

**Differenzierung von Makrophagen-Vorläufern des Knochenmarks  
bei der Maus unter dem Einfluß von Interleukin-2**

Sind Interleukin-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer  
natürliche Killer (NK-) Zellen ?

vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

Hao Li

geboren am 13.09.57. in Sichuan, China

Hannover, 1994.

**Differenzierung von Makrophagen-Vorläufern des Knochenmarks  
bei der Maus unter dem Einfluß von Interleukin-2**

Sind Interleukin-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer  
natürliche Killer (NK-) Zellen ?

vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

Hao Li

geboren am 13.09.57. in Sichuan, China

Hannover, 1994.

Referent: Prof. Dr. M.-L. Lohmann-Matthes  
Korreferent: Prof. Dr. H. Kirchhoff  
Tag der Promotion: 27. Juni 1994

## DANKSAGEN

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. M. L. Lohmann-Matthes, die es mir überhaupt erst ermöglicht hat, in Hannover beim Fraunhofer-Institut die Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihr für die freundliche Überlassung des Themas, für die Betreuung und die wertvollen Hinweise. Ihre ständig wohlwollende Unterstützung und hilfreiche Beratung haben dieser Arbeit sehr zum Gelingen beigetragen.

Frau Prof. Dr. H. Kirchhoff danke ich herzlich für das freundlicherweise übernommene Korreferat.

Frau Dr. E. Kniep danke ich sehr für das Gegenlesen des Manuskriptes und die hilfreiche Kritik.

Bei Dipl. Biol. U. Pohler und Dipl. Biol. J. Lehmann sowie Dr. I. Strehlow möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie die Bereitschaft bei der Lösung von Problemen mitzuhelfen bedanken.

Drs. T. Decker und M. Baccarini danke ich für das stete Interesse und hilfreiche Beratung.

Frau G. Aichert-Brinkmann bin ich für die Anfertigung der Photographien sehr dankbar.

Allen Mitarbeitern der Abt. Immunbiologie des Fraunhofer Institutes in Hannover danke ich herzlich für ein hervorragendes Arbeitsklima, das durch Hilfsbereitschaft besonders geprägt wurde.

Zu guter Letzt danke ich aus ganzem Herz meiner Familie (meinen Eltern, meinem Mann und meiner Schwester), die zwar weit entfernt von mir sind, aber stete Liebe, Ermunterung und Unterstützung an mich geschickt haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

*H. Li, U. Pohler, I. Strehlow, S. Hertig, M. Baccharini, A. Emmendorffer, J. Tschopp, and M.-L. Lohmann-Matthes*: Macrophage precursor cells produce perforin and perform Yac-1 lytic activity in response to stimulation with interleukin-2. *Journal of Leukocyte Biology*, 56, August 1994.

*H. Li, E. Kniep, A. Emmendorffer and M.-L. Lohmann-Matthes*: Differentiation of macrophage precursors to cells with LAK activity under the influence of CSF-1 and high dose IL-2. *Scand. J. Immunol.*, 33, 511-520, 1991.

*H. Li, R. Schwinzer, M. Baccharini, and M.-L. Lohmann-Matthes*: Cooperative effects of colony-stimulating factor 1 and recombinant interleukin 2 on proliferation and induction of cytotoxicity of macrophage precursors generated from mouse bone marrow cell cultures. *J. Exp. Med.*, 169, 973-986, 1989.

## **ABSTRACT**

It is well known that NK-cells (natural killer cells) play an important role in the natural defence of immune system against neoplastic or virally infected cells, as well as certain microorganisms. Nevertheless the cell lineage of NK-cells has not yet been clarified. In the present work the bone-marrow precursor cells, which could differentiate into NK-cells after activating with interleukin-2 (NK-cytotoxicity stimulation), were studied under the bone-marrow culture conditions. It was found out that these NK-cell precursors from bone-marrow were dependant on myeloid growth factors: GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) or CSF-1 (colony stimulating factor 1, i.e. macrophage-colony stimulating factor), to proliferate. Incubating these NK-cell precursors only with CSF-1 or PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), the factor which stimulates the cell-differentiation, the cells developed into typical mature macrophages in a short time (24-72 hours). Thus these bone-marrow precursor cells, which were able to differentiate into NK-cells, were identified as macrophage precursors.

Interleukin-2 is the crucial factor, which influences the differentiation of bone marrow macrophage precursors into the direction to NK-cells. Within 3-6 days of incubation with interleukin-2, these macrophage precursor cells developed first into NK-cells and then into LAK-cells (lymphokine-activated killer cells) which have been well known as the further activated form of NK-cells. The cell types were determined by morphological, phenotypic, and functional investigations.

The experimental results presented in this work demonstrate that NK-/LAK-cells might derive from macrophage system.

## ABSTRAKT

Es ist seit langem bekannt, daß NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) bei der natürlichen Abwehr des Immunsystems gegen neoplastische oder Virus-infizierte Zellen und manche Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen. Dennoch ist die Zellzugehörigkeit der NK-Zellen immer noch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Knochenmark-Kultur die Knochenmark-Vorläuferzellen untersucht, die sich durch Interleukin-2-Aktivierung (NK-Zytotoxizität Stimulation) zu NK-Zellen differenzierten. Es stellte sich heraus, daß diese NK-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark zur Proliferation von myeloischen Wachstumsfaktoren: GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor) oder CSF-1 ("colony-stimulating factor 1" bzw. Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor), abhängig waren. Wurden diese NK-Zell-Vorläufer allein mit CSF-1 oder PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), welches die Differenzierung stimuliert, inkubiert, entwickelten sie sich in kurzer Zeit (24-72 Stunden) zu typischen reifen Makrophagen. Deshalb wurden diese Knochenmark-Vorläuferzellen, die fähig waren, zu NK-Zellen zu differenzieren, als Makrophagen-Vorläufer identifiziert.

Interleukin-2 ist der entscheidende Faktor, der die Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks in die Richtung zu NK-Zellen beeinflusst. Bei der Inkubation mit Interleukin-2 konnten sich diese Makrophagen-Vorläuferzellen innerhalb von 3-6 Tagen zunächst zu typischen NK-Zellen, danach zu deren weiter aktivierten Form LAK-Zellen (Lymphokin-aktivierte-Killer-Zellen) entwickeln. Die Zelltypen wurden durch morphologische, phänotypische, und funktionelle Untersuchungen bestimmt.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten an, daß NK-/LAK-Zellen wahrscheinlich aus dem Makrophagensystem abstammen.

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. NK-Zellen und Makrophagen-Vorläufer.....	1
1.2. IL-2 und IL-2 Rezeptor.....	3
1.3. LAK-Zellen und ihre Beziehung zu NK-Zellen.....	5
1.4. Mechanismus der NK/LAK-Zytotoxizität und das Membranloch-bildende Perforin.....	7
1.5. Regulatorische Funktion der NK-Zellen.....	8
1.6. Ziel der Arbeit.....	11
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
<b><u>Material</u></b>	
2.1. Tiere.....	12
2.2. Chemikalien.....	12
2.3. Zytokine.....	15
2.4. Antikörper.....	16
2.5. Enzyme.....	19
2.6. Isotope.....	19
<b>2.7. Medien</b>	
2.7.1. RPMI 1640 Medium.....	20
2.7.2. Vollmedium.....	20
2.7.3. L-Zell "konditioniertes" Medium.....	20
2.7.4. Iscove's Medium.....	20
<b>2.8. Puffer und Lösungen</b>	
<b><u>2.8.1. für die zellbiologische Arbeit</u></b>	
2.8.1.1. PBS <sup>+</sup> -MC (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung).....	21
2.8.1.2. Actinomycin D Lösung.....	21
2.8.1.3. Glycerin-Gelatine-Lösung.....	21
2.8.1.4. Gepufferte Formalin-Aceton-Lösung.....	22
2.8.1.5. 2-ME/Hepes Stammlösung.....	22
2.8.1.6. MTT-Lösung.....	23



2.8.1.7.	MTT-Abstopplösung.....	23
2.8.1.8.	Perkoll Stammlösung.....	23
2.8.1.9.	Puffer für die Esterase-Doppelfärbung.....	23
2.8.1.10.	Trypsin/EDTA-Lösung.....	24

### 2.8.2. für ELISA, FACS und histochemische Färbungen

2.8.2.1.	TBS-Puffer.....	25
2.8.2.2.	DAB-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung.....	25
2.8.2.3.	ELISA-Waschpuffer.....	25
2.8.2.4.	FACS-Waschpuffer.....	25
2.8.2.5.	Fast-Red-Lösung.....	26
2.8.2.6.	TMS-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer).....	26

### 2.8.3. für die molekularbiologische Arbeit

2.8.3.1.	20xSSC Lösung.....	26
2.8.3.2.	50x Denhardt's Lösung.....	27
2.8.3.3.	DEPC-H <sub>2</sub> O.....	27
2.8.3.4.	DMSO-Mix.....	27
2.8.3.5.	Hybridisierungspuffer für den Northern-Blot.....	27
2.8.3.6.	Hybridisierungspuffer für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	27
2.8.3.7.	5x RNA-Probenpuffer.....	28
2.8.3.8.	Lösung D.....	28
2.8.3.9.	10x TE-Puffer.....	29

## **2.9. Zelllinien**

2.9.1.	D10.G4.1.....	29
2.9.2.	FDCP-1.....	29
2.9.3.	L929.....	29
2.9.4.	P815.....	30
2.9.5.	7TD1.....	30
2.9.6.	Yac-1.....	30

## **Methoden**

### **2.10. Zellisolierung, -kultur, -reinigung und -aktivierung**

2.10.1.	Isolierung der Knochenmarkszellen.....	31
2.10.2.	Perkoll-Gradient Fraktionierung.....	31
2.10.3.	Knochenmark (KM)-Vorkultur.....	32
2.10.4.	Isolierung der Makrophagen-Vorläufer aus KM-Vorkultur.....	33
2.10.5.	Depletion der phagozytischen Zellen.....	33

2.10.6.	Depletion der Lymphozyten mit magnetischen Beads.....	33
2.10.7.	Hauptkultur und LAK-Kultur.....	34
2.10.8.	Aktivierung der KM-Markrophagen-Vorläufer zur Zytokin-Produktion.....	34
<b>2.11. Zellfärbungen</b>		
2.11.1.	Zytopräparate.....	34
2.11.2.	Zellkultur in Chamber Slides.....	35
2.11.3.	Esterase-Doppelfärbung.....	35
2.11.4.	Fluoreszenzfärbung der Zelloberflächenmarker.....	36
2.11.5.	Immunhistochemische Färbung mit AP-konjugiertem Antikörper.....	36
2.11.6.	Pappenheimfärbung (May-Grünwald/Giemsa-Färbung).....	37
<b>2.12. Tests</b>		
2.12.1.	[ <sup>3</sup> H]-Thymidin Einbau zum Test der Zellproliferation.....	37
2.12.2.	[ <sup>51</sup> Cr] Freisetzung aus Zielzellen zum Test der Zytotoxizität.....	38
2.12.3.	Test der Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität.....	39
2.12.4.	MTT-Test (kolorimetrischer Bioassay).....	39
2.12.5.	Enzymgebundener Immunoassay (ELISA).....	40
2.12.6.	Soft-Agar Assay.....	40
<b>2.13. Nachweis der Zytokine</b>		
2.13.1.	IL-1.....	41
2.13.2.	IL-6.....	41
2.13.3.	IL-10.....	42
2.13.4.	M-CSF.....	42
2.13.5.	GM-CSF/IL-3.....	42
2.13.6.	IFN- $\gamma$ .....	43
2.13.7.	TNF- $\alpha$ .....	43
<b>2.14. Nachweis der mRNA von speziellen Proteinen</b>		
<u>2.14.1. Northern-Blot</u>		
2.14.1.1.	Markierung einer cDNA Probe mit [ <sup>32</sup> P].....	43
2.14.1.2.	RNA Präparation.....	44
2.14.1.3.	RNA-Trennung und Blot.....	45
2.14.1.4.	Hybridisierung und Nachweis der RNA.....	46
<u>2.14.2. <i>in situ</i> Hybridisierung</u>		
2.14.2.1.	cDNA Markierung mit Digoxigenin (DIG).....	46

2.14.2.2.	Zellfixierung und Permeabilisierung.....	47
2.14.2.3.	Hybridisierung.....	47
2.14.2.4.	Immunologischer Nachweis mit anti-DIG Antikörper.....	48
2.15.	Statistische Analyse.....	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>Anreicherung und Kultur für NK-aktive Zellen aus Knochenmark</b>	
3.1.1.	Anreicherung der NK-Vorläufer aus den gesamten Knochenmarkzellen.....	50
3.1.2.	Mikroskopische Untersuchung der Knochenmarkzellen in verschiedenen Perkol-Fractionen.....	51
3.1.3.	Proliferation der NK-Vorläufer haltigen Zellpopulation.....	52
3.1.4.	Effektive Knochenmark-Kultur für proliferierende und NK-aktive Zellen .....	54
3.1.5.	Reinigung der NK-aktiven Zellen nach KM-Kultur in CSF + IL-2.....	56
<b>3.2.</b>	<b>Eigenschaften der durch IL-2 induzierten, NK-aktiven Makrophagen- Vorläuferzellen</b>	
3.2.1.	Morphologie und Phänotyp der NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen.....	59
3.2.2.	Faktor-Abhängigkeit der Zellproliferation.....	61
3.2.3.	Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität.....	62
3.2.4.	Zielzelle-Selektivität der Effektorzellen.....	64
3.2.5.	Morphologische Entwicklung der Zellen beim Entzug von IL-2.....	65
<b>3.3.</b>	<b>Induktion von LAK Aktivität in NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläuferzellen</b>	
3.3.1.	Aktivierung zur LAK-Aktivität durch Stimulierung mit hohen Dosen IL-2.....	67
3.3.2.	Kinetik der LAK-Induktion.....	68
3.3.3.	Morphologie der aus NK-ähnlichen Makrophagen- Vorläufern entwickelten LAK-Zellen.....	69
3.3.4.	Phänotyp der aus NK-ähnlichen Makrophagen- Vorläufern entwickelten LAK-Zellen.....	71
<b>3.4.</b>	<b>Perforin Produktion von Markrophagen-Vorläuferzellen</b>	
3.4.1.	Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität.....	72
3.4.2.	Nachweis der Perforin mRNA durch Northern-Blot.....	73
3.4.3.	Nachweis der Perforin mRNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung.....	75

---

3.4.4. Nachweis des Perforin Proteins durch immunhistochemische Färbung.....	77
<b>3.5. Zytokin-Freisetzung von NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen</b>	
3.5.1. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Zielzellen und Zytokinen.....	78
3.5.1.1. TNF- $\alpha$ .....	78
3.5.1.2. IL-1.....	80
3.5.1.3. IL-6.....	81
3.5.1.4. IL-10.....	82
3.5.1.5. IFN- $\gamma$ .....	83
3.5.2. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Phorbolster/Ca <sup>2+</sup> -Ionophor.....	85
3.5.3. Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren.....	86
3.5.3.1. GM-CSF/IL-3.....	86
3.5.3.2. M-CSF.....	88
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>91</b>
4.1. Sind NK-Zellen IL-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer ?.....	91
4.2. Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks unter dem Einfluß von CSF-1 und IL-2.....	96
4.3. <i>in vivo</i> Anwendung der kultivierten LAK-Zellen und Analyse der Ursache für die Nebenwirkungen der Immunotherapie mit LAK-Zellen plus hohe Dosen IL-2.....	101
4.4. Vergleich der Eigenschaften von den unstimulierten Makrophagen-Vorläufern, den durch IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufern, und den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen.....	102
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>107</b>

---

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb.1	Frisch isolierte gesamte Knochenmarkzellen.....	50
Abb.2	Proliferation der KM-Zellen von Perkoll-Fraktion 32%/52%.....	53
Abb.3	Zellproliferation in Gegenwart von rekombinanten CSFs.....	54
Abb.4	Einfluß des Zeitpunktes der Zugabe von IL-2 auf die Induktion der NK-Aktivität.....	55
Abb.5	Morphologie der gereinigten Makrophagen- Vorläufer (MV-Zellen).....	58
Abb.6	Die aus den gereinigten MV-Zellen ausgereiften Makrophagen.....	58
Abb.7	Die aus der KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 gewonnene, zytoplasmatische Granula-haltige, NK-aktive MV-Zelle.....	59
Abb.8	Die aus der KM-Vorkultur allein mit CSF gewonnene, agranuläre, NK-inaktive MV-Zelle.....	59
Abb.9	Oberflächenantigen-Profile der NK-aktiven MV-Zellpopulation.....	60
Abb.10	Faktor-Abhängigkeit der Proliferation von NK-ähnlichen MV-Zellen.....	61
Abb.11	Kinetik der NK-Aktivität in Gegenwart von CSF-1+IL-2.....	62
Abb.12	Verlust der Zytotoxizität nach Entzug von IL-2.....	63
Abb.13	Target-Selektivität von NK-aktiven MV-Zellen.....	64
Abb.14	Die von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1 ausgereiften Makrophagen.....	65
Abb.15	Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern gewonnenen reifen Makrophagen.....	66

---

Abb.16	Morphologie der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1+IL-2 entwickelten Zellen.....	66
Abb.17	Kinetik der LAK-Induktion in IL-2 stimulierten MV-Zellen.....	69
Abb.18	Morphologie der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.....	70
Abb.19	Fragmentierung der LAK-Zellen, beobachtet am Tag 9 der LAK-Kultur.....	70
Abb.20	Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.....	71
Abb.21	Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität von NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen.....	73
Abb.22	Northern-Blot Analyse für die Exprimierung der Perforin-Messenger-RNA durch MV-Zellen.....	74
Abb.23	Ergebnis von <i>in situ</i> Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin.....	76
Abb.24	Immunhistochemische Färbung mit mAk gegen murines Perforin.....	77
Abb.25	Eine Hypothese über die Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks.....	96

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. A	Zytokin-Produktion von NK-Zellen (Daten aus der Literatur).....	10
Tab.1	Zytotoxizität verschiedener Percoll-Fractionen aus murinem Knochenmark gegen Yac-1 Tumorzellen nach IL-2 Stimulation.....	51
Tab.2	Zelltypen in den verschiedenen Fraktionen von Percoll-Gradient I.....	52
Tab.3	Zellzusammensetzung in den Fraktionen von Percoll-Gradient II.....	56
Tab.4	NK-Aktivität und Zellzahl in jeder Fraktion von Percoll-Gradient II.....	57
Tab.5	Wirkung von IL-2-Dosen auf NK-ähnliche MV-Zellen.....	68
Tab.6	Zytotoxizität gegen Yac-1 von verschiedenen MV-Zellproben.....	75
Tab.7	Freisetzung von TNF aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen.....	79
Tab.8	Freisetzung von IL-1 aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen.....	80
Tab.9	Freisetzung von IL-6 aus MV-Zellen bei Aktivierung mit IL-2 und Yac-1.....	81
Tab.10	Freisetzung von IL-10 aus MV-Zellen.....	83
Tab.11	Freisetzung von IFN- $\gamma$ aus MV-Zellen.....	84
Tab.12	Zytokin-Freisetzung aus MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA und Ionomycin.....	85
Tab.13	Freisetzung von GM-CSF oder IL-3 aus den stimulierten MV-Zellen.....	87
Tab.14	Produktion von M-CSF durch MV-Zellen.....	88

---

Tab. 15.a	Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen.....	90
Tab. 15.b	Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-inaktiven MV-Zellen.....	90
Tab. 16	Vergleich der Eigenschaften von MV-Zellen mit denen von NK/LAK-Zellen.....	103



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Koloniebildende-Einheiten, engl. colony forming units
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute, engl. counts per minute
<sup>51</sup> Cr	Chrom-51 (Natriumchromat)
CSF	Kolonie-stimulierender-Faktor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay, engl. Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Durchflußzytometer, engl. fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, engl. gravity
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen CSF
h	Stunde, engl. hour
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
hr	human rekombinant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

---

IL-2 R	Interleukin-2 Rezeptor
Ion.	Ionomycin
KM	Knochenmark
LAK	Lymphokin-aktivierte Killer
LGL	große granuläre Lymphozyten, engl. large granular lymphocytes
LU	lytische Einheiten
L-Zellen	L929-Fibroblastenzellen
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
M-CSF	Makrophagen CSF
2-ME	2-Mercaptoethanol
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5,-Diphenyltetrazolium Bromide
MV	Makrophagen-Vorläufer
MΦ	Makrophagen
NK	natürliche "Killer"
NTB	Nitroblau tetrazolium Salz
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, engl. phosphate buffered saline
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunde
spez.	spezifisch
SR	spontane Freisetzung, engl. spontaneous release
Stdn.	Stunden
TBS	Tris-Puffer-Salzlösung

---

TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TMS	Tris-Magnesium-Salzlösung
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Einheit, engl. unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
VM.	Vollmedium

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. NK-Zellen und Makrophagen-Vorläufer.

