

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patienten und Kontrollgruppe**

Zu Zwecken der initialen HLA-Typisierung wurde uns nach Aufklärung und Einwilligung heparinisiertes Vollblut von gesunden Personen und Melanompatienten zur Verfügung gestellt. Von diesen erwiesen sich 9 HLA-A2+ und 7 HLA-A1+ gesunde Personen sowie 19 HLA-A2+ und 4 HLA-A1+ Melanompatienten mit metastasiertem Melanom (AJCC Stadium IV, ein Patient Stadium IIIb) als geeignet, so dass sie im Rahmen der Studie analysiert werden konnten. Die nähere Patientencharakterisierung ist Tabelle V zu entnehmen. Für die vorliegenden Analysen lag ein positives Votum der Ethikkommission (MMS) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin vor.

#### **2.1.2 Tumorzelllinien**

Für diese Studie wurden die HLA-A2+ und HLA-A1+ positiven Melanomzelllinien SK-Mel 24, SK-Mel 30 und RVH (ATCC, American Type Culture Collection, MD, USA), sowie MKR, SB-Mel, HB-Mel (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 16), Mel-14 (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 15), Mel-15 (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 6), Mel-18a (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 17), Mel-38 (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 18) und Mel-17 (autologe Tumorzelllinie Pat Nr. 19) verwandt. Die Linien MKR, SB-Mel und HB-Mel wurden in unserem Labor aus Melanom-Metastasengewebe generiert, die übrigen Linien wurden uns freundlicherweise aus dem Labor von Prof. Dr. Dirk Schadendorf (DKFZ Mannheim, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.3 Kulturmedium**

Für die Kultivierung der Tumorzellen wurde RPMI 1640 (Seromed Biochrom, Berlin) versetzt mit 10% Fetalem Kälber Serum (FCS, Seromed Biochrom), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (Seromed Biochrom) verwandt. IMDM (Iscove's modified DMEM, Seromed Biochrom) versetzt mit 10% AB-Serum (PAA, Linz, Österreich), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (alles Seromed Biochrom)

diente als Kulturmedium für die Lymphozyten. Diese Medien werden im Folgenden als Standardmedien bezeichnet.

#### **2.1.4 Phosphatpuffer**

Als Phosphatpuffer diente PBS-Dulbecco ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium (Dulbecco's phosphate buffered saline, Seromed Biochrom).

#### **2.1.5 Dichtegradient**

Zur Lymphozyten-Isolierung wurde Ficoll-Hypaque-Lösung mit der Dichte 1,0077 (Seromed Biochrom) verwandt.

#### **2.1.6 Enzym-Mix**

Der Enzym-Mix, der zur Andauung des Tumorgewebes benutzt wurde, bestand aus 5 ml RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin (alles Seromed Biochrom), 250 U/ml Collagenase (Type VII-S, Sigma, Deisenhofen), 10 U/ml Hyaluronidase (Type IV-S, Sigma) und 0,4 mg/ml DNase (Type I, Sigma).

#### **2.1.7 FACS-Antikörper**

Zur HLA-Typisierung der verschiedenen Kontrollpersonen, Melanompatienten und Tumorzelllinien dienten ein Maus-anti-Human-IgG-mAk gegen HLA-A2 (BB.7.2; ATCC) und Maus-anti-Human-IgG-mAks gegen HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11/24 beziehungsweise HLA-A23/24 (One Lambda, Canoga Park, CA). FITC (Fluorescein-Isothycyanat)-markierte Ziege-anti-Maus IgG-mAks oder IgM-mAks wurden als sekundäre Antikörper verwandt.

Die Expression von kostimulatorischen Antigenen auf der Oberfläche der Tumorzellen wurde ebenfalls im FACS analysiert. Dazu wurden folgende FITC-markierte Antikörper verwandt: anti-CD80, anti-CD54, anti-CD58, anti-CD86, sowie anti-HLA-Klasse-I und anti-HLA-DR (alle Immunotech, Hamburg). Separierte T-Zellen wurden durch Anfärbung mit den Maus-anti-Human mAk anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE (Phycoerythrin), anti-CD45RA-FITC und anti-CD45RO-FITC (alle Immunotech) phänotypisiert. Isotypenspezifische IgG-FITC oder IgG-PE bei der direkten Färbung, sowie Isotypenspezifische IgG kombiniert mit FITC-

markiertem Ziege-anti-Maus-mAk (alle Immunotech) dienten zur Anfärbung der Negativkontrolle.

