

Aus der Universitäts-Kinderklinik Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

Funktionelle Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von Natürlichen Killerzellen in Abhängigkeit von der HLA Klasse I Expression auf erythroiden Vorläuferzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eva-Maria Engels
aus Reutlingen

2003

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

1	Einleitung	5
1.1	Einführung	5
1.2	Das Immunsystem	5
1.2.1	Antigenerkennung und Verarbeitung	6
1.3	Der Major Histokompatibility Complex (MHC)	7
1.4	Zytotoxizität von Lymphozyten	8
1.4.1	Natürliche Killerzellen	8
1.4.2	zytotoxische T-Lymphozyten	10
1.5	Zellkulturen	11
1.6	Hämatopoese	12
1.7	Nabelschnurblut	14
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Reagenzien, Puffer und Farbstoffe	16
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Computerprogramme	18
2.1.4	Glas- und Kunststoffartikel	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus peripherem Blut	20
2.2.2	Anreicherung von CD34 ⁺ Stammzellen, NK-Zellen und Glykophorin A ⁺ Zellen mit der MACS-Methode	21
2.2.3	Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)	23
2.2.4	Kultivierung von erythroiden Vorläuferzellen	25
2.2.5	Gewinnung der Zellen aus der Zellkultur	27
2.2.6	Zytospinn	27
2.2.7	Anfärbung der Präparate mit der Avidin-Biotin Methode	27
2.2.8	Kultivierung der Zelllinie K562	30
2.2.9	Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Europiumfreisetzungstest	30
3	Ergebnisse	34
3.1	Zellkulturen	34
3.1.1	Phänotypisierung der Zellkulturen mit Hilfe der Durchflußzytometrie	34

3.1.2	Quantitative Analyse der HLA Klasse I Expression auf erythroiden Zellen im zeitlichen Verlauf	37
3.2	Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Europiumfreisetzungstest	42
3.2.1	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide und granulo-/monozytäre Zellen im autologen System	42
3.2.2	Zytotoxizität von NK-Zellen (allogen) und CBMC's (autolog) gegen Normoblasten	45
3.3	Analysen der Immunperoxidasefärbung	48
4	Diskussion	49
4.1	Methodenkritik	49
4.2	HLA-I Expression im zeitlichen Verlauf	51
4.2.1	HLA-I Expression auf erythroiden und granulo-/monozytären Zellen	51
4.2.2	Vergleich der HLA-I Expression auf erythroiden Zellen mit granulo-/monozytären Zellen	52
4.2.3	Schlußfolgerung aus der HLA-I Expression	53
4.3	Zytotoxizität von NK-Zellen im autologen System	54
4.3.1	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide Vorläuferzellen	54
4.3.2	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen granulo-/monozytäre Vorläuferzellen	54
4.4	Zytotoxizität von NK-Zellen im allogenen System	54
4.4.1	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Normoblasten	54
4.5	Schlußfolgerung aus den Zytotoxizitätsbestimmungen	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literatur	59
7	Anhang	64
7.1	Abbildungsverzeichnisse	64
7.2	Tabellenverzeichnisse	64
7.3	Facs Daten	65
7.4	Abkürzungen	68

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das menschliche Immunsystem beschäftigt die Forscher schon seit langer Zeit. Durch die Erforschung konnten Einblicke in die Mechanismen der bakteriellen und viralen Abwehrmechanismen gewonnen werden, was eine effektive Bekämpfung vieler Erkrankungen ermöglicht hat (u. a. die Ausrottung der Pocken) und mit der Entdeckung der Haupthistokompatibilitätsantigene wurde die Transplantationsmedizin in ihrer heutigen Form erst ermöglicht.

Auch heute gibt uns das menschliche Immunsystem, insbesondere die Mechanismen der Selbst- und Fremderkennung, das Entstehen von Autoimmunerkrankungen und Tumoren noch viele Rätsel auf. Es gibt Hinweise darauf, dass NK-Zellen und die HLA Expression an der Oberfläche der verschiedenen Blutzellen in diesem Prozess eine bedeutende Rolle zukommt, die in der medizinischen Forschung derzeit intensiv untersucht wird.

1.2 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus hat verschiedene Systeme sich vor fremden Mikro- und Makroorganismen zu schützen.

Zum einen das natürliche oder angeborene Immunsystem, welches aus Haut, Schleimhäuten, Zellmembranen, Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und Zytokinen besteht. All diesen Zellen und Strukturen ist gemein, dass sie schon vor dem ersten Kontakt des Organismus mit einem Antigen (Ag) vorhanden sind und fremde Substanzen im eigentlichen Sinne nicht unterscheiden können.

Die erworbene Immunität ist spezifisch gegen Mikroorganismen gerichtet und entsteht durch Kontakt von B- und T-Lymphozyten mit einem fremden Ag. Das erworbene Immunsystem besitzt drei Besonderheiten: Erstens besitzt es ein immunologisches Gedächtnis was dazu führt, dass bei erneutem Kontakt mit einem, dem Wirt bekannten, Ag schneller und effizienter gegen das Ag vorgegangen und es vernichtet werden kann. Zweitens hat es die Fähigkeit das natürliche Immunsys-

tem gezielt an einen Ort zu lenken und für die spezielle Abwehr ein zu setzen und drittens muß es Strukturen im menschlichen Organismus geben, welche den Lymphozyten eine Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd ermöglicht. Heute ist allgemein anerkannt, dass den Haupthistokompatibilitätstantigenen des Menschen eine bedeutende Rolle in der Selbst- und Fremderkennung zukommt. Unklar ist jedoch, welche Mechanismen eine Abweichung des physiologischen Vorgangs im Menschen bewirken, die Autoimmunerkrankungen, Allergien und Tumorentstehung zur Folge haben kann [Abbas et al., 1996; Breuer et al., 1999, Handgretinger et al. 1999].

1.2.1 Antigenerkennung und Verarbeitung

Das spezifische Immunsystem gliedert sich in zwei Systeme. Das humorale und das zellvermittelte Abwehrsystem. Die Hauptvertreter sind die B- und T-Lymphozyten, sie stammen von den im Knochenmark ansässigen pluripotenten Stammzellen ab und siedeln sich nach einem Reifungsprozeß in den sekundär lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Tonsillen) an.

Der Hauptvertreter der humoralen Abwehr sind die B-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten tragen an ihrer Membranoberfläche Antikörper (Ak), diese wurden von Behring und Kitasato 1890 entdeckt. Trifft ein Ag auf einen Ak wird eine Aktivierungskaskade in Gang gesetzt, welche dazu führt, dass sich B-Zellen in Ak bildende Plasmazellen umwandeln; je nach Antikörper Subklasse wird der Ak an der Zelloberfläche exprimiert (IgM, IgG, IgE) oder ins Blut sezerniert (IgA) [Breuer et al., 1999].

Der Hauptvertreter der zellvermittelten Abwehr sind die T-Lymphozyten. Sie lassen sich anhand bestimmter Oberflächenmoleküle, in drei funktionell unterschiedliche T-Zell Subpopulationen, einteilen. T_H-Zellen (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻), zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺) und Gedächtniszellen (CD3⁺ CD45 R0⁺). T-Lymphozyten bilden keine Ak, haben aber einen Rezeptor der Ak ähnlich aufgebaut und membranständig ist. Im Unterschied zu den B-Lymphozyten erkennen T-Lymphozyten körperfremde Strukturen nur, wenn diese zusammen mit Proteinen des Major Histokompatibility Complex (MHC) den T-Zellen präsentiert werden. Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten wird vor allem durch den Weg wie ein Ag in den

Organismus gelangt bestimmt. MHC I Moleküle präsentieren normalerweise intrazelluläre Erreger, extrazelluläre Keime werden mit MHC II Molekülen präsentiert. Auf Grund der Rezeptorstruktur können T_H-Zellen nur an MHC II-, CTL nur an MHC I Moleküle binden. Nach Aktivierung führen CTL zur Lyse der Antigen präsentierenden Zelle (APC), T_H-Zellen rekrutieren B-Lymphozyten und Zellen der unspezifischen Abwehr und führen über einen indirekten Weg die Vernichtung der Zelle herbei [Abbas et al., 1996].

1.3 Der Major Histokompatibility Complex (MHC)

Der MHC ist eine Region von polymorphen Genen, dessen Genprodukt auf der Oberfläche einer Vielzahl von kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Der MHC wurde von George Snell und Kollegen bei der Untersuchung von Hauttransplantaten an Inzucht Mausstämmen entdeckt. Beim Menschen legte die Behandlung mit allogenen Bluttransfusionen und Organtransplantationen den Verdacht auf äquivalente Gene nahe. Da die Ag zuerst auf menschlichen Leukozyten entdeckt wurden nannte man das MHC-äquivalente Genprodukt beim Menschen Humanes Leukozyten Antigen (HLA) [Abbas et al., 1996]. Die HLA-Gene liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, wobei es zwei Arten von HLA-Genprodukten gibt. Sie werden in Klasse I und Klasse II eingeteilt.

HLA-I (-A, -B, -C, -E) kommt auf fast allen kernhaltigen Zellen vor, es ist aus zwei Polypeptidketten aufgebaut, wovon eine hochvariabel, die andere konstant (β_2 -Mikroglobulin) ist.

HLA-II (-DQ, -DQ, -DR) wird nur von immunkompetenten Zellen exprimiert: B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Endothelzellen. HLA-II besteht ebenfalls aus zwei Polypeptidketten, die beide hochvariabel sind.

Die HLA-I Moleküle zeigen den T-Lymphozyten, welche Strukturen körpereigen und welche körperfremd sind. Dieser Vorgang erfolgt im Thymus bei der sogenannten Prägung durch positive Selektion. Dabei treffen die unreifen T-Lymphozyten auf körpereigene Strukturen in Verbindung mit HLA-I Molekülen; es überleben nur die Zellen, welche an diesen Komplex binden, die Bindung aber zu keiner Aktivierung des T-Lymphozyten führt [Breuer et al., 1999; Wahn et al., 1999].

1.4 Zytotoxizität von Lymphozyten

1.4.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden von Rosenberg, Herberman und Kiessling in den siebziger Jahren erstmals beschrieben [Rosenberg et al., 1972, Herberman et al., 1975, Kiessling et al., 1975]. NK-Zellen machen 5-15 % der im peripheren Blut zirkulierenden mononukleären Zellen aus und werden, was Morphologie, Phänotyp und Funktionseigenschaften angeht, als eine Gruppe von Lymphozyten mit besonderen Eigenschaften angesehen. Auf Grund ihrer Morphologie, es sind große, lymphoide Zellen mit zytoplasmatischen Granula, wurden sie früher auch als Large Granular Lymphocyte (LGL) bezeichnet. Phänotypisch handelt es sich um $CD56^+$, $CD16^+$, $CD94^+$ und $CD3^-$ Zellen [Valés-Gómez et al., 2000]. NK-Zellen vermitteln eine natürliche Immunität, da sie in der Lage sind eine spontane zytotoxische Aktivität gegen virusinfizierte Zellen, einige Mikroorganismen und Tumorzellen zu entfalten. Diese zytotoxische Aktivität wird nicht MHC-restringiert vermittelt [Abbas et al., 1996].

Welche physiologische Funktion NK-Zellen zukommt ist bis heute nicht vollständig geklärt, derzeit vermutet man, dass NK-Zellen neben den Eigenschaften Mikroorganismen und Tumorzellen aus dem Organismus zu eliminieren auch eine Rolle bei der Hämatopoese und in der Schwangerschaft zukommt [Valés-Gómez et al., 2000]. Auch ist bisher nur teilweise erforscht, wie NK-Zellen ihre Zielzellen erkennen und welche Strukturen daran beteiligt sind.

Schon länger bekannt ist die Antikörper abhängige Zytotoxizität von NK-Zellen, die über CD16 in Gang gesetzt wird [Wahn et al., 1999].

1990 haben Ljunggren und Karre eine negative Korrelation zwischen der NK-Sensibilität von Zellen und der HLA-I Expression an der Zelloberfläche dieser Zellen beobachtet. Daraus wurde die "missing self" Hypothese abgeleitet. Sie besagt, dass die Funktion von NK-Zellen darin besteht, den Körper auf Zellen zu überwachen, die ungenügend oder keine HLA-I Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren [Ljunggren and Karre, 1990]. Diese Hypothese läßt sich heute nur noch teilweise halten. Man ist sich heute darüber einig, dass NK-Zellen sowohl autologe als auch allogene HLA Moleküle an der Oberfläche von Zellen erkennen, aber auch darüber,

dass eine große Anzahl an verschiedene Rezeptoren, die hemmende und aktivierende Signale übermitteln, an der Regulation der NK-Zell Funktion beteiligt sind und dass eine NK-Zelle mehrere dieser Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimiert.

Es gibt viele Hinweise darauf, dass NK-Zellen Targetzellen, Rezeptor- und HLA-Allele spezifisch erkennen [Valés-Gómez et al., 2000; Colonna, 1996].

Eine wichtige Rollen bei der Steuerung der NK-Zell Funktion scheint nach dem aktuellen Stand der Forschung zwei Rezeptorgruppen zu spielen:

CD94/NKG2 gehört zur Gruppe der lectin-like Rezeptoren und wird zu 90% von NK-Zellen ($CD2^+$, $CD3^+$, $CD16^+$, $CD56^+$) und zu einem geringeren Teil von zytotoxischen T-Lymphozyten vom γ/δ - und α/β -Typ exprimiert [Valés-Gómez et al., 2000; Chang et al., 1995]. Der Ligand auf der Zielzelle scheint HLA-E zu sein. Die Erkennung von HLA-A und -B Moleküle soll nach neuen Erkenntnissen indirekt über HLA-E erfolgen [Braud et al.; Borrego et al., 1998].

Der zweite Rezeptor, KIR (Killer-cell Immunglobulin-like Receptor) gehört zu den Immunglobulin-like Rezeptoren. KIRs kommen neben NK-Zellen auch auf T-Zellen vor [Ferrini et al., 1994]. Ein Ligand für KIR ist HLA-C bzw. spezifische HLA-C Allele [Colonna et al 1993; Ciccone et al., 1992].

In beiden Rezeptorgruppen hat man hemmende (CD94/NKG2-C bzw. p58) und aktivierende (CD94/NKG2-A bzw. p50) Rezeptoren gefunden, wobei für beide Rezeptorgruppen gilt, dass das hemmende Signal dem aktivierenden Signal überlegen ist [Houchins et al., 1997; Moretta M. et al., 1995].

Neben HLA-C und -E, scheint auch HLA-G einen Schutz der Zelle gegen die Lyse von NK-Zellen zu vermitteln [Perez-Villar et al.; Soderstrom et al.; Mandelboim et al., 1997].

Kontrovers wird zur Zeit der Einfluß der HLA-präsentierten Ag auf die Interaktion zwischen NK-Zellen und Ligand diskutiert. Dieser neue und interessante Aspekt muß in nächster Zeit sicher noch intensiver erforscht werden [Valés-Gómez et al., 2000].

1.4.2 zytotoxische T-Lymphozyten

Eine nicht MHC restringierte Zytotoxizität, lässt sich auch bei einer Subpopulation von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) beobachten. Bei diesen Zellen handelt es sich um CD3⁺, CD8⁺, CD4⁻ T-Zellen die einen T-Zell Rezeptor (TCR) tragen, der sich aus einer γ und δ Kette zusammensetzt. Diese sogenannten γ/δ T-Zellen kommen im peripheren Blut zu 2-5% vor [Wahn et al., 1999, Parker et al., 1990].

Ungefähr 90% der CTL exprimieren NKRs (Natural Killer Cell Receptors), die ebenfalls sehr häufig auf NK-Zellen und auf wenigen α/β T-Lymphozyten nachgewiesen wurden [Brenner et al., 1988].

Bindet der NKR an MHC-I Moleküle wird durch diese Interaktion eine Hemmung der γ/δ T-Zellen ausgelöst. In ähnlicher Weise wie bei NK-Zellen führt eine verminderte oder eine fehlende Expression von MHC-I Molekülen zu einer Aktivierung der γ/δ T-Zelle [Moretta et al., 1992, Moris et al., 1999].

Man vermutet, dass weitere Liganden an der Aktivierung der γ/δ T-Lymphozyten beteiligt sind. Ein solcher Ligand, der derzeit noch unbekannt ist, scheint auf B-Zell-Lymphomen gehäuft exprimiert zu werden und Ähnlichkeit mit bakteriellen Phosphoantigenen zu haben [Fisch et al., 1997, Moris et al., 1999]. Exprimiert eine Zielzelle den vermuteten Liganden (z. B. Daudi Zellen) führt die Interaktion von γ/δ T-Zellen und Ligand zur Zytokinproduktion und Proliferation der γ/δ T-Lymphozyten. Die Funktion von γ/δ T-Zellen und NK-Zellen sind sich sehr ähnlich, man vermutet heute, dass γ/δ T-Zellen bestimmte Tumorzellen spezifischer erkennen können als NK-Zellen [Fisch et al., 2000, Moris et al., 1999].

Eine weitere Funktion von γ/δ T-Zellen könnte die Vermeidung von Autoimmunität sein. Die hemmende Wirkung von NKRs könnte dazu dienen, die Immunantwort zu drosseln, die durch normales Gewebe und fremde Ag induziert wird. Dieser protektive Effekt kann durch verschiedenen Veränderungen gestört werden: z. B. vermehrte Expression an Liganden für γ/δ T-Zellen, eine Reduktion der NKR Expression auf γ/δ T-Zellen oder eine verminderte Expression von HLA-I Molekülen auf körpereigenen Zellen [Moris et al., 1999]. Eine Störung in diesem sensiblen Gleichgewicht kann gravierende Auswirkungen haben. Kommt es zu einer Vermehrung und Aktivierung von γ/δ T-Zellen sind sie in der Lage erythroide Vorläuferzellen (BFU-E) zu

zerstören und eine Aplasie der roten Blutzellen auszulösen [Handgretinger et al., 1999, Hara et al., 1990].

