. Dr. Dirk Schadendorf (DKFZ Mannheim, Universität Heidelberg) zur Verfügung .

2.1.4 Dichtegradient

Die Isolierung der Lymphozyten aus dem Vollblut wurde unter Verwendung von Ficoll-Hypaque-Lösung mit der Dichte 1,077 der Firma Seromed Biochrom (Berlin) durchgeführt.

2.1.5 Medien

Als Kulturmedium für die Lymphozyten diente Iscove's modified DMEM, Seromed Biochrom nach Zufügen von 10% AB-Serum (PAA, Linz, Österreich) 1 mMol L-Glutamin, 100 U/I Penicillin und 100 mg/I Streptomycin, sämtlich von Seromed Biochrom. Im Folgenden wird dieses Medium als Komplettmedium bezeichnet.

Die Melanom-Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium (Seromed Biochrom) kultiviert, welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), ebenfalls von Seromed Biochrom und 1 mMol L-Glutamin, 100 U/I Penicillin, sowie 100 mg/I Streptomycin versetzt wurde. Im Folgenden wird dieses Medium Kulturmedium genannt.

Als Einfriermedium für die isolierten MNZ diente FCS mit Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt).

2.1.6 Puffer

Dulbecco's phosphate buffered saline, nachfolgend PBS, ohne Zusatz von Magnesium oder Kalzium von Seromed Biochrom wurde als Puffer eingesetzt.

Als Waschpuffer in der intrazellulären Zytokinfärbung wurde PBS, versetzt mit 2% Endobulin (Baxter, München) verwendet.

Im Sekretionsassay® wurde folgender nach Angaben des Herstellers Miltenyi zusammengestellte Puffer eingesetzt: Aqua destillatum (Braun, Melsungen) wurde mit 0,5% Bovinem Serum-Albumin (BSA) (Polysciences, Inc., Warrington, PA) und 2mM EDTA (Sigma, Deisenhofen) versetzt, nachfolgend S-Puffer genannt.

2.1.7 Peptide und Stimulanzen

Sämtliche zur Stimulation eingesetzte Peptide wurden unter Verwendung des Applied Biosystems 432 A Peptid Synthesizers im Labor von Prof. Dr. Stefan Stevanovic in Tübingen synthetisiert. Alle Peptide wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 5mg/ml gelöst und weiter mit PBS auf eine Konzentration von 100µg/ml verdünnt. Die folgende **Tabelle 2.1** gibt Antigen, Aminosäure (AA)-Sequenz, AA-Position, HLA-Bindungsmotiv und Referenz wieder. Als Stimulanz in der Positivkontrollen diente Pokeweed Mitogen (PWM, Sigma).

Tabelle 2.1 Peptide

Antigen	AA-Sequenz	Position	HLA-Bindungs- motiv	Referenz
Influenza	GILGFVFTL	58-66	A2	BEDNAREK 1991
Tyrosinase	DSDPDSFQDY	454-463	HLA-A1	SCHEIBENBOGEN 2002 (a)
Tyrosinase	SSDYVIPIGTY	146-156	HLA-A1	KAWAKAMI 1998
Tyrosinase	GDENFTIPY	227-235	HLA-A1	(Kandidatenepitop)
Tyrosinase	EKEDYHSLY	517-525	HLA-A1	(Kandidatenepitop)
Tyrosinase	KCDICTDEY	243-251	HLA-A1	KITTLESEN 1998
Tyrosinase	YMDGTMSQV	368-376	HLA-A2	WÖLFEL 1994
gp 100	KTWGQYWGV	154-162	HLA-A2	KAWAKAMI 1995
MART1	AAGIGILTV	27-35	HLA-A2	COULIE 1994

2.1.8 Antikörper für den IFN γ -ELISPOT-Assay

Die Nitrozelluloseplatte für den ELISPOT-Assay wird mit dem monoklonalen Maus-anti-human IFN γ -Antikörper von Genzyme (Rüsselsheim) Code-Nr. 1598-00 beschichtet. Als zweiter Antikörper wird der biotinylierte Maus-anti-human IFN γ -Antikörper, Clone 4S.B3 von Pharmingen (Hamburg) eingesetzt.