### **2.1.8 Peptide und Antikörper für den ELISPOT**

Das Influenza-Matrix Protein von Aminosäure-Position 58-66 (GILGFVFTL), welches ein HLA-A2.1-Bindungsmotiv enthält, wurde vom Labor von Prof. H.G. Rammensee (Tübingen) hergestellt. Die Peptide wurden in DMSO (Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst und weiter mit PBS verdünnt. Für Blockierungsexperimente wurden die monoklonalen Maus-anti-Human-Ak BB.7.2 gegen HLA-A2 (ATCC) und AIMHC II (Immunotech) spezifisch für HLA-DR eingesetzt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung von MNCs aus Heparin-Vollblut**

Nach Verdünnung von heparinisiertem Vollblut 1:2 mit sterilem PBS (Seromed Biochrom) wurden jeweils 35 ml vorsichtig über 15 ml Ficoll Hypaque (Seromed Biochrom) in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) geschichtet und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden der Röhrchen während mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) als Interphase auf der Ficoll-Hypaque-Phase unter der PBS-Plasma-Phase verbleiben. Die Interphasen wurden vorsichtig abpipettiert und die Zellen anschließend zweimal mit PBS (Seromed Biochrom) gewaschen. Die Zellen wurden in Portionen von  $1-2 \times 10^7$  in 1 ml FCS (Seromed Biochrom) + 10% DMSO (Merck) in speziellen Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden) eingefroren und anschließend bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer (Sigma), indem kleine Mengen der jeweiligen Zellsuspension mit den entsprechenden Mengen von 1:2-verdünntem Trypan-Blau (Sigma) /PBS (Seromed Biochrom) angefärbt und unter dem Mikroskop vier Großquadrate

ausgezählt wurden. Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat:

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

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

### 2.2.3 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

Die aus heparinisierem Vollblut gewonnenen MNCs wurden zu Zwecken von Subpopulationsanalysen bei einigen Patienten weiter in CD4+, CD8+, sowie CD8+/CD45RO+ und CD8+CD45RA+ T-Lymphozyten-Subpopulationen aufgetrennt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers ein magnetisches Zellisolationssystem verwandt (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), bestehend aus kolloidalen super-paramagnetischen Microbeads, die an Maus-anti-Human-mAk gekoppelt sind. Die spezifischen Ak gegen verschiedene Oberflächenrezeptoren binden an die MNCs und diese Ak-gekoppelten Zellen können anschließend in einer magnetischen Säule heraussortiert werden. Frisch isolierte oder aufgetaute MNCs wurden für 15 min bei 4°C leicht schüttelnd mit 20 µl der jeweiligen Microbeads und 80 µl Puffer (PBS + 10% AB-Serum) pro 10<sup>7</sup> MNCs inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, in 500 µl Puffer aufgenommen und durch eine Säule (positiv-selection-column Type Ms+) gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befand. Nicht haftende Zellen wurden mit der Pufferlösung mehrfach abgespült, bevor die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die positiv angereicherten Zellen herausgedrückt wurden. Nach der Separation wurden die Zellen gewaschen, in 1 ml IMDM-Standardmedium aufgenommen, über Nacht bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen und am nächsten Tag im ELISPOT getestet. Für die Isolierung von CD8+/CD45R0+- bzw. CD8+/CD45RA+- T-Lymphozyten wurde ein CD8-Multi-Sort-Kit (Miltenyi Biotec) verwandt. CD8+ angereicherte T-Lymphozyten wurden für 10 min bei 4°C mit 20 µl MACS-MultiSort-Release-Reagenz pro ml Zellsuspension inkubiert, danach gewaschen und nach sorgfältigem Aufschütteln des Pellets mit 30 µl MACS-MultiSort-Stop-Reagenz, 50 µl Puffer und 20 µl CD45R0- bzw. CD45RA-Microbeads pro 10<sup>7</sup> Zellen für 15 min bei 4°C leicht schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, in 500 µl Puffer resuspendiert und nach dem zuvor beschriebenen Verfahren positiv angereichert. Die Reinheit der einzelnen Separationen wurde durch FACS-Färbungen kontrolliert und lag im Mittel über 90%.