Vor 20 Jahren entdeckten mehrere Gruppen von Wissenschaftlern während ihren Studien der Zell-vermittelten-Zytotoxizität zufällig die natürlichen Killerzellen [Rosenberg et al. 1972, Takasugi et al. 1973]. Die Forscher wünschten, eine spezifische zytotoxische Aktivität von Zellen aus Tumor-tragenden Patienten gegen autologe Tumorzellen oder gegen allogene Tumoren des ähnlichen oder gleichen histologischen Typs zu finden, und fanden eine Zytotoxizität von "Lymphozyten" aus normalen Individuen. Diese Art zytotoxischer Aktivität unterscheidet sich von der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten durch folgende Eigenschaften: (i) Sie zeigt keine MHC-Restriktion [Kiessling et al. 1975]; (ii) Sie scheint nicht von der antigenen Sensibilisierung abhängig zu sein und zeigt keine spezifische "secondary memory" Antwort [Herberman et al. 1975]. Diese zytotoxischen Zellen können spontan die für diese Form der Zytotoxizität empfindlichen, sogenannten NK-Zielzellen, wie z.B. syngene, allogene, und xenogene Tumorzellen (Leukemiezellen, Karzinomzellen und andere Typen [Herberman & Holden 1978]), Virus-infizierte Zellen (z.B. Herpes und Influenza Virus [Biron & Welsh 1982]), und sogar manche Mikroorganismen [Nencioni et al. 1983, Morgan et al. 1984] zerstören. Deshalb wurde diese spontane zytotoxische Aktivität "Natural Killing"-Aktivität genannt und die dafür verantwortlichen Effektor-Zellen als NK-Zellen bezeichnet. Gleich nach ihrer Entdeckung zeigten funktionelle Experimente im *in vivo* Modell, daß NK-Zellen bei der natürlichen Resistenz gegen Tumoren und Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle spielen [Baldwin et al. 1976, Herberman & Holden 1978, und Hanna et al. 1980, 1981].

Zahlreiche Forschungen über NK-Zellen, hauptsächlich über ihre Identität, Ursprung und Zugehörigkeit, wurden in erstem Jahrzehnt nach ihrer Entdeckung gemacht. Obwohl man damals nicht in der Lage war, reine NK-Zellen zu isolieren, sind folgende Eigenschaften von den Zellen, die NK-Aktivität ausübten, übereinstimmend festgestellt worden: (i) NK-Aktivität

wird von Zellen mit LGL ("large granular lymphocytes") Morphologie vermittelt; (ii) NK-Effektorzellen sind nicht adhärenente und nicht phagozytierende Zellen, die im peripheren Blut und in der Milz am häufigsten zu finden sind; (iii) Den NK-Effektorzellen fehlen typische Eigenschaften und Oberflächenmarker von klassischen Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen oder T-Zellen [Übersicht Ortaldo & Herberman 1984, Tutt et al. 1986]. Dank der Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen NK-Zellen und der Anwendung von rekombinanten Faktoren in der Zellkultur, wurden ab 1986 die Methoden für Isolierung, Kultur und Analyse der NK-Zellen wesentlich verbessert und die Gewinnung von NK-Zellen mit hohem Reinheitsgrad ermöglicht [Hackett et al. 1986]. 1988 wurde von Fitzgerald et al. die erste genauere Definition der NK-Zellen publiziert [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988]. Es wurde beschrieben, daß NK-Zellen CD3<sup>-</sup>, TCR<sup>-</sup> große granuläre Lymphozyten sind und daß sie bestimmte Marker (beim Menschen CD 16 sowie NKH-1 und bei der Maus NK-1,1 oder NK-2.1) auf der Oberfläche exprimieren. NK-Zellen brauchen für ihre zytolytischen Reaktionen nicht die Expressierung von MHC Klasse I oder II Molekülen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zwischen NK-Zellen und T-Zellen, dennoch hat es die Zugehörigkeit der NK-Zellen nicht ausreichend geklärt.

Durch ein Transplantationsexperiment von Haller et al. 1977 ist festgestellt worden, daß die Vorläufer der NK-Zellen aus dem Knochenmark kommen [Haller et al. 1977]. 10 Jahre später konnte durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, daß IL-2 der essentielle Faktor ist, der die Entwicklung dieser Knochenmark-Vorläufer von NK-inaktiver Form zu NK-aktiven Effektor-Zellen stimuliert [Koo et al. 1986, Pollack et al. 1987, und Lotzova et al. 1987]. Im Maussystem fanden Hackett et al., daß die Knochenmarkvorläufer für NK-Zellen NK-1.1 Marker exprimieren [Hackett et al. 1986]. Ob diese Vorläufer eine unabhängige Zelltyp representieren oder ob sie zu einem bereits bekannten Zelltyp gehören, ist bis heute unklar.

1979 erschien die erste Veröffentlichung, die über die Gemeinsamkeiten zwischen NK-Zellen

und Promonozyten, auch Makrophagen-Vorläufer genannt, berichtet [Lohmann-Matthes et al. 1979]. Diese Promonozyten wurden aus einer 5-tägigen Maus-Knochenmark-Kultur in L-Zell konditioniertem Medium isoliert und waren nicht adhärente und nicht phagozytierende Zellen. Sie waren zytolytisch für die NK-Zielzellen Yac-1 und sahen wie mittelgroße Lymphozyten aus. Sie wurden als Promonozyten identifiziert, weil sie in CSF-1 haltigem L-Zell konditioniertem Medium zu Makrophagen ausdifferenzieren konnten. Die Autoren vermuteten, daß diese Makrophagen-Vorläuferzellen mit den beschriebenen NK-Zellen verwandt sind oder daß es sich in beiden Fällen um die gleichen Zellen handeln könnte. Diese neuartige Ansicht wurde später durch Experimente mit den aus Milz und Leber isolierten Makrophagen-Vorläufern unterstützt [Baccarini et al. 1985, 1986a, 1986b, Decker et al. 1986]. Jedoch wurde die Hypothese, daß NK-Zellen wahrscheinlich aus dem Makrophagensystem kommen, für lange Zeit ignoriert, weil andere Autoren zeigten, daß in der Knochenmark-Kultur nur mit gereinigtem Makrophagen-Wachstumsfaktor CSF-1 keine NK-Aktivität gefunden wurde [Koo & Manyak 1986].

Von 1988 bis 1993 ist die Zahl der Publikationen aus der Forschung über die Zugehörigkeit der NK-Zellen gering. Suchen nach NK-Vorläufern im Knochenmark wurde meistens mittels "LTBMC" ("long-term bone marrow culture") Kultur durchgeführt [Van-Den-Brink et al. 1990, Sitnicka & Hansson 1992, Vecchini et al. 1993]. Bei diesen langfristigen Knochenmark-Kulturen werden die gesamten Knochenmark-Zellen zuerst ohne exogen zugefügte Faktoren für 4 Wochen inkubiert, danach mit IL-2 für weitere 3-6 Tage kultiviert. Die NK-Aktivität taucht in der Kultur ungefähr nach 3-tägiger Inkubation mit IL-2 auf. Über die Vorläufer-Zellen, die für die Erzeugung der NK-Aktivität verantwortlich sind, weiß man nur, daß sie sich von den T-Zell-Vorläufern unterscheiden [Lotzova et al. 1993].

## **1.2. IL-2 und IL-2 Rezeptor**

Wie oben erwähnt, ist IL-2 der essentielle Faktor, der in Knochenmarkzellen die NK-

Aktivität stimuliert. Diese Funktion von IL-2 wurde durch Forschungen mit Knochenmarkzellen aus Maus, Mensch, und Ratte [Koo et al. 1986, Lotzova & Savary 1987, und Van-den-Brink 1990] gefunden. Man betrachtet dies als eine der wichtigsten Wirkungen von IL-2 auf das Immunsystem.

Ursprünglich wurde IL-2 im Überstand von humanen peripheren Blut-Lymphozyten, die mit T-Zell-spezifischen Mitogenen inkubiert worden waren, entdeckt [Morgan & Ruscetti 1976]. Funktionelle und phänotypische Daten deuteten an, daß der Faktor das Wachstum von T-Lymphozyten fördert [Ruscetti et al. 1977]. Es stellte sich später heraus, daß die Aktivitäten von folgenden Faktoren alle auf dasselbe Molekül zurückzuführen sind: (i) T-Zellwachstumsfaktor (TCGF); (ii) Thymozyten stimulierender Faktor (TSF); (iii) Thymozyten-Mitogenese Faktor (TMF); (iv) T-Zellen ersetzender Faktor (TRF); und (v) Killer-Helfer Faktor (KHF). Dieses Molekül wurde nach dem zweiten internationalen "Lymphokine Workshop" 1979 Interleukin-2 (IL-2) genannt [Aarden et al. 1979].

IL-2 ist ein aus 133 Aminosäuren bestehendes Protein (Molmasse 15,420) und zeigt keinerlei Sequenzverwandtschaft zu anderen Faktoren [Taniguchi et al. 1983, Kashima et al. 1985]. Es übt seine Wirkungen durch spezifische, sättigbare Rezeptoren aus, die an der Oberfläche von T-Zellen, B-Zellen, [Übersicht von Smith 1989], NK-/LAK-Zellen [Siegel et al. 1987], Monozyten [Wahl et al. 1987, Holter et al. 1987, Espinoza-Delgado et al. 1990] und Neutrophilen [Djeu et al. 1993] zu finden sind. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Rezeptoren, die unabhängig voneinander exprimiert werden können. Der hochaffine IL-2-Rezeptor ( $K_d \approx 10^{-11}$  M) ist ein Komplex aus den zwei Proteinketten von IL-2R  $\alpha$  (p55, im Humansystem Tac-Antigen genannt) und IL-2R  $\beta$  (als p75 oder p70 bezeichnet) [Tsudo et al. 1986, Teshigawara et al. 1987]. Der IL-2-Rezeptor mittlerer Affinität ( $K_d \approx 10^{-9}$  M) besteht nur aus der  $\beta$ -Kette, während die  $\alpha$ -Kette einen Rezeptor niedriger Affinität ( $K_d \approx 10^{-8}$  M) darstellt [Tsudo et al. 1986, Teshigawara et al. 1987, und Robb et al. 1987]. Bei aktivierten T-Zellen erfolgt die Stimulierung durch IL-2 nach Bindung an den hochaffinen

Rezeptor [Tsudo et al. 1987]. Bei NK-Zellen hingegen wurde eine Signaltransduktion durch Bindung allein an die  $\beta$ -Untereinheit beobachtet, wobei NK-Zellen in Abwesenheit von Tac-Antigen ( $\alpha$ -Untereinheit) auf IL-2 reagierten und zytolytisch wurden [Siegel et al. 1987, Tsudo et al. 1987]. Der Mechanismus, wie die Signaltransduktion bei der Aktivierung durch IL-2 erfolgt, ist unklar. Es wird allgemein angenommen, daß der Phosphorylierungszustand des Rezeptors eine wesentliche Rolle spielt [Sharon et al. 1989].

Baccarini et al. berichteten 1989, daß der p75 IL-2 Rezeptor ebenfalls auf murinen Makrophagenvorläufer aus dem Knochenmark vorliegt [Baccarini et al. 1989]. Ähnlich wie bei NK-Zellen und bei den nicht aktivierten Monozyten und Neutrophilen ist nur die IL-2R  $\beta$ -Untereinheit (p75) an der Oberfläche dieser murinen Promonozyten zu finden.

Seit einiger Zeit ist es bekannt, daß IL-2 außer seiner lange bekannter Wirkung auf das Wachstum der T-Zellen noch mehrere andere Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems hat, wie z.B. (i) Es aktiviert die Tumor-abtötende Zytotoxizität und das Wachstum der NK/LAK-Zellen [Herbermann et al. 1987]; (ii) Es erhöht die Proliferation der B-Zellen und ihre Produktion von Immunglobulin [Ceuppens et al. 1985]; (iii) Es stimuliert Monozyten (im Mensch) zur Steigerung ihrer Zytotoxizität [Malkovsky et al. 1987] und zur Freisetzung von IL-6 [Musso et al. 1992]; (iv) Es moduliert die Freisetzung von Histamin aus aktivierten Basophilen [White et al. 1992]. Deshalb gilt IL-2 nicht mehr als ein spezifischer Faktor, der nur auf Lymphozyten wirkt.

### **1.3. LAK-Zellen und ihre Beziehung zu NK-Zellen**

1982 beobachteten Grimm et al. bei *in vitro* Kultur von humanen peripheren Blut-Lymphozyten mit IL-2-haltigen Überständen eine früher nicht beschriebene zytotoxische Aktivität, nämlich LAK (Lymphokin-aktivierte Killer)-Aktivität. LAK-Aktivität unterscheidet sich von NK-Aktivität dadurch, daß sie sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente



Tumor-Zellen lysiert [Grimm et al. 1982]. Dieser Befund hat sofort große Aufmerksamkeit erregt, weil er Hoffnungen auf eine neue Tumor-Therapie geweckt hat. Einige Forschungsgruppen begannen sofort, mit den *in vitro* kultivierten LAK-Zellen im Tierversuchsmodell zu experimenten [Rosenstein et al. 1984, Mule et al. 1984, und Lafreniere & Rosenberg 1985]. IL-2 ist wiederum als der entscheidene Faktor bestätigt worden, der die LAK-Aktivität induziert [Rosenberg et al. 1984]. Von Yang et al. wurde später genauer beschrieben, daß eine effektive *in vitro* Kultur für die Generation der LAK-Aktivität hohe IL-2-Konzentrationen (1000 U/ml) benötigt und die Kultur normalerweise von 72 bis 96 Stunden dauert [Yang et al. 1986].

In den ersten Jahren nach der Entdeckung des LAK-Phänomens waren die Meinungen über die Vorläufer-Zellen für LAK-Aktivität unvereinbar [Grimm et al. 1982, 1983, Karre et al. 1983, und Rosenstein et al. 1984]. Der Grund dafür ist, daß die damaligen Kulturen nie einen hohen Reinheitsgrad erreichten. Erst nach der Anwendung der positiven Sortierungstechnik stimmten die Untersuchungsergebnisse aus Maus [Salup et al. 1987], Mensch [Morris et al. 1989], und Ratte [Maghazachi et al. 1988, Vujanovic et al. 1989] darin überein, daß die Zellen, die unter dem Einfluß von IL-2 LAK-Aktivität entwickeln, NK-Zellen sind. Mit anderen Worten: Die meisten LAK-Effektoren sind die von IL-2 aktivierten NK-Zellen. Die Hauptmerkmale dieser LAK-Effektoren sind: (i) Sie exprimieren keine T-Zell-Marker, wie CD3 und CD8; (ii) Sie vermitteln eine MHC-unabhängige Zytotoxizität gegen sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Tumor-Zellen [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988].

Bei den Untersuchungen mit Knochenmark-Kulturen beweisen übereinstimmende Ergebnisse, daß NK-Aktivität und LAK-Aktivität von denselben, nicht zytotoxischen Knochenmark-Vorläuferzellen durch IL-2 Stimulation generiert werden, obwohl die beiden Aktivitäten nach unterschiedlichen Zeiten nachgewiesen wurden. LAK-Aktivität taucht in der Kultur etwas später (~ 3 Tage) auf als NK-Aktivität [Sarnecka et al. 1989, Keever et al. 1990, Sitnicka &

Hansson 1992]. Diese Ergebnisse haben auf der Knochenmarkvorläufer Ebene die Beziehung zwischen NK-Zellen und LAK-Zellen als zwei Differenzierungszustände bestätigt.

#### **1.4. Mechanismus der NK/LAK Zytotoxizität und das Membranloch-bildende Perforin**

Obwohl NK/LAK-Zellen sich deutlich von den zytotoxischen T-Zellen unterscheiden, weil sie keine typischen Oberflächenmarker für die zytotoxischen T-Zellen, wie z.B. CD3 und CD8, tragen und sie unabhängig von der Expressierung des MHC Moleküls zytolytische Aktivität haben, haben sie auf der anderen Seite mit zytotoxischen T-Zellen etwas gemeinsam, nämlich in den Zytoplasmen beider Typen von Zellen ist das lytische Protein, das sogenannte Perforin, zu finden, welches normalerweise nicht bei anderen Zellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und T-Helfer-Zellen zu beobachten ist [Masson & Tschopp 1985, Podack et al. 1985a und b, Young et al. 1986, Liu et al. 1986, und Lowrey et al. 1988].