1.5 Zellkulturen

Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts ist es erstmals gelungen Granulozyten und Makrophagen ex vivo zu kultivieren. Seit dieser Zeit sind verschiedene Techniken weiterentwickelt worden, so dass heute ein Großteil an hämatopoetischen Zellen ex vivo generiert werden kann. Trotz viele Bemühungen weisen die ex vivo generierten Zellen funktionelle Defizite auf z. B. zeigen sie in Kultur eine unvollständige Ausreifung und die Generierung von echten Stammzellen ist bis heute noch nicht gelungen [Metcalf, 1984, McNiece et al., 2001].

Der Prozeß der Hämatopoese ist bis heute nicht vollständig verstanden, schon seit längere Zeit geht man davon aus, dass Interaktionen zwischen Zellen, Stroma, Wachstumsfaktoren und Mikroumgebung des KM eine entscheidende Rolle bei der Regulierung und Differenzierung der Hämatopoese zukommt [Verfaillie, 1998, Metcalf, 1984].

Die Generierung von hämatopoetischen Zellen ist für viele medizinische Anwendungen nützlich.

So stellt es eine einfache Möglichkeit dar, noch mehr über die Regulierung und Zell-Zellinteraktionen der Hämatopoese zu erforschen. Mit der Generierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen könnte man die Zeit der Aplasie nach Chemotherapie verkürzen, was das Infektionsrisiko reduzieren und somit lebensbedrohliche Komplikationen vermindern würde.

Die Arbeitsgruppe von Brugger et al. konnte zeigen, dass CD34⁺ Stammzellen in einer Flüssigkultur mit einem Cocktail aus SCF, Erythropoetin, IL-1, IL-3 und IL-6 die besten Ergebnisse bezüglich Ausbeute an kernhaltigen Zellen und klonaler Expansion an Vorläuferzellen liefern [Brugger et al., 1993].

Für die Generierung von determinierten granulozytären Vorläuferzellen eignet sich ein Mix aus SCF, IL-6, Anti-IL-3 Rezeptorantagonist (Daniplestim), CSF-G und Flt3 Ligand [Scheding et al., 2000].

In den letzten Jahren wurden verschiedene klinische Studien durchgeführt, in welchen Tumorpatienten mit ex vivo expandierten Zellen behandelt wurden. Die Zeit der Aplasie konnte nicht signifikant verkürzt werden, aber es zeigte sich eine Verbesserung des Engraftments von neutrophilen Granulozyten [McNiece et al., 2001].

Auch hätte man die Chance mittels Gentransfer Erkrankungen von hämatopoetischen Stammzellen zu heilen. Ein weiterer Bereich wäre die Transfusionsmedizin. Könnte man Blutzellen ex vivo herstellen, ließe sich das Risiko für parenteral übertragbare Infektionen gegen null minimieren [Mantalaris et al., 1998].

1.6 Hämatopoese

Die Hämatopoese stellt einen komplizierten Prozess dar in welchem pluripotente Stammzellen proliferieren und differenzieren. Durch diesen Prozeß wird das gesamte Spektrum an hämatopoetischen Zellen ermöglicht.

Alle im Blut zirkulierende Zellen sind Abkömmlinge einer sehr geringen Anzahl an pluripotenten CD34⁺ Stammzellen. Diese CD34⁺ Stammzellen machen 0,01% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark von gesunden Erwachsenen aus.

Mit zunehmender Differenzierung geht die Eigenschaft zur Selbsterneuerung verloren. Ist eine Vorläuferzelle auf eine Zelllinie festgelegt, wird sie als determinierte Stammzelle bezeichnet.

Heute sind über 30 hämatopoetische Zytokine und Wachstumsfaktoren bekannt, die den Prozeß der Hämatopoese regulieren. Neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird den Zell-Zellinteraktionen, dem Zell-Matrixkontakt und Adhäsionsrezeptoren (wie z. B. Integrinen), die sich in der extrazellulären Matrix befinden, eine bedeutende Rolle zugeschrieben [Veiby et al., 1997, 1996, Verfaillie, 1998].

Erythrozyten entwickeln sich aus undifferenzierten Vorstufen im Knochenmark. Die primitivste Erythrozytenvorstufe, die aus KM und peripherem Blut kultiviert werden kann, wird als Erythroid Burst Forming Unit (BFU-E) bezeichnet und ist in der Zellkultur nach 10 bis 15 Tagen nachweisbar. BFU-E bilden große Kolonien die rötlich schimmern (siehe Abbildung 2, Kapitel 3.1). Die Erythroid Colony Forming Unit

(CFU-E) stellt eine reifere Vorstufe der Erythrozyten dar, sie ist nach 4 bis 7 Tagen in Kultur als kleinerer Klon erkennbar [Sieff et al., 1982]. Unter dem Einfluß von Erythropoetin differenzieren CFU-E über die Stufen des Proerythoblasten und Normoblasten zum Retikulozyten und am Ende zum reifen, kernlosen Erythrozyten. Die Differenzierung von Granulo- und Monozyten verläuft in analoger Weise zur Erythropoese (siehe Abbildung 3, Kapitel 3.1). Granulo- und Monozyten zeigen ein zweigipfliges Wachstum, so sind frühe Kolonien an Tag 7, späte Kolonien an Tag 14 in Kultur nachweisbar [Isselbacher et al., 1995].

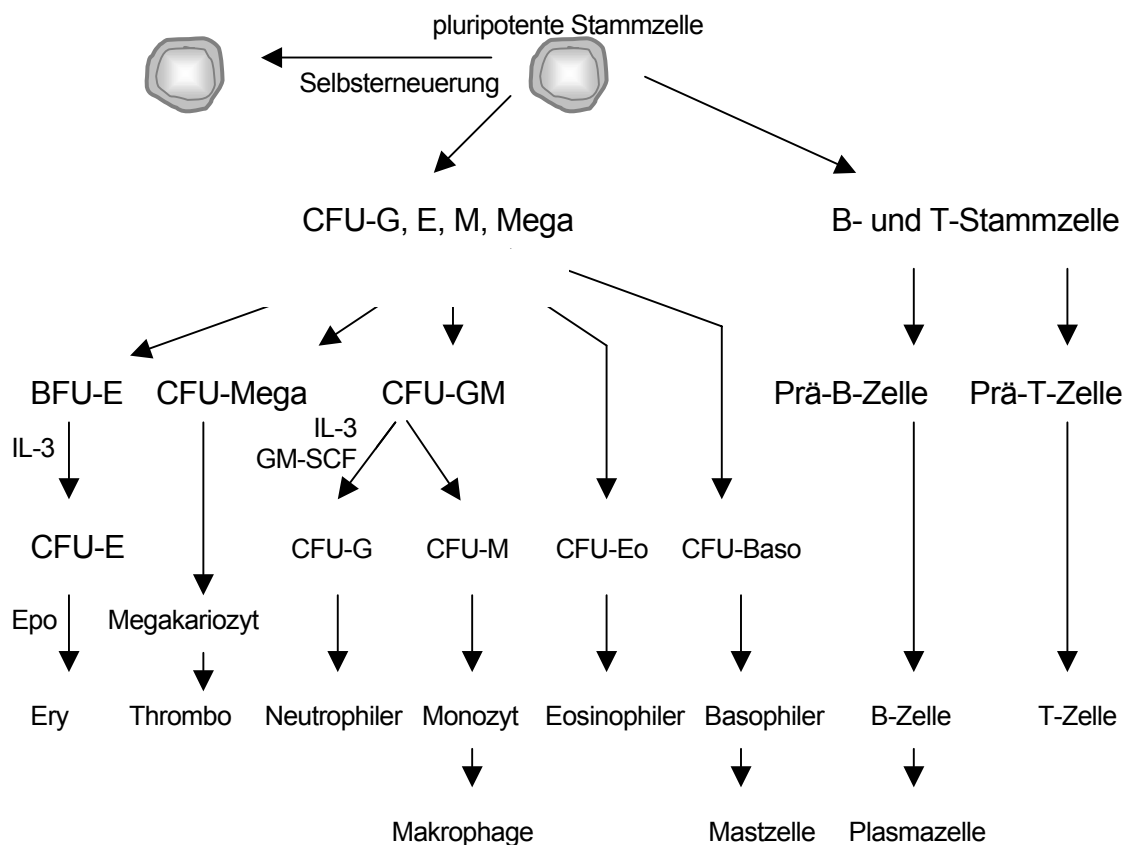


Abbildung 1: Übersicht über die Hämatopoese; Abkürzungen: CFU= colony forming unit, BFU= burst forming unit, E=erythroid, GM=Granulo-/Monozyten, IL= Interleukin, Epo= Erythropoetin.

Noch ist unklar wie die Proliferation und Differenzierung im KM reguliert wird. Es gibt Hinweise darauf, dass vorübergehend exprimierte Oberflächenmoleküle eine regulierende Funktion zukommen könnte.

Die Regulierung der Erythropoese durch Erythropoetin erfolgt auf der Stufe von CFU-E und man weiß heute, dass BFU-E von Erythropoetin unabhängig reguliert wird [Adamson et al., 1978]. Man vermutet, dass eine Regulierung über sezernierte Faktoren von Nachbarzellen, die u. a. von T-Lymphozyten und Makrophagen gebildet werden, erfolgt [Nathan et al., 1978, Cline et al., 1979].

Auch hat man beobachtet, dass Komplement bindende monoklonale Ak eine Hemmung oder Lyse der erythroiden Vorläuferzellen bewirken können. Ebenso könnte HLA-DR eine Rolle bei der Regulierung der frühen Hämatopoese spielen, da HLA-DR auf BFU-E und CFU-GM exprimiert wird, CFU-E hingegen kein HLA-DR an der Oberfläche trägt [Robinson et al., 1981, Sieff et al., 1982].

1.7 Nabelschnurblut

Seit 15 Jahren wird Nabelschnurblut (CB=Cord Blood) von Immunologen und Hämatologen beforscht. CB bietet die Möglichkeit größere Mengen an Blut (20-100 ml) von Neugeborenen zur Verfügung zu haben, dadurch werden auch funktionelle Untersuchungen bei diesem Probandenkollektiv möglich. Wie sich das Immunsystem Neugeborener von Erwachsenen oder Kindern unterscheidet ist derzeit Gegenstand intensivster Forschung. Immunologen erhoffen sich Aufschlüsse über die Regulierung der Th₁ und Th₂ Antwort zu finden. Für Hämatologen bieten sich neue Möglichkeiten bei der Knochenmarkstransplantation (KMT).

1988 wurde die erste KMT mit CB durchgeführt. Die Verwendung von CB minimiert das Risiko einer graft-versus-host disease (GVHD), da die Lymphozyten von Neugeborenen noch unreif sind [Rocha et al., 2000]. CD34⁺ Stammzellen aus CB proliferieren stärker als Stammzellen aus KM oder aus peripherem Blut. Dies verkürzt die Zeit der Aplasie und fördert ein schnelles Anwachsen des Transplantates und CB ist schnell verfügbar, da die Proben ABO- und HLA-typisiert in Nabelschnurblut Banken gelagert werden [Gluckman et al., 2001 und 1997].

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit entstand aus der Beobachtung heraus, dass NK-Zellen und CTL vom γ/δ^+ -Typ eine zytotoxische Aktivität in der Abwesenheit von HLA-I Molekülen zeigen und dieses Phänomen näher untersucht werden soll.

Ein Ziel dieser Arbeit war es erythroide Zellen, aus $CD34^+$ Stammzellen in einem nicht flüssigen Medium zu kultivieren, um die HLA-I Expression auf diesen Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgen zu können.

Ein weiteres Ziel war es, die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide und granulö-/monozytäre Vorläuferzellen im autologen System zu untersuchen und diese miteinander zu vergleichen, um mögliche Unterschiede in der zytotoxischen Eigenschaft von NK-Zellen in Abhängigkeit von der HLA-I Expression zu erkennen.

Als drittes und letztes sollen Glykophorin A^+ Zellen aus Nabelschnurblut angereichert werden und die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide Zellen im allogenen System untersucht werden. Die Ergebnisse sollen mit den Versuchen, die im autologen System durchgeführt werden, verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Puffer und Farbstoffe

allgemeine Reagenzien

PBS spezial (mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco
EDTA Puffer 20 ml 0,25 Mol/l; pH: 8,0	Life Technologies
Ficoll Separating Solution	Biochrom KG
Collagenase Typ IV (<i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma
Bovine Serum Albumin V 7,5 % (BSA)	Gibco

Medium

RPMI 1640	Biochrom KG
10 % Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG
Penicillin 100 U/ml	Biochrom KG
Streptomycin 100 µg/ml	Biochrom KG
L-Glutamin 5 mM	Biochrom KG
Hepes-Puffer 25 mM	Biochrom KG

Medium für die Durchflußzytometrie

500 ml PBS spezial	Gibco
10 ml EDTA-Puffer	Biochrom KG
FACS ^R Brand Lysing Solution	Becton Dickinson
Flow TM Solution	Becton Dickinson

Medium für die MACS-Anreicherungen

500 ml PBS spezial
36 ml BSA
10 ml EDTA Puffer

Zellkulturmedium "Erythro"

0,1 % human purified collagen proteins
 25 % FCS
 1 % BSA
 2 mM L-Glutamin
 100 µM 2-β-Mercaptoethanol
 100 ng/ml rh IL 3*
 2 U/ml rh Erythropoetin*
 100 ng/ml rh Stem Cell Factor (SCF)*

Zellkulturmedium "GM"

0,1 % human purified collagen proteins
 25 % FCS
 1 % BSA
 2 mM L-Glutamin
 100 µM 2-β-Mercaptoethanol
 20 ng/ml rh SCF
 10 ng/ml rh GM-CSF
 20 ng rh G-CSF

in Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium

Die semisoliden Medien wurden in der oben beschriebenen Zusammenstellung von der Firma Laboratoire HEMERIS geliefert.

Gegen Ende meiner Arbeit ist das Zellkulturmedium "Erythro" ausgegangen und Laboratoire HEMERIS hatte seine Produktion eingestellt, so dass ich die mit * gekennzeichneten Zytokine zu dem noch vorhandenen Grundmedium hinzufügte.

Die verwendeten Zytokine wurden in höchster Reinheitsstufe von der Firma R+D Systems bezogen.

Immunperoxidase-Färbung

Aceton 100 %	Merck
Methanol 100 %	Merck
Formalin 30 %	Merck
Tris NaCl-Puffer	Merck
Primärantikörper Ig Maus (monoklonal)	Dako
Sekundärantikörper Kaninchen (monoklonal)	Dako
Avidin-Biotin-Komplex	Merck
Alkohol (96 %, 100 %, Xylol)	Merck
Benzidin	Sigma
Hämalaun	Merck
Pertex (Eukid)	Mechte

Europiumfreisetzungstest

Europium Solution	Wallac
BATDA Ligand	Wallac
Zelllinie: K562 (Erythroleukämie)	

Sonstiges

Vetren ^R 200 (2 ml Ampullen)	Promonta
Ampuva 500 ml	Fresenius
HCL	Merck
Trypanblau	Sigma
Triton X 10 %	Sigma
Polyglobulin (Oktagam)	Universitätsapotheke

2.1.2 Geräte

Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Brutschrank (Hera Cell)	Heraeus Instruments
Zentrifugen: Rotina 48 R	Hettich
Rotixa RP	
Vortexer (Reax Top)	Heidolph
Drehschüttler	Heidolph
Mikroskope: Olympus C x 40	Olympus
Olympus I x 50	
Feinwaage	Sartorius
Viktor 1420 Multilable Counter	Wallac
FACScan	Becton Dickinson
Pipettierhilfe: (Pipettboy)	Abimed

2.1.3 Computerprogramme

Lysis (FACS Steuerung und Auswertung)	Becton Dickinson
Victor	Wallac

2.1.4 Glas- und Kunststoffartikel

1, 5, 10 und 50 ml einmal Spritzen	Braun
Butterfly 19	Venisystems
PPN-Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner
Sterile Plastikpipetten 1, 2, 5,10 und 25 ml	Greiner
Pipettenspitzen weiß, blau, gelb	Eppendorf
"FACS "-Analyseröhrchen	Falcon
Petrischalen rund (ø 3,6 cm)	Zentrallager
Petrischalen viereckig (12 x 12 cm)	Zentrallager
Zellkulturflaschen (250 ml)	Greiner
96-Lochplatte round/flat	Greiner
Neubauer Zählkammer	Brandt
mini MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH
midi MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH
Zellsieb 70 µm	Falcon
Objektträger 76 x 26 mm	Langenbrinck
Deckgläser	Menzel
Fettstift (Dako Pen)	Dako
Abtupfpapier (Blotting Paper)	Easyclone™
Nylonstreifen (Nylon sifting fabric)	Easyclone™

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus peripherem Blut

Durchführung:

Periphere Blut Monocyten (PBMC) wurden nach der Methode von Böyum [Böyum, 1968] aus venösen Blut gesunder Spender isoliert.

150 ml heparinisiertes Vollblut werden mit 100 ml PBS verdünnt.

Das Blut wurde auf achtmal 15 ml Trennmedium (Ficoll) bei Raumtemperatur aufgeschichtet und anschließend bei 20 °C und 800 G für 15 Min. zentrifugiert. Aus der Interphase wurden die mononukleären Zellen entnommen und dreimal gewaschen. Zentrifugeneinstellung: 10 °C, 450 G, 12 Min. (1. Waschschrift), 4 °C, 400 G, 8 Min. (2. und 3. Waschschrift).