#### **2.2.4 Separation von Tumorzellen aus Tumor-/Metastasengewebe**

Die ca. 1 cm<sup>3</sup> großen Gewebestücke wurden innerhalb einer Stunde nach der operativen Entfernung weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte eine sorgfältige mechanische Zerkleinerung mit Skalpell und kleiner Präparierschere unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale. Die Gewebemasse wurde dann in der Petrischale in 5 ml Enzym-Mix (siehe 2.1.4) aufgenommen und 45 min bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in 30 ml RPMI-Standardmedium gründlich resuspendiert und zweimal durch einen sterilen Mullfilter gegeben. Die filtrierte Fraktion wurde 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert, gut resuspendiert und erneut in 30 ml RPMI-Standardmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Filtration der Suspension durch einen 100 µm Nylon-Filter (Cell-Strainer, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg). Der Filtration schlossen sich zwei Waschschriffe mit RPMI-Standardmedium an. Die Tumorzellen wurden anschließend in RPMI-Standardmedium in Kulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.2.5 Kultur der Tumorzelllinien**

Alle Zelllinien wuchsen adhärenf in Kulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, wobei RPMI-Standardmedium diente als Kulturmedium.

#### **2.2.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (mAk) die Analyse von Oberflächenstrukturen auf verschiedensten Zellen. Man kann entweder direkt Fluoreszenz-markierte-mAk verwenden (direkte Färbung) oder einen unmarkierten primären Ak mit einem sekundären Fluoreszenz-markierten Ak koppeln (indirekte Färbung). Im Durchflusszytometer wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelle bestimmt, welche mit der Dichte der jeweils angefärbten Oberflächenstruktur korreliert. Ein Standardprotokoll diente der Färbung der jeweils untersuchten Zellen: Tumorzellen wurden zunächst mit einem Zellschaber (Falcon) vom Boden der Kulturflaschen (Nunc) abgelöst und anschließend genau wie die zu analysierenden Lymphozyten herunterzentrifugiert (2000 U/min) und für 10 min bei 4°C mit PBS + 2% Endobulin (Baxter, Wien, Österreich) inkubiert. Endobulin als humanes Immunglobulin G dient der Absättigung von freien Fc-Rezeptoren und soll die unspezifische Antikörper-Bindung minimieren. Nach erneutem Zentrifugieren erfolgte die Färbung von 1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Ansatz mit dem

jeweiligen Ak für 30 min bei 4°C unter Lichtabschluss. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS + 2% Endoglobulin gewaschen und abschließend mit PBS + 1% Formalin (Sigma) fixiert. Bei der indirekten Färbung wurden die Zellen zuvor für 30 min bei 4°C unter Lichtabschluss mit dem sekundären Antikörper inkubiert, dann gewaschen und fixiert. Die Analyse erfolgte am gleichen oder darauffolgenden Tag mit einem FACS-Scan oder FACS-Calibur unter Verwendung der CellQuest-Software (alles Becton Dickinson).

Um nur die spezifische Fluoreszenzintensität zu messen, wurden die Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische Bindung von den Messergebnissen subtrahiert. Diese wurde durch Färbung mit irrelevanten, isotypenspezifischen IgG-FITC-mAk oder IgG-PE-mAk bei der direkten Färbung oder irrelevanten, isotypenspezifischen IgG-mAk + FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-mAk (alle Immunotech) bei der indirekten Färbung ermittelt.