2.1.9 Spezielle Reagenzien für den IFN γ -ELISPOT-Assay

Als Detergenz zum Ausspülen der Zellen aus der Platte kommt Tween 20 von Sigma (Deisenhofen) zum Einsatz. Die Streptavidin-gekoppelte Phosphatase wurde von BioRad

(München) bezogen. Als Farbstoffbildendens Substrat diente 5-Bromo-3-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau Tetrazolium (BCIP/NBT) ebenfalls von BioRad.

2.1.10 Antikörper in der Durchflußzytometrie

Die Analyse der HLA-Expression auf den Melanomzellen wurden mit monoklonalen Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-konjugierten Maus-anti-Human-Antikörpern gegen HLA-Klasse ABC, HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ (alle von Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

Zur Färbung extrazellulärer Epitope auf den Lymphozyten dienten monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper, konjugiert mit im folgenden aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffen: CD3-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), CD4-PerCP, CD8- Allophycocyanin (APC), CD45RA-Phycoerythrin (PE), CD56-PE. Alle Antikörper wurden von Becton Dickinson bezogen.

Die Expression intrazellulärer Aktivitätsmarker wurde ebenfalls mit fluoreszierenden Antikörpern untersucht: Anti-IFN γ -FITC, Anti-IL2-PE, Anti-IL4-PE, Anti-CD69-PE (sämtlich von Becton Dickinson) und Anti-Granzym B-PE (Hözl, Köln).

Der Sekretionsassay® wurde unter Verwendung des von Miltenyi (Bergisch-Gladbach) gelieferten Versuchskit durchgeführt. Das Paket enthält einen bispezifischen Anti-IFN γ -anti-CD45-Ak, die IFN γ -Catch-Reagenz und einen Anti-IFN γ -PE-Antikörper, die IFN γ -Detektions-Reagenz.

2.1.11 Spezielle Reagenzien in der Durchflußzytometrie

Als Lyse-Reagenz in der IZ-DZ wurde das von Becton Dickinson angebotene Produkt BDLyse® eingesetzt. Zum Permeabilisieren der Zellen diente FACSPERM®, ebenfalls von Becton Dickinson.

2.1.12 Instrumente und Software

Die ELISPOT-Platten wurden mit einer Stereolupe von Eschenbach in Ratingen und mit Hilfe eines computergesteuerten Lesesystem, dem ELISPOT-Reader von AID, Stassberg ausgewertet.

Die FACS-Färbungen wurden an dem Vier-Farben-Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung der dazugehörigen Software CellQuest von Becton Dickinson durchgeführt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS (SPSS; Incorporated, Chicago, IL).

2.1 Methoden

2.2.1 Ficoll-Präparation mononukleärer Zellen

Das heparinisierte Vollblut der Spender wird 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In 50ml Falcon Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) werden 15 ml Ficoll Hypaque vorgelegt, die behutsam mit 35ml des verdünnten Vollblutes überschichtet werden. Nach Zentrifugation für 30 min bei 20°C mit 2000 U/min ohne Bremse sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten entsprechend ihrer Dichte auf dem Boden des Röhrchens, während die MNZ als zart sichtbare Interphase auf der Ficoll-Phase und unter der Plasma-PBS-Phase verbleiben. Die Interphase wird vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen. Es folgt zweimaliges Waschen der MNZ mit PBS bei 2000 U/min. Nach Portionierung zu $1-2 \times 10^7$ MNZ in je 1 ml Einfriermedium werden die Zellen in Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden) überführt und bei -196°C in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung der Zellen gelagert.