Für die Gewinnung der Normoblasten aus Nabelschnurblut (NSB) wurde ebenfalls die oben beschriebene Methode verwendet, wobei das Ausgangsvolumen stark variierte und dementsprechend die Anzahl der Ficoll-Ansätze individuell angepaßt wurden.

Für die Gewinnung der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurden 60 ml venöses Blut entnommen und mit 2 ml Natrium-Heparin (Vetren®) versehen.

Das Blut wurde mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und auf 3 Röhrchen, welche je 15 ml Ficoll enthielt, aufgeschichtet. Es wurde wie oben beschrieben verfahren.

Dienten die NK-Zellen als Effektoren für die erythroiden Zellen, wurde demselben Spender Blut abgenommen, der 10 Tage zuvor Blut für die CD34 Anreicherung gespendet hatte.

Bei den Versuchen mit den Normoblasten fanden die Versuche im allogenen System statt, die Blutspender für die NK-Zell Spende wurden zufällig ausgewählt.

2.2.2 Anreicherung von CD34⁺ Stammzellen, NK-Zellen und Glykophorin A⁺ Zellen mit der MACS-Methode

Grundlagen der Methode:

Die Anreicherung der Zellen erfolgte mit der MACS (Magnetic Cell Sorting) Methode.

Diese Methode ermöglicht es aus einer Zellsuspension eine bestimmte Zellpopulation anzureichern. Die zu isolierenden Zellen werden mit einem monoklonalen anti-humanen Mausantikörper markiert. Dieser Ak ist gegen Oberflächenantigene der Zelle gerichtet und ist zusätzlich mit magnetischen Teilchen (MicroBeads) gekoppelt. Die so markierten Zellen werden über eine Säule gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet.

Um eine Zellpopulation anzureichern kann nach dem Prinzip der negativen Depletion oder der positiven Selektion vorgegangen werden.

Bei der negativen Depletion werden die nicht gewünschten Zellen mit einem oder mehreren MicroBead Ak markiert, die markierten Zellen bleiben in der Säule aufgrund des Magnetfeldes hängen. Die nicht gebundenen Zellen passieren die Säule und werden in einem sterilen Tube gesammelt (flow through, Flüssigkeit die durch die Säule geflossen ist). Der flow through enthält somit die gewünschten Zellen.

Bei der positiven Separation werden die gewünschten Zellen (z.B. CD34⁺ oder CD56⁺) mit dem Microbead Ak markiert, die Zielzellen bleiben zunächst in der Säule hängen, durch Elution gewinnt man die Zellen aus der Säule. Bei diesem Vorgehen enthält der flow through die nicht gewünschten Zellen.

Vorbereitung der Zellen:

Bei allen drei Anreicherungen (CD34, Glykophorin A und CD56) wurde das Prinzip der positiven Separation angewandt.

Die mononukleären Zellen, die nach der oben beschriebenen Methode gewonnen wurden, wurden nach dem vierten Waschgang in einem Volumen von 200 µl aufgenommen und mit 150 µl magnetischen CD34⁺ MicroBead Ak für 20 Min. bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurden 100 µl Polyglobulin zugegeben, welches unspezifische Bindungen abfängt und damit eine höhere Reinheit der Zellanreicherung bewirkte.

Anschließend wurden die Zellen in 50 ml PBS aufgenommen, durch ein Sieb gedrückt und zweimal gewaschen. Zentrifugeneinstellung: 400 G, 4 °C, 8 Min.

Die Zellen wurden nach dem zweiten Waschgang in PBS + BSA mit einem Endvolumen von 500 µl aufgenommen.

Vorbereitung der magnetischen Säule:

Die mini MACS Säule wurde mit 1 ml PBS + BSA gespült.

Die midi MACS Säule wurde mit 5 ml PBS + BSA gespült.

Anreicherung:

Die markierten Zellen wurden in einer 500 µl Portion über die Säule gegeben, anschließend wurde die Säule mit 2 ml PBS + BSA gewaschen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld gebracht und auf ein neues steriles Röhrchen gesetzt. Die CD34⁺ Zellen wurden durch Durchdrücken eines direkt auf die Säule passenden Stempels mit 1 ml PBS + BSA eluiert.

Um die Reinheit der CD34⁺ Zellen zu erhöhen, wurden die sich in 1 ml befindenden angereicherten Zellen über eine zweite Säule gegeben, welche ebenfalls mit 1 ml PBS + BSA gespült wurde.

Im Unterschied zur ersten Säule wurde die zweite Säule nach Auftragen der angereicherten Zellen in zweimal 500 µl Portionen mit nur 1 ml PBS + BSA gewaschen. Am Ende befanden sich die isolierten CD34⁺ Zellen in einem Volumen von 1 ml.

Bei der CD 56⁺ und der Glykophorin A⁺ Anreicherung wurde eine midi MACS Säule verwendet. Die Durchführung entsprach der oben beschriebenen Methode; hier wurden jedoch andere Volumina verwendet.

Die Zellen wurden wie oben vorbereitet: mit 100 µl Polyglobulin und 150 µl magnetischen CD56⁺ bzw. Glykophorin A⁺ MicroBeads, wobei das Endvolumen 500 µl betrug.

Die Zellen wurden nach dem zweiten Waschgang in einem Volumen von 1 ml aufgenommen und in zweimal 500 µl über die Säule gegeben, anschließend wurde die Säule mit 10 ml PBS + BSA gespült. Die Zellen wurden mit 5 ml Medium eluiert. Die Zellen wurden nur über eine Säule gegeben.

2.2.3 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine fluoreszenz - abhängige Technik zur Messung von Zellen in Suspension.

Meßprinzip:

Es handelt sich um ein Meßsystem, welches mittels Streulicht und Fluoreszenzsignalen einzelne, in einer Flüssigkeit befindliche Zellen fokussiert und analysiert. Die Zellen werden einzeln, einer Perlenkette ähnlich, zu einem Analysepunkt geleitet. Ein optisches Detektionssystem und ein Rechner quantifizieren die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen, die durch den fokussierten Lichtstrahl der Lichtquelle (Argon-Laser, Wellenlänge 488 nm) entstehen. Eine Analyse der Zellsuspension entspricht der Summe der Einzelanalysen von Zellen [Schmitz, Rothe, 1994, Raffael, 1988].

Messung der Lichtstreuung:

Trifft Licht auf eine Zelle tritt Streulicht mit unterschiedlichen Qualitäten auf. Folgende Faktoren beeinflussen das Streulicht:

- die Membranstruktur der Zelle
- intrazelluläre Bestandteile (Granula, Vakuolen)
- die Querschnittsfläche der Zelle

FSC (Forward Scatter): ein Maß für die Zellgröße; Vorwärtsstreuung entlang des einfallenden Lichts.

SSC (Sideward Scatter): ein Maß für die intrazelluläre Granularität; Seitwärtsstreuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht.

Messung der Fluoreszenz:

Fluoreszenz ist die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung. Man verwendet Ak gegen bestimmte Oberflächenmarker, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind. Auf diese Weise erhält man neben Größe und Granularität noch eine weitere Information über die Eigenschaft der Zelle.

Fluoreszenz 1 (FI-1): Erfasst im FACScan Farbstoffe mit einer Emissionswellenlänge von 530+/-30 nm, z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC).

Fluoreszenz 2 (FI-2): Erfasst im FACScan Farbstoffe mit einer Emissionswellenlänge von 585+/-42nm, z.B. Phycoerythrin (PE).

Durchführung:

Mit dem FACScan wurde die Reinheit der verschiedenen Anreicherungen (CD34, CD56, Glykophorin A) dokumentiert, ebenso diente die FACS Analyse zum Nachweis, welche Zellen in den Zellkulturen gewachsen waren und es ermöglichte die HLA-I Expression auf erythroiden und granulo-/monozytären Vorläuferzellen über die Zeit zu verfolgen.

Dazu wurden drei Röhrchen angesetzt:

1. Negativkontrolle, mit dieser wurde das Gerät eingestellt.
2. PE markierter Ak gegen CD34 Oberflächenmarker.
3. FITC markierter Ak gegen W6/32 Oberflächenmarker (entspricht HLA A, B und C).

Ansatz für den Zellenachweis nach 8, 10, und 14 Tagen:

1. Kontrolle
2. W6/32 FITC
3. Glykophorin A PE
4. W6/32 FITC/Glykophorin A PE
5. CD13 PE (myeloischer Marker, der u. a. auf Granulo- und Monozyten vorkommt) [Abbas et al., 1996; Isselbacher et al., 1995].

Ansatz für CD 56⁺ angereicherte Zellen:

1. Kontrolle
2. CD56 PE

Ansatz für Glykophorin A⁺ Zellen:

1. Kontrolle
2. Glykophorin A PE
3. W6/32 FITC
4. W6/32 FITC/Glykophorin A PE

Von den Ak wurden 15 µl verwendet und 100 µl Zellsuspension hinzugefügt, wobei eine Zellzahl von 20.000 Zellen nicht unterschritten werden sollte.

Nach 20 Min. Inkubationszeit, in Dunkelheit und bei 4 °C wurden die Proben zweimal gewaschen. Zentrifugeneinstellung: 400 G, 4 °C für 6 Min.

Auswertung der Proben:

Für die computergestützte Datenauswertung wurde das Programm Lysis II (Becton Dickinson) verwendet. Um die Reinheit der Zellen zu dokumentieren wurden die Meßergebnisse als Punktdiagramm (Dot Plot) in einem Koordinatensystem dargestellt. Nach dem Setzen eines Gates auf die Zielpopulation (Lymphozyten) wurde die Fluoreszenz in einem zweiten Schaubild dargestellt. In dieses wurde zur statistischen Auswertung ein Achsenkreuz gelegt. Mit Hilfe der Software konnte dann die Häufigkeit der Punktverteilungen in den einzelnen Quadranten berechnet werden.

2.2.4 Kultivierung von erythroiden Vorläuferzellen

Ziel war es, erythroide Vorläuferzellen in einem Kulturmedium aus CD34⁺ Stammzellen zu kultivieren, um bei diesen Zellen die HLA-I Expression über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgen zu können. Es ist bekannt, dass CD34⁺ Zellen HLA-I an ihrer Oberfläche exprimieren, Erythrozyten es im Verlauf ihrer Differenzierung verlieren [Sieff et al., 1982]. Die Reinheit der Kultur und die HLA-I Expression wird mit dem FACS nach 8, 10 und 14 Tagen untersucht.

Als Kontrolle werden ebenfalls aus CD34⁺ Stammzellen granulo-/monozytäre Vorläuferzellen kultiviert. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie einfacher zu kultivieren sind und sie im Gegensatz zu den erythroiden Zellen die HLA-I Expression nicht reduzieren [Isselbacher et al., 1995, Sieff et al., 1982].

Es standen folgende zwei Kulturmedien zur Verfügung:

“**Erythro**” (EASYCLONE™): durch spezifische Zytokine (siehe Kapitel 2.1.1) wachsen erythrozytäre Vorstufen, diese Zellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie Glykophorin A in ihrer Zellmembran enthalten.

Glykophrin A, ist ein für Erythrozyten und deren Vorstufen vorkommendes Membranprotein, welches die Lipid-Doppelschicht der Erythrozytenmembran überspannt und die Blutgruppenantigene trägt [Isselbacher et al., 1995].

Analog zum oben genannten "Erythro" enthält das Kulturmedium "**GM**" (EASYCLONE™) spezifische Zytokine (siehe Kapitel 2.1.1) die das Wachstum von granulo- und monozytären Vorstufen erlauben; diese Zellen dienen als Kontrollzelllinie, da diese Zellen Glykophorin A negativ, HLA-A, -B und -C positiv sind [Sieff et al., 1982; Robinson et al., 1981].

Durchführung:

1. Ein Röhrchen Medium enthielt 2,4 ml "Erythro" bzw. "GM".
2. Es wurden 0,8 ml kaltes Kollagen hinzu gegeben und gut gemischt.
3. Die Zellen wurden auf ein Verhältnis von 3000 Zellen/ml, in einem Endvolumen von 100 µl, welches durch Auffüllen mit PBS + BSA erreicht wurde, eingestellt und dem kollagenhaltigen Medium hinzugefügt und nochmals gut durchmischt.

Das Endvolumen von 3,3 ml wurde auf 3 runde Petrischalen (Ø 3,6 cm) verteilt und in eine große, quadratische Petrischale (12 x 12 cm) gestellt. Zusätzlich wurde eine kleine Petrischale mit 2 ml Ampuva gefüllt und ohne Deckel dazugestellt.

Die Zellkulturen wurden nach 8, 10 und 14 Tagen unter einem Lichtmikroskop angeschaut und gezählt, wobei ein Zellhaufen von 40 und mehr Zellen als eine Kolonie gewertet wurde [Metcalf, 1984].

Da die Firma, von welcher die Kulturmedien bezogen wurden, während der Labor-tätigkeit leider ihre Produktion einstellte, wurde wie folgt weiter verfahren. Das Problem betraf nur die erythroide Zellreihe, da von der Kontrolle noch ausreichend Kulturmedium vorhanden war.

Es gab noch genügend Vorrat eines semisoliden Mediums ohne Zytokine von derselben Firma, dieses wurde im weiteren Verlauf verwendet und die Zytokine in folgender Konzentration hinzu gegeben:

rh IL3:	100 ng/ml
rh Erythropetin:	2 U/ml
rh Stem Cell Factor:	100 ng/ml

2.2.5 Gewinnung der Zellen aus der Zellkultur

Die kultivierten Zellen wurden nach 8, 10, und 14 Tagen mit dem FACScan analysiert, um zu sehen welche Zellen gewachsen waren und um die Reinheit der gewachsenen Zellen zu dokumentieren.

Außerdem wurde nach den oben genannten Zeiträumen ein histologisches Präparat angefertigt.

Damit die Zellen im FACS analysiert werden und man sie für weitere Versuche nutzen konnte, mußten die Zellen wieder in Suspension gebracht werden. Aus diesem Grund wurde das Kollagen mit Kollagenase Typ IV verdaut.

Durchführung:

Es wurden auf eine kleine, runde Petrischale 1 ml Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml) gegeben und für 30 Min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die sich nun in einem flüssigen Medium befanden, in ein 15 ml Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Zentrifugeneinstellung: 300 G, 20 °C für 10 Min. Zum Nachweis, welche Zellreihe sich entwickelt hatten, wurden die Zellen im FACScan nach der oben beschriebenen Methode analysiert.

2.2.6 Zytopinn

Zur Durchführung sollten die Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in PBS vorliegen. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 µl in die vorbereiteten Zentrifugeneinsätze pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte 5 Min. bei 500 rpm. Anschließend wurden die Einsätze vorsichtig zerlegt, um die gleichmäßig auf einer runden Fläche des OT verteilten Zellen nicht zu verwischen. Die OT wurden bei Zimmertemperatur Luft getrocknet. Die trockenen Präparate wurden nach der unten beschriebenen Methode gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

2.2.7 Anfärbung der Präparate mit der Avidin-Biotin Methode

Grundlagen des Färbeverfahrens:

Die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode) gehört zur Gruppe der Immunperoxidase-Färbungen. Das Eiweißmolekül Avidin hat die Fähigkeit 4 Moleküle

Biotin zu binden, da Avidin eine sehr hohe Affinität zum Biotin besitzt und das Signal bzw. die Färbung durch die 4 Bindungsstellen des Avidins für das Biotin verstärkt wird, handelt es sich um eine sehr empfindliche Methode, die es ermöglicht auch kleine Mengen eines Ag nachzuweisen [Bourne, 1989].

Folgende drei Ak wurden verwendet:

1. Primärantikörper (von der Maus), er ist gegen das zu bestimmende menschliche Ag gerichtet.
2. Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Maus-Ak); er bindet an den Primärantikörper und ist mit Biotin gekoppelt.
3. Peroxidase-konjugierter AB-Komplex; die freie Bindungsstelle des Avidins ermöglicht die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. (In 5 ml Puffer wird je ein Tropfen Avidin und Biotin hinzu gegeben.)

Avidin: ist ein Glykoprotein, welches vier Moleküle Biotin physikalisch binden kann.

Biotin: ist ein wasserlösliches Vitamin und ein zyklisches Harnstoffderivat; im menschlichen Organismus hat es vor allem Bedeutung als Coenzym von Carboxylasen [Isselbacher et al., 1995]

Durchführung:

1. Fixierung des Präparates:

Dazu wurde eine Fixierlösung aus folgenden Komponenten hergestellt:

- 19 ml Aceton (100 %)
- 19 ml Methanol (100 %)
- 2 ml Formalin (30 %)

der Objektträger (OT) wurde für 90 Sec. in die Fixierlösung und anschließend in Trispuffer eingetaucht. Danach wurde der OT vorsichtig mit einem Tuch abgetupft und die Kontur des Präparates mit einem Fettstift umfahren und in der Mitte geteilt, um an einem Präparat zwei Färbungen durchführen zu können.

2. Auftragen des Kaninchenserums:

Das Kaninchenserum wurde im Überschuß auf den OT (Verdünnung 1:5, Kaninchenserum:Puffer) aufgebracht und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kaninchenserum verhindert unspezifische Bindungen, welche zwischen Kollagen und dem Primärantikörper entstehen könnten.

3. Auftragen der Antikörper:

Nach Absaugen des Kaninchenserums wurde der Primär-Ak (W6/32 und Glykophorin A) aufgetragen und für 1 h inkubiert, der Sekundär-Ak wurde für 0,5 h und der AB-Komplex wurde ebenfalls für 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Ak wurden die Präparate zweimal mit Trispuffer in einer Standkuvette gewaschen.