Die ersten Berichte über Perforin erschienen 1984, als einige Forschungsgruppen sich für die zytoplasmatischen Granula aus zytotoxischen T-Zellen und LGL-Zellen interessierten [Millard et al. 1984, Henkart et al. 1984, Podack et al. 1984, und Blumenthal et al. 1984]. Die Forscher fanden, daß diese aus zytotoxischen Zellen isolierten Granula allein Membranen durchlässig machen können. Daher haben die Forscher die lytische Komponente in den Granula nach der Funktion unterschiedlich als "cytolin", "pore forming protein", oder "C9-related protein" genannt. Ein Jahr später einigte man sich auf den Namen "Perforin" [Podack et al. 1985a]. Bei zahlreichen biochemischen Arbeiten ist gefunden worden, daß Perforin ein Protein ist, das aus 534 Aminosäuren besteht und nur in zytotoxischen Granula existiert. Zusammen mit anderen Enzymen in Granula spielt Perforin bei dem Abtöten der Zielzellen durch zytotoxische Effektor-Zellen eine wesentliche Rolle [Tschopp & Nabholz 1990, Young et al. 1990].

Anders als Lymphotoxin und TNF, deren zytotoxische Funktion nur eine von ihren pleiotropischen Aktivitäten repräsentiert, ist Perforin ein Protein mit einer einzigen Funktion: die Membran der Zielzellen zu lysieren und zum Zelltot zu führen [Podack et al. 1991]. Die Lyse, die mit Perforin assoziiert ist, bedingt die Anwesenheit von Kalzium. In Gegenwart von Kalzium ( $\sim 1$  mM) kann Perforin an der Membran der Zielzellen erfolgreich polymerisieren, und dann die Zielzellen lysieren. Jedes fertige Perforin-Polymer, auch als Polyperforin bezeichnet, besteht aus 12-18 Monomeren und befindet sich in der Ziel-Membran als ein geschlossener Zylinder von 16 nm Länge und einem Durchmesser von 5-20 nm [Tschopp & Nabholz 1990].

Alle CD8 positiven CTL-Zelllinien und alle NK-Zellpopulationen (einschließlich LAK-Zellen) enthalten Perforin [Podack et al. 1991]. In den wenig Perforin exprimierenden, frisch isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus humanem peripheren Blut wurde die Menge von Perforin-mRNA nach IL-2 Aktivierung rasch erhöht [Lichtenheld et al. 1988, Smyth et al. 1990a]. IL-2 allein reicht aus, hohes Niveau von Perforin-mRNA zu induzieren. Die Aktivierung erfolgt über den p75 IL-2R. Dieser Vorgang ist unabhängig von dem Vorhandensein des T-Zell-Rezeptors [Liu et al. 1989, Smyth et al. 1990a]. Interessant aber noch unverständlich ist, daß die IL-2-induzierte Perforin Erhöhung durch IL-6 verstärkt werden kann, obwohl IL-6 allein völlig ineffektiv ist [Smyth et al. 1990b]. Perforin scheint nicht in B-Zellen und Monozyten induzierbar zu sein [Podack et al. 1991].

### **1.5. Regulatorische Funktion der NK-Zellen**

NK-Zellen sind wichtige immunoregulatorische Zellen, weil sie fähig sind, eine Menge von Zytokinen freizusetzen. Obwohl die Forscher bereits in früheren Studien über NK-Zellen (1981-1983) beobachteten, daß mehrere Typen von Lymphokinen, wie z.B. alpha und gamma IFN, IL-1, IL-2, Lymphotoxin (LT), Kolonie-stimulierende Faktoren, und B-Zell Wachstumsfaktor, in Überständen der NK-Zellkultur zu finden waren [Übersicht von Ortaldo &

Herberman 1984], konnten sie nicht ausschließen, daß die die NK-Zellkultur kontaminierenden Zellen, z.B. T-Lymphozyten, für die Freisetzung der Zytokine verantwortlich waren. Ab 1986, als die Gewinnung von hoch gereinigten NK-Zellpopulationen und eine spezifische Stimulierung der NK-Zellen (z.B. mit spezifischem Ligand) möglich waren, ist die Fähigkeit von NK-Zellen, Zytokine zu produzieren, in verschiedenen Laboren bestätigt worden [Übersicht von Trinchieri 1989].

Sowohl frisch isolierte als auch kultivierte NK-Zellen können entweder spontan oder nach Stimulation eine Reihe von Zytokinen synthetisieren, die in der Tabelle "Zytokin-Produktion von NK-Zellen" (siehe Tab.A auf Seite 10) mit Daten aus verschiedenen Laboren zusammengestellt wurden. Die Untersuchungen zur Fähigkeit der NK-Zellen Zytokine zu produzieren wurden entweder mittels Northern-Blot Analyse oder Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf Messenger-RNA Ebene oder mittels Aktivitätstest oder Immunopräzipitation auf Protein Ebene durchgeführt. Zur Aktivierung der NK-Zellen wurden häufig folgende Stimulatoren benutzt: NK-Targetzellen, CD16 FcR Ligand (z.B. Sepharose verbundene anti-CD16 Antikörper oder Immunkomplexe, wie die mit IgG Antikörper bedeckten Erythrozyten oder Zielzellen), IL-2, IFN- $\gamma$ , und Phorbolster/Kalzium Ionophor. Eine Kombination aus zwei Stimulatoren wurde häufig verwendet, weil sie deutlich effektiver wirkt als ein einziger Faktor. Im Humansystem zeigte sich z.B. die Kombination von CD16 Ligand mit IL-2 sehr wirksam, denn unter dieser Stimulationsbedingung konnte innerhalb von 2 Stunden aktive Synthese von Messenger-RNA für TNF, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und CSF-1 in NK-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen hatte der CD16 Ligand allein fast gar keine Wirkung, und IL-2 allein bewirkt nur eine schwache Induktion von GM-CSF mRNA [Cuturi et al. 1989]. In den Experimenten mit NK-Targetzellen allein oder plus IFN- $\gamma$  als Aktivator wurde deutlich höhere TNF-Freisetzung bei der Kombination beobachtet [Peter et al. 1986]. Der Mechanismus der synergistischen Wirkung von zwei Stimulatoren ist noch nicht geklärt.

Tab.A *Zytokin-Produktion von NK-Zellen*  
(Daten aus der Literatur)

Stimulator	synthetisiertes Zytokin	mRNA <sup>+</sup>	Protein <sup>+</sup>
Keine	IL-1- $\beta$	1	
	IL-6	1	
NK-Targetzellen	IL-1		2
	TNF (niedrig)		3
NK-Targetzellen + IFN- $\gamma$	TNF (hoch)		3
IL-2	GM-CSF (niedrig)	5	5
	IL-6	1	
IL-2 + CD16 FcR Ligand	CSF-1	4,5,6	6
	G-CSF	6	6
	GM-CSF	4,5,6	5,6
	IFN- $\gamma$	4,5,6	5,6
	TNF	4,5,6	5,6
IL-2 + Immunkomplex	IFN- $\gamma$		5
	TNF		5
Phorbol Dibutyrate und/oder Kalzium Ionophore A23187	GM-CSF,	4,5	5
	IL-3	4,5	
	TNF,	4,5	

1. Vitolo et al. 1993
2. Herman et al. 1986
3. Peters et al. 1986
4. Anegon et al. 1988
5. Cuturi et al. 1989
6. Saito et al. 1993

### 1.6. Ziel der Arbeit

1. Es sollte versucht werden, Bedingungen für primäre Knochenmark-Kulturen zu etablieren, unter denen die im Knochenmark vorliegenden Vorläufer für NK-Zellen sowohl proliferieren als auch sich zu NK-aktiven Effektoren entwickeln können. Dabei sollte der Wachstumsfaktor für diese Vorläufer-Zellen definiert werden.
2. Eine Isolierungsmethode sollte etabliert werden, mit der die aus dem Knochenmark kultivierten NK-aktiven Zellen zu einem hohen Grad gereinigt werden können. Die isolierten NK-Zellen sollten auf morphologischer, phänotypischer, funktioneller, und differenzierender Ebene untersucht und charakterisiert werden.
3. Sollten die aus Knochenmark-Kultur gewonnenen NK-aktiven Zellen mit den Makrophagen-Vorläufern identisch sein, sollte weiterhin geklärt werden, ob diese Zellen zu LAK-Effektoren differenzierbar sind und ob in ihren Zytoplasmen Perforin zu finden ist wie bei den beschriebenen NK/LAK-Zellen.
4. Da IL-2 als ein sehr wichtiger stimulierender Faktor für die NK/LAK-Aktivität anerkannt wurde und der IL-2R auf murine Makrophagen-Vorläufern aus dem Knochenmark vorliegt, sollte in diesem Studium die Zytotoxizität-stimulierende Wirkung von IL-2 auf Makrophagen-Vorläufer auf funktioneller Ebene und Gen Ebene untersucht werden.
5. Die Frage, was für Ähnlichkeiten und Unterschiede es zwischen Makrophagen-Vorläufern und NK-Zellen gibt, sollte in dieser Arbeit in den Bereichen von Morphologie, Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile), zytotoxischer Funktion, zytotoxischem Mechanismus, und Zytokin-Produktions-Spektrum beantwortet werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### Material

#### 2.1. Tiere

C57Bl/6 Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen aus der Zucht von Charles River, Sulzfeld, oder von der Zentralen Versuchstieranstalt, Hannover bezogen.

#### 2.2. Chemikalien

##### für Zellisolierung und Zellkultur

Agar (Bacteriologischer Grad )	Fa. OXOID, Basingstoke	L11
Concanavalin A	Fa. Pharmacia, Freiburg	17-0450-01
Ficoll-Paque (steril)	Fa. Pharmacia	17-0840-02
FKS (Fötiales Kälberserum)	Fa. Sigma, Deisenhofen	F-7524
$\alpha$ -D-Glucose	Fa. Serva, Heidelberg	22720
Hepes (N-2-Hydroxyethyl- piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid. pKa. 20°C=7,55)	Fa. Biomol, Hamburg	05288
Iscove's Medium	Fa. Gibco-BRL, Karlsruhe	074-02200A
2-ME (2-Mercaptoethanol)	Fa. Sigma	M-7154
Natrium Pyruvat	Fa. Biochrom	L0473
Percoll (steril)	Fa. Pharmacia	17-0891-01
RPMI 1640	Fa. Gibco-BRL	074-01800N

##### für Zellfixierung, Färbung und Einbetten

Aquatex	Fa. Merck, Darmstadt	Art.No.8562
Bovin Serum Albumin	Fa. Sigma	A-3350

DMF (N,N-Dimethylformamid)	Fa. Sigma	D-4254
Ethylenglycolmonomethylther	Fa. Merck	Art.No.859
Fast Garnet GBC	Fa. Sigma	F-6504
Fast Blue BB Salz	Fa. Sigma	F-3378
Fast Red TR	Fa. Sigma	F-2768
Gelatine (für Mikrobiologie)	Fa. Merck	Art.No.4070
Giemsa-Lösung	Fa. Sigma	GS-500
Glycerin	Fa. Serva	23175
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fa. Merck-Schuchardt	822287
Hämatoxylin	Fa. Sigma	H-3136
Human Ig	Fa. Sigma	I-4506
Isopropanol	Fa. Roth, Karlsruhe	Art.6752
Levamisole	Fa. Sigma	L-9756
Mayer´s Hämalaun-Lösung	Fa. Merck	Art.No.9249
May-Grünwald-Lösung	Fa. Sigma	MG-500
NaN <sub>3</sub>	Fa. Riedel-deHaen	1687
Naphtol-As-D-Chloracetat	Fa. Sigma	N-0758
Naphtol-AS-MX-Phosphat	Fa. Sigma	N-4875
α-Naphtylbutyrat	Fa. Merck	Art.No.502

### für verschiedene Tests

Actinomycin D	Fa. Sigma	A-4262
Avidin-POD-Konjugat	Fa. DAKO, Hamburg	P 347
DAB (3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid)	Fa. Sigma	D-5637
Ionomycin	Fa. Sigma	I-0634
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-		



2-yl]-2,5,-diphenyltetrazolium bromide)	Fa. Sigma	M-2128
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)	Fa. Sigma	P-8139
Rotiszint 2200 (Szintil- lationsflüssigkeit)	Fa. Roth	Art.9389
Tween 20 (Polyoxyethylene- Sorbitan-Monolaurate)	Fa. Merck	822184

**für molecular biologische Arbeiten**

Agarose (Elektrophorese Grad)	Fa. Gibco-BRL	55100B
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Fa. Sigma	D-5758
Dextran Sulfate	Fa. Pharmacia	17-0340-01
DIG-DNA Markierungs Kit	Fa. Boehringer-Mannheim	1175033
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Fa. Boehringer-Mannheim	1175041
EDTA	Fa. Sigma	E-4378
Ethidiumbromid	Fa. Serva	21238
Formamide	Fa. Sigma	F-7503
Guanidiniumisothiocyanat	Fa. Stratagene,Heidelberg	300116
Megaprime DNA Labelling Kit	Fa. Amersham	RPN.1607
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Sigma	P-5288
Lachs Sperma DNA	Fa. Stratagene	201190
Sarcosyl	Fa. Sigma	L-5125
Tris (research grade)	Fa. Serva	37190
Triton-X-100	Fa. Serva	37240
Hefe tRNA	Fa. Sigma	R-8759

### 2.3. Zytokine

- IL-1: Rekombinantes murines Interleukin-1  $\alpha$  aus *E.coli* von Oncogene Science (spezifische Aktivität von  $1 \times 10^7$  U/mg Protein) wurde durch Firma Dianova bezogen und beim IL-1 Bioassay als Standard gebraucht.
- IL-2: Rekombinantes humanes Interleukin-2 aus *E.coli* (spezifische Aktivität von  $2 \times 10^7$  U/mg Protein), kreuzreaktiv mit Mauszellen, wurde freundlichweise von Dr. Conradt, GBF, Braunschweig zur Verfügung gestellt. Bei der Zellkultur und Zellaktivierung wurde IL-2 als stimulierender Faktor benutzt.
- IL-3: Rekombinantes murines Interleukin-3 aus *E.coli* von Behring (spezifische Aktivität von  $5 \times 10^7$  CFU/mg Protein) wurde beim IL-3 Bioassay als Standard gebraucht.
- IL-6: Rekombinantes humanes Interleukin-6, kreuzreaktiv mit Mauszellen, aus Hefe von Genzyme (spezifische Aktivität von  $1 \times 10^7$  U/mg Protein) wurde beim IL-6 Bioassay als Standard benutzt.
- IL-10: Rekombinantes murines Interleukin-10 aus COS7 von Phar Mingen (spezifische Aktivität von 470 U/mg) wurde beim ELISA für IL-10 als Standard verwendet.
- GM-CSF: Rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor aus Hefe (biologische Aktivität von  $5 \times 10^7$  CFU/mg Protein) wurde freundlichweise von der Firma Behring zur Verfügung gestellt. Dieser Faktor wurde bei der Zellkultur als Wachstums-Faktor und beim GM-CSF Bioassay als Standard gebraucht.

- CSF-1: Rekombinanter humaner Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor aus *E.coli* (biologische Aktivität von  $1 \times 10^7$  CFU/ mg Protein), kreuzreaktiv mit Mauszellen, auch als Geschenk von Behring bezogen, wurde als spezifischer Wachstumsfaktor für die Zellen des Makrophagensystems [Stanley et al. 1983] benutzt.
- TNF- $\alpha$ : Rekombinanter muriner Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  aus *E.coli* (spezifische Aktivität von  $4 \times 10^5$  bis  $4 \times 10^9$  U/mg Protein) von Genzyme wurde beim TNF- $\alpha$  Bioassay als Standard verwendet.
- IFN- $\gamma$ : Rekombinantes murines Gamma-Interferon aus *E.coli* (spezifische Aktivität von  $1 \times 10^7$  U/mg Protein) wurde von Bender Wien (durch Boehringer Ingelheim) erworben und wurde zur Zellaktivierung und beim ELISA für IFN- $\gamma$  als Standard gebraucht.

#### 2.4. Antikörper

##### gegen Zelloberflächenmarker

- B220: 1) Ratte anti-Maus-B220 (CD45R, B-Zell-Marker) von Phar Mingen (Cat.No: 01121D) wurde bei der Depletion der B-Lymphozyten gebraucht. Die Einsetzungsverdünnung war 1:40.
- 2) FITC markiertes Ratten IgG 2a anti-Maus-Ly 5 (B220) von Klon RA3-6B2 (Medac, Hamburg, Cat.No: RM2601) wurde bei der Fluoreszenzfärbung zum Nachweis der B-Lymphozyten benutzt.
- CD3: 1) Ratten IgG 2a anti-Maus CD3 (spezifischer T-Zell-Marker) von Klon KT3

(SeroTec, England Code: MCA500) wurde bei der Depletion der T-Lymphozyten benutzt. Die Einsetzungsverdünnung war 1:40.

2) FITC markiertes Hamster IgG anti-Maus CD3 (Medac, Cat.No: HM3401) wurde zur Untersuchung der Zellphänotypen gebraucht.

CD4: FITC markiertes Ratten anti-Maus-L3T4 (CD4, T-Helferzell-Marker) von Klon YTS 191.1 (Medac, Cat.No: RM2401) wurde zur Untersuchung auf Anwesenheit von T-Helferzellen gebraucht.

CD8: FITC markiertes anti-Maus Lyt-2 (CD8, zytotoxische T-Zell-Marker) von Becton Dickinson (Order No: 1353) wurde zur Untersuchung auf Anwesenheit von zytotoxischen T-Zellen gebraucht.

F4/80: Ratten IgG2b anti-Maus Makrophagen [Anstyn & Gordon 1981], ein freundliches Geschenk von Dr. Siamon Gordon (University of Oxford, UK), wurde als dialysierte Ammonium Sulfat Fällung aus Gewebekulturüberstand zur Verfügung gestellt und bei der indirekten Fluoreszenzfärbung für Makrophagen als erster Antikörper benutzt. Die Einsetzungsverdünnung war 1:20.

Mac-1: FITC markiertes Ratten IgG 2b anti-Maus Makrophagen (Mac-1, Marker der myeloischen Zellen) von Klon M1/70.15 (Medac Cat.No: RM2801) wurde zur Untersuchung der Zelloberflächenmarker gebraucht.

NK-1.1: Maus IgG2b anti-Maus NK-1.1 (Marker der Maus NK Vorläufer und reifen NK Zellen [Hackett, et al. 1986]) von Klon PK136 aus American Type Culture Collection wurde an Protein A-Sepharose und anschließend durch Filtration über



anti-TNF- $\alpha$ : Kaninchen IgG+IgM anti-murines TNF- $\alpha$  (zur Neutralization) Fa. Genzym Code. IP-400

anti-Perforin: mAb CB.5.4 Ratte anti-murines Perforin, ein großzügiges Geschenk von Prof. Tschopp, Institut für Biochemie, Universität de Lausanne, Schweiz.