2.2.2 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der MNZ erfolgt steril. Die MNZ werden im Wasserbad zügig erwärmt und sofort in 35 ml 37°C warmes Komplettmedium überführt. Nach Waschen bei 2000 U/min werden die MNZ in ein Volumen von 2 ml Komplettmedium aufgenommen und in einem 4 ml hydrophobem Zentrifugenröhrchen mit losem Deckel über Nacht im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Durchführung der entsprechenden Versuche.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgt in der Neubauer-Kammer (Sigma, Deisenhofen): Ein Aliquot der Zellsuspension wird 1:2 mit Trypanblau (Sigma)/PBS-Lösung versetzt, um die avitalen Zellen anzufärben. Unter dem Mikroskop werden vier Großquadranten der Neubauer-Kammer mit je 0,1 μl ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl der Ausgangslösung} = \text{gezählte Zellzahl} \times 0,25 \times 10^4 \times \text{Verd} \times \text{Vol}$$

(Verd = Verdünnungsfaktor, Vol = Volumen der Ausgangslösung in ml)

2.2.4 Zellkultur

Sämtliche hier eingesetzten Melanomzelllinien wuchsen adhärent und wurden in 250 ml-Zellkulturflaschen (Nunc) in Kulturmedium (s.o.) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, bzw. bei Farbumschlag des dem Medium zugesetzten Indikators als Zeichen eines starken Mediumverbrauchs. Wenn die Zellen den Kulturflaschenboden vollständig bedeckten wurden die Melanomzellen auf mehrere Flaschen aufgeteilt.

2.2.5 IFN γ -ELISPOT

Wie in der Einleitung dargelegt, ist der ELISPOT-Test oft modifiziert worden. In dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll benutzt (SCHMITTEL 1997): Zunächst erfolgt die Beschichtung der ELISPOT-Platte mit dem ersten Antikörper unter sterilen Bedingungen: Nachdem eine 96 well Mikrotiterplatte (Millititer, Millipore, Bedford, MA) für einige Minuten mit 50 μ l PBS befeuchtet wurde, werden die Vertiefungen über Nacht mit je 50 μ l einer Lösung mit Maus-anti-human-IFN γ -monoklonaler Antikörper (mAK) in einer Konzentration von 8 μ g/ml bei 4°C inkubiert. Nach Dekantieren der AK-Lösung werden die Vertiefungen gewaschen und mit Iscove's DMEM und 10% AB-Serum zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ blockiert. Anschließend kann die beschichtete Platte im Versuch eingesetzt werden. Nach Übernacht-Inkubation werden 1×10^6 MNZ in einer Konzentration von $1,67 \times 10^5$ in 200 μ l Kompletmedium pro Vertiefung auf sechs Vertiefungen aufgeteilt. Anschließend werden die Zellen mit IMP 58-66 in einer Konzentration von 10 μ g/ml versetzt. Von weiteren 1×10^6 MNZ in sechs Vertiefungen bleiben fünf Vertiefungen als Negativkontrolle unstimuliert, die $1,67 \times 10^5$ MNZ in der sechsten Vertiefung werden mit 1 μ g/ml PWM als Positivkontrolle versetzt. Nach der Auswertung wird die Anzahl der Punkte aus den fünf Vertiefungen der Negativkontrolle auf 1×10^6 bezogen. Die Platte wird 24 h bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Dann werden die MNZ durch sechsmaliges Spülen der Platte mit je 200 μ l PBS mit 0,05% Tween 20 (Sigma) aus den Vertiefungen herausgewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit je 50 μ l eines biotinylierten Maus-anti-human IFN γ mAK in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml versetzt und 24 h bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS werden die Vertiefungen mit je 100 μ l Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase in einer Verdünnung von 1:1600 bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 2 h wird die Mikrotiterplatte wiederum mit PBS gewaschen und pro Vertiefung mit 100 μ l BCIP/NBT Substrat versetzt. Nach 20-30 min wird

die sich einstellende Farbreaktion durch Waschen unter fließendem Leitungswasser abgebrochen. Unter Lichtabschluss wird die Platte bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung der Platte, d.h. das Zählen und Beurteilen der Punkte, erfolgt mit einer Stereolupe oder durch ein computergesteuertes Bild-Auswertungs-System (s. o.). Die Summe der gezählten Punkte entspricht der Anzahl der reaktiven Zellen in 1×10^6 Peptid-stimulierten MNZ.