4. Färbung der Präparate mit Benzidin:

Benzidin, ein brauner Farbstoff, wurde in folgender Mischung angerührt:

50 mg Benzidinpulver

100 ml Trispuffer

50 µl Peroxidase

Die Präparate wurden für 2 Min. mit dem Farbstoff inkubiert und mehrmals mit viel Wasser gespült.

5. Kerngegenfärbung mit Hämalaun:

Hämalaun ist ein blauer Farbstoff, der speziell die Kerne färbt; man inkubierte die Präparate für 3 Min. und spülte sie abermals mit viel Wasser.

6. Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe:

Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde den Präparaten das Wasser entzogen, damit der Kleber, mit welchem das Deckglas des OT fixiert wurde, hält. Dazu wurden die Präparate in eine Standkuvette gestellt und kurz in den jeweiligen Alkohol getaucht (Verdünnungsstufen der aufsteigenden Alkoholreihe: 70%, 96%, 100%, und Xylol).

7. Fixierung des Deckglases:

Das Deckglas wurde auf dem OT mit Eukid fixiert; der Klebstoff muß ca. 12 h trocknen, die Präparate konnten direkt nach dem Befestigen des Deckglases mikroskopiert werden.

2.2.8 Kultivierung der Zelllinie K562

Bei der Zelllinie K562 handelt es sich um eine erythroleukämische Zelllinie. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie sensibel für die NK-vermittelte Lyse sind. Aus diesem Grund dienen sie als Kontrolle für den Europiumfreisetzungstest, da er weder für die erythroiden noch für die granulo-/monozytären Vorläuferzellen etabliert ist. Die Kultivierung von K562 wurde als Suspensionskultur mit RPMI und 10% FCS durchgeführt. Für die Pflege der Zelllinie wurde alle zwei Tage das Nährmedium erneuert. Dazu wurden die Zellen alle zwei Tage auf $5-10 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt und mit frischem Medium versorgt. Ein guter Zustand der Zellen ist sehr wichtig, da die Zellen in einem besonders widerstandsfähigen Zustand sein sollen, wenn sie im Zytotoxizitätstest eingesetzt werden, damit die Spontanlyse des Assays möglichst gering bleibt. Dies ist besonders wichtig, da der Zustand der Zellen einen wesentlichen Einfluß auf die Spontanlyse des Tests hat und diese möglichst gering bleiben sollte.

2.2.9 Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Europiumfreisetzungstest

Grundlagen der Methode:

Der Europiumfreisetzungstest (Europiumrelease Assay) erfaßt fluormetrisch die Zytotoxizität von Zellen, welche mit BATDA (Ligand) markiert und mit Europium (Chelatbildner) versehen werden.

Die zu untersuchenden Zellen (Targets) werden mit dem fluoreszierenden Liganden inkubiert. Der lipophile Ligand (BATDA) hat die Eigenschaft die Zellmembran zu passieren. Ist der Ligand im Zellinneren angekommen, wird er durch Abspaltung der Estergruppen in eine hydrophile Substanz (TDA) umgewandelt. Dadurch ist ein Durchdringen der Zellmembran nicht mehr möglich.

Findet eine Lyse durch die Effektoren (NK-Zellen) statt, so tritt der Ligand aus der lysierten Zelle aus. Vor der Messung des Tests wird Europium hinzugefügt. Europium und TDA bilden einen stabilen, fluoreszierenden Komplex (EuTDA), der im Überstand nachgewiesen werden kann. Dabei ist die Menge im Überstand proportional zur Anzahl der lysierten Zellen.

Die Zytotoxizität der Effektorzellen wird als prozentualer Anteil an lysierten Targetzellen ausgedrückt, was nur möglich ist, wenn die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bekannt ist. Aus diesem Grund müssen folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

Maximallyse: Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.

Spontanlyse: Wert der dadurch zustande kommt, dass Zellen ohne Einfluß von Effektorzellen während des Tests absterben oder spontan Europium freisetzen.

Für die Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{(\text{Meßwert-Spontanlyse})}{(\text{Maximallyse-Spontanlyse})} \times 100$$

Anmerkung:

Da der Europiumfreisetzungstest nicht für die hier verwendeten Targetzellen etabliert war [Blomberg et al., 1986], wurde bei den Normoblasten in Vorversuchen die Markierung mit dem Liganden, bei den erythroiden und den granulo-/monozytären Zellreihen sowohl die Markierung der Zellen mit dem Liganden als auch die Maximallyse ausgetestet.

Durchführung:

Der Europiumfreisetzungstest wurde, weitgehend so durchgeführt wie er von Blomberg et al. 1986 beschrieben wurde.

1. Die erythroiden bzw. granulo-/monozytären Zellen (Targetzellen), welche aus der Zellkultur nach Tag 10 gewonnen wurden, wurden nachdem mit dem FACS die Reinheit der Zellen analysiert worden war, auf eine Konzentration von 1 Mil-

- lion Zellen/ml eingestellt und mit 5 µl BATDA für 30 Min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
2. Als Kontrolle für den Test wurde die Erythrozytenleukämie K562 verwendet, welche als Suspensionskultur vorlag. Die K562 Zellen wurden in derselben Weise wie die anderen Zellen eingestellt.
 3. Nach 30 Min. wurden die Zellen fünfmal mit Medium gewaschen. Zentrifugeneinstellung: 350 G, 20 °C, 7 Min.
 4. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit der Neubauer Zählkammer gezählt.
 5. Die Zellen wurden in der Konzentration 5.000 Zellen/100 µl eingestellt, wovon 100 µl/Well in eine 96 Lochplatte pipettiert wurden.
 6. Als Effektoren dienten die mit der MACS-Methode angereicherten CD 56⁺ Zellen. Sie wurden in vier verschiedenen Konzentrationen (40:1, 20:1, 10:1, 5:1) eingestellt, wobei die Ausgangskonzentration 2 Millionen Zellen/ml betrug.
 7. Nachdem die Effektoren zu den Targetzellen hinzu gegeben worden waren, wurde der Testansatz für 1,5 h im Brutschrank inkubiert (Einstellung des Brutschrankes: 37 °C, 5% CO₂).
 8. Nach der Inkubation wurde die Platte zentrifugiert. Zentrifugeneinstellung: 100 G, 20 °C, 2 Min.
 9. Im Anschluß wurden 20 µl aus der 96 Lochplatte mit rundem Boden auf eine flache 96 Lochplatte übertragen und 200 µl Europium/Loch hinzugefügt.
 10. Die Platte wurde für 15 Min. auf einen Drehschüttler gestellt und anschließend mit dem Multilable Counter gemessen.

Für die Versuche mit den Normoblasten wurde der Test in ähnlicher Weise durchgeführt mit folgenden Variationen:

Die Normoblasten wurden aus Nabelschnurblut (NSB) gewonnen; die Anreicherung erfolgte mit der MACS-Methode nach Glykophorin A. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf eine Konzentration von 1 Million Zellen/ml eingestellt, aber mit 8 µl BATDA für 30 Min. inkubiert, was in Vorversuchen ausgetestet worden war.

Bei den Versuchen mit den Normoblasten sind verschiedene Effektoren getestet worden:

- angereicherte CD 56⁺ Zellen
- CD 56⁻ PBMC (flow through der CD56 Anreicherung)
- Glykophorin A⁻ CBMC (flow through der Glykophorin A Anreicherung).

Auswertung des Tests:

Im Test wurden immer 3-fach Bestimmungen durchgeführt, von diesen wurden Mittelwerte gebildet, die Berechnung der Meßergebnisse erfolgte dann nach oben genannter Formel. Um die Güte des Tests beurteilen zu können wurde die Spontanlyse des Assays mit folgender Formel berechnet, sie sollte nicht größer als 30% sein.

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{(\text{Meßwert der Spontanlyse})}{(\text{Meßwert der Maximallyse})} \times 100$$

3 Ergebnisse

3.1 Zellkulturen

3.1.1 *Phänotypisierung der Zellkulturen mit Hilfe der Durchflusszytometrie*

Die Anzüchtung der Zellen über 14 Tage ist bei 6 Versuchen von insgesamt 15 Versuchen gelungen. Die Zellen wurden dazu in zwei verschiedene Kulturmedien gebracht. Der Unterschied lag in den verwendeten Wachstumsfaktoren, Erythropoetin, IL3 und Stem Cell Factor bei den erythroiden Zellen und SCF, GM-CSF und G-CSF bei den granulo-/monozytären Zellen. Die gewachsenen Zellpopulationen wurden nach 8, 10 und 14 Tagen im FACScan analysiert, nachdem sie wie in der in Kapitel 2.2.5. beschriebenen Methode aus der Kultur resuspendiert wurden.

Die durchflußzytometrische Analyse diente der phänotypischen Bestimmung der gewonnenen Populationen und zum quantitativen HLA-I Nachweis. Es wurden folgende Markierungen durchgeführt:

- Isotypenkontrolle (Anit-Maus IgG)
- Glykophorin A: Positivkontrolle für die erythrozytäre Herkunft der Zellen
- W6/32: monoklonaler Ak gegen HLA-I (HLA-A, -B und -C)
- Doppelfärbung: Glykophorin A und W6/32
- CD 13: Negativkontrolle, ein myeloischer Oberflächenmarker, der u. a. von Granulozyten und Monozyten exprimiert wird.

Als Kontrolle wurden granulo-/monozytäre Zellen verwendet, von diesen Zellen ist bekannt, dass sie HLA-I und CD13 positiv und Glykophorin A negativ sind [Abbas et al., 1996; Isselbacher et al., 1995].

Nach der CD34 Anreicherung, die eine Reinheit von 90% und mehr zeigte, steht eine Zellzahl von 90-270.000 Zellen/ml zur Verfügung (im Durchschnitt 168.000 Zellen/ml). Aus 3000 Zellen/ml wurden nach der oben genannten Methode Kolonien angesetzt. Die Anzahl der Kolonien nach 8, 10 und 14 Tagen hatte eine große Spannbreite: 3-80 Kolonien/Petrischale bei der erythroiden Reihe und 10-50 Kolonien/Petrischale bei den granulo-/monozytären Zelllinie. Dabei wird ein Zellhaufen von mehr als 40 Zellen als Kolonie gewertet, Zellhaufen die weniger Zellen enthal-

ten werden als „Cluster“ bezeichnet [Metcalf, 1984]. Ebenso variiert die Zellzahl, die man aus zwei Petrischalen erhält. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Zellausbeute der erythroiden und ganzulo-/monozytären Zellen, nachdem sie für 8, 10 und 14 Tage in Kultur waren.

	Erythro	GM
Tag 8		
Zellzahlen/kleine Petrischale	100-660.000 Zellen/ml	170-590.000 Zellen/ml
Durchschnitt Tag 8	364.000 Zellen/ml	335.000 Zellen/ml
Tag 10		
Zellzahlen/kleine Petrischale	290-1.270.000 Zellen/ml	130-1.400.000 Zellen/ml
Durchschnitt Tag 10	878.000 Zellen/ml	537.000 Zellen/ml
Tag 14		
Zellzahlen/kleine Petrischale	580-1.320.000 Zellen/ml	90-1.140.000 Zellen/ml
Durchschnitt Tag 14	867.000 Zellen/ml	517.000 Zellen/ml

(Zellzahl die man aus 2 Petrischalen erhält)

Bei V4, V5 und V15 sind die erythroiden Zellen für Glykophorin A zu 97-77% und für CD13 zu 2-38% rein. Bei den Experimenten 6, 9 und 13 zeigen die erythroiden Vorläuferzellen eine Reinheit von 47-86% für Glykophorin A und für CD13 von 13-72%. Um einiges besser fallen die Reinheiten der Kontrollzelle, der granulo-/monozytären Zellen aus. Sie sind für Glykophorin A zu 1-2%, für CD13 zu 62-94% positiv (die einzelnen FACS-Daten sind im Anhang aufgeführt).

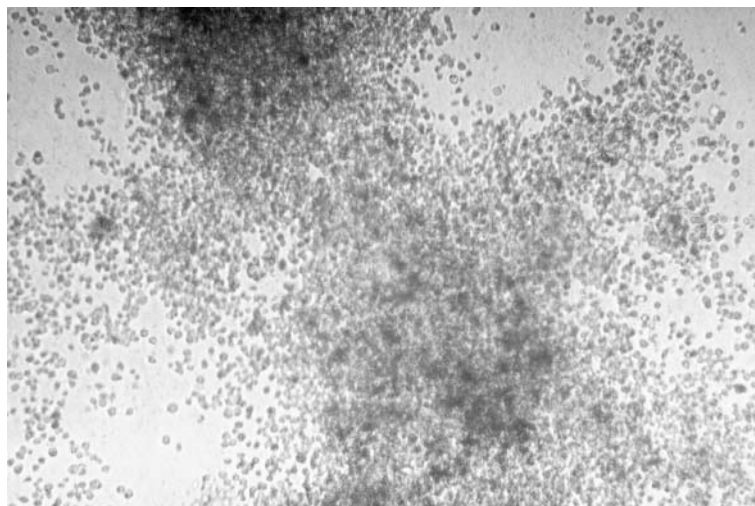


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme der erythrozytären Zellen in Kultur an Tag 14. Zu sehen sind kleine Zellen, die dichte Kolonien bilden. Im Original zeigten sie eine rostrote Farbe.

Vergrößerung 400fach, die Zellen stammen aus V15.

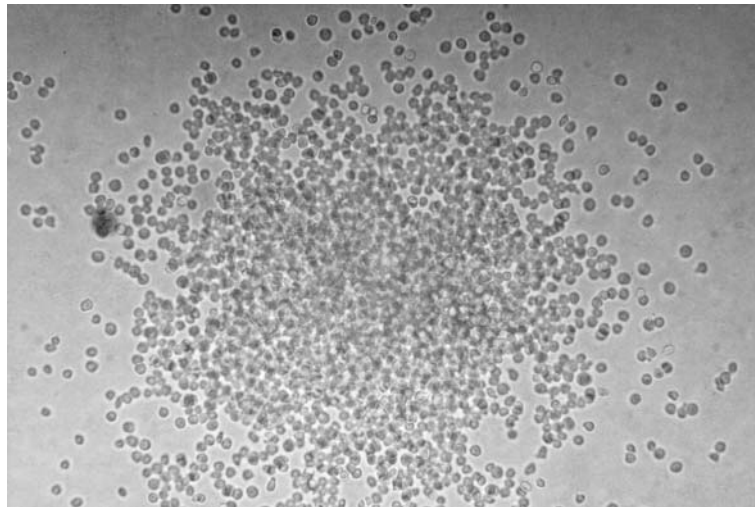


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme der granulo-/monozytären Zellen in Kultur an Tag 10. Zu sehen sind größere Zellen, die weniger dichte Kolonien bilden. Im Original zeigten sie eine bläulich wässrige Farbe. Vergrößerung 500fach, die Zellen stammen aus V13.

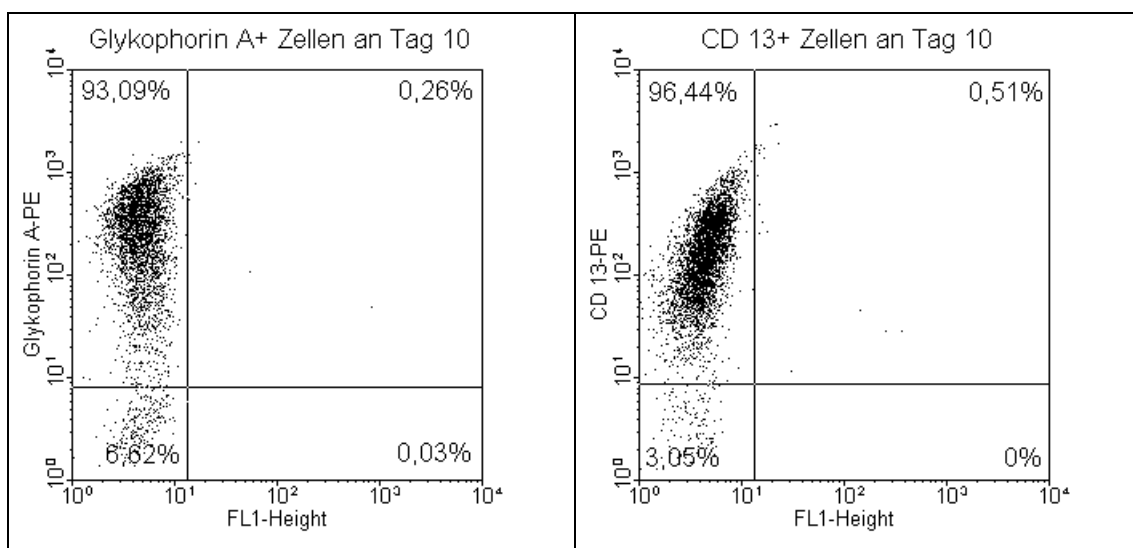


Abbildung 4: Dot Plots Darstellung einer repräsentativen durchflußzytometrischen Analyse der erythroiden (li.) bzw. granulo-/monozytären (re.) Vorläuferzellen nach 10 Tagen in Kultur. Es kann gezeigt werden, dass die erythroiden Vorläuferzellen für Glykophorin A, die granulo-/monozytären Vorläuferzellen für CD13 positiv sind. Beide Zelllinien haben sich aus $CD34^+$ Stammzellen in getrennten Medien entwickelt; beide Populationen stammen aus V15.

3.1.2 Quantitative Analyse der HLA Klasse I Expression auf erythroiden Zellen im zeitlichen Verlauf

In dieser Arbeit wird die HLA-I Expression der erythroiden Zellen im Verlauf als auch im Vergleich mit der Kontrollzelle untersucht. Dazu wurden die Zellen, nach der CD34 Anreicherung in einem spezifischen semisoliden Kulturmedium gezüchtet und nach 8, 10 und 14 Tagen mit den oben genannten Oberflächenmarkern inkubiert.