## **2.2.7 ELISPOT-Assay**

### **2.2.7.1 IFN $\gamma$ -ELISPOT-Assay**

Der ELISPOT-Assay, der initial von CZERKINSKY et al. beschrieben und anschließend von zahlreichen Arbeitsgruppen modifiziert und verfeinert wurde (CZERKINSKY 1988, HERR 1996, SCHEIBENBOGEN 1997(a), SCHMITTEL 1997), basiert auf der Verwendung von Antikörpern zum Nachweis von Zytokinen, die von spezifischen T-Zellen nach einer kurzen in-vitro-Stimulation freigesetzt werden. Im Rahmen dieser Studie wurde ein IFN $\gamma$ -ELISPOT-Assay wie folgt eingesetzt: 96-Well Nitrozellulose-Platten (Milititer, Milipore, Bredford, MA) wurden mit 50  $\mu$ l PBS (Seromed Biochrom) für einige Minuten befeuchtet. Die Wells wurden anschließend mit 50  $\mu$ l monoklonalem Maus-anti-human-IFN $\gamma$ -Ak in einer Konzentration von 8  $\mu$ g/ml (Code-Nr. 1598-00, Genzyme, Rüsselsheim) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ak-Lösung wurde dekantiert und die Wells wurden anschließend mit 200  $\mu$ l IMDM (Biochrom) + 10% AB-Serum (PAA, Linz, A) für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> blockiert. Aus Heparinblut gewonnene MNCs bzw. mittels Mini-Macs-System isolierte T-Lymphozyten wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$ /well und bei Bedarf in weiteren Verdünnungsstufen mit  $1,5 \times 10^4$ /well bzw.  $1,5 \times 10^3$ /well eingesetzt. Anschließend wurden sie

ohne Zusätze, mit 10 µg/ml Influenza-Matrix-Protein, mit Tumorzellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$ /well oder mit 10 µg/ml PWM (Pokeweed Mitogen, Sigma) für 24h bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit 200 µl PBS + 0,05 % Tween-20 (Sigma) aus den Platten herausgelöst. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 4°C mit 50 µl/well eines biotinierten Maus-anti-human-IFN $\gamma$ -mAk in einer Konzentration von 5 µg/ml (Clone-Nr. 4.S.B3, Pharmingen, Hamburg). Nach viermaligem Waschen der Platten mit PBS (Seromed Biochrom) wurden sie mit 100 µl/well Streptavidin-Alkaline-Phosphatase (1:1000 verdünnt, BioRad, München) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µl BCIP/NBT Substrat (BioRad) für 20-30 min in die Platten pipettiert. Die sich einstellende grau-blaue Farbreaktion wurde durch Abspülen unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Die Platten wurden unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur getrocknet und die Anzahl der Spots, welche IFN $\gamma$ -freisetzenden Zellen entspricht, unter einem Stereomikroskop (Eschenbach, Ratingen) oder mit Hilfe eines computergesteuerten Lesegerätes ausgewertet (AID, Strassberg). Anschließend wurde die Summe aus der ermittelten Anzahl von Spots pro Well gebildet, bezogen auf  $1 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^5$  eingesetzte Zellen.

Für die Analysen zur Ermittlung der Antigen-präsentierenden Fähigkeiten von Tumorzellen wurden die Tumorzellen bzw. MNCs für zwei Stunden bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> mit 10 µg/ml des Influenza-Matrix-Proteins vorinkubiert und anschließend drei mal mit PBS gründlich gewaschen. Tumorzellen, die in Blockierungsexperimenten eingesetzt wurden, inkubierten zunächst für 30 min mit dem jeweiligen Antikörper, bevor sie in die Nitrozellulose-Platten zu den MNCs oder T-Lymphozyten pipettiert wurden. Als Negativkontrolle wurden MNCs ohne Zusätze für 24 Stunden in den Nitrozellulose-Platten belassen. Die gemessene spontane IFN $\gamma$ - Freisetzung wurde als Hintergrund abgezogen. PWM (Sigma), ein starkes Mitogen diente als Stimulierungs- bzw. als Positivkontrolle.

#### **2.2.7.2 Granzyme-ELISPOT-Assay**

Der Granzyme-ELISPOT-Assay unterscheidet sich von dem IFN $\gamma$ -ELISPOT-Assay in den verwendeten Antikörpern: Die Nitrozellulose-Platten wurden mit 50µl/well eines

monoklonalen anti-Human-Granzyme Antikörpers (Pharmingen) in einer Konzentration von 40 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein biotinierter Maus-anti-Human Granzyme-mAk (Miltenyi Biotec) wurde in einer Konzentration von 0,156 µg/ml als sekundärer Antikörper eingesetzt.

### **2.3 Statistische Analysen**

Die statische Auswertung der Tumor-gerichteten T-Zellantworten bei Gesunden und Melanompatienten erfolgte mit dem Wilcoxon-Test, einem Rangreihentest für abhängige Stichproben, der keine Normalverteilung voraussetzt.