### 2.5. Enzyme

Trypsin: Trypsin (aus Rinderpankreas) wurde als 2,5%ige Lösung (für die Zellkultur) von Firma Boehringer Mannheim (Bestell Nr:210234) gekauft.

Klenow Enzym: Zur cDNA Markierung wurde Klenow Enzym (labeling grade, 2 U/ $\mu$ l) von Boehringer Mannheim (Bestell Nr: 1008404) erworben.

### 2.6. Isotope

[ $^3$ H]Thymidin: spez. Aktivität von 25 Ci/mmol, wurde von IRE (Düsseldorf) bezogen und beim [ $^3$ H]-Thymidin-Einbauassay zur Untersuchung der Zellproliferation gebraucht .

Na $_2$ [ $^{51}$ CrO $_4$ ]: spez. Aktivität von 423 mCi/mg, wurde von NEN (Dreieich) erworben und beim  $^{51}$ Cr-Freisetzungssassay zum Test der Zytotoxizität verwendet.

[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP: spez. Aktivität von 3000 Ci/mmol, wurde von Amersham-Buchler (Braunschweig) gekauft und bei der Markierung der cDNA Sonde für den Northern blot benutzt.

## 2.7. Medien

### 2.7.1. RPMI 1640 Medium

Zu 1 Liter in dest. H<sub>2</sub>O aufgelösten RPMI 1640 Medium wurden 10<sup>5</sup> Einheiten Penicillin, 0,1 g Streptomycin, 15 mg Phenolrot als pH-Indikator sowie 2 g NaHCO<sub>3</sub> als Puffersubstanz gegeben, der pH-Wert mit CO<sub>2</sub> auf 6,9 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert, und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.7.2. Vollmedium

Das Vollmedium besteht aus 90% RPMI 1640 Medium und 10% fötalem, bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS). Das Vollmedium enthält alle für die Zellen nötigen Wachstumsfaktoren, ist deswegen das am häufigsten benutzte Medium für die Zellkultur.

### 2.7.3. L-Zell "konditioniertes" Medium

L929 Fibroblasten-Zellen sezernieren spontan Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF), die zum Proliferieren und Heranreifen der Makrophagen notwendig sind [Stanley & Heard, 1977]. Zum Gewinnen des L-Zell "konditionierten Medium"s wurden 10 ml Vollmedium auf 3x10<sup>6</sup> L929 Fibroblasten-Zellen, die zuvor in einer 9-cm Gewebekulturschale (Falcon 3003) ausgesät worden waren, gegeben. Es folgte eine 4-tägige Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde der zellfreie Überstand von L929-Zellen gesammelt und als CSF-haltiges Medium verwendet. Das Medium wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 2.7.4. Iscove's Medium (Minimum Essential Medium Iscove's Modification)

Zu 1 Liter in dest. H<sub>2</sub>O aufgelösten Iscove's Medium wurden 2 g NaHCO<sub>3</sub>, 10<sup>5</sup> Einheiten Penicillin und 0,1 g Streptomycin gegeben. 15 mg/l Phenolrot wurde als pH Indikator zugesetzt und der pH-Wert des Mediums wurde mit CO<sub>2</sub> auf 6,9 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde das fertige Iscove's Medium bei 4°C aufbewahrt. Iscove's Medium

wurde für den Soft Agar Assay und den IL-1 Bioassay als Medium verwendet.

## **2.8. Puffer und Lösungen**

### **2.8.1. für die zellbiologische Arbeit**

#### **2.8.1.1. PBS<sup>+</sup>-MC (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung):**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	140 mM
KCl	2,5 mM
Penicillin	10 <sup>5</sup> Einheiten/ l
Streptomycin	0,1 g / l
pH	7,4

Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und danach bei 4°C aufbewahrt. Für den als PBS-MC bezeichneten Puffer wurden Penicillin und Streptomycin nicht hinzugefügt.

#### **2.8.1.2. Actinomycin D Lösung:**

Actinomycin D	5 mg
70% Ethanol	0,5 ml
PBS <sup>+</sup> -MC	4,5 ml

Actinomycin D wurde zunächst in 70% Ethanol gelöst, dann mit PBS aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Diese Lösung wurde für den TNF-Aktivitätstest zur Hemmung der Zellteilung von L929 gebraucht.

#### **2.8.1.3. Glycerin-Gelatine-Lösung:**

Gelatine	10 g
PBS-MC	70 ml



Glyzerin	30 ml
----------	-------

Bei ca. 60°C wurde Gelatine in PBS-MC gelöst, die Lösung handwarm abgekühlt und Glyzerin hinzugegeben. Bei 4°C ist diese Gallerte unbegrenzt haltbar. Vor dem Gebrauch wurde sie auf 60°C erwärmt und die luftgetrockneten Präparate mit der auf 40°C abgekühlten Glyzerin-Gelatine-Lösung eingedeckt.

#### 2.8.1.4. Gepufferte Formalin-Aceton-Lösung:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	40 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
dest. H <sub>2</sub> O	100 ml
Aceton	90 ml
Formalin	50 ml

Die Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Die hergestellte Lösung zeigte einen pH Wert von ca. 6,6 und wurde bei der doppelten Esterase-Färbung zur Zellfixierung benutzt.

#### 2.8.1.5. 2-ME/Hepes Stammlösung:

2-Mercaptoethanol	10 µl
H <sub>2</sub> O	10 ml
1 M Hepes Lösung	12,5 ml
Vollmedium	27,5 ml

2-Mercaptoethanol wurde zuerst mit H<sub>2</sub>O gemischt, steril filtriert, dann mit der sterilen Hepes Lösung und Vollmedium versetzt. Die dadurch entstandene Stammlösung enthielt zirka 3 mM 2-Mercaptoethanol und 0,25 M Hepes, und wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

**2.8.1.6. MTT-Lösung:**

MTT	50 mg
PBS <sup>+</sup> -MC	10 ml

MTT wurde in PBS<sup>+</sup>-MC gelöst, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die MTT-Lösung wurde bei dem kolorimetrischen Bioassay (MTT Test) verwendet.

**2.8.1.7. MTT-Abstopplösung:**

Dimethylformamid	200 ml
dest.H <sub>2</sub> O	200 ml
SDS	40 g

In einer 500 ml Glasflasche wurde zuerst DMF mit H<sub>2</sub>O versetzt. Danach wurde SDS in die Flasche gegeben. Die Flasche wurde bei 37°C über Nacht stehen gelassen, um das SDS aufzulösen. Diese Lösung wurde bei 37°C aufbewahrt.

**2.8.1.8. Percoll Stammlösung (60,6%):**

Percoll	60 ml
3xRPMI 1640	30 ml
FKS	9,8 ml

Diese Lösung diente als Stammlösung zum Aufbauen des Percollgradientes und konnte bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden. Die Osmolarität der Lösung steht bei 285 m OSM/Kg H<sub>2</sub>O.

**2.8.1.9. Puffer für die Esterase-Doppelfärbung:**

Stammlösung A:	10 ml 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 140 ml H <sub>2</sub> O
Stammlösung B:	10 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 140 ml H <sub>2</sub> O

Sörensen-Puffer:

pH 6,3    77,35 ml Stammlösung A + 22,65 ml Stammlösung B

pH 7,4 19,60 ml Stammlösung A + 80,40 ml Stammlösung B

1) für die Chloracetatesterase-Färbung:

Sörensen-Puffer pH 7,4	190 ml
Fast Blue BB Salz	200 mg
Naphtol-AS-D-Chloracetat	20 mg
DMF	10 ml

Naphtol-AS-D-Chloracetat wurde in einem Reagenzröhrchen aus Glas in DMF (N,N-dimethylformamid) gelöst und zu der Puffer/Farbstoff-Mischung gegeben. Das Gemisch wurde immer frisch angesetzt, vor Licht geschützt und unmittelbar vor der Färbung durch Whatman-Filterpapier (Nr.54) filtriert.

2) für die 2-Naphtylbutyratesterase Färbung:

Sörensen-Puffer pH 6,3	190 ml
fast Garnet GBC	200 mg
$\alpha$ -Naphtylbutyrat	200 $\mu$ g
Ethylenglycolmonomethylether	8 ml

$\alpha$ -Naphtylbutyrat wurde mit Ethylenglycolmonomethylether gemischt und zu der Puffer/Farbstoff-Mischung gegeben. Vor jedem Gebrauch wurde es frisch angesetzt und vor Licht geschützt.

#### 2.8.1.10. Trypsin/EDTA Lösung:

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
$\alpha$ -D-Glucose	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g
EDTA	0,2 g

Die Substanzen wurden hintereinander im 1 Liter dest.H<sub>2</sub>O gelöst und mit 20 ml

2,5% Trypsin-Lösung versetzt, damit eine Endkonzentration von 0,05% (w/v) Trypsin in der Lösung entstand. Nach Sterilfiltration wurde die Lösung in Aliquots bei -20°C zum Aufbewahren eingefroren.

### **2.8.2. für ELISA, FACS und histochemische Färbungen**

#### **2.8.2.1. TBS-Puffer:**

Tris/HCl	100 mM
NaCl	150 mM
pH 7,5	

#### **2.8.2.2. DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung:**

3,3-Diaminobenzidin	7 mg
TBS	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4 µl

Diaminobenzidin (Substrat für Peroxidase) wurde in TBS aufgelöst. Kurz vor dem Gebrauch wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben. Zum Aufbewahren konnte die Diaminobenzidin/TBS-Lösung bei -20°C eingefroren werden, dann vor der Anwendung aufgetaut und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergänzt.

#### **2.8.2.3. ELISA-Waschpuffer:**

NaCl	0,3 M
Tween 20	0,1%
in PBS-MC gelöst und bei 4°C aufbewahrt.	

#### **2.8.2.4. FACS-Waschpuffer:**

FKS	2%
NaN <sub>3</sub>	0,01% (w/v)

in PBS<sup>+</sup>-MC versetzt, bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.8.2.5. Fast-Red-Lösung:

Naphthol AS-MX-phosphat	2 mg
N,N-Dimethylformamid	0,2 ml
0,1 M Trispuffer pH8,2	9,8 ml
1 M Levamisole	0,01 ml
Fast Red TR	10 mg

Zuerst wurde Naphtol AS-MX-phosphat in N,N-Dimethylformamid (im Glasreagenzröhrchen) gelöst, dann wurden Trispuffer und Levamisole zugegeben. Diese Lösung ist bei 4 °C einige Wochen, bei -20°C länger haltbar. Kurz vor der Färbung wurde Fast Red TR (Substrat für Alkalische Phosphatase [Dejong et al. 1985]) darin gelöst und durch einen Filter (0,22 µm, Millipore, Nr:SLGS 025BS) auf die Objektträger gegeben.

#### 2.8.2.6. TMS-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer):

Tris/HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
pH 9,5	

#### 2.8.3. für die molekularbiologische Arbeit

##### 2.8.3.1. 20xSSC Lösung:

NaCl	3 M
Na-Citrate	0,3 M
pH 7,0 (20°C)	

mit dest.H<sub>2</sub>O angesetzt, autoklaviert und dann bei RT aufbewahrt.

**2.8.3.2. 50xDenhardt's Lösung:**

Ficoll	1 %
Polyvinylpyrrolidon	1 %
BSA	1 %

in H<sub>2</sub>O bidest

sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

**2.8.3.3. DEPC-H<sub>2</sub>O:**

H<sub>2</sub>O bidest + 0,1%DEPC

über Nacht stehen lassen, dann autoklavieren.

**2.8.3.4. DMSO-Mix:**

H <sub>2</sub> O	150 µl
Dimethylsulfoxid	1750 µl
0,5 M Na-Phosphatpuffer (pH 7)	70 µl
20% SDS	35 µl

Der Mix wurde in 150 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

**2.8.3.5. Hybridisierungspuffer für den Northern-Blot:**

SSC	5 x
Denhardt's	5 x
SDS	0,5 %
EDTA	10 mM

bei RT aufbewahrt.

**2.8.3.6. Hybridisierungspuffer für die *in situ* Hybridisierung:**

SSC	4 x
-----	-----

Formamid	50%
Denhart´s Solution	1 x
Dextran Sulfat	5 %
Lachs Sperma DNA	0,5 mg/ml
Hefe tRNA	0,25 mg/ml

Vor der Hybridisierung wurde der Puffer aus den Stammlösungen (20xSSC, 50xDenhardt´s, 28% Dextran Sulfat, 10mg/ml Lachs Sperma DNA und 5 mg/ml Hefe tRNA) frisch angesetzt.

#### 2.8.3.7. 5x RNA-Probenpuffer:

Na-Phosphatpuffer (pH 7)	10 mM
Ficoll	10%
Bromphenolblau	0,4%

Der Puffer wurde mit Wasser angesetzt, autoklaviert und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.8.3.8. Lösung D:

Guanidiniumisothiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM (pH 7)
Sarcosyl	0,5%
2-Mercaptoethanol	0,1 M

Um den Umgang mit Guanidiniumisothiocyanat (GTC) zu minimieren, wurde 250 g GTC in der Originalverpackung mit 293 ml Wasser, 17.6 ml 1 M Natriumcitrat pH 7 und 26.4 ml 10% Sarcosyl bei 65 °C gelöst. Diese Stammlösung konnte mindestens 3 Monate bei RT aufbewahrt werden. Lösung D wurde dann durch Zugabe von 72 µl 2-Mercaptoethanol/10 ml Stammlösung hergestellt. Diese Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und für die RNA Isolation benutzt [Chomczynski & Sacchi 1987].

### 2.8.3.9. 10xTE-Puffer:

Tris/HCl	100 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

mit H<sub>2</sub>O bidest angesetzt, autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

## 2.9. Zelllinien

### 2.9.1. D10.G4.1.

D10.G4.1 ist eine klonierte Maus T-Helfer-Zelllinie (Herkunft: AKR/J(H-2k) Mäuse). In Abwesenheit von IL-1 wächst diese Zelllinie nur minimal nach Con A Stimulation. Deswegen wird sie als vertraubare und empfindliche Zelllinie zum Bioassay auf IL-1 verwendet [Kaye et al. 1983]. Die D10 Zellen werden kultiviert in Iscove's Medium mit 5% FKS, 1 mM Natrium Pyruvat, 1% 2-ME/Hepes Stammlösung, und ca. 7% Überstand aus Con A-stimulierten Ratten Milzzellen in 6-well Mikrotiterplatten (Nunc, Denmark).

### 2.9.2. FDCP-1

FDCP-1 ist eine murine Faktor-abhängige hämatopoietische Vorläufer Zelllinie [Naparstek et al., 1986] und proliferiert nur in Antwort auf GM-CSF oder IL-3 [Magee & Wing 1989]. In der vorliegenden Arbeit wurden FDCP-1 Zellen in Vollmedium plus ca.10% IL-3-haltiges Medium (Wehi-3D Zellüberstand) in Gewebekulturschalen (Falcon 3003) kultiviert. Sie wurden zur Bestimmung der GM-CSF- oder IL-3-Aktivität in Überständen verwendet.

### 2.9.3. L929

Die adhärente L929-Fibroblastenlinie (Herkunft: C3H Mäuse) wurde in Vollmedium in Gewebekulturschalen (Falcon 3003) kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium entfernt, 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (2.8.1.10) auf den L929 Zellrasen gegeben und 4-5 min bei RT inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde anschließend vorsichtig entfernt,



die Zellen mit Vollmedium abgespült und zweimal gewaschen. Die gewaschenen L929 wurden in Vollmedium aufgenommen, verdünnt und in Kulturschalen wieder eingesät. L929 Zellen wurden in der Arbeit als TNF-empfindliche Tumorzellen für den TNF-Aktivitätstest gebraucht.

#### 2.9.4. P815

P815-Mastozytomzellen (Herkunft: DBA/2J Mäuse, Methylcolanthren-induziert) wurden in Vollmedium als Suspensionskultur in Greiner Petrischalen gehalten. Diese Tumorzelllinie zeigt sich NK-resistent, läßt sich aber von LAK-Zellen und aktivierten Makrophagen lysieren. Zur Bestimmung der NK- oder LAK-Aktivität wurden P815 jeweils als Kontrolle oder Zielzellen bei dem Zytotoxizität-Test verwendet.

#### 2.9.5. 7TD1

Die Hybridoma Zelllinie 7TD1 (Fusion der Maus Myeloma Zelllinie SP2/0-AG14 mit Milzzellen aus einer mit 50 µg *E.coli* LPS immunisierten C57BL/6 Maus) wächst nur in Gegenwart von IL-6 und wird deswegen zum Bioassay auf IL-6 angewendet [Van-Snick et al. 1986]. Zur Kultur werden die Zellen im Vollmedium, ergänzt mit 2% 2-ME/Hepes Stammlösung (2.8.1.5) und 5-10% IL-6 haltigem Medium (3T3-Zellüberstand), in 50 ml Gewebekulturflaschen (Nunc, Denmark 1 63371) gehalten.

#### 2.9.6. Yac-1

Yac-1 ist eine durch Inokulation mit Moloney Leukemia Virus (MLV) in einer neugeborenen A/Sn Maus induzierte Lymphoma Zelllinie. Diese Zelllinie ist sehr empfindlich gegen die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen aus der Maus [Kiessling et al. 1975 a und b]. Yac-1 wurde zum NK-Aktivität-Test als Zielzellen benutzt und *in vitro* mit Vollmedium in 9-cm Gewebekulturschalen (Falcon 3003) gehalten.

## Methoden

### **2.10. Zellisolierung, -kultur, -reinigung und -aktivierung**

#### **2.10.1. Isolierung der Knochenmarkzellen**

Maus-Femuren wurden aseptisch entnommen, gesäubert und an den Enden aufgeschnitten. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze und einer 27 G (0,4-mm in Durchmesser) Kanüle herausgespült, dann in RPMI 1640 Medium suspendiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Knochenmarkzellen mit Vollmedium auf eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^7$  /ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde sorgfältig auf einen 4-stufigen Perkoll-Gradienten (Gradient I: 32,0%, 52,0%, 55,0%, 60,6%) geschichtet und bei 1500 Upm ( $425 \times g$ ) für 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Zellfraktion zwischen Perkoll-Stufe 1 (32,0%) und -Stufe 2 (52,0%) gesammelt, dreimal gewaschen und zur Knochenmark-Vorkultur (siehe 2.10.3) eingesät.