Die durchflußzytometrischen Ergebnisse werden neben der Dot Plot Darstellung auch als Histogramm ausgewertet was einer Häufigkeitsverteilung entspricht. Diese Darstellung ermöglicht die Bestimmung des Peak Chanals. Der Peak Kanal bezeichnet die Fluoreszenzintensität, die von den meisten Zellen einer definierten Population emittiert wird. Durch diese Art der Auswertung wird neben dem qualitativen auch ein quantitativer Vergleich möglich, da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen ist, d. h. ein höherer Wert entspricht einer stärkeren HLA-I Rezeptordichte als ein geringerer Wert, da die Zelle mit vielen Bindungsstellen heller leuchtet [Raffael, 1988, Schmitz et al., 1994].

Es werden 6 Versuche durchgeführt, der Peak Kanal wird von den doppelt markierten Zellen (Glykophorin A und W6/32) bestimmt.

Wie in Abbildung 5 bis 7 zu sehen ist, liegt der Peak Kanal der granulo-/monozytären Zellen bei allen Versuchen deutlich höher als bei den erythroiden Zellen. Der Peak Kanal für CD34⁺ wird bei den letzten drei Versuchen mitbestimmt (V9, V13 und V15). Die Werte sind mit 1860 bei V15, 173 bei V13 und 244 bei V9 deutlich höher als die Werte der erythroiden bzw. der granulo-/monozytären Zellen an Tag 8 und 10.

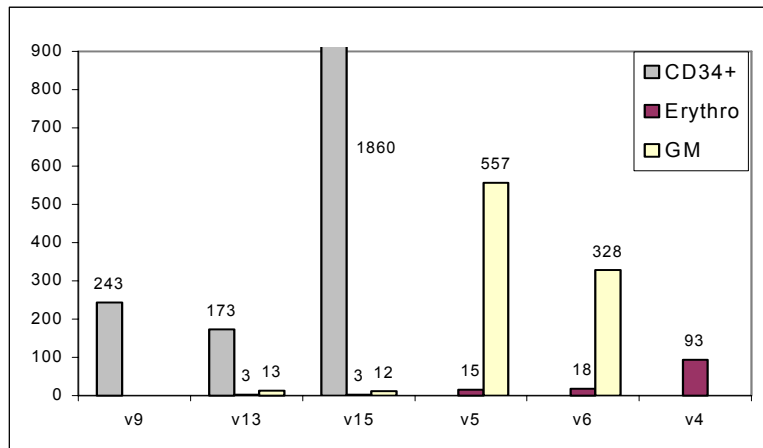


Abbildung 5: zeigt die Peak Chanal Werte der CD34⁺ Zellen an Tag 0 im Vergleich zu den erythroiden Zellen bzw. den granulo-/monozytären Zellen an Tag 8.

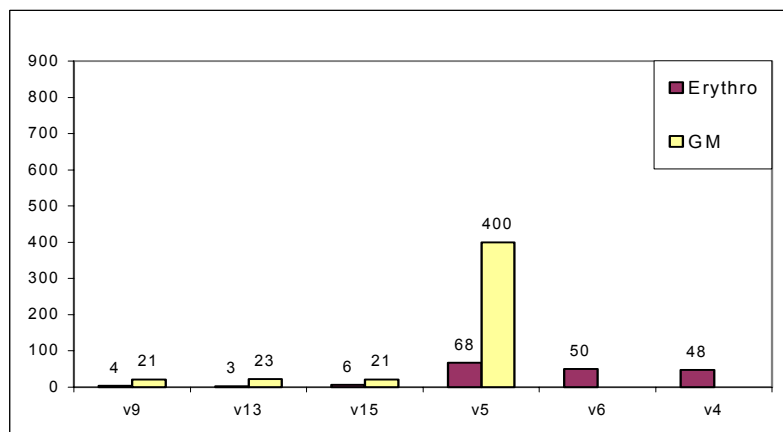


Abbildung 6: zeigt die Peak Chanal Werte der erythroiden Zellen im Vergleich zu den granulo-/monozytären Zellen an Tag 10.

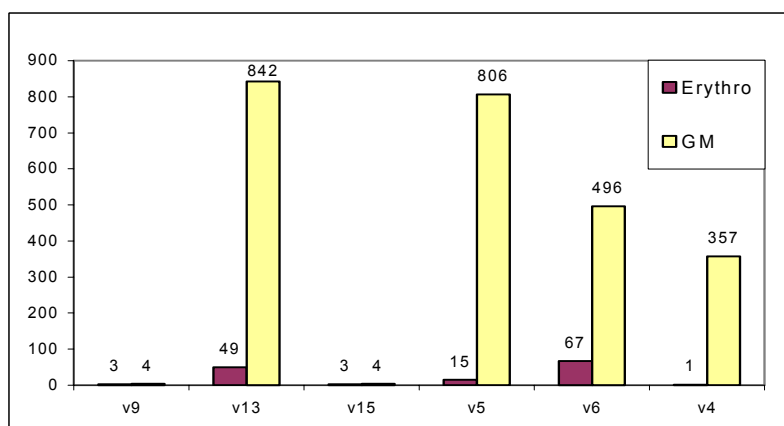


Abbildung 7: zeigt die Peak Chanal Werte der erythroiden Zellen im Vergleich zu den granulo-/monozytären Zellen an Tag 14.

Verlauf der HLA-I Expression bei den erythroiden Zellen

Eine Abnahme des Peak Chanals der erythroiden Zellen von Tag 8 bis Tag 14 konnte bei 3 Versuchen beobachtet werden: V4, V9 und V15. Bei V4 und V9 nimmt der Peak Chanal über die Zeit ab, bei V15 hebt sich der Peak Chanal an Tag 10 leicht an und hat an Tag 14 den gleichen Wert wie an Tag 8. V5, V6 und V13 verhalten sich zu den oberen Versuchen gegensätzlich, bei ihnen ist eine Zunahme der Expression zu sehen, bei V5 ist sie nur sehr gering, bei V6 und V13 ist sie deutlicher. Alle Werte liegen deutlich unter dem Peak Chanal der CD34⁺ angereicherten Zellen.

Verlauf der HLA-I Expression der granulo-/monozytären Zellen

Bei V5, V6 und V13 bleiben die HLA-I Expression annähernd konstant oder sie steigen von Tag 10 zu Tag 14 an. Bei V9 und V15 verhält sich der Peak Chanal ähnlich zu den Werten der erythrozytären Zellen, er nimmt ab. Bei V4 liegt nur ein Wert an Tag 14 vor, da die Zellen schlecht gewachsen sind.

Bei den granulo-/monozytären Zellen kann man eine Abnahme der HLA-I Expression im Vergleich zur HLA-I Expression auf CD34⁺ Stammzellen sehen. Nach der Differenzierung zu granulo-/monozytären Zellen läßt sich keine Abnahme der HLA-I Expression beobachten, sie steigt nach 14 Tagen tendenziell sogar an. Bei den erythroiden Zellen ist die Tendenz einer Abnahme der HLA-I Expression besonders deutlich, wenn man die Peak Chanal Werte der CD34⁺ Zellen mit berücksichtigt.

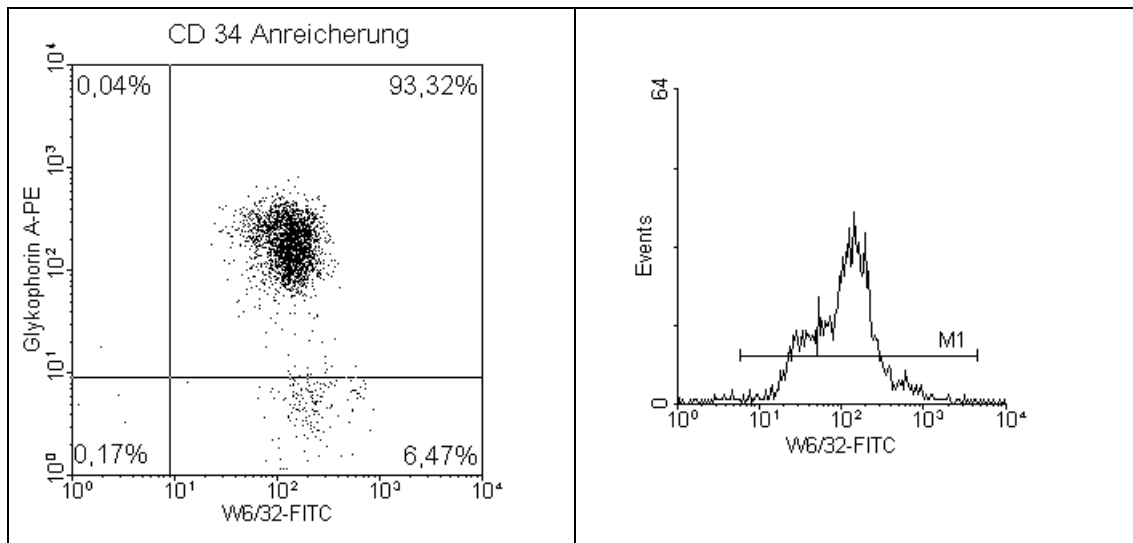


Abbildung 8: FACS-Analyse einer repräsentativen CD34 Anreicherung; die Dot Plot Darstellung zeigt CD34⁺ Zellen die doppelt positiv für Glykophorin A-PE und W6/32-FITC sind. Die Darstellung als Histogramm zeigt den Peak Chanal der bei 179 liegt. Die Zellen stammen aus Versuch 13.

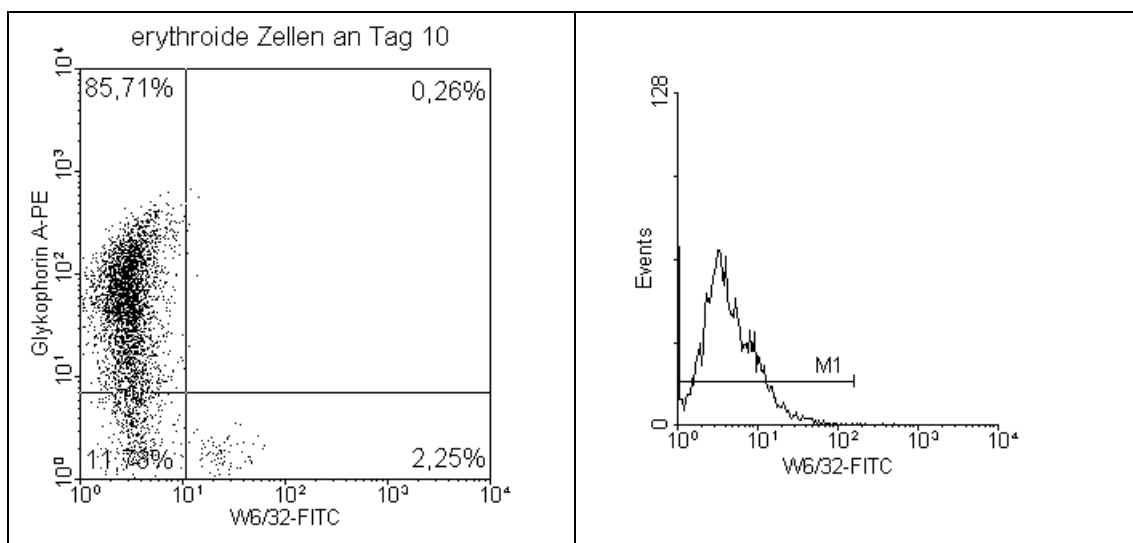


Abbildung 9: FACS-Analyse Glykophorin A positiver und CD13 negativer Zellen nach 10 Tagen in Kultur; Dot Plot und Darstellung als Histogramm, der Peak Chanal liegt bei 3. Die Zellen stammen aus Versuch 13.

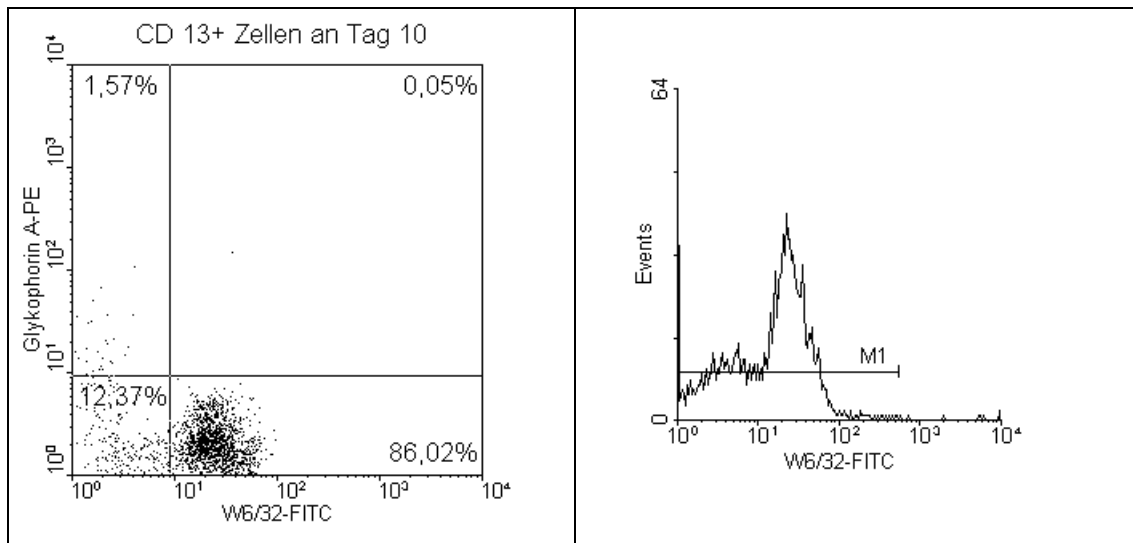


Abbildung 10: FACS-Analyse CD13 positiver und Glykophorin A negativer Zellen nach 10 Tagen in Kultur; Dot Plot und Darstellung als Histogramm, der Peak Chanal liegt bei 23. Die Zellen stammen aus Versuch 13.

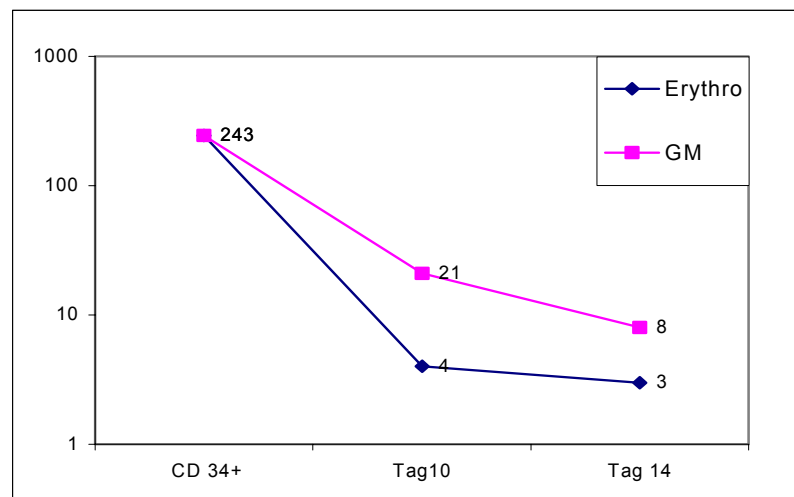


Abbildung 11: zeigt ein Beispiel für das Verhalten der Peak Chanal Werte im zeitlichen Verlauf; die Daten stammen aus Versuch 9. Der Peak Chanal wurde von den für Glykophorin A⁺ und W6/32⁺ doppelpositiven Zellen bestimmt. Es liegen keine Werte von Tag 8 vor, da die Zellen schlecht gewachsen sind.

3.2 Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Europiumfreisetzungstest

3.2.1 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide und granulo-/monozytäre Zellen im autologen System

Um die Zytotoxizität der NK-Zellen im autologen System zu untersuchen wurde ein Europiumfreisetzungstest mit 10 Tage alten Zellen aus den Kulturen durchgeführt. Dazu wurden den selben Blutspendern, die zuvor Blut für die CD34 Anreicherung gespendet hatten, nach 10 Tagen (bei V4 an Tag 11) erneut Blut entnommen, aus welchem CD56⁺ Zellen isoliert wurden. Die CD56⁺ Zellen, die eine Reinheit von 96% und mehr hatten, dienten als Effektoren, die erythroiden, bzw. granulo-/monozytären Vorläuferzellen aus den Kulturen als Targetzellen. Es wurden 4 Europiumfreisetzungstest nach der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Zellen stammten aus V7, V9, V13 und V15. Die Daten aus der FACS Analyse sind im Anhang zusammengefaßt. Als Kontrolle wurde die NK-sensitive erythroleukämie K562 verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 bis 15 dargestellt.

Da der Europiumfreisetzungstest nicht für die verwendeten Targetzellen etabliert war, wurden die Maximallyse und der Ligandeneinbau in Vorversuchen ausgetestet [Bloomberg et al., 1986].

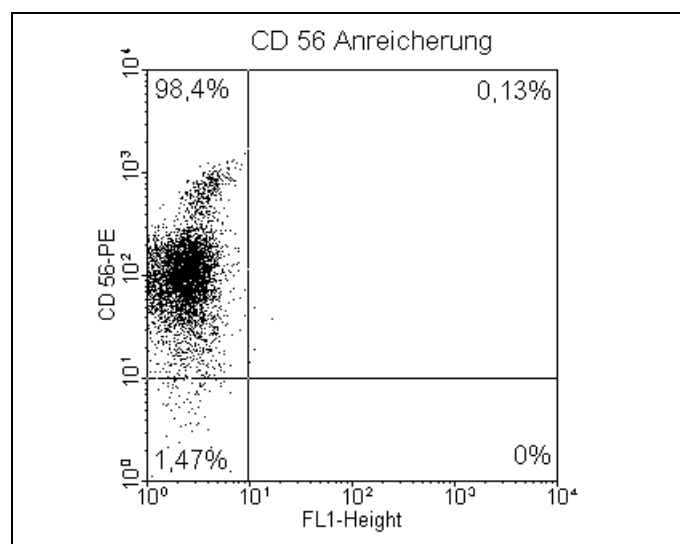


Abbildung 12: Dot Plot einer repräsentativen durchflußzytometrischen CD56 Anreicherung; die Zellen stammen aus V15.