2.2.6 Durchflußzytometrie

2.2.6.1 Färbung intrazellulärer Zytokine (IZ-DZ)

Das in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Protokoll zur intrazellulären Zytokinfärbung entspricht dem von Kern 1998 publizierten unter Berücksichtigung der Herstellerangaben der verwendeten Reagenzien (KERN 1998). Nach dem Auftauen der MNZ und Inkubation über Nacht bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂, wird die Zellsuspension in drei Aliquots zu je 2×10^6 MNZ/400 µl Komplettmedium aufgeteilt. Ein Aliquot wird mit IMP 58-66 in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. Tumorzellen in einem Verhältnis von 1:10 mit den MNZ versetzt. Außerdem wird zusätzlich je ein Aliquot ohne Stimulanz als Negativkontrolle oder nach Zufügen von 1 µg/ml PWM als Positivkontrolle bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde werden jedem Stimulationsansatz 1600 µl Komplettmedium und 20 µg Brefeldin A (BFA, Sigma) hinzugefügt, so dass die Endkonzentration an AB-Serum und BFA jeweils 10 µg/ml betragen. Nach weiteren fünf Inkubationsstunden im Brutschrank wird der Stimulationsprozeß durch Waschen mit kaltem PBS und anschließender zehnmütiger Inkubation mit 1 ml 1 mMol EDTA bei 37°C gestoppt. Nachdem die Zellen mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4°C gewaschen wurden, werden die extrazellulären Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAK durch Inkubation für 15 min auf Eis im Dunkeln gefärbt. Folgende Antikörpermengen werden eingesetzt: 10 µl Anti-CD3-PerCP, 5 µl Anti-CD8-APC, 10 µl Anti-CD45RA-PE und 10 µl Anti-CD4-PE. Anschließend werden die MNZ durch fünfminütiges Waschen bei 1700 U/min bei 4°C mit 1:10 in PBS verdünnter BDlyse® Reagenz fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt durch zehnmütige Inkubation mit 1:10 mit PBS verdünntem FACSPERM® bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4°C, werden die intrazellulären Aktivitätsmarker mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAKs durch Inkubation für 30 min im Dunkeln auf Eis gefärbt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 20 µl Anti-IFNγ-FITC-mAK, 1,25 µl des unverdünnten Anti-Granzyme B-

mAk und 10 µl des Anti-69-PE-Ak. Nachdem die Proben mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4°C gewaschen wurden, erfolgt die abschließende Fixierung der Färbung mit je 100 µl PBS + 1% Formalin.

Zusätzlich zu den mit vier Farben gefärbten Proben werden ungefärbte Proben und mit isotypenspezifischen IgG_{2a}-mAK des entsprechenden Farbstoffs gefärbte Proben angefertigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische AK-Bindung zu ermitteln. Mit jeweils nur einem der spezifischen Antikörper gefärbten Proben wird die Kompensation der Fluoreszenzen am Durchflußzytometer eingestellt.