#### **2.10.2. Perkoll-Gradient Fraktionierung**

Kurz vor dem Aufbauen eines Gradienten wurde die Perkoll Stammlösung (60,6%, siehe 2.8 1.8) mit Vollmedium auf die gewünschten Konzentrationen, wie unten dargestellt, verdünnt. Je 2 ml von den fertig eingestellten Perkoll-Lösungen wurde sorgfältig stufenweise in die konischen Zentrifugeröhrchen (Falcon 2099) gefüllt.  $3-6 \times 10^7$  Zellen in 2 ml Vollmedium wurden mit Hilfe einer 2 ml Pipette auf die Oberfläche des Gradienten geschichtet. Die Gradienten wurden 30 min zentrifugiert (Gradient I bei  $425 \times g$  und Gradient II bei  $550 \times g$ ). Die dadurch getrennten Zellfraktionen wurden mit Hilfe einer Spritze und einer 20 G (0,9x70 mm) Kanüle abgenommen und dreimal mit RPMI 1640 gewaschen.

Herstellung der Perkoll-Stufen für Gradient I:

Stufe	Volumen	Perkoll Stammlösung	Vollmedium
1 (32,0%)	4,5 ml	<del>2,367 ml</del> 2,376 ml	2,124 ml
2 (52,0%)	4,5 ml	3,821 ml	0,579 ml
3 (55,0%)	4,5 ml	4,125 ml	0,375 ml
4 (60,6%)	4,5 ml	4,500 ml	0,000 ml

Herstellung der Perkoll-Stufen für Gradient II:

Stufe	Volumen	Perkoll Stammlösung	Vollmedium
1 (32,0%)	4,5 ml	2,376 ml	2,124 ml
2 (40,8%)	4,5 ml	3,063 ml	1,437 ml
3 (45,3%)	4,5 ml	3,398 ml	1,103 ml
4 (50,0%)	4,5 ml	3,750 ml	0,750 ml
5 (55,0%)	4,5 ml	4,125 ml	0,375 ml
6 (60,6%)	4,5 ml	4,500 ml	0,000 ml

**2.10.3. KM-Vorkultur**

10x10<sup>6</sup> Zellen (2.10.1) wurden in 15 ml Vollmedium in 9-cm Gewebekulturschale (Greiner) ausgesät. Zur Expandierung der Makrophagen-Vorläufer wurde die Kultur mit CSF-haltigem L-Zell "konditioniertem" Medium (2.7.3) auf 10-15% supplementiert. Für manche Untersuchungen (wie z.B. Northern-Blot Analyse, Zytokin-Produktion) wurde anstatt des L-kond. Mediums rekombinanter GM-CSF (200 U/ml) eingesetzt, um zu vermeiden, die möglich im L-kond. Medium existierenden unbekannt Faktoren auf die Zellen einzuwirken. Bei niedriger Konzentration (< 200 U/ml) wirkt GM-CSF hauptsächlich auf die Vermehrung der Zellen des Makrophagensystems [Metcalf, 1987]. Zur Erzeugung der NK-Aktivität wurde die KM-Vorkultur mit IL-2 (100 U/ml) ergänzt. Dazu wurde das Vollmedium mit 5 µM 2-ME [Kuppen et al. 1991] benutzt. Diese KM-Vorkultur lief immer nur 3 Tage.

#### **2.10.4. Isolierung der Makrophagen Vorläufer aus KM-Vorkultur**

Nach einer 3-tägigen KM-Vorkultur wurden die nicht adhärenen Zellen gesammelt, gewaschen, und über einen 6-stufigen Percoll Gradienten II (32,0%, 40,0%, 45,0%, 50,0%, 55,0%, und 60,6%) fraktioniert. Die Zellfraktion zwischen Percoll-Stufe 2 (40,0%) und 3 (45,0%) wurde gesammelt und dreimal mit RPMI 1640 gewaschen. Diese Zellfraktion enthielt ungefähr 85% Makrophagen Vorläufer (einschließlich ein paar leicht adhärenen Makrophagen), ca. 10% polymorphkernige Zellen, und 2-5% Lymphozyten.

#### **2.10.5. Depletion der Phagozytischen Zellen**

Die Zellen wurden in Vollmedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml suspendiert und mit Eisenpartikeln (Technicon Instruments Corp. Tanytown, NY. Product No.T01-0507) in einer Plastikschale (Falcon 3003) 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Während der Inkubation fraßen die phagozytischen Zellen Eisenpartikel. Nach der Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen gesammelt und in ein 10 cm langes Röhrchen (Falcon 2057) überführt. Das Röhrchen wurde in einen Dynal Magneten (Dynal MPC-1, "magnetic particle concentrator", Dynal, Oslo, Pord.No.:12001) eingelegt, um die nicht adhärenen aber Eisenpartikeln-enthaltenden (also phagozytischen) Zellen zu entfernen. Nachdem die phagozytischen Zellen fest an der Wand des Röhrchens hingen, wurde die Zellsuspension im Röhrchen mit Hilfe einer Spritze und einer 20 G (0,9x70 mm) Kanüle aus dem Röhrchen abgesaugt. Die dadurch gewonnene Zellpopulation war frei von phagozytischen und adhärenen Granulozyten und semi-reifen Makrophagen.

#### **2.10.6. Depletion der Lymphozyten mit magnetischen Beads**

Zuerst wurden die Zellen mit Antikörper gegen spezifische Oberflächemarker von unerwünschten Lymphozyten (Ratte anti-Maus CD3 für T Lymphozyten und Ratte anti-Maus B220 für B Lymphozyten) bei  $4^\circ\text{C}$  für 45 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit PBS + 2% FKS auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt

und in 10 ml Falcon Reagenzröhrchen überführt. Magnetische Beads der Firma Dynal, gekoppelt mit Schaf anti-Ratte IgG, wurden in einem Verhältnis von 4:1 (Beads zu Zellen) in die Zellsuspension gegeben. Das Röhrchen wurde bei 4°C für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Beads und die über die Antikörper daran gebundenen Zellen von Dynal Magnet MPC-1 entfernt. Die übrige Zellsuspension wurde abzentrifugiert und 2 mal gewaschen. Die dadurch gereinigte Zellpopulation enthielt weniger als 0.5% Lymphozyten.

#### **2.10.7. Hauptkultur und LAK-Kultur**

Die aus 3-tägiger KM-Vorkultur (2.10.3) isolierten Makrophagen-Vorläuferzellen wurden als Ausgangspopulation in Vollmedium mit 2-ME (5  $\mu$ M) weiter kultiviert. Je nach dem Zweck der Untersuchung wurden entsprechende Faktoren (CSF-1 oder IL-2, oder CSF-1 +IL-2) in verschiedenen Konzentrationen in die Kultur eingefügt. Diese Kultur wurde als Hauptkultur bezeichnet. Für LAK-Kultur wurde der Hauptkultur hohe Konzentration von IL-2 (1000 U/ml) gegeben.

#### **2.10.8. Aktivierung der KM-Makrophagen Vorläufer zur Zytokin-Produktion**

Um die Zytokin-Produktionsfähigkeit von Knochenmark Makrophagen-Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden die gewaschenen Zellen im Vollmedium (0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) mit entsprechenden stimulierenden Faktoren bei 37°C über Nacht inkubiert. Überstände wurden am nächsten Tag (ca.20 Stdn. nach der Zugabe der Faktoren) gesammelt und in Polypropylene Röhrchen (Falcon 2063) bei 4°C aufbewahrt. Zytokine wurden entweder im Bioassay (2.12.4) oder im ELISA (2.12.5) nachgewiesen.

### **2.11. Zellfärbungen**

#### **2.11.1. Zytopräparate**

Je 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Objektträger wurden in einer Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon

Southern, Astmoor, GB) 5 min bei 500 Upm auf Objektträger gebracht und danach luftgetrocknet. Die davon angefertigten Zytopräparate können durch verschiedene Färbungsverfahren zur Untersuchung von Zellmorphologie, Zelloberflächenmarkern und zytoplasmatischen Komponenten verwendet werden. Zum Aufbewahren können die getrocknete Zytopräparate in Alufolie getrennt voneinander eingepackt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

### **2.11.2. Zellkultur in Chamber Slides**

Zellen wurden im Vollmedium mit 0,2% 2-ME/Hepes Stammlösung (2.8.1.5) auf eine Zellkonzentration von  $2.5\text{-}5 \times 10^5$  Zellen/ml suspendiert und je  $300 \mu\text{l}$  pro Loch in die 8-well Chamber Slides (Nunc, IL. Order No.:177402) eingesät. Die entsprechenden Zusätze wie PMA, M-CSF, und IL-2 wurden je nach dem Ziel der Untersuchung zu den Kulturen hinzugegeben. Die Slides wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

### **2.11.3. Esterase-Doppelfärbung**

Die Präparate wurden zuerst in der gepufferten Formalin-Aceton-Lösung (siehe 2.8.1.4) für 30 Sek. bei  $4\text{-}10^{\circ}\text{C}$  fixiert, dann 3 min mit PBS gespült, und danach an der Luft getrocknet. Die fixierten Präparate wurden für 15 min im Dunkeln mit der unter 2.8.1.9 beschriebenen Färbelösung für Chloracetatesterase (spezifisch für Granulozyten) bei RT inkubiert, und danach 3 min mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült. Nachdem die Präparate luftgetrocknet waren, wurden sie für weitere 25-30 min in der filtrierten Färbelösung für 2-Naphylbutyratesterase (siehe 2.8.1.9) im Dunkeln gefärbt, um Monozyten und Makrophagen (positiv für 2-Naphylbutyratesterase) nachzuweisen. Anschließend wurden die Präparate 3 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und danach luftgetrocknet. Mit Mayer's Hämalaun-Lösung (für Kernfärbung) wurden sie ca. 4 min gegengefärbt. Nach gründlichem Spülen mit Wasser und anschließendem Lufttrocknen, wurden die Präparate mit der Glycerin-Gelatine-Lösung (2.8.1.3) eingedeckt.

### **2.11.4. Fluoreszenzfärbung der Zelloberflächemarker**

1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 40 µl FACS-Waschpuffer (2.8.2.4) wurden in 0,6 ml Röhrchen (Greiner 101101) suspendiert. Die Zellen wurden zunächst mit 40 µl Human Ig Lösung (10 µg/ml) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert, um die unspezifische Bindung an FcR an der Zelloberfläche zu blockieren. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen entweder mit 40 µl FACS-Waschpuffer oder mit 40 µl Antikörper Lösung (Antikörper verdünnt in FACS-Waschpuffer) für 45 min auf dem Eis inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer. Anschließend wurde der FITC-konjugierte zweite Antikörper zugesetzt und weiter auf dem Eis inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen wiederum dreimal gewaschen und schließlich mittels des Durchflußzytometers (FACScan Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg) analysiert. Für die direkte Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen gleich nach dem Blockierungsschritt mit FITC-Antikörper für 30 min auf dem Eis inkubiert.

### **2.11.5. Immunhistochemische Färbung mit AP-konjugiertem-Antikörper**

Frische oder eingefrorene Zytopräparate wurden bei RT für 10 min in 100%igem Isopropanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS + 0,1% Tween 20 wurden sie mit Ziegen Serum (1:10 verdünnt in TBS) für 40 min vorinkubiert. Nachdem das Ziegen Serum entfernt worden war, wurden die Zytopräparate für 45 min bei RT mit Antikörper-Lösung (Ratte anti-murines Perforin 1:400 in TBS verdünnt) in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit TBS + Tween 20. Als nächster Schritt wurde 1:20 verdünnter Ziege anti-Ratte IgG (konjugiert mit alkalischer-Phosphatase) auf die Zytopräparate gegeben und bei RT für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate zunächst dreimal mit TBS + Tween 20 gespült, dann wurde Fast-Red-Substrat-Lösung (2.8.2.5) durch einen Filter (Millipore SLGS025BS) darauf gegeben und 10-30 min reagieren gelassen. Durch Spülen mit TBS wurde die Farbentwicklung abgestoppt. Die anschließende Gegenfärbung (Kernfärbung) erfolgte durch kurzes Einlegen der Präparate im Hämatoxylin (nur für 5-10 Sek.), danach wurde sofort mit

Wasser gespült. Die fertig gefärbten Zytopräparate wurden mit Aquatex eingedeckt.

### 2.11.6. Pappenheimfärbung (May-Grünwald/Giemsa-Färbung)

Zytopräparate wurden 3 min mit May-Grünwald-Färbelösung überschichtet und dadurch fixiert und gefärbt (die sauren Bestandteile der Zellen lassen sich bei dieser Behandlung bläulich anfärben). Nach kurzem Waschen in dest. Wasser wurden sie mit der 1:10 in dest. Wasser verdünnten Giemsa-Lösung für 10 min gegengefärbt. Bei diesem Schritt wurden basische azidophile Proteine mit dem sauren Farbstoff rot angefärbt. Nachdem die Zytopräparate mit dest. Wasser gründlich gespült und danach luftgetrocknet wurden, waren sie bereit für die lichtmikroskopische Untersuchung.

May-Grünwald-Lösung: 0,25% (w/v) May-Grünwald in Methanol

Giemsa-Lösung: 0,4% (w/v) modifiziertes Giemsa in gepuffertem Methanol (pH 6,8) gelöst.

## 2.12. Tests

### 2.12.1. <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau zum Test der Zellproliferation

Die zu testenden Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten (Falcon 3072) auf  $5 \times 10^3$  in 200  $\mu$ l Vollmedium pro Loch ausgesät und mit oder ohne Wachstumsfaktor bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für verschiedene Zeiten inkubiert. Danach wurde 1  $\mu$ Ci von [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro Loch in die Platten gegeben und für weitere 18 Stdn. inkubiert. Die Zellen in den Platten wurden schließlich mit einem Zellerntegerät (Skatron, Norway) auf Glasfaserfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) geerntet. Die getrockneten Filterplättchen wurden in Plastikröhrchen (Scintillation Vials & Caps, Skatron, Cat.No.15765) gelegt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS1801) gemessen. Die Radioaktivität ist in Counts pro Minute (cpm) angegeben.



### 2.12.2. $^{51}\text{Cr}$ Freisetzung aus Zielzellen zum Test der Zytotoxizität

Zuerst wurden die Zielzellen mit  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  ( $200 \mu\text{Ci}/5 \times 10^6$  Zellen) in 0,5 ml Vollmedium für 1,5 Stdn. bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  markiert. Nach der Markierung wurden die Zielzellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen, um extrazelluläres  $^{51}\text{Cr}$  zu entfernen, und anschließend mit Vollmedium auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Zum Test der Zytotoxizität wurden je 100  $\mu\text{l}$  Effektorzellensuspension mit verschiedener Zellzahl ( $4 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$  und  $1 \times 10^4$  Zellen) pro Loch in 96-well Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Nunc, Roskilde, Denmark) ausplattiert. Dazu wurden die radioaktiv markierten Zielzellen ( $1 \times 10^4$  /Loch) pipettiert. Die dadurch gebildeten Verhältnisse von Effektor- und Zielzellen waren: 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1 und 1:1. Die Mikrotiterplatten wurden kurz bei 600 Upm zentrifugiert und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 4 Stdn. (zur Untersuchung der NK-Aktivität) oder 16 Stdn. (zum Test der LAK-Aktivität) Lysezeit wurden die Mikrotiterplatten für 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert, 100  $\mu\text{l}$  Aliquots von den Überständen abgenommen und die darin enthaltene Radioaktivität ("Experimental Release": ExpR) in einem Meßgerät für gamma-Strahlen (Kontron MR 480, Basel, Schweiz) gemessen. Zur Kontrolle wurden von den Zielzellen die spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (ohne Anwesenheit von Effektorzellen, als SR bezeichnet) sowie die maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (100%ige Abtötung der Zielzellen durch Inkubation mit 1 N HCl: MaxR) bestimmt. Die Zytotoxizität der Effektorzellen wurde entweder als % spezifische Lyse von Zielzellen, berechnet nach der unten dargestellten Formel, oder Lytische Einheiten (LU) angegeben:

$$\% \text{spezifische Lyse} = \frac{\text{ExpR} - \text{SR}}{\text{MaxR} - \text{SR}} \times 100$$

Wenn die Ergebnisse als LU präsentiert werden, entspricht Eine Lytische Einheit (1 LU) die Zahl der Effektorzellen, die eine 20%ige spezifische Lyse von  $1 \times 10^4$  Zielzellen bewirkten.

LU wurden aus verschiedenen Verhältnissen von Effektor- und Zielzellen kalkuliert.  $LU/10^7$  ergibt die lytischen Einheiten von  $1 \times 10^7$  Effektorzellen.

### 2.12.3. Test der Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Um festzustellen, ob die Zytotoxizität der Zellen von der Anwesenheit von Kalzium abhängig war, wurden drei Testmedien: A) Vollmedium, B) Vollmedium + 10 mM EDTA und C) Vollmedium + 10 mM EDTA + 15 mM  $CaCl_2$  verwendet. EDTA kann mit den im Vollmedium enthaltenen Kalzium-Ionen Komplexe bilden. Dadurch wurde  $Ca^{2+}$  im Medium B depletiert. Im Medium C wurde  $CaCl_2$  im Überschuß zugegeben, damit es wieder  $Ca^{2+}$  enthielt. Die zu testenden Effektorzellen wurden in drei Portionen unterteilt, in den entsprechenden Testmedien suspendiert, und in 96-well Mikrotiterplatten ausplattiert. Zytotoxizitätstests wurden wie unter 2.12.2. beschrieben durchgeführt.

### 2.12.4. MTT-Test (kolorimetrischer Bioassay)

Da nur lebende Zellen fähig sind, MTT umzusetzen (Bildung von blauen Formazan Kristallen), wird MTT-Test häufig zur Bestimmung des Zellwachstums angewendet. Dieser Test wird auch kolorimetrischer Bioassay genannt [Mosmann 1983, Tada et al. 1986]. In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test zu Untersuchungen der Zytokin-Aktivitäten in Zellüberständen durchgeführt. Die Zytokin-abhängigen wurden Zelllinien in 96-well Mikrotiterplatten mit den zu testenden Überständen sowie entsprechenden Zytokin-Standards kultiviert. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit Medium ohne Faktor inkubiert. Nachdem die Zellen im Kontrollwell verstorben waren (ca. 2-4 Tage), wurde je  $10 \mu\text{l}$  MTT-Lösung (2.8.1.6) pro Loch in die Platten pipettiert. Nach ca. 4 stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden  $100 \mu\text{l}$  MTT-Abstopplösung (2.8.1.7) pro Loch gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  stehen gelassen, um ein vollständiges Lösen der gebildeten blauen Kristalle zu erreichen. Es erfolgte eine photometrische Absorptionsmessung mit einem Microplate Reader (MR 700 Dynatech) bei 570 nm.