Test der Maximallyse

Im autologen System wurde nach der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Methode der Europiumfreisetzungstest durchgeführt, wobei die ML viermal variiert wurde.

Mit HCl, gesättigter NaCl Lösung, Triton und 15 Min. Ultraschallbehandlung. Es zeigte sich, dass die Lyse mit Triton und Ultraschall gleich effektiv war. Die Lyse mit HCl und die gesättigte NaCl Lösung um 2/3 geringer ausfielen. Aufgrund dessen wurde für die weiteren Zytotoxizitätsbestimmungen die ML mit Triton beibehalten, da sie auch dem ursprünglichen Protokoll entsprach.

Test der Zellmarkierung mit dem Liganden (BATDA)

Der Ligandeneinbau wurde mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Ligand (BATDA) getestet.

Auf eine Zellkonzentration von 1 Million Zellen/ml wurden 5 µl bzw. 8 µl BATDA gegeben und für 30 Min. inkubiert.

Die „Basiswerte“ des Testes (BC, SL, ML) haben sich wie folgt verändert: wenn die Zellen mit 8 µl BATDA inkubiert wurden, stieg der BC um den Faktor 1.6 und die ML um den Faktor 1.1 an. Die Spontanlyse nahm um 18 % zu, weshalb im weiteren Verlauf zur Markierung der Zellen die Konzentration 5 µl Ligand auf 1 Million Zellen/ml verwendet wurde.

In Abbildung 13 bis 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

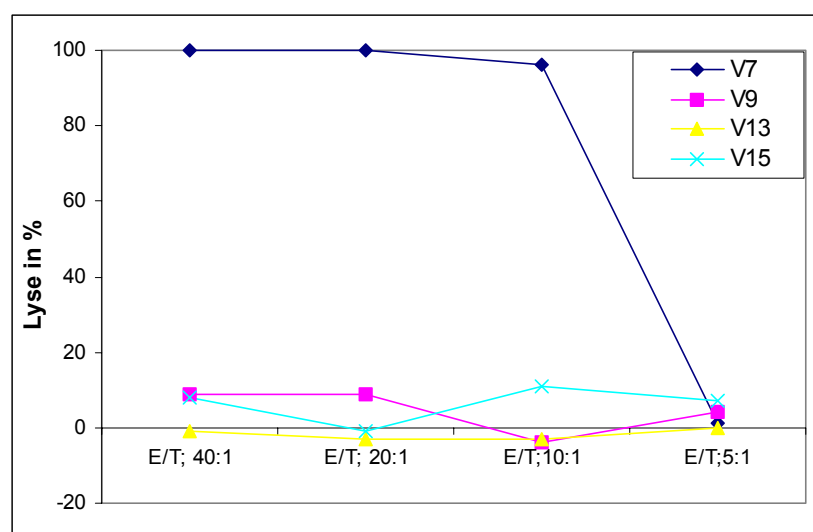


Abbildung 13: zeigt das Lyseverhalten von NK-Zellen gegen die erythroide Vorläuferzellen.

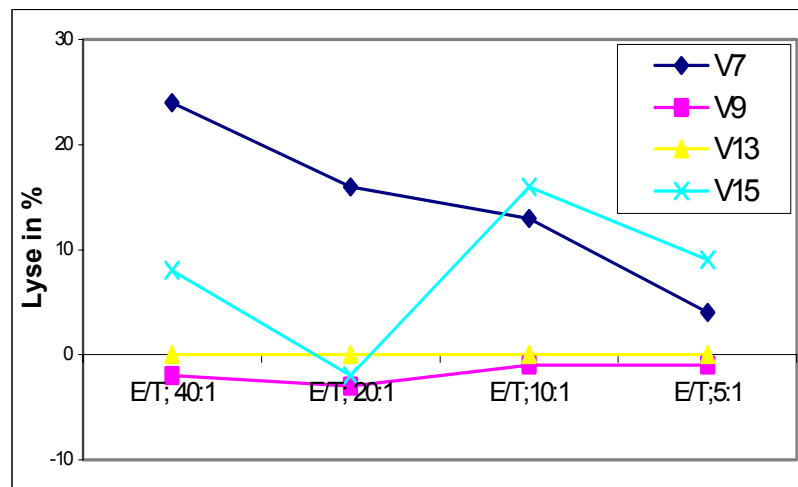


Abbildung 14: zeigt das Lyseverhalten von NK-Zellen gegen granulo-/monozytäre Vorläuferzellen.

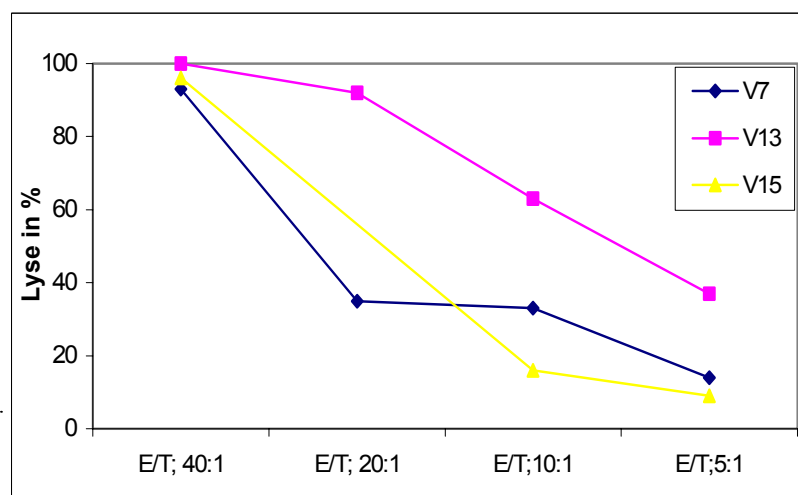


Abbildung 15: zeigt das Lyseverhalten von NK-Zellen gegen K562.

Die Ergebnisse sind sehr heterogen. Bei den 10 Tage alten erythroiden Zellen konnte bei 3 Proben keine Zytotoxizität nachgewiesen werden (die maximal spezifische Lyse liegt bei 8%). Eine Probe zeigt eine maximal spezifische Lyse von 100% bei einem Effektor/Target-Verhältnis von 40:1, wobei die Spontanlyse bei diesem Versuch mit 52% sehr hoch war. Die Spontanlysen der anderen Versuchen lag zwischen 22% bei V15, 14% bei V13 und 39% bei V9.

Auch bei den granulo-/monozytären Zellen ist keine Zytotoxizität von NK-Zellen nachweisbar, hier liegt die maximale spezifische Lyse zwischen 0 und 24%. Wobei die Spontanlysen sich zwischen 14 und 52% bewegen.

Die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen K562 wurde als Kontrolle mitbestimmt. Bei K562 handelt es sich um ein Standardtarget zur Zytotoxizitätsbestimmung von NK-Zellen. Die maximalen spezifischen Lysen liegen zwischen 88% und 100%, die Spontanlysen bewegen sich zwischen 14 und 21%.

Anmerkung:

Die Testwerte der ML legten den Verdacht nahe, dass die ML nach 1.5 h Inkubationszeit nicht vollständig abgelaufen war, sie also zu gering ausfiel. Aus diesem Grund wurden die „Basiswerte“ nach zwei Tagen erneut gemessen wobei sich der Verdacht bestätigte. Zur Auswertung wird deshalb die ML der zweiten Messung verwendet, sowohl bei den Versuchen mit den erythroiden Zellen als auch bei den Versuchen mit den Normoblasten.

3.2.2 Zytotoxizität von NK-Zellen (allogen) und CBMC's (autolog) gegen Normoblasten

Um das Lyseverhalten der NK-Zellen sowohl im autologen als auch im allogenen System zu untersuchen wurden neben den Versuchen im autologen System auch Versuche mit Normoblasten aus Nabelschnurblut, die nach Glykophorin A angereichert wurden, durchgeführt. Ebenfalls wurde untersucht, ob sich das Lyseverhalten der NK-Zellen in Abhängigkeit von der HLA-I Rezeptordichte unterscheidet. Von Normoblasten ist bekannt, dass sie Glykophorin A positiv und HLA-I negative Zellen sind [Sieff et al., 1982].

Die Glykophorin A⁺ Zellen wurden nach oben beschriebener Methode doppelt gefärbt. Die Reinheit für die nach Glykophorin A angereicherten Zellen liegt zwischen 6 und 71%, die für W6/32 zwischen 1 und 87%. Keine der untersuchten Proben ist doppelt positiv für W6/32 und Glykophorin A (die genauen FACS-Werte sind im Anhang aufgeführt).

Da der verwendete Test auch für diese Zellpopulation nicht etabliert war, wurde ebenfalls in Vorversuchen der Ligandeneinbau in die Zellen getestet.

Test der Zellmarkierung mit dem Liganden (BATDA)

1 Million Zellen/ml wurden mit 5 μ l und mit 8 μ l BATDA für 30 und 60 Min. im Brutschrank inkubiert. Es zeigte sich, dass die Zeit keinen wesentlichen Einfluß auf die „Basiswerte“ hatte. Bei der Verwendung von 8 μ l und einer Inkubationszeit von 30 Min. verändern sich die „Basiswerte“ folgendermaßen:

der BC nahm um 0.7, die ML um 1.0 zu; die SL ist um 30 % geringer ausgefallen, als bei der Verwendung von 5 μ l Liganden. Aus diesem Grund wurde bei den weiteren Versuchen die Zellen mit 8 μ l BATDA für 30 Min. inkubiert (die SL lag bei diesem Test bei 27%). Da sich bei den Vorversuchen zum Ligandeneinbau interessante Resultate zeigten, wurden in zwei weiteren Versuchen die Zytotoxizität der CBMC's bzw. PBMC's aus den Durchläufen der Glykophorin A bzw. NK-Zellen Anreicherung untersucht. Die Ergebnisse der Europiumfreisetzungstest sind in Abbildung 16, 17 und 18 dargestellt.

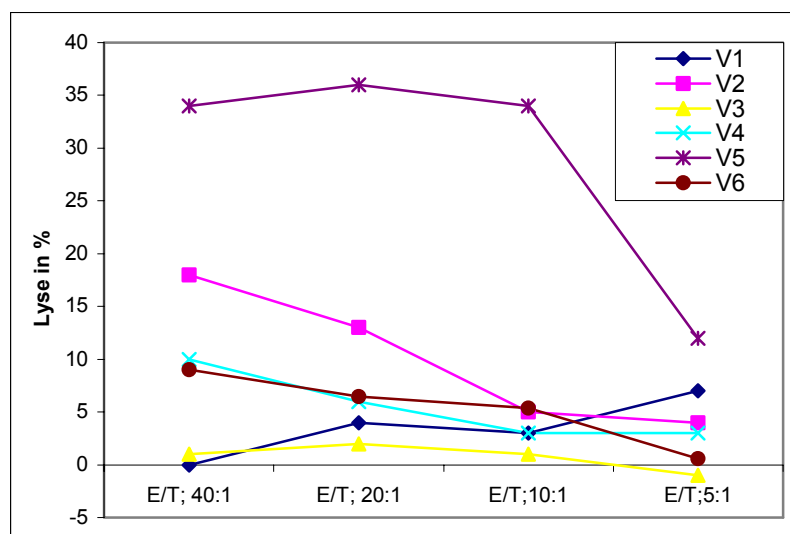


Abbildung 16: zeigt das Lyseverhalten von NK-Zellen gegen die Nomoblasten.

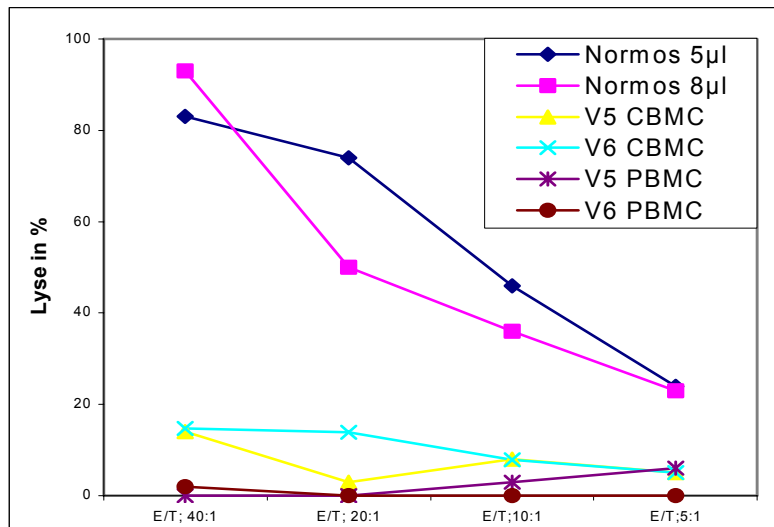


Abbildung 17: zeigt das Lyseverhalten im autologen System von CBMC's (aus der Glykophorin A Anreicherung) gegen Normoblasten. Auf Grund der interessanten Resultate sind auch die Vorversuche des Ligandeneinbaus der Normoblasten dargestellt (Effektoren sind CBMC's aus der Glykophorin A Anreicherung). Außerdem ist das Lyseverhalten im allogenen System von PBMC's (aus der CD56 Anreicherung) gegen Normoblasten zu sehen.

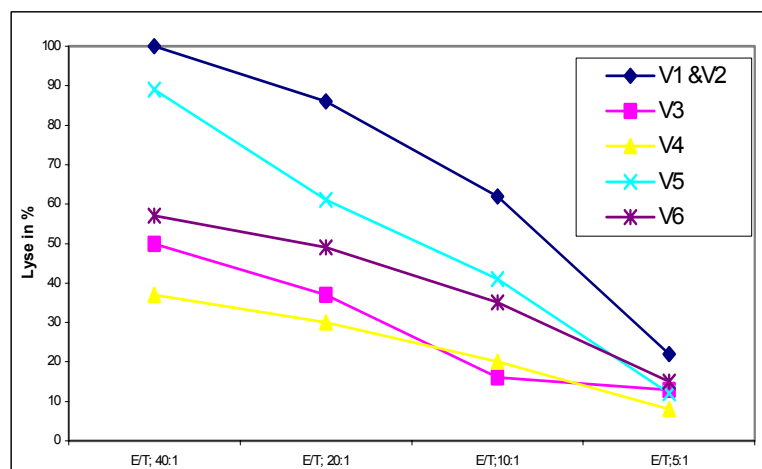


Abbildung 18: zeigt das Lyseverhalten von NK-Zellen gegen K562.

Auch hier sind die Ergebnisse sehr heterogen, die maximalen spezifischen Lysen von NK-Zellen gegen Normoblasten liegen zwischen 0 und 36%, die maximalen spezifischen Lysen der Vorversuche bewegen sich zwischen 0 und 90%, bei SL zwischen 11 und 30%. Als Referenz wurde wieder die Aktivität von NK-Zellen gegen K562 mitbestimmt, die SL liegt dabei zwischen 10 und 21%.

3.3 Analyser der Immunperoxidasefärbung

Von den erythroiden- und den granulo-/monozytären Zellen wurden nach 8, 10 und 14 Tagen nach der in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Methode Präparate angefertigt.

Für die Präparate wurden erythroide- bzw. granulo-/monozytäre Zellen aus den gleichen Kulturen verwendet, mit welchen auch die Europiumfreisetzungstests durchgeführt wurde; d. h. es liegen von 6 Versuchen Präparate vor.

Jedes Präparat wurde geteilt und mit zwei Primärantikörpern, Glykophorin A und W6/32 behandelt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, dass die Färbemethode gelungen ist, sich die Färbung aber nicht zu den einzelnen Zellkolonien oder Zellen zuordnen läßt und somit keine objektive Aussage zur quantitativen HLA-I Expression gemacht werden kann.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Zellkultur

In dieser Arbeit wurde eine semisoliden, kollagenhaltige Zellkultur verwendet. Semisoliden Zellkulturen bieten mehrere Vorteile: die physiologischen Bedingungen des KM werden vergleichsweise gut imitiert, d.h. die Zellen können in einem dreidimensionalen Gefüge wachsen, was wichtige Zell-Zellinteraktionen erlaubt, die nach neuesten Studien von großer Bedeutung sind. Die Versorgung der Zellen mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird durch das Kollagen im Kulturgefäß gleichmäßig sichergestellt (Kollagen bildet eine netzartige Struktur aus), was bei der Verwendung von Agar schwieriger ist und mit einer schlechteren Proliferation an CFU-E einher geht. Auch können Zellen, die in Agar fixiert sind nur schwer wieder in Lösung gebracht werden [Verfaillie, 1998, Mantalaris et al., 1998].

Ein weiterer Vorteil der semisoliden Zellkultur ist, dass die Zellen mit wenig Aufwand stabil fixiert und immunhistochemisch gefärbt werden können. Bei der Verwendung von Methylzellulose ist eine Fixierung der Zellen nicht möglich, die Zellen sinken langsam auf den Boden der Kulturplatte ab, was die mikroskopische Auswertungsgenauigkeit erschweren, bis unmöglich machen kann [Metcalf, 1984, Dobo et al., 1995, Lindel, 2000].