2.2.6.2 *Färbung oberflächengebundener Zytokine (Sekretionsassay® (S-DZ))*

Die Durchführung entspricht der Arbeitsanleitung in dem von der Firma Miltenyi herausgegebenen Versuchskit (BROSTERHUS 1999). 2×10^6 PBMC werden in 1 ml Kompletmedium in hydrophobe Polystyrol-Röhrchen (Falcon) pipettiert. Die Zellsuspension wird mit IMP 58-66 in einer Konzentration von 10 µg/ml im Brutschrank stimuliert. Je eine Probe mit 1 µg/ml PWM, sowie eine Probe ohne Zusätze werden ebenfalls inkubiert. Nach sechs Stunden wird die Stimulation durch Waschen mit kaltem S-Puffer abgebrochen. Nach Resuspension der MNZ mit 80 µl kaltem Medium und Zugabe von $20 \mu\text{l}/10^7$ MNZ der IFN γ -Fang-Matrix, einem bispezifischen anti-IFN γ -anti-CD45-Antikörper-Konjugat werden die Zellen fünf Minuten unter Schütteln auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 37°C warmen Kompletmedium werden die Proben 45 min im Brutschrank inkubiert, wo sie alle 5 min aufgeschüttelt werden. Nach zehnmütigem Waschen bei 1700 U/min mit kaltem Puffer werden die Proben in FACS-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Inkubation mit 5 µl anti-CD8-APC auf Eis wird zusätzlich der IFN γ -Detektions-Antikörper, der extrazellulär an die IFN γ -Fang-Matrix gebundenes IFN γ färbt in einer Konzentration von $20 \mu\text{l}/10^7$ Zellen hinzugefügt. Die Probe wird für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden zehn Minuten mit kaltem Puffer bei 1700 U/min gewaschen und anschließend mit je 100 µl 1% Formalin in PBS fixiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.6.3 *Durchflußzytometrische Messung*

Die Proben werden im Durchflußzytometer gemessen und ausgewertet: Nach sorgfältiger Resuspension und Verdünnung mit PBS werden aus jeder Probe mit einer Geschwindigkeit von ca. 1000 Zellen pro Sekunde 250 000 PBMC eingelesen. Von jedem Spender wird eine Serie von einer unstimulierten, einer IMP 58-66-stimulierten und einer PWM-stimulierten Probe eingelesen und ausgewertet. Vor jeder zu messenden Proben-Serie erfolgt die Einstellung der Fluoreszenzintensität der Laser am Durchflußzytometer nach Messung der ungefärbten und der mit Isotypen gefärbten Proben. Das Signal dieser Proben im Durchflußzytometer entspricht der Eigenfluoreszenz, bzw. dem Signal der unspezifisch gebundenen AK. Am Gerät wird die Intensität dieser Fluoreszenzsignale auf einen Wert unter 10^1 eingestellt. Die Einstellung der Kompensation erfolgt mit Hilfe der Einzelfärbungen.

Folgendermaßen werden die Daten ausgewertet: Im Forward-Scatter-Side-Scatter-Diagramm wird die Lymphozytenregion entsprechend der Lymphozytenpopulation definiert. Weiterhin sind die gesuchten reaktiven Lymphozyten durch Expression von CD3 und CD8 definiert. Die Darstellung der Lymphozyten im CD3/CD8-Diagramm zeigt die doppelt-positive Population im oberen rechten Quadranten. Die so definierten Zellen werden dann in einem Diagramm dargestellt, das die IFN γ -Expression gegen die Granzym B-Produktion bzw. entsprechende andere Parameter, die mit der vierten Farbe gefärbt sind, darstellt. Die Frequenz der reaktiven T-Lymphozyten wird als Prozentzahl der CD3+CD8+Zellen ausgedrückt. Nach Subtraktion der Frequenz der IFN γ -produzierenden Zellen in der unstimulierten Probe von der in der spezifisch (Peptide oder Zellen) stimulierten Probe erhält man die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen. In **Abbildung 2.1** ist die Auswertung durchflußzytometrischer Daten wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die unstimulierten und die Melanomzell-stimulierten Populationen auf dieselbe CD3+CD8+-Population bezogen, was sachlich nicht zutreffend ist.