### 2.12.5. Enzymgebundener Immunoassay ( ELISA )

In dieser Arbeit wurde der ELISA hauptsächlich zur Untersuchung des Zytokin-Gehaltes in Überständen angewendet. Zuerst wurden die Platten (Nunc Immunoplate I, Code Nr. 439454) mit entsprechendem anti-Zytokin "Fang-Antikörper" je 50  $\mu\text{l}$  pro Loch (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit ELISA-Waschenpuffer (2.8.2.3) wurde pro Loch 100  $\mu\text{l}$  PBS + 0,5 % BSA zum Blockieren der Plastikoberfläche zugegeben und die Platten für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen und dann wurden die zu testenden Überständen sowie Zytokin-Standard Lösungen einpipettiert (50  $\mu\text{l}/\text{Loch}$ ). Die Platten wurden in einer feuchten Kammer 2 h bei RT inkubiert, danach fünfmal gewaschen. Als nächste Schritt erfolgte eine Inkubation der Platten mit 1:100 verdünntem biotinyliertem Antikörper gegen dasselbe Zytokin (50  $\mu\text{l}/\text{Loch}$ ) in einer feuchten Kammer bei RT für 1 Stunde. Danach wurden die Platten sechsmal gewaschen, und mit 1:500 verdünntem Avidin-POD-Konjugat (50  $\mu\text{l}/\text{Loch}$ ) in einer feuchten Kammer bei RT für 30-45 min inkubiert. Am Ende wurde wiederum sechsmal gewaschen. Danach wurde die DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (siehe 2.8.2.2) je 50  $\mu\text{l}$  pro Loch in die Platten gefüllt und die Platten anschließend bei RT im Dunkeln 10-20 min stehen gelassen. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1N HCl/Loch wurde die Farbreaktion abgestoppt. Mit dem Microplate Reader wurden die Ergebnisse ausgewertet.

### 2.12.6. Soft-Agar Assay

30-60x10<sup>6</sup> frische Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Mäusen im Alter von 4 Wochen wurden in 3 ml PBS suspendiert, dann sorgfältig auf 5 ml Ficoll geschichtet und bei 2500 U<sub>pm</sub> zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Zellfraktion zwischen PBS und Ficoll gesammelt und dreimal gewaschen. Die Zellen wurden dann in dem mit 15% FKS versetztem Iscove's Medium auf 1x10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. Je 0,1 ml zu testenden Überständen oder CSF-haltige Lösungen wurde in 3,5 cm Gewebekulturschalen (35x10 w/Grid, Nunc, Inc., IL. Order No.:174926) gefüllt. Danach wurde die KM-Zellsuspension im Verhältnis von 8:1

mit 3,5% Agar im 42°C Wasserbad gemischt und dann in die Schalen (0,9 ml/Schale) gegossen. Es folgte eine schnelle Mischung, um die zu testenden Überstände oder CSF Lösungen mit den Zellen sowie dem Agar in der Kulturschale gleichmäßig zu verteilen. Die Schalen wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert. Danach wurden die auf dem Agar ausgewachsenen Kolonien unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Zur Bestimmung der Zelltypen in den Kolonien wurden die Scheiben von "Soft-Agar" im PBS-MC Bad auf Objektträger gebracht und danach luftgetrocknet. Anschließend wurden die Präparate nach Esterase-Doppelfärbung (2.11.3) angefärbt und mikroskopisch untersucht.

### **2.13. Nachweis der Zytokine**

#### **2.13.1. IL-1**

Die zu testende Überstände sowie Standard IL-1 (0,1-125 Einheiten/ml) wurden zunächst in die Löcher der 96-well Mikrotiterplatten (Falcon 3072) gefüllt. Die gewaschenen D10 Zellen (2.9.1) wurden in IL-1-Testmedium (Iscove's Medium + 1 mM Natrium Pyruvat + 1% 2-ME/Hepes Stammlösung + 5 µg/ml Con A + 5% FKS) auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt, je 100 µl pro Loch in die Mikrotiterplatten pipettiert, dann bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Kontrolle wurden D10 Zellen mit IL-1-Testmedium allein inkubiert. Nach angemessener Inkubationszeit wurde der MTT-Test durchgeführt (2.12.4) und das Wachstum der D10 Zellen bestimmt. Mit Hilfer der IL-1 Standardlösungen wurde eine Eichkurve erstellt. Die IL-1 Aktivität der Proben werden an der Eichkurven abgelesen.

#### **2.13.2. IL-6**

7TD1 Zellen (2.9.5) wurden in Vollmedium + 2% 2-ME/Hepes Stammlösung (somit die Endkonzentration von 2-ME im Medium auf ca. 50 µM liegt) in die 96-well-Mikrotiterplatten ( $2,5 \times 10^3$  Zellen pro Loch) pipettiert, die zuvor mit verdünnten, zu testenden Überständen und Standard IL-6 beschicht worden waren und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 3-4 Tage inkubiert.

Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt. Zum Aufstellen der Eichkurve wurde Standard IL-6 in den Testlöchern schrittweise von 125 U/ml bis zu 0,5 U/ml verdünnt.

### 2.13.3. IL-10

Der IL-10-Gehalt in den Zellüberständen wurde mittels ELISA (2.12.5) nachgewiesen. Die zwei dazu gebrauchten spezifischen anti Maus IL-10 Antikörper (gereinigt und biotinyliert, siehe Seite 18) wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

### 2.13.4. M-CSF

Zum Bestimmen der M-CSF-Aktivität in Zellüberständen wurde der Soft-Agar Assay (2.12.6) und anschließend eine doppelte Esterase-Färbung (2.11.3) gemacht.

### 2.13.5. GM-CSF/IL-3

FDPC-1 Zellen brauchen entweder GM-CSF oder IL-3 im Kulturmedium, um zu überleben und zu proliferieren (2.9.2). Um GM-CSF- oder IL-3-Aktivität der Zellüberständen zu untersuchen, wurde spezifischer, monoklonaler anti-Maus IL-3 Antikörper (Seite 18) bei dem Bioassay mit FDPC-1 Zellen verwendet, indem zwei Ansätze, mit und ohne anti-IL-3, parallel getestet wurden. Bei der Untersuchung wurden FDPC-1 Zellen zunächst in Vollmedium ( $4 \times 10^5$  Zellen/ml) suspendiert und dann je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Loch in 96-well Mikrotiterplatten, die seriell verdünnten Standard GM-CSF (0,25-125 U/ml) oder IL-3 (0,01-10 U/ml) oder die zu testenden Überstände enthielten, ausgesät. Anschließend wurde je 10  $\mu$ l anti-IL-3 Antikörper in die entsprechenden Testlöcher pipettiert. Die Ergebnisse des Bioassays wurden ebenfalls wie oben beschrieben mit dem MTT-Test ausgewertet. Die Einheiten der GM-CSF- oder IL-3-Aktivität wurden jeweils mit der Eichkurve von Standard GM-CSF oder IL-3 berechnet.

### 2.13.6. IFN- $\gamma$

Mit zwei spezifischen anti-Maus IFN- $\gamma$  Antikörper (gereinigt und biotinyliert, siehe Seite 18) wurde ein ELISA (2.12.5) zum Nachweis des Gamma-IFNs in Zellüberständen durchgeführt. Die Antikörper waren 1:500 verdünnt.

### 2.13.7. TNF- $\alpha$

Die TNF-Aktivität in Zellüberständen wurde mittels L929-Zellen bestimmt. In Gegenwart von Actinomycin D sind L929-Zellen sehr sensitiv für TNF-vermittelte Zytotoxizität und lassen sich innerhalb von 24 h lysieren [Ruff & Gifford 1980]. Zum Test wurden L929-Zellen ( $1.5 \times 10^4$  Zellen pro Loch) in Vollmedium in die 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert, so daß sich ein geschlossener Zellrasen bildete. Auf diesen Zellen wurden serielle Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8 etc.) der zu testenden Zellüberstände sowie des Standard TNFs (0,10-200 U/ml) hergestellt. Je 100  $\mu$ l 1:500 im PRMI 1640 verdünnte Actinomycin D Lösung (2.8.1.2) wurde zugefügt. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wurden aus jedem Loch 100  $\mu$ l Medium entnommen und 10  $\mu$ l MTT Lösung hinzupipettiert, um den Abtötungsgrad der L929 Zellen zu bestimmen. Da Actinomycin-behandelte Zellen MTT langsamer umsetzen als normale Zellen, wurde die Inkubationszeit von ca. 4 h auf 6 h verlängert. Die Ergebnisse wurden ausgewertet wie bei dem MTT-Test (2.12.4) beschrieben. Um den TNF-Typ (TNF- $\alpha$  oder TNF- $\beta$ ) zu bestimmen, wurde spezifischer anti-TNF- $\alpha$  Antikörper (siehe Seite 19) in einer Verdünnung von 1:100 dem Test zugefügt.

## 2.14. Nachweis der mRNA von speziellen Proteinen

### 2.14.1. Northern-Blot

#### 2.14.1.1 Markierung einer cDNA Probe mit [<sup>32</sup>P]

Zur Markierung wurde der "Megaprime"-Kit der Firma Amersham verwendet. Die Markierung wurde nach der "Random Prime" Methode [Feinberg & Vogelstein 1983]

folgenderweise durchgeführt: 20 ng doppelsträngige cDNA wurde mit 5  $\mu$ l Primerlösung (Nonadesoxynukleotide in wäßriger Lösung) versetzt und der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Die DNA wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und zur Primeranlagerung auf RT abgekühlt. Die Markierung erfolgte nach Zugabe von 10  $\mu$ l 5x Markierungspuffer (dATP, dGTP, dTTP in Tris/HCL pH 7,8), 34  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (spez. Aktivität: 3000Ci/mM) und 2  $\mu$ l Klenow-Enzym (1 Unit/ $\mu$ l) für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde die DNA durch Ethanolfällung von den freien Nukleotiden abgetrennt und in TE Puffer (2.8.3.9) aufgenommen. Es wurde eine spezifische Aktivität von > 10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g DNA erreicht.

#### 2.14.1.2. RNA Präparation

3-10x10<sup>6</sup> Zellen aus Gewebekultur wurden abzentrifugiert und zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurde das Zellpellet mit 900  $\mu$ l Lösung D (2.8.3.8) versetzt, so daß die Zellen sofort lysiert wurden [Chomczynski & Sacchi 1987]. Das Zellysat wurde in ein 2 ml Eppendorffhütchen überführt und 90  $\mu$ l 2 M NaAc (pH 4,0), 900  $\mu$ l Phenol (vorher mit Wasser gesättigt), und 180  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurden hinzugegeben (nach Zugabe jeder einzelnen Komponente wurde vorsichtig gemischt). Die Suspension wurde anschließend 10 Sekunden kräftig auf dem Vortex geschüttelt. Nach 15 min Abkühlen auf Eis wurde die Probe 20 Minuten bei 10000xg in einer Eppendorffzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befand sich die RNA in der wässrigen Phase, DNA und Protein dagegen in der Interphase und der Phenolphase. Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Eppendorffhütchen transferiert, mit 900  $\mu$ l Isopropanol gemischt und dann mindestens 1 Stunde bei -20°C stehen gelassen, um die RNA zu präzipitieren, die schließlich durch Zentrifugation (10 min bei 10000xg) gewonnen werden konnte. Die RNA wurde in 75%igem vorgekühltem Ethanol resuspendiert und 5 min bei 10000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette sorgfältig abgenommen und der Niederschlag wurde 10-15 min bei RT luftgetrocknet, bis keine Spuren

von Ethanol mehr sichtbar waren. Die RNA wurde in 50  $\mu\text{l}$  0,5% SDS aufgenommen und 15 min auf 65°C erhitzt, um sie zu lösen. Um die Nukleinsäuregehalte der Proben zu bestimmen, wurde die Extinktion der Proben bei 260 nm gemessen. Die RNA-Lösung wurde entweder direkt im Northern-Blot analysiert oder bei -70°C aufbewahrt.

### 2.14.1.3. RNA-Trennung und Blot

Je 10  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung (ca. 20  $\mu\text{g}$  RNA) wurde mit 8  $\mu\text{l}$  DMSO-Mix (2.8.3.4) und 1,2  $\mu\text{l}$  Glyoxal (20% in H<sub>2</sub>O pH ca.6) gemischt und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden schnell auf 4°C abgekühlt, mit 4  $\mu\text{l}$  5x RNA-Probenpuffer (2.8.3.7) gemischt, auf ein Gel (1% Agarose in 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7) aufgetragen und bei 70 V in demselben Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid in 10 mM NaPO<sub>4</sub> 10 min angefärbt, um die RNA sichtbar zu machen. Am Ende wurde ein Northern-Blot nach Standard Technik [Maniatis et al. 1982] gemacht, nämlich: eine Membran (Hybond N<sup>+</sup> Nylonmembran, Amersham) wurde auf das Gel gelegt und ein Kapillar-Blot aufgebaut, wie in der Abbildung unten dargestellt. Das Transferieren der RNA von dem Gel auf die Membran erfolgte über Nacht, wobei 2 x SSC als transferierender Puffer benutzt wurde.

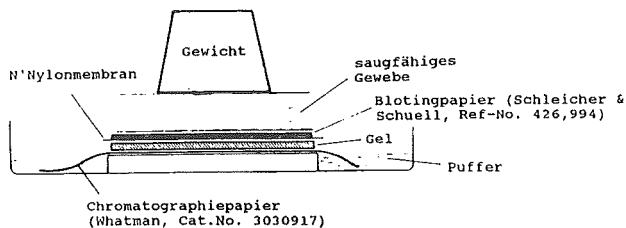


Abb. Gerät für einen Northern-Blot



#### 2.14.1.4. Hybridisierung und Nachweis der RNA

Die Nylonmembran wurde zur Fixierung der RNA für 30-60 min bei 80°C gebacken. Anschließend wurde die Membran in 2xSSC angefeuchtet und mit denaturierter Lachs-Sperma DNA (100 µg/ml in Hybridisierungspuffer) 1-3 Stunden bei 42°C prähybridisiert. Die durch Erhitzen und Abkühlen denaturierte radioaktiv markierte cDNA wurde in den Prähybridisierungsansatz gegeben und mit der RNA für 12-15 h bei 65°C hybridisiert. Danach wurde die Membran in SSC/SDS nach folgendem Schema gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen: 1. 2xSSC/0,1%SDS 10 min bei 20°C, 2. 2xSSC/0,1% SDS 30 min bei 65°C, 3. 1xSSC/0,1% SDS 30 min bei 65°C, und 4. 0,2xSSC/0,1% SDS 20 min bei 65°C. Um die hybridisierte radioaktive DNA sichtbar zu machen, wurde die Membran in eine Haushaltsfolie eingepackt und dann mit einem Kodak Xomat AR Film und zwei Verstärkerfolien für 1-5 Tage bei -70°C autoradiographiert.

#### 2.14.2. *in situ* Hybridisierung

##### 2.14.2.1. cDNA Markierung mit Digoxigenin (DIG)

Zur DIG-Markierung der cDNA wurde wiederum die "Random Prime" DNA-Markierungsmethode angewendet. Die Reagenzien wurden von Boehringer Mannheim erworben. Zunächst wurden ca. 30 ng DNA, die vorher gereinigt und linearisiert worden war, in einem Eppendorffgefäß mit bidest. Wasser auf 15 µl aufgefüllt, dann durch Erhitzen für 10-15 min im kochenden Wasserbad und darauf folgendes schnelles Abkühlen auf Eis/NaCl denaturiert. Es folgte die Zugabe von 2 µl Hexanucleotid-Gemisch, 2 µl dNTP-Markierungsgemisch (dATP, dCTP, dGTP je 1 mM und dTTP 0,65 mM sowie DIG-dUTP 0,35 mM), und anschließend 1 µl Klenow Enzym (2 Einheiten/µl). Die Mischung wurde kurz zentrifugiert und für 20 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) zugegeben, um die Synthese abzustoppen. Die Lösung wurde mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl vorgekühltem (-20°C) absolutem Ethanol gemischt und 1 Stunde bei -70°C oder über Nacht bei -20°C stehen gelassen, um DNA zu präzipitieren. Es folgte

eine 10 min Zentrifugation bei 12000xg. Der Niederschlag wurde einmal mit 50  $\mu$ l kaltem Ethanol (70%) gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 50  $\mu$ l TE-Puffer gelöst. Die Menge DIG-markierter DNA wurde in verschiedenen Verdünnungen (10x, 100x, 1000x, 2000x, 4000x, 8000x, 16000x und 32000x) im Vergleich zu Standard DIG-DNA im Dot-Blot bestimmt.

Hexanucleotid-Gemisch:	Tris-HCl	0,5 M
	MgCl <sub>2</sub>	0,1 M
	Dithioerythritol	1 mM
	BSA	2 mg/ml
	Hexanukleotide	62,5 A <sub>260</sub> U/ml
	pH	7,2 (20°C)

#### 2.14.2.2. Zellfixierung und Permeabilisierung

Die eingefrorenen Zytopräparate wurden sofort für 10-15 min in 100% Isopropanol fixiert. Die fixierte Präparate wurden bei Raumtemperatur zunächst einmal für 15 min mit PBS + 0.02% Triton X-100 (DEPC behandelt) und dann zweimal für 10 min mit 2xSSC (DEPC behandelt) gespült.

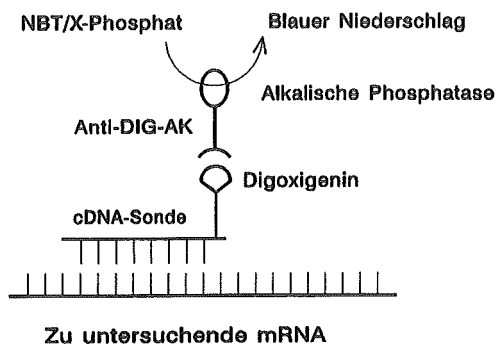
#### 2.14.2.3. Hybridisierung

Die Zytopräparate wurden bei RT mit 25-35  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (2.8.3.6) pro Präparat für eine Stunde prähybridisiert. Es folgte eine 16-20-stündige Hybridisierung bei 37°C mit der zuvor bei 100°C für 10 min denaturierten und dann schnell abgekühlten DIG-markierten cDNA Sonde (5 ng/Präparat). Am Ende der Hybridisierung wurden die Präparate folgendermaßen gewaschen: zuerst für 5 min in PBS + 0,02% Triton X-100 bei RT, dann 10 min in 2 x SSC bei RT, anschließend zwei mal für 10 min in 1 x SSC + 0,01% SDS bei 50°C, schließlich für 10 min in 0,5 x SSC + 0,01% SDS bei RT.