Mittels Kollagenase können die Zellen mit wenig Aufwand wieder in Lösung gebracht werden, die Zellen stehen dann z. B. für Durchflußzytometrische Analysen oder für weitere Experimente zur Verfügung.

In den hier vorliegenden Versuchen gestaltete sich die Kultivierung der Zellen zunächst problematisch, was unschwer daran zu erkennen ist, dass 15 Versuche angesetzt wurden, aber nur 6 vollständige Versuche zum Abschluß gebracht werden konnten. Bei den Zellkulturen war eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass die granulo-/monozytären Zellen weniger empfindlich waren und ein besseres Wachstum zeigten als die erythroiden Zellen. Auch ist die Reinheit für Glykophorin A in den erythroiden Zellkulturen leider nicht optimal, im Gegensatz zu den granulo-/monozytären Zellen, die sehr homogen CD13 exprimieren.

Der Grund für ein schlechtes Zellwachstum kann an allgemeinen Ursachen wie fehlerhaften Inkubationsbedingungen (O_2 - und CO_2 -Gehalt, Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit) oder an den verwendeten Medien, die FCS oder BSA enthielten, liegen. Die oben genannten Fehlerquellen können ausgeschlossen werden, da die Kontrollkulturen, die im gleichen Brutschank und mit den selben Medien angesetzt wurden, ein gutes Wachstum zeigten.

Eine wahrscheinliche Ursache für ein weniger gutes Zellwachstum könnte mit den verwendeten Zytokinen zusammen hängen. Zytokine sind sehr instabile Proteine, die bei Raumtemperatur schnell ihre Funktion einbüßen. Auch ist zu beachten, dass der Ansatz der erythroiden Zellkultur verändert wurde, da die Firma, von der wir die Zellkulturen bezogen, ihre Produktion einstellte. Das Kulturmedium für die erythroiden Zellen mußte neu hergestellt werden, insbesondere wurden dazu Zytokine einer anderen Charge verwendet.

Durchflußzytometrie

Zum Nachweis der Expression von bestimmten Oberflächenantigenen wurde die Durchflußzytometrie verwendet. Im Vergleich zur Immunhistochemie kann eine Probe in relativ kurzer Zeit auf eine große Anzahl an Oberflächenantigenen untersucht werden, und sie ist in der Anwendung schnell und einfach. Ergebnisse sind weniger vom Untersucher abhängig und statistische Aussagen sind besser möglich. Wegen all dieser Vorteile fand die Durchflußzytometrie schnell Eingang in die diagnostische Routine.

Zwei wichtige Faktoren, die das Ergebnis der durchflußzytometrischen Analyse negativ beeinflussen können sind: Autoimmunfluoreszenz und unspezifische Bindungen des Ak an andere Strukturen als an das spezifische Ag. Da jede Zelle das Phänomen der Autoimmunfluoreszenz aufweist wurde von jeder Probe eine negativ Kontrolle bestimmt. Eine Zunahme der unspezifischen Bindungen, die durch Reste von Kollagen hätte ausgelöst werden können, wurden nicht beobachtet. Somit war eine sichere Auswertung möglich.

Europiumfreisetzungstest

Üblicherweise wird in der immunologischen Forschung ein $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstest eingesetzt. Bei dem hier verwendeten Europiumfreisetzungstest handelt es sich um einen nichtradioaktiven, alternativen Test. Er wurde von Blomberg et al. beschrieben und von Mitarbeitern im unserem Labor etabliert [Blomberg et al., 1986]. Er liefert vergleichbare Ergebnisse zum $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstest. Einschränkungen erfährt der Test dadurch, dass sich nicht alle Zellpopulationen gleich gut mit dem Liganden markieren lassen oder die Spontanlyse sehr hoch wird. Als Kontrolle wird die Erythroleukämie K562 eingesetzt. K562 liefert hohe Meßwerte und erzielt Spontanlysen unter 30%, wenn sorgfältig mit den Zellen umgegangen wird.

Eine geringe Spontanlyse ist an zu streben, da sie von der Maximallyse subtrahiert wird; liegt eine hohe Spontanlyse vor, wird das Meßfenster sehr klein. Auch wird der Test weniger sensitiv, da kleinere zytotoxische Effekte bei einer hohen Spontanlyse untergehen. Aus diesen Gründen wird eine geringe Spontanlyse angestrebt. Einen wesentlichen Einfluß hat hierbei der Zustand der Targetzellen.

4.2 HLA-I Expression im zeitlichen Verlauf

4.2.1 HLA-I Expression auf erythroiden und granulo-/monozytären Zellen

Ziel dieses Teils des Experiments war es die HLA-I Expression auf erythroiden Vorläuferzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen zu beobachten. Zum Vergleich und als Kontrolle dienten granulo-/monozytäre Vorläuferzellen.

In den Arbeiten von Sieff et al. und Robinson et al. konnte gezeigt werden, dass BFU-E HLA-DR und HLA-A, -B und -C exprimieren. Die Expression von HLA-DR besteht transitorisch, in der sehr frühen Erythropoese und ist nicht mehr auf CFU-E nachweisbar. Die Reduktion der HLA-I Expression verläuft langsamer, da CFU-E HLA-I exprimieren, es bei reifen Erythrozyten aber nicht mehr nachweisbar ist. Umgekehrt dazu verhält sich die Glykophorin A Expression auf erythroiden Zellen, sie nimmt mit der weiteren Differenzierung der Zellen zu [Sieff et al. 1982, Robinson et al., 1981]

Berücksichtigt man für die hier vorliegenden Ergebnisse nur die Versuche, die eine Reinheit der erythroiden Zellen für Glykophorin A von mehr als 70% aufwiesen (V4, V5 und V15) können die o. g. Aussagen an Hand der hier vorliegenden Ergebnisse nachvollzogen werden.

Die Reinheit für Glykophorin A ist an Tag 10 und nicht wie erwartet an Tag 14 am höchsten. Ein Grund dafür könnte sein, dass nach 14 Tagen die Versorgung der Zellen in der Zellkultur nicht mehr optimal war, zum anderen wurde an Tag 10 die Kulturen mit den meisten Kolonien verwendet, da die Zellen für den Europiumfreisetzungstest eingesetzt wurden. Bei einer großen Zellzahl fallen mögliche Unreinheiten weniger stark ins Gewicht.

Für Zellen die eine Reinheit für Glykophorin A von weniger als 70% haben sind keine genauen Aussagen zu machen, an der relativ hohen CD13 Expression kann man vermuten, dass es sich um eine Mischkultur handelt, die einen deutlichen Anteil an granulo-/monozytäre Zellen enthält, die wie oben erwähnt positiv für HLA-I sind.

Deutlich besser fallen die Ergebnisse bei den granulo-/monozytären Zellen aus. In allen Versuchen liegt die Reinheit für CD13 über 70% (mit einer Ausnahme bei V6 an Tag 14) man kann also davon ausgehen, dass in den Zellkulturen granulo-/monozytäre Zellen herangereift sind.

Die CD13⁺ Zellen sind stark positiv für HLA-I, was in den oben genannten Arbeiten von Sieff et al. und Robinson et al. Bestätigung findet.

4.2.2 Vergleich der HLA-I Expression auf erythroiden Zellen mit granulo-/monozytären Zellen

Vergleicht man die HLA-I Expression der beiden Zellpopulationen miteinander und verwendet man dafür den Peak Chanal als Maß für die Intensität der Expression, zeigen die Kontrollzellen in allen Versuchen eine stärkere HLA-I Expression als die erythroiden Zellen, dies wird besonders deutlich, wenn man die Peak Chanal Werte der CD34⁺ Stammzellen mit berücksichtigt. Ein solcher Sachverhalt wird auch in der Literatur dahingehend beschrieben, dass HLA-I auf erythroiden Vorläuferzellen nur

vorübergehend exprimiert wird und differenzierte erythroide Zellen HLA-I negativ sind.

Für granulo-/monozytäre Vorläuferzellen wird beschrieben, dass die HLA-I Expression im Laufe ihrer Differenzierung reduziert wird, aber nicht vollständig verloren geht [Sieff et al., 1982].

Interessant sind die Beobachtungen, dass granulo-/monozytären Zellen schon nach 7 Tagen in Kultur deutlich weniger HLA-I exprimieren als CD34⁺ Zellen und eine große Spannbreite für die HLA-I Intensität innerhalb der gleichen Zellpopulation zwischen den einzelnen Versuchen besteht (z. B. liegen die Peak Channel Werte der CD34⁺ Zellen zwischen 173 und 1.860).

4.2.3 *Schlußfolgerung aus der HLA-I Expression*

Trotz der methodischen Schwierigkeiten und der geringen Anzahl an Versuchen können die in der Literatur gemachten Aussagen tendenziell bestätigt werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten über eine vorübergehende HLA-DR und HLA-I Expression auf granulo-/monozytären und erythroiden Vorläuferzellen (bei letzteren ist auch die HLA-I Expression transitorisch). Man geht heute davon aus, dass HLA-I und HLA-DR eine regulierende Funktion in der Hämatopoese zukommt. Robinson et al. und Winchester et al. konnten zeigen, dass die Blockierung von HLA-I mit monoklonalen Ak in Gegenwart von Komplement eine Hemmung oder Lyse von BFU-E/CFU-E bzw. CFU-GM zur Folge hat [Robinson et al., 1981, Winchester et al., 19978].

Dies könnte ein Grund sein, warum CD34⁺ Stammzellen deutlich mehr HLA-I exprimieren als CFU-E und CFU-GM, da das Überleben dieser Zellen besonders wichtig für den Organismus ist. Eine Störung in diesem komplexen Zusammenspiel von immunkompetenten Zellen, hämatopoetischen Stammzellen und Wachstumsfaktoren können schwerwiegende Erkrankungen wie eine aplastische Anämie oder eine Aplasie der roten Blutzellen zur Folge haben [Handgretinger et al., 1999, Zanjani et al., 1980].

4.3 Zytotoxizität von NK-Zellen im autologen System

Bei diesem Teil des Experimentes sollte der Einfluß der HLA-I Expression auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen unter autologen Bedingungen untersucht werden.

4.3.1 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen erythroide Vorläuferzellen

Bei 3 von 4 Versuchen zeigte sich keine Zytotoxizität (maximal spezifische Lyse 8%). Bei einem Versuch findet man eine hohe maximal spezifische Lyse von 100%, allerdings ist die Interpretation dieses Ergebnisses schwierig, da die Spontanlyse mit 52% sehr hoch liegt.

4.3.2 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen granulo-/monozytäre Vorläuferzellen

Analoge Ergebnisse findet man bei den granulo-/monozytären Zellen. Hier liegt bei keinem der 4 Versuchen eine zytotoxische Aktivität vor (maximal spezifische Lyse 24%, bei einer Spontanlyse von 40%).

4.4 Zytotoxizität von NK-Zellen im allogenen System

Bei diesem Teil des Experimentes sollte der Einfluß der HLA-I Expression auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen unter allogenen Bedingungen untersucht werden.

4.4.1 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Normoblasten

Es wurden 6 Versuche mit CBMCs, die nach Glykophorin A⁺ angereichert wurden durchgeführt. Die Anreicherung der Zellen gestaltete sich schwierig, was sich in der Reinheit der Zellen die zwischen 6% und 70% liegt zum Ausdruck kommt. Zwischen 1% und 87% dieser Zellen sind für HLA-I positiv, wobei eine negative Korrelation zwischen diesen beiden Oberflächenmolekülen festgestellt werden kann d. h. Glykophorin A⁺ Zellen sind HLA-I negativ und umgekehrt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 im Anhang zusammen gefaßt.

Bei keinem der durchgeführten Versuche zeigen NK-Zellen eine zytotoxische Aktivität. Die maximal spezifische Lyse der Zellen liegt zwischen 0% und 36%, bei SL unter 30%. Bei V5 könnte man eine geringe zytotoxische Aktivität vermuten, da aber hier die höchste SL von 30% vorliegt ist die Lyse der Zellen zum größten Teil auf die hohe SL zurück zu führen.

Interessante Resultate zeigen die Vorversuche des Ligandeneinbautests, die im autologen System statt fanden.

Effektoren sind CBMCs die aus der Glykophorin A⁺ Anreicherung gewonnen wurden (flow through). Bei einer geringen SL von 28% und einer maximal spezifischer Lyse von 80% (5µl BATDA) bzw. einer SL von 8% und einer maximal spezifischen Lyse von 90% (8µl BATDA) kann von einer starken zytotoxischen Aktivität der Zellen ausgegangen werden.

4.5 Schlußfolgerung aus den Zytotoxizitätsbestimmungen

Das die Ergebnisse schlecht zu beurteilen sind liegt zu einem großen Teil an den verwendeten Methoden. So ist die Reinheit, insbesondere bei den erythroiden Zellen zum Teil unbefriedigend. Insbesondere bleibt unklar, ob die hohen Spontanlysen auf den Ligandeneinbau oder auf die Vorbehandlung der Zellen zurückzuführen ist. Aus diesem Grund hätte der Europiumfreisetzungstest für beide Zellpopulationen noch besser etabliert werden (z. B. im Vergleich mit dem ⁵¹Chromfreisetzungstest) und die Wahl der verwendeten Zellkultur nochmals überdacht werden müssen. Bei allen Vorteilen der semisoliden Zellkultur gegenüber der suspensions Kultur, stellt das Verdauen des Kollagens mittels Kollagenase einen großen Streß für die Zellen dar. Dass die Durchführung des Europiumfreisetzungstests beherrscht wurde und die NK-Zellen funktionstüchtig waren, zeigen die guten Ergebnissen der Zytotoxizität von NK-Zellen gegen die Erythroleukämie K562.

Ungeachtet dieser methodischen Kritikpunkte liefern jüngere Arbeiten Hinweise darauf, dass bei der physiologische Regulierung von NK-Zellen äußerst komplexe Vorgänge ablaufen. Mehre Autoren sind sich darüber einig, dass die Expression von HLA-I Molekülen an Zelloberflächen maßgeblich daran beteiligt ist. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei HLA-C [Colonna et al., 1993; Ciccone 1992] und

dem nicht klassischen HLA-E [Braud et al.; Borrego et al., 1998] und -G zu [Mandelboim et al.; Soderstrom et al.; Perez-Villar et al., 1997] .

Man geht heute davon aus, dass eine NK-Zelle verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche trägt, diese Rezeptoren ermöglichen eine Allel spezifische Unterscheidung der HLA-I Moleküle, und dass diese Rezeptoren in einer Antikörper ähnlichen Vielfalt, Individuum spezifisch vorkommen [Colonna et al., 1996, Valés-Gomés et al., 2000]. Besonders gut untersuchte Rezeptoren sind bisher KIR und CD94/NKG2 [Chang et al., 1995; Houchins et al., 1997; Moretta et al., 1995].

Für die vorliegenden Ergebnisse können aus den oben genannten Gründen nur Mutmaßungen abgeleitet werden, in nachfolgenden Experimenten sollte eine genauere Typisierung der Probanden und eine intensivere Phänotypbestimmung der NK-Zellpopulationen erfolgen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit entstand aus der Beobachtung heraus, dass NK-Zellen und CTL vom γ/δ -Typ eine zytotoxische Aktivität in der Abwesenheit von HLA-I Molekülen zeigen.

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Erythrozyten im Laufe ihrer Differenzierung HLA-I Moleküle verlieren. Da bisher zu diesem Thema wenig Untersuchungen vorliegen, bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, erythroide Vorläuferzellen zu kultivieren, um die HLA-I Expression an der Oberfläche dieser Zellen im zeitlichen Verlauf verfolgen zu können.

Zu diesem Zweck wurden $CD34^+$ Stammzellen aus dem Blut von gesunden, freiwilligen Spendern isoliert und 14 Tage in einem semisoliden Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden granulo-/monozytäre Vorläuferzellen verwendet.

Mittels Durchflußzytometrie wurde Reinheit und HLA-I Expression der Zellen dokumentiert.

Trotz methodischer Schwierigkeiten konnte gezeigt werden, dass erythroide Vorläuferzellen tendenziell nach 14 Tagen weniger HLA-I an ihrer Oberfläche exprimieren als an Tag 8 und 10. Ebenso nahm die HLA-I Expression im Vergleich zu granulo-/monozytären Vorläuferzellen stärker ab. Interessant war die Beobachtung, dass beide Zellreihen nach 8 Tagen weniger HLA-I exprimieren als $CD34^+$ Stammzellen. Ein weiteres Ziel war es, die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in Abhängigkeit von der HLA-I Expression zu untersuchen. Dazu wurde ein Europiumfreisetzungstest durchgeführt. Als Targetzellen dienten erythroide Zellen, die nach 10 Tagen aus der Zellkultur gewonnen wurden. Als Effektoren wurden $CD56^+$ Zellen verwendet. Diese wurden aus Blut des selben Spenders, der 10 Tage zuvor Blut für die $CD34^+$ Stammzellen für die Zellkultur gespendet hat, isoliert.

Ebenso sollte die Fragestellung bearbeitet werden, in welcher Weise sich die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen unterscheidet, wenn als Targetzellen autologe oder allogene Zellen verwendet werden. Im allogenen System dienten Glykophorin A⁺ Zellen, die aus CB gewonnen wurden als Targetzellen. Als Effektoren wurden $CD56^+$ Zellen verwendet, die aus Blut von freiwilligen, gesunden Spendern isoliert wurden.

Bei der in dieser Arbeit gewählten Versuchsanordnung konnte weder im allogenen noch im autologen System eine zytotoxische Aktivität von NK-Zellen beobachtet werden. Um genauere Aussagen machen zu können hätte, wie in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit einer amerikanisch/englischen Arbeitsgruppe, eine genauere Phänotypisierung sowohl der Targetzellen als auch der NK-Zellen erfolgen müssen. Da, wie es derzeit scheint, die Funktion von NK-Zellen überaus komplex reguliert wird.