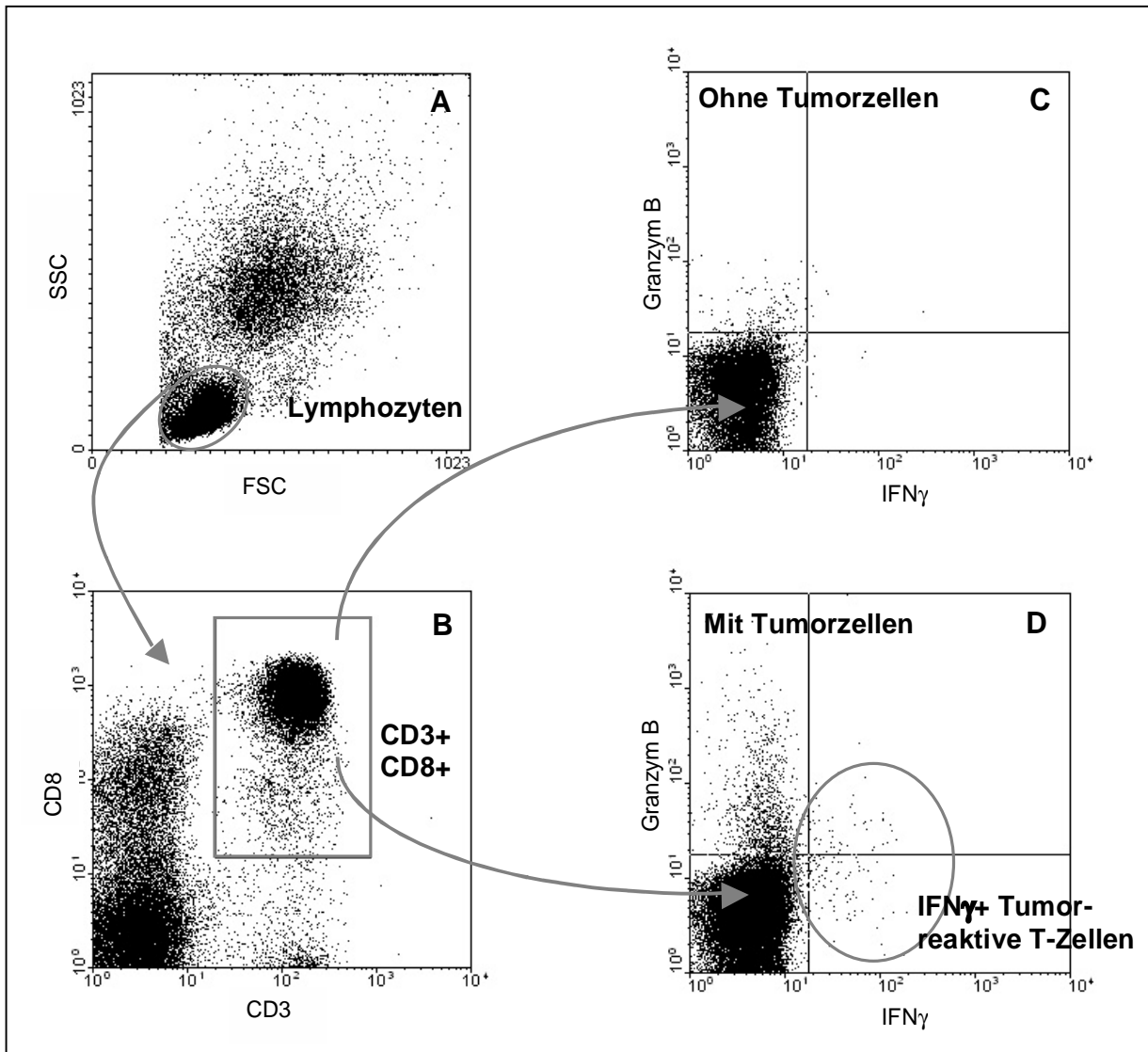


Abbildung 2.1 Darstellung der durchflußzytometrischen Daten

Darstellung im FSC-SSC-Diagramm und Definition der Lymphozytenpopulation (**A**), Präsentation der Lymphozyten im CD3-CD8-Dot plot (**B**). Abbildung der CD3+CD8+ Lymphozyten im IFN γ -GranzymB-Diagramm und Ermittlung der IFN γ -positiven Population (**C** und **D**).

2.2.7 Statistik

Die Korrelationen zwischen den antigen-spezifischen T-Zell-Frequenzen der sechs Spender in Reaktion auf das IMP 58-66 im IFN γ -ELISPOT, IZ-DZ und der S-DZ, wurde durch Pearson's Korrelationskoeffizienten unter Verwendung der SPSS-Software berechnet.