#### 2.14.2.4. Immunologischer Nachweis mit anti-DIG Antikörper

Gleich nach dem Waschen wurden die Zytopräparate zunächst mit der Blocking-Lösung (0,2% BSA + 0,3% Triton X-100 in TBS, pH 7,6) 30 min bei RT und anschließend mit anti-DIG Antikörper (1:1000 verdünnt in Blocking-Lösung) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate 15 Min in TBS + 0,1% Triton X-100 und danach 15 Min in TBS allein gewaschen, dann in TMS (pH 9,5, siehe 2.8.2.6) für 5 Min äquilibriert. Anschließend wurden sie mit NTB+X-Phosphat Lösung (4,5 µl Nitroblau-Tetrazolium Salz, 75 mg/ml in 70% DMF + 3,5 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyphosphat, Toluidin-Salz, 50 mg/ml in 100% DMF + 1 ml TMS-Puffer) bedeckt. Die Farbreaktion verlief für 4-20 h bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Präparate mit TE Puffer (2.8.3.9) gespült, um die Reaktion abzustoppen, in Isopropanol dehydriert, und 40 Sek. mit Xylol gereinigt. Die Präparate konnten für die mikroskopische Untersuchung mit Glycerin-Gelatin-Lösung eingedeckt werden.

### Prinzip der Detektion mit einer DIG-Sonde



### 2.15. Statistische Analyse

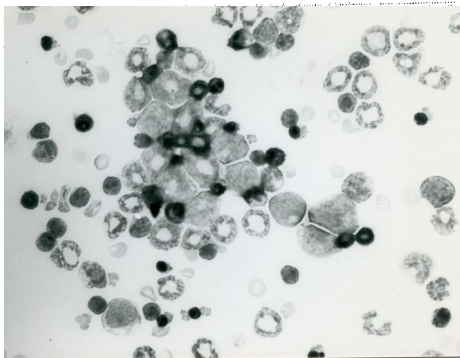
Alle Experimente wurde in Triplikaten gemacht und mindestens dreimal wiederholt. Die nachgewiesene Unterschiede zwischen den Proben wurden mittels "Student´s *t*-test" analysiert.  $P < 0,05$  galt als signifikant.

### 3. E R G E B N I S S E

#### 3.1. Anreicherung und Kultur für NK-aktive Zellen aus Knochenmark

##### 3.1.1. Anreicherung der NK-Vorläufer aus den gesamten Knochenmarkszellen

Wie schon in der Einleitung 1.1 erwähnt, befinden sich die Vorläufer der NK-Zellen im Knochenmark. *In vitro* Stimulation der frisch isolierten Knochenmarkszellen mit IL-2 führt zu einer Entwicklung von NK-inaktiven Vorläufern zu aktiven NK-Zellen. Um die NK-Aktivität in der Maus nachzuweisen, wird die Zytotoxizität gegen NK-empfindliche Yac-1 Tumorzellen (siehe 2.9.6) in einem 4-stündigen Test gemessen [Koo et al., 1986; Pollack & Rosse, 1987]. In der vorliegenden Arbeit wurden die NK-Vorläufer, deren Zelldichte relativ niedrig ist [Silvennoinen et al., 1986], durch Zentrifugation im Dichtegradienten angereichert. Die frisch isolierten gesamten Knochenmarkszellen wurden über einen 4-stufigen Percoll-Gradienten (Gradient I, siehe 2.10.2) in 4 Fraktionen getrennt. Danach wurden alle Fraktionen mit IL-2 kultiviert. Nach 48- sowie 72-stündiger Inkubation wurde die Zytotoxizität der Zellen gegen Yac-1 getestet. Bisher wurde die höchste anti-Yac-1 Aktivität bei den Zellen in der leichten Percoll-Fraktion (Fr. 32%/52%) nachgewiesen (Tab.1). Die zytotoxische Aktivität hing mit der Anwesenheit von IL-2 zusammen und trat bei den Kulturen ohne IL-2 nicht auf.



**Abb.1.** Frisch isolierte gesamte Knochenmarkszellen. Das Zytopräparat zeigt eine heterogene Population, die aus verschiedenen Zelltypen (myeloischen Monoblasten und polymorphkernigen Zellen, Erythrozyten, kleinen Lymphozyten, und noch unidentifizierbaren Vorläuferzellen) besteht.

Tab.1. *Zytotoxizität verschiedener Perkoll-Fractionen aus murinem Knochenmark gegen Yac-1 Tumorzellen nach IL-2 Stimulation*

Zellen	in Vollmedium		in 100 U/ml IL-2	
	48 h	72 h	48 h	72 h
gesamte KM Zellen	0%	0%	2±2%	15±3%
Fr.1 32%/52%	0%	0%	15±2% <sup>a</sup>	35±5% <sup>b</sup>
Fr.2 52%/55%	0%	0%	2,5±2%	5±3%
Fr.3 55%/60,6%	0%	0%	0%	0%
Fr.4 60,6%/Boden	0%	0%	0%	0%

Die Zellen wurden in 96-well Mikrotitrierplatten ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/Loch) ausgesät und entweder nur mit Vollmedium oder mit Vollmedium + 100 U/ml IL-2 inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal gewaschen und weiter mit  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Yac-1 ( $5 \times 10^3$  Zellen/Loch) 4 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse werden als % spezifische Lyse von Yac-1 Zielzellen (siehe 2.12.2) angegeben.

<sup>a</sup>  $p < 0,01$ , Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

<sup>b</sup>  $p < 0,01$ , Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

### 3.1.2. Mikroskopische Untersuchung der Knochenmarkzellen in verschiedenen Perkoll-Fractionen

Die frisch isolierte gesamte KM Zellpopulation bestand aus heterogenen Zelltypen (siehe Abb. 1). Sie wurde durch Zentrifugation über einen Perkoll-Gradienten in vier Fraktionen, die jeweils Zellen ähnlicher Dichte enthielten, aufgetrennt. Es wurden Zytopräparate (2.11.1)

aller Perkoll-Fractionen gemacht, nach Pappenheim (2.11.6) gefärbt und schließlich die Zellzusammensetzung von jeder Fraktion mikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Ein großer Teil der Zellen in der leichten Fraktion (32%/52%) ließen sich wegen ihrer unreifen Morphologie nicht identifizieren. Solche unidentifizierbaren Vorläufer waren in den schweren Perkoll-Fractionen (52%/55%, 55%/60% und 60%/Boden) kaum zu finden.

Tab.2. *Zelltypen in den verschiedenen Fraktionen von Perkoll-Gradient I*

Perkoll Fr.	Unidentifizierbare Vorläufer	Monoblast-ähnliche Zellen	Polymorph-kernige Zellen	Kleine Lymphozyten	Erythrozyten
32%/52%	60±10%*	15±5%	10±5%	5±3%	2±1%
52%/55%	10±5%	9±5%	39±12%	25±10%	8±5%
55%/60,6%	—	1±1%	60±10%	10±5%	30±10%
60,6%/Bod.	—	—	—	15±3%	85±5%

"—" bedeutet, der entsprechende Zelltyp wurde in der Fraktion nicht beobachtet.

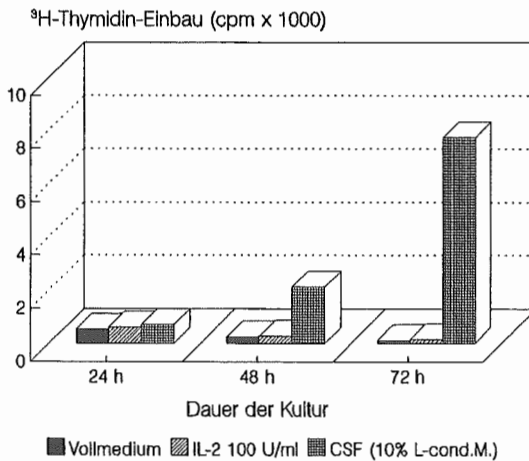
\*  $p < 0,02$  Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

### 3.1.3. Proliferation der NK-Vorläufer haltigen Zellpopulation

Eine Kultivierung der Knochenmarkzellen von der leichten Perkoll-Fraktion (32%/52%), die die meisten NK-Vorläufer enthielt, mit lymphoidem Wachstumsfaktor IL-2 führte zu keiner signifikanten Proliferation. Im Gegensatz dazu resultierte die Kultivierung dieser Fraktion mit

CSF-haltigem Medium (L-Zell "konditioniertes" Medium) in einer starken Proliferationsantwort (Abb.2). Da das L-Zell "konditionierte Medium" außer CSF (CSF-1 und GM-CSF) auch andere Faktoren enthalten konnte, wurden die rekombinanten Koloniestimulierenden Faktoren, nämlich hrCSF-1 und mrGM-CSF, für den weiteren Proliferationstest eingesetzt. In Abbildung 3 ist zu sehen, daß sowohl hrCSF-1 als auch mrGM-CSF eine starke Zellproliferation anregten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Zellen in der leichten Percoll-Fraktion von myeloidem Wachstumsfaktor abhängig wachsen.

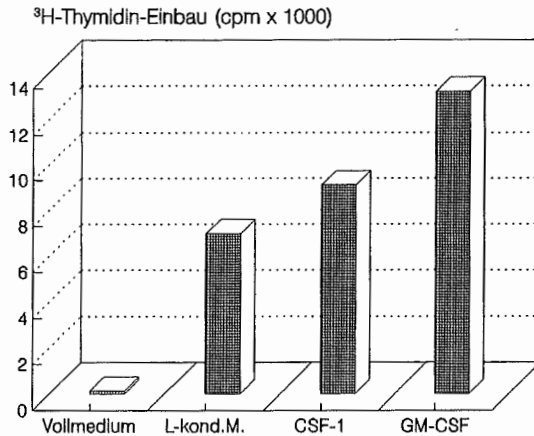
***Proliferation der KM-Zellen von Percoll-Fraktion 32%/52%***



**Abb.2.** Die Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten auf  $5 \times 10^3$  Zellen/Loch ausplattiert und inkubiert mit 1) Vollmedium allein; 2) IL-2; oder 3) CSF-haltigem L-Zell "konditionierten" Medium. Der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbausassay (2.12.1) wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt.



### Zellproliferation in Gegenwart von rekombinanten CSFs



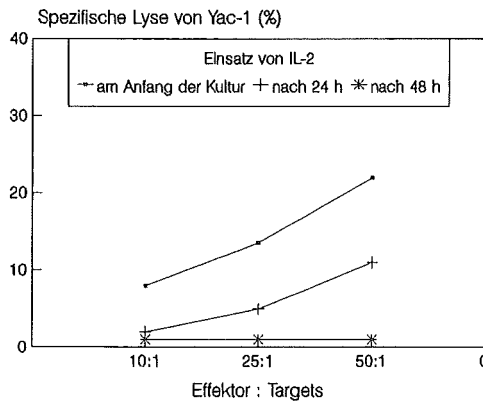
**Abb.3.** Die Zellen von Fr.32%/52% wurden in 96-well Mikrotiterplatten ( $5 \times 10^3$  Zellen/Loch) mit Reihenfolge wie in der Abbildung beschrieben 1) Vollmedium, 2) 10% L-Zell "konditioniertes" Medium, 3) 1000 U/ml hrCSF-1, und 4) 1000 U/ml mrGM-CSF inkubiert. Vollmedium und L-Zell "konditioniertes" Medium dienten als Kontrolle. Nach 2 Tagen wurde [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in die Kultur gegeben und 20 h später die Einbausrate gemessen.

#### 3.1.4. Effektive Knochenmark-Kultur für proliferierende und NK-aktive Zellen

Unter der Kulturbedingung nur mit CSF wurde keine zytotoxische Aktivität der Zellen (Fr.32%/52%) beobachtet. Nach einer 3-tägigen Kultur wurden die Zellen durch den Perkoll-Gradienten II (2.10.2) in fünf Fraktionen getrennt und die lytische Aktivität jeder Fraktion getestet. Es konnte keine Yac-1 Lyse nachgewiesen werden. Da die Zellen nach Kultur in

Gegenwart von IL-2 gute NK Aktivität zeigten wie unter 3.1.1. beschrieben, wurde versucht, eine Kombination von CSF (als Zellwachstumsfaktor) mit IL-2 (als NK Aktivität stimulierender Faktor) in die Kultur einzusetzen. Diese Kulturbedingung mit beiden Faktoren führte sowohl zu einer aktiven Zellproliferation als auch zu NK-Aktivität. In Abbildung 4 wird demonstriert, daß die Wirksamkeit von IL-2 stark von der Zugabezeit beeinflusst wurde. Je früher IL-2 zur Kultur hinzugefügt wurde, desto effektivere Induktion von NK-Aktivität wurde beobachtet. Wenn IL-2 erst zwei Tage nach dem Beginn der Kultur eingesetzt wurde, konnte keine NK-Aktivität mehr in den Zellen induziert werden.

***Einfluß des Zeitpunktes der Zugabe von IL-2 auf die Induktion der NK-Aktivität***



**Abb.4.** Die Zellen von Fr.32%/52% wurden in drei separaten Kulturen mit CSF (10% L-Zell kond. Medium) kultiviert. IL-2 (100 U/ml) wurde jeweils bei drei verschiedenen Zeitpunkten in die entsprechenden Kulturen gegeben: 1) gleich am Anfang der Kultur; 2) 24 Stunden später; und 3) 48 Stunden später. Jede Kultur wurde für 72 Stunden mit IL-2 inkubiert. Danach wurde ein 4-stündiger Zytotoxizitätstest (siehe 2.12.2) durchgeführt.

### 3.1.5. Reinigung der NK-aktiven Zellen nach Kultur in CSF +IL-2

Nach einer 3-tägigen KM-Vorkultur in dem "cocktail" von CSF mit IL-2 (siehe 2.10.3) wurden die Zellen aus der Kultur geerntet und über einen 6-stufigen Perkoll-Gradienten II (2.10.2) fraktioniert. Die dadurch entstandenen fünf Zellfraktionen wurden für die morphologische Identifizierung und den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, daß die NK-aktiven Zellen wiederum in den leichten Fraktionen (Fr1-3) angereichert wurden (Tab.4). Dabei wies die Fraktion 2 (40,8/45,3%), die eindeutig den höchsten Prozentsatz an Makrophagen Vorläufern enthielt (Tab.3), die beste NK-Aktivität auf (Tab.4). In dieser Fraktion wurden ca. 60% der aus der CSF+IL-2 Vorkultur geernteten Zellen wiedergewonnen (Tab.4).

Tab.3. *Zellzusammensetzung in den Fraktionen von Perkoll-Gradient II*

Perkoll-Fr.	Makrophagen- Vorläufer *	leicht ad- härente MΦ	PMN	Lymphozyten + andere
1. 32/40,8%	20±7%	67±9%	5±2%	3±3%
2. 40,8/45,3%	80±5% <sup>a, b</sup>	8±4%	7±3%	5±3%
3. 45,3/50,5%	42±5%	3±1%	40±6%	10±2%
4. 50,5/55,0%			80±4%	20±8%
5. 55,0/60,6%			48±7%	44±11%

\* Die morphologischen Charakteristika von Makrophagen-Vorläufern wurde in früherer Arbeit beschrieben [Lohmann-Matthes 1979, Baccharini et al. 1985].

<sup>a</sup> p < 0,01 Fr.2 vs. Fr.1

<sup>b</sup> p < 0,01 Fr.2 vs. Fr.3

Tab.4. *NK-Aktivität und Zellzahl in jeder Fraktion von Percoll-Gradient II*

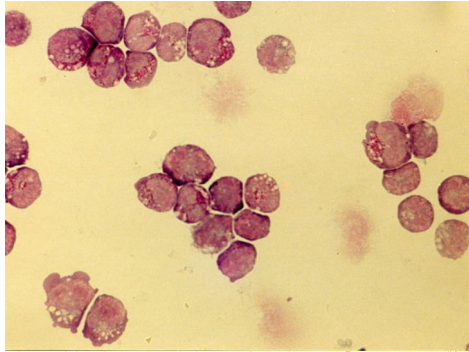
	Fr.1.	Fr.2	Fr.3	Fr.4 + Fr.5
NK-Aktivität (LU /10 <sup>7</sup> )*	15±4	33±4 <sup>a, b</sup>	20±3	0
Zellzahl/gesamte	3±1 %	60±7 %	27±2 %	7±3 %

\* Die lytischen Einheiten in den Zellpopulationen (LU/10<sup>7</sup>) wurden wie unter 2.12.2. beschrieben berechnet.

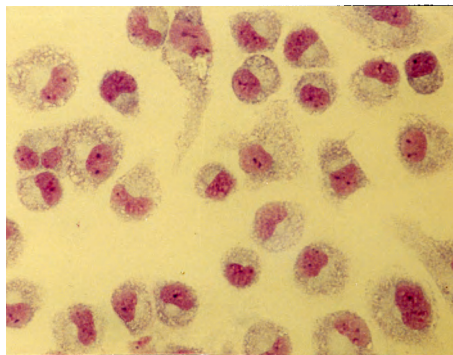
<sup>a</sup> p < 0,05 Fr. 2 vs. Fr. 1

<sup>b</sup> p < 0,05 Fr. 2 vs. Fr. 3

Da die Fraktion 2 sowohl die beste NK-Aktivität als auch den höchsten Reinheitsgrad (Tab.3) hatte, wurde sie zu weiteren Untersuchungen eingesetzt. Zum Erhöhen des Reinheitsgrads dieser Fraktion, nämlich zum Entfernen der PMN, leicht adhärenen Makrophagen und kleinen Lymphozyten, wurde die Zellpopulation zuerst in einer Plastik Kulturschale für 30 min bei 37°C mit Eisenpartikeln inkubiert (2.10.5), um die adhärenen und phagozytischen Zellen (PMN und Makrophagen) von der Population zu trennen. Danach wurde, wie unter 2.10.6 beschrieben, ein Antikörper-"cocktail" von Ratte anti-Maus B220 und Ratte anti-Maus CD3 mit den Zellen für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen, die B220 oder CD3 Antikörper gebunden hatten (typische B- und T-Lymphozyten), mit Dynal Beads, gekoppelt mit Schaf anti-Ratte IgG, von der Population beseitigt. Die so behandelten Zellen ließen sich bei mikroskopischer Untersuchung als homogene Makrophagen Vorläufer erkennen (Abb.5). Es wurde nach der Reinigung kein Verlust an NK-Aktivität beobachtet. Die gereinigten MV-Zellen differenzierten nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C mit 0,2 µg/ml PMA, welches schnell eine Enddifferenzierung von Makrophagenlinien bewirken kann [Nguyen et al. 1993], zu reifen Makrophagen aus (Abb.6)



**Abb.5.** Morphologie der gereinigten Makrophagen-Vorläufer (MV-Zellen). Die Zellen wurden aus einer 3-tägigen KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 isoliert und gereinigt wie unter 2.10.4-6 beschrieben.