Aus den oben genannten Gründen kann eine Bewertung der Ergebnisse nur mit Vorbehalt erfolgen und eine definitive Aussage ist auf Grund der hier durchgeführten Versuche nicht möglich. Dennoch ist es in bescheidenem Maße mit dieser Arbeit gelungen, die physiologische Funktionsweise von NK-Zellen zu beleuchten und Anregungen für weitere Studien zu liefern

6 Literatur

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (1996)
Immunologie
Hans Huberverlag Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.
2. Adamson JW, Torok-Storb B, Lin N. (1978)
Analysis of erythropoiesis by erythroid colony formation in culture
Blood Cells 4, 1-2, 89-103.
3. Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T. (1986)
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence.
J Immunol Methods 86, 2, 225-9.
4. Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T. (1986)
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. Significance and specificity of the method.
J Immunol Methods 92, 1, 117-23.
5. Böyum, A. (1968)
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scan J Clin Lab Invest 21, Supp. 97, 7.
6. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. (1998)
Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.
J Exp Med 187, 5, 813-818.
7. Bourne JA. (1989)
Handbuch 1 der Immunperoxidase Färbemethoden.
Laboratory DAKO Cooperation 7-18.
8. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, McMichael AJ. (1998)
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2-A, B and C.
Nature 391, 6669, 795-799.
9. Brenner MB, Strominger JL, Krangel MS. (1988)
The γ/δ T cell receptor.
Adv Immunol 43, 133-92.
10. Breuer R, Hofer I, Trageser G. (1999)
Spektrum der Wissenschaft, spezial: das Immunsystem.
2.Auflage, Verlagsgesellschaft mbH Heidelberg.
11. Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. (1993)
Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, interferon- γ and erythropoietin.
Blood 81, 10, 2579-84.
12. Chang C, Rodriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips JH, Lanier LL. (1995)
Molecular characterization of human CD94: a type II Membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily.
Eur J Immunol 25, 9, 2433-7.

13. Ciccone E, Pende D, Viale O, Than A, Di Donato C, Orengo AM, Biassoni R, Verdiani SA, Amoroso A, Moretta A. (1992)
Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific function: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2).
J Exp Med 176. 4, 963-71.
14. Cline MJ, Golde DW. (1979)
Cellular interactions in haematopoiesis.
Nature 277. 5693, 177-81.
15. Colonna M. (1996)
Natural killer cell receptors specific for MHC class I Molecules.
Curr Opin Immunol 8. 1, 101-7.
16. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. (1993)
Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across polymorphism of HLA-C.
Science 260. 1121-1124.
17. Dobo I, Allegraud A, Navenot JM, Boasson M, Bidet JM, Praloran V. (1995)
Collagen matrix: an attractive alternative to agar and methylcellulose for the culture of hematopoietic progenitors in autologous transplantation products.
J Hematother 4. 281-7
18. Ferrini S, Cambiaggi A, Meazza R, Sforzini S, Marciano S, Mingari MC, Moretta L. (1994)
T-cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function.
Eur J Immunol 24. 10, 2294-2298.
19. Fisch P, Moris A, Rammensee HG, Handgretinger R. (2000)
Inhibitory MHC class I receptors on γ/δ T cells in tumour immunity and autoimmunity.
Immunol Today 21. 4, 187-91.
20. Fisch P, Meuer E, Pende D, Rothenfusser S, Viale O, Kock S, van der Brugger P. (1997)
Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role of human V γ 9/V δ 2 T cells in tumour immunity.
Eur J Immunol 27. 12, 3368-79.
21. Gluckman E. (2001)
Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood.
N Engl J Med 344. 24, 1860-1.
22. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A. (1997)
Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors.
N Engl J Med 337. 373-81.
23. Handgretinger R, Geiselhart A, Moris A, Grau R, Teuffel O, Bethge W, Kanz L, Fisch P. (1999)
Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors.
N Engl J Med 340. 4, 278-84.
24. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. (1975)
Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity.
Int J Cancer 16. 2, 216-29.

25. Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC. (1997)
Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C.
J Immunol 158. 8, 3603-3609.
26. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. (1995)
Harrisons Innere Medizin (Band 1 und 2).
13. Auflage, Blackwell, Berlin, Oxford, Edinburgh, London, Melbourne, Paris, Yokohama
27. Kissling R, Klein E, Wigzell H. (1975)
Natural killer cells in the mouse: 1. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells.
Eur J Immunol 5. 112-8.
28. Lindel T. (2000)
Suspensionskulturen.
4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
29. Ljunggren HG, Karre K. (1990)
In search of the "missing self": MHC molecules and NK recognition.
Immunol Today 11. 7, 237-44.
30. Mandelboim O, Pazmany L, Davis DM, Vales-Gomez M, Reyburn HT, Rybalov B, Strominger JL. (1997)
Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells.
Proc Nat Acad Sci USA 94. 26, 14666-70.
31. Mantalaris A, Keng P, Boune P, Chang AYC, Wu JHD. (1998)
Engineering a human bone marrow moel: a case study on ex vivo erythropoiesis.
Biotchnol Prog 14. 1, 126-33.
32. Metcalf D. (1984)
Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications.
Elsevier Amsterdam, New York, Oxford.
33. Moretta A, Bottino C, Vitale MDP, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. (1992)
Receptors for HLA class I molekules in human natural killer cells.
Annu Rev Immunol 14. 619-48.
34. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. (1995)
Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human-natural killer cells.
J Exp Med 182. 3, 875-884.
35. Moris A, Rothenfusser S, Meuer E, Handgretinger R, Fisch P. (1999)
Role of γ/δ T cells in tumor immunity and their control by NK receptors.
Micorobes Infect 1. 3, 263-7.
36. Nathan DG, Chess L, Hillman DG, Clarke B, Breard J, Merler E, Housman DE. (1978)
Human erythroid burst-forming unit: T-cell requirement for proliferation in vitro.
J Exp Med 147. 2, 324-39.
37. Parker et al. (1990)
Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor γ/δ repertoire.
J Exp Med 171. 5, 1579-1612.

38. Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Reyburn H, Strominger JL. (1996)
Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLAG expression on target cells.
Science 274. 792-795.
39. Perez-Villar JJ, Melero I, Navarro F, Carretero M, Bellon T, Llano M, Colonna M, Geraghty ED, Lopez-Botet M. (1997)
The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1.
J Immunol 158 (12), 5736-43.
40. Raffael, A. (1988)
Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie.
Labor-Medizin, GIT Verlag, Damstadt.
41. Robinson J, Sieff C, Delia D, Edwards PAW, Greaves M. (1981)
Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation.
Nature 289. 68-71.
42. Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA. (2000)
Graft-versus-host disease in children who received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling.
N Engl J Med 342. 1846-54.
43. Rosenberg EB, Herberman RB, Levine PH, Halterman RH, McCoy JL, Wunderlich JR. (1972)
Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins.
Int J Cancer 9. 3, 648-58.
44. Scheduling S, Meister B, Bühring HJ, Baum C, McKearn JP, Bock T, Kanz L, Brugger W. (2000)
Effective ex vivo generation of granulopoietic postprogenitor cells from mobilized peripheral blood CD34⁺ cells.
Exp Hematol 28. 4, 460-70.
45. Schmitz G, Rothe G. (1994)
Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik.
Schlattaueer Stuttgart, New York.
46. Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves MF. (1982)
Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation.
Blood 60. 3, 703-12.
47. Soderstrom K, Corliss B, Lanier LL, Phillips JH. (1997)
CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells
J Immunol 159. 3, 1072-5.
48. Zanjani ED, Rinehart JJ. (1980)
Role of cell-cell interaction in normal and abnormal erythropoiesis.
Am J Pediatr Hematol/Oncol 2. 3, 233-44.
49. Valés-Gómez M, Reyburn H, Strominger J. (2000)
Interaktion between the human NK receptors and their ligands.
Critical Reviews in Immunology 20. 223-244.
50. Veiby OP, Mikhail AA, Snodgrass HR. (1997)
Growth factors and hematopoietic stem cells.
Hematol Oncol Clin North Am 11. 1173.

-
51. Verfaillie CM. (1998)
Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process.
Blood 92, 8, 2609-12.
 52. Wahn U, Seger R, Wahn V. (1999)
Pädiatrische Allergologie und Immunologie.
3. Auflage, Kapitel 1 Urban & Fischer München, Jena.
 53. Winchester RJ, Meyers PA, Broxmeyer HE, Wang CS, Moore MAS, Kunkel HG. (1978)
Inhibitor of human erythropoietic colony formation in culture by treatment with Ia antisera.
J Exp Med 148, 2, 613-8.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnisse

<i>Abbildung 1: Übersicht Hämatopoese.....</i>	11
<i>Abbildung 2: lichtmikroskopische Aufnahme, erythrozytäre Zellkultur.....</i>	33
<i>Abbildung 3: lichtmikroskopische Aufnahme, granulo-/monozytäre Zellkultur.....</i>	36
<i>Abbildung 4: Dot Plot Glykophorin A⁺ und CD13⁺ Zellen.....</i>	34
<i>Abbildung 5: Balkendiagramm Peak Chanal Tag 8.....</i>	38
<i>Abbildung 6: Balkendiagramm Peak Chanal Tag 10.....</i>	38
<i>Abbildung 7: Balkendiagramm Peak Chanal Tag 14.....</i>	36
<i>Abbildung 8: Dot Plot und Histogramm, CD34⁺ Zellen.....</i>	40
<i>Abbildung 9: Dot Plot und Histogramm, erythroider Zellen Tag 10.....</i>	38
<i>Abbildung 10: Dot Plot und Histogramm, CD13⁺ Zellen Tag 10.....</i>	41
<i>Abbildung 11: Liniendiagramm, Peak Chanal im zeitlichen Verlauf.....</i>	39
<i>Abbildung 12: Dot Plot CD56 Anreicherung.....</i>	40
<i>Abbildung 13: Liniendiagramm, Zytotoxizität NK-Zellen gegen erythroide Vorläuferzellen.....</i>	41
<i>Abbildung 14: Liniendiagramm, Zytotoxizität NK-Zellen gegen granulo-/monozytäre Vorläuferzellen.....</i>	44
<i>Abbildung 15: Liniendiagramm, Zytotoxizität NK-Zellen gegen K562.....</i>	42
<i>Abbildung 16: Liniendiagramm, Zytotoxizität NK-Zellen gegen Normoblasten.....</i>	44
<i>Abbildung 17: Liniendiagramm, Zytotoxizität Ligandeneinbautest Normoblasten.....</i>	47
<i>Abbildung 18: Liniendiagramm, Zytotoxizität NK-Zellen gegen K562.....</i>	47

7.2 Tabellenverzeichnisse

<i>Tabelle 1: Zellausbeute.....</i>	33
<i>Tabelle 2: Facs-Werte der erythroide Vorläuferzellen an Tag 8.....</i>	65
<i>Tabelle 3: Facs-Werte der erythroide Vorläuferzellen an Tag 10.....</i>	65
<i>Tabelle 4: Facs-Werte der erythroide Vorläuferzellen an Tag 14.....</i>	65
<i>Tabelle 5: Facs-Werte der granulo-/monozytären Vorläuferzellen an Tag 8.....</i>	66
<i>Tabelle 6: Facs-Werte der granulo-/monozytären Vorläuferzellen an Tag 10.....</i>	66
<i>Tabelle 7: Facs-Werte der granulo-/monozytären Vorläuferzellen an Tag 14.....</i>	66
<i>Tabelle 8: Facs-Werte Normoblasten.....</i>	67

7.3 Facs Daten

Tabelle 2

Facs Werte der erythroiden Zellen an Tag 8

	V4	V5	V6	V9	V13	V15	
Glykophorin A	72%	77%	60%		47%	75%	
W6/32		88%	80%		4%	7%	
Gly A / W6/32	65%	69%	60%		2%	8%	
Peak Chl	93	15	18		3	3	
CD 13	9%	38%	50%		17%	24%	

Tabelle 3

Facs Werte der erythroiden Zellen an Tag 10

	V4	V5	V6	V7	V9	V13	V15	
Glykophorin A	92%	93%	86%	79%	56%	84%	91%	
W6/32	73%	77%	93%	5%	66%	5%	29%	
Gly A / W6/32	98%	96%	94%	3%	53%	1%	19%	
Peak Chl	48	68	50	4	4	3	6	
CD 13	11%	8%	57%		72%	7%	8%	

Tabelle 4

Facs Werte der erythroiden Zellen an Tag 14

	V4	V5	V6	V9	V13	V15	
Glykophorin A	77%	83%		61%	45%	97%	
W6/32	49%	47%	87%	12%	97%	4%	
Gly A / W6/32	86%	36%		15%	46%	8%	
Peak Chl	1	15	67	3	49	3	
CD 13	7%	2%	13%	42%	3%	2%	

Tabelle 2-4: Dargestellt sind die Daten der FACS Messungen der erythroiden Zellen nach 8, 10 und 14 Tagen. Bei V9 an Tag 8 liegen keine Werte vor, da die Zellen schlecht gewachsen sind. Bei V4 an Tag 8 wurde der Ak vergessen. (* V 9 wurde an Tag 12, V 15 an Tag 15 gemessen)

Tabelle 5Facs Werte der granulo- /monozytären Zellen an **Tag 8**

	V4	V5	V6	V9	V13	V15	
Glykophorin A		2%	1%		1%	1%	
W6/32		99%	98%		73%	85%	
Gly A / W6/32		3%	3%		1%		
Peak Chl		557	328		13	12	
CD 13		72%	88%		78%	84%	

Tabelle 6Facs Werte der granulo- /monozytären Zellen an **Tag 10**

	V4	V5	V6	V7	V9	V13	V15	
Glykophorin A		1%		2%	1%	1%	1%	
W6/32		83%		86%	84%	86%	95%	
Gly A / W6/32		57%		0%	1%	0%		
Peak Chl		400		20	21	23	21	
CD 13		96%			93%	84%	90%	

Tabelle 7Facs Werte der granulo- /monozytären Zellen an **Tag 14**

	V4	V5	V6	V9	V13	V15	
Glykophorin A	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
W6/32	96%	99%	99%	95%	96%	31%	
Gly A / W6/32	94%	12%	1%	0%	5%	1%	
Peak Chl	357	806	469	8	843	4	
CD 13	95%	99%	62%	94%	85%	88%	

Tabelle 5-7: Dargestellt sind die Daten der FACS Messungen der Kontrollzelle nach 8, 10 und 14 Tagen. Bei V4 und V9 an Tag 8 und 10 liegen keine Werte vor, da die Zellen schlecht gewachsen sind. Bei V6 an Tag 10 kann auf die Daten nicht mehr zugegriffen werden.

Tabelle 8*Facs Werte der Normoblasten*

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	Vorversuch
Glykophorin A	6%	31%	71%	55%	27%	25%	33%
W6/32	87%	42%	1%	6%	61%	70%	8%
Doppelfärbung	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Peak Chl	98	83	49	22	645	43	27

Tabelle 8: Dargestellt sind die Daten der FACS Messung der Normoblasten. Bei allen Versuchen sind die Zellen nicht doppeltpositiv für Glykophorin A und W6/32.

7.4 Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CB	Cord blood
BFU-E	Burst formin unit (E=erythroide Zellreihe)
CBMC	Cord blood mononuclear cells
CFU-E	Colony formin unit
CD	Cluster of differentiation
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
E/T Verhältnis	Effektor/Target Verhältnis
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G-CSF	Granulocyten colony forming factor
HLA-I	Humanes Leucozyten Antigen Klasse I
HLA-II	Humanes Leucozyten Antigen Klasse II
IL-3	Interleukin 3
KIR	Killer cell Immunglobulin-like Receptor
KM	Knochenmark
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKR	Natural Killercell receptor
CB	Cord Blood
OT	Objekt Träger
PBMC	Periphere blood mononuclear cells
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
SCF	Stem cell factor

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Handgretinger bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und der beständigen Betreuung in allen Fragen.

Bei Frau Ableiter bedanke ich mich für die Hilfe und Zeit, die sie mir bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen widmete.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Andreas Geiselhart, der mich mit Geduld in die Methoden einarbeitet, für die stetige Einsatzbereitschaft, für ein immer offenes Ohr und die Hilfestellungen bei Problemen.

Den Mitarbeitern des KMT-Labors, Dr. Kuci und Dr. Schumm danke ich für den Zuspruch während der Arbeit und die Hilfe bei kleineren und manchmal auch größeren Dingen. Allen ungenannten Mitarbeitern danke ich für die zahlreichen Hinweise, Tips und Tricks zwischen ihrer eigentlichen Arbeit.

Meinen Freunden und Bekannten, die sich für eine Blutspende zur frühen Stunde bereit erklärt haben.

Herrn Professor Dr. Niethammer danke ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die durch ihre bereitwillige Unterstützung meiner Ausbildung die hier vorliegende Dissertation möglich gemacht haben.

Lebenslauf

Name: Eva-Maria Engels

Geburtsdatum: 7. November 1973

Geburtsort: Reutlingen

1980-1993 Freie Georgenschule in Reutlingen

1993-1994 Freiwilliges soziales Jahre an der Universitäts-
Kinderklinik in Tübingen

1994-2001 Studium der Humanmedizin

1996 Physikum (Ludwig-Maximilian Universität zu München)

1997 1. Staatsexamen (Universität Ulm)

2000 2. Staatsexamen (Eberhard-Karls Universität Tübingen)

2000-2001 Praktisches Jahr, KKH Reutlingen

2001 3. Staatsexamen (Eberhard-Karls Universität Tübingen)

Seit 16.07.2001 Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Kinderklinik Freiburg