**Abb.6.** Die aus den gereinigten MV-Zellen ausgereiften Makrophagen. Die MV-Zellen, isoliert und gereinigt aus der 3-tägigen KM-Vorkultur mit CSF+IL-2, wurden in einer 8-well Chamberslide (siehe 2.11.2) mit PMA (0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2. Eigenschaften der durch IL-2 induzierten, NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

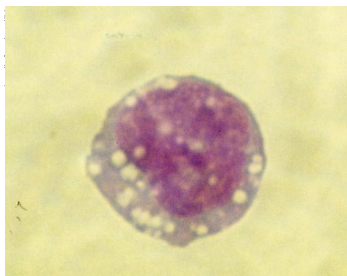
NK-aktive MV-Zellen, isoliert aus 3-tägiger KM-Vorkultur mit CSF+IL-2, wurden weiter charakterisiert. In folgenden werden die Kulturen, die mit den aus 3-tägiger KM-Vorkultur isolierten MV-Zellen als Ausgangspopulation begannen, "Hauptkultur" genannt.

#### 3.2.1. Morphologie und Phänotyp der NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

Beim Betrachten der Zellen im Lichtmikroskop mit hoher Vergrößerung (> 600x) stellte sich heraus, daß NK-aktive MV-Zellen zytoplasmatische Granula enthalten (Abb.7), die nicht bei NK-inaktiven Makrophagen Vorläufern, isoliert aus KM-Vorkultur nur mit CSF, zu finden sind (Abb. 8).

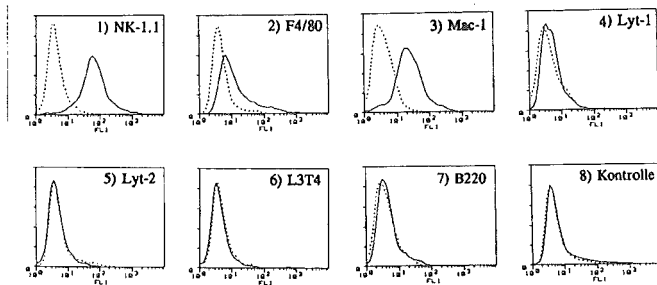


**Abb.7.** Die aus der KM-Vorkultur mit CSF +IL-2 gewonnene, zytoplasmatische Granula-haltige, NK-aktive MV-Zelle.



**Abb.8.** Die aus der KM-Vorkultur allein mit CSF gewonnene, agranuläre, NK-inaktive MV-Zelle.

Um den Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der gereinigten NK-aktiven MV-Zellpopulation zu untersuchen und gleichzeitig ihren Reinheitsgrad zu überprüfen, wurden die Zellen in direktem oder indirektem Fluoreszenzfärbungsverfahren (2.11.4) mit verschiedenen spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die ausgewählten Antikörper waren folgende: 1) NK-1.1, gegen Maus NK-Zellen; 2) F4/80, gegen Maus Makrophagen; 3) anti-Maus Mac-1, gegen myeloide Zellen; 4) FITC-anti-Maus Lyt-1, gegen alle T-Zellen; 5) FITC-anti-Maus Lyt-2, gegen zytotoxische T-Zellen; 6) FITC-anti-Maus L3T4, gegen T-Helferzellen; 7) anti-Maus B220, gegen B-Zellen, und 8) Maus IgG2b anti-human Monozyten Leu-M3, als Isotyp Kontrolle. Die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung wurden mit Hilfe des FACS analysiert und ausgewertet. In Abbildung 9 ist dargestellt, daß die gereinigte NK-aktive MV-Zellpopulation völlig negativ für Lyt.1, Lyt.2, L3T4, und B220 war. Die Zellen hatten NK-1.1 und Mac-1 Marker an der Oberfläche, zeigten aber nur eine schwache Expressierung von F4/80. F4/80 ist ein Makrophagedifferenzierungsmarker und nur auf reifen Makrophagen eindeutig zu finden [Crocker & Gordon 1985; Hoefsmit et al., 1986].

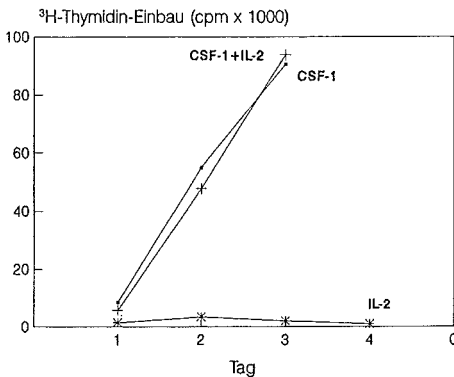


**Abb.9.** Oberflächenantigen-Profile der NK-aktiven MV-Zellpopulation. Die gereinigten NK-aktiven MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 wurden mittels der Immunofluoreszenzfärbung untersucht. Ein Maus IgG2b diente als Isotyp Kontrolle. Alle Zellen in der Population wurden analysiert.

### 3.2.2. Faktor-Abhängigkeit der Zellproliferation

Da die NK-aktiven MV-Zellen Ähnlichkeiten (LGL Morphologie und NK-1.1<sup>+</sup>) mit den NK-Zellen aufwiesen, wurde ein Proliferationstest durchgeführt, um zu bestimmen, welcher Zellstamm-spezifische Wachstumsfaktor (CSF-1 oder IL-2) für die weitere Proliferation der Zellen gebraucht wird. In diesem Test wurden MV-Zellen aus 3-tägiger KM-Vorkultur (mit CSF+IL-2) in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät, dann entweder mit 1000 U/ml IL-2 oder mit 1000 U/ml CSF-1 oder mit IL-2 + CSF-1 (je 1000 U/ml) inkubiert. 1000 U/ml IL-2 wurde deswegen in diesem Experiment verwendet, weil beschrieben wurde, daß NK-Zellen zur Proliferation hohe Konzentrationen von IL-2 benötigen [Talmadge et al. 1986]. Am Tag 1, 2, 3, 4 der Kultur wurde der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbausassay durchgeführt. Abbildung 10 zeigt, daß die NK-aktiven MV-Zellen für ihre Proliferation immer noch auf CSF-1 angewiesen sind. IL-2 hatte im getesteten Zeitraum (von Tag1 bis 4) weder stimulierende noch hemmende Wirkung auf die Zellproliferation.

#### *Faktor-Abhängigkeit der Proliferation von NK-ähnlichen MV-Zellen*



**Abb.10.**  $5 \times 10^3$  Zellen in  $200 \mu\text{l}$  Vollmedium pro Loch wurde in 96-well Mikrotiterplatten eingesät und inkubiert mit: 1) IL-2 (1000 U/ml); 2) CSF-1 (1000 U/ml); und 3) IL-2+CSF-1 (je 1000 U/ml). Der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau wurde an verschiedenen Tagen getestet.

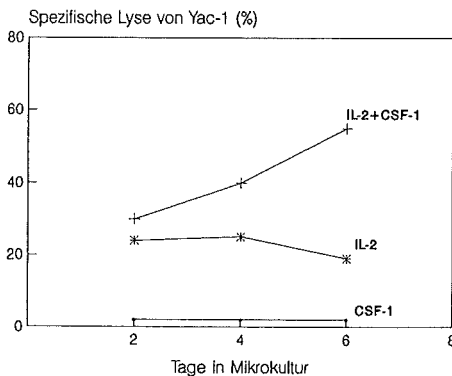


### 3.2.3. Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Um zu studieren, unter welcher Kulturbedingung die NK-aktiven MV-Zellen ihre Zytotoxizität beibehalten und wie sie sich möglicherweise verändern, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

In der ersten Untersuchung wurden die NK-aktiven MV-Zellen in Mikrotiterplatten ( $1 \times 10^5$  Zellen/Loch) eingesät und in Gegenwart von entweder 100 U/ml IL-2 oder 100 U/ml CSF-1, oder IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml) kultiviert. Diese Mikrokulturen wurden alle zwei Tage mit frischem Vollmedium und den entsprechenden Faktoren gefüttert. Die Zytotoxizität der Zellen gegen Yac-1 wurde am Tag 2, 4, und 6 der Kultur getestet. Abbildung 11 demonstriert, daß die NK-aktiven MV-Zellen in der Kultur mit CSF-1 allein ihre Zytotoxizität schnell verloren. In der Kultur mit IL-2 allein ist NK-Aktivität gut geblieben. Die Kombination von CSF-1+IL-2 rief eine erhöhte Zytotoxizität hervor. Da CSF-1 keine stimulierende Wirkung auf die NK-Aktivität hatte, ist die Steigerung der Zytotoxizität in der Kultur mit CSF-1+IL-2 vermutlich durch die Zunahme der Effektorzellzahl verursacht.

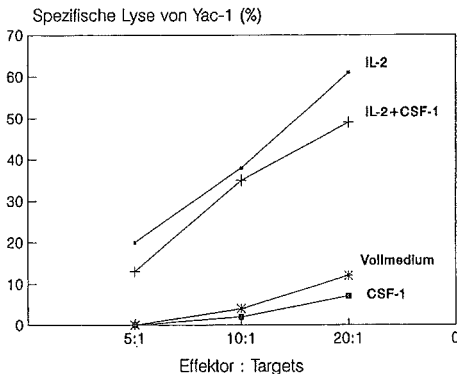
#### *Kinetik der NK-Aktivität in Gegenwart von CSF-1+IL-2*



**Abb.11.** In 96-well Mikrotiterplatten wurden NK-aktive MV-Zellen jeweils mit 100 U/ml IL-2, 100 U/ml CSF-1, und IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml) kultiviert. Die NK-Aktivität gegen Yac-1 wurde an verschiedenen Tagen untersucht.

Eine hohe NK-Aktivität konnte nach 5-tägiger Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 100 U/ml) erreicht werden. Zu dieser Zeit sind die lytische Einheiten in der Zellpopulation mehrfach erhöht im Vergleich zu der NK-aktiven MV-Ausgangspopulation, die frisch aus der KM-Vorkultur isoliert wurde. Für die zweite Untersuchung auf die Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität wurden diese stark lytischen Effektorzellen in Mikroturen überführt und mit oder ohne IL-2 in CSF-1 oder Vollmedium über Nacht inkubiert. Danach wurde die Zytotoxizität gegen Yac-1 getestet. Wie in Abbildung 12 gezeigt, wurde die Zytotoxizität nur in den Kulturen, zu denen IL-2 gegeben worden war, wiedergefunden. Die hoch NK-aktiven Zellen verlieren bei einer Inkubation über Nacht ohne IL-2 ihre Zytotoxizität. Es ist ausgeschlossen, daß die Effektorzellen bei dem Entzug von IL-2 abgestorben waren, denn bei lichtmikroskopischer Untersuchung wurde kein Zelltot beobachtet. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß die Zellen nur in Gegenwart von IL-2 ihre NK-Aktivität aufrechterhalten können.

#### *Verlust der Zytotoxizität nach Entzug von IL-2*

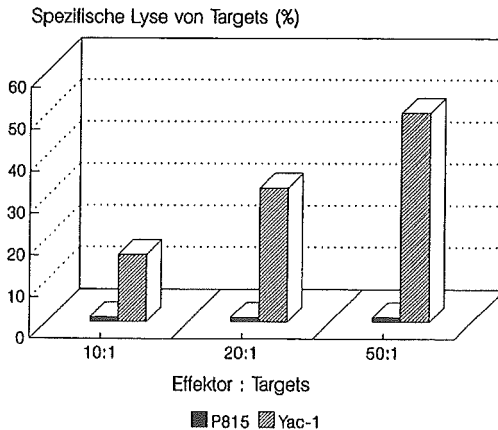


**Abb.12.** Hoch NK-aktive Zellen aus 5-tägiger Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 wurden in 96-well Mikrotiterplatten überführt und über Nacht inkubiert mit: 1) CSF-1 (100 U/ml); 2) Vollmedium; 3) IL-2 (100 U/ml); und 4) IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml). Der Zytotoxizitätstest gegen Yac-1 wurde am nächsten Tag durchgeführt.

### 3.2.4. Zielzell-Selektivität der Effektorzellen

Um zu untersuchen, ob die NK-ähnlichen MV-Zellen nur selektiv auf NK-empfindlichen Zielzellen (vertreten von Yac-1) ihre lytische Aktivität ausüben, wurden sie als Effektoren in einem Zytotoxizitätstest gegen P815 Mastocytoma (NK-resistente Tumorlinie) eingesetzt. Die Inkubationszeit der Effektorzellen mit den Tumorzellen wurde von 4 Stdn. auf 16 Stdn. verlängert, da dies die optimale Lysezeit für P815 Zellen ist. Yac-1 Zellen dienten dabei als positive Kontrolle. Wie in der Abbildung 13 gezeigt, waren die Effektorzellen, zwar hoch lytisch gegen Yac-1 Zielzellen, aber nicht in der Lage, P815 Tumorzellen abzutöten.

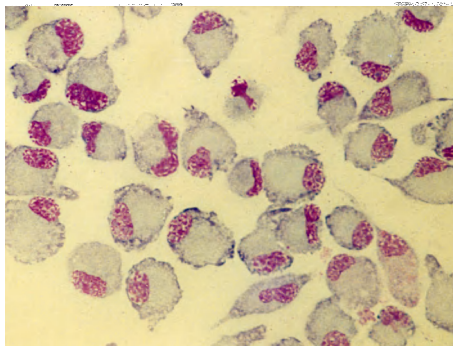
*Target-Selektivität von NK-aktiven MV-Zellen*



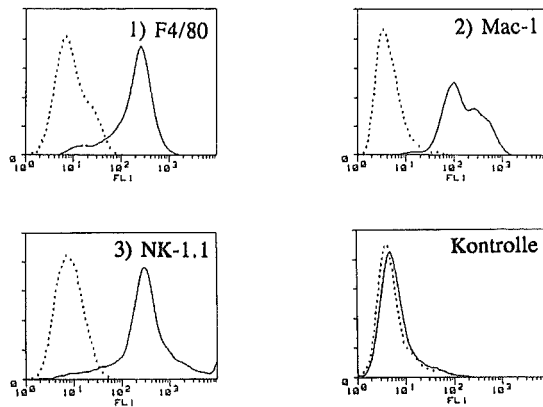
**Abb.13.** Die Effektorzellen wurden für den Test in 96-well Mikrotiterplatten jeweils mit  $^{51}\text{Cr}$ -markierten P815 und Yac-1 Tumorzellen bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  für 16 h inkubiert.

### 3.2.5. Morphologische Entwicklung der Zellen beim Entzug von IL-2

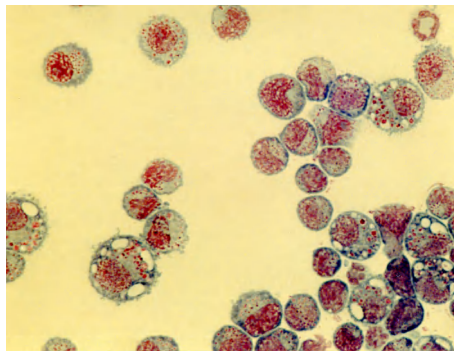
In dem Kapitel über die Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität (3.2.3) wurde gezeigt, daß in den Kulturen mit verschiedenen Lymphokinzusätzen aus derselben MV-Ausgangspopulation funktionell sich unterschiedlich verhaltende Zellen entwickelten (siehe Abb. 11 und 12). Um zu sehen, ob sich die Zellen aus Kulturen mit CSF-1 allein oder mit CSF-1+IL-2 morphologisch unterscheiden, wurden die MV-Zellen aus 3-tägiger CSF+IL-2 KM-Vorkultur in "Chamberslides" (siehe 2.11.2) eingesät und entweder mit CSF-1+IL-2 oder mit CSF-1 allein weiter kultiviert. Die Kulturen wurden zwei Tage später gefüttert und am Tag 4 beendet. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 1000 upm, wurde der Überstand im "Chamber" sorgfältig entfernt und die Slides an der Luft getrocknet. Schließlich wurden sie nach Pappenheim (2.11.6) gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Abbildungen 14 und 16 zeigen, daß die Zellen aus beiden Kulturen ganz unterschiedlich aussahen. In der Kultur nur mit CSF-1, differenzierten sich die NK-ähnlichen MV-Zellen zu Zellen aus, welche typische Morphologie (Abb.14) und Phänotyp (Abb.15) von Makrophagen aufwiesen. Dagegen haben sich die gleiche Vorläuferzellen in der Kultur mit CSF-1+IL-2 zu Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula entwickelt (Abb.16).



**Abb.14.** Die von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1 ausgereiften Makrophagen.



**Abb.15.** Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern gewonnenen reifen Makrophagen.



**Abb.16.** Morphologie der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1+IL-2 entwickelten Zellen.

### 3.3. Induktion von LAK-Aktivität in NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläuferzellen

Die im vorigen Kapitel (3.2.1-5) präsentierten Ergebnisse haben dargelegt, daß die von IL-2 induzierten NK-aktiven MV-Zellen funktionell, morphologisch und phänotypisch den NK-Zellen ähnelten. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie sie sich unter den Bedingungen für die Induktion von LAK-Zellen (siehe 1.3) weiter entwickeln.

#### 3.3.1. Aktivierung zur LAK-Aktivität durch Stimulierung mit hohen Dosen IL-2

NK-ähnliche MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 wurden in 9-cm Kulturschalen (Greiner) in CSF-haltigen Medium (100 U/ml CSF-1) bei hoher IL-2-Konzentration (1000 U/ml) kultiviert. Nach 3-tägiger LAK-Kultur (siehe 2.10.7) wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und zum Test der LAK-Aktivität in 96-well Mikrotiterplatten mit verschiedenen Zellzahlen von  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ , und  $1 \times 10^4$  pro Loch ausgesät. Sowohl NK-sensitive Yac-1 als auch NK-resistente P815 Tumorzellen wurden als  $^{51}\text{Cr}$  markierte Zielzellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  /ml in Vollmedium suspendiert und dann in die Mikrotiterplatten je 100  $\mu\text{l}$  pro Loch hinzupipettiert. Dadurch entstand eine Reihe von E:T Verhältnissen von 10:1, 5:1, 2:1 und 1:1. Die Platten wurden kurz bei 600 Upm zentrifugiert und schließlich, auf Grund der optimalen Lysezeit für P815, bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> für 16 Stunden inkubiert. Zum Vergleich wurde die gleiche NK-ähnliche MV-Ausgangspopulation in Medium mit niedriger IL-2-Konzentration (100 U/ml) parallel kultiviert und mitgetestet. Tabelle 5 demonstriert, daß die mit 1000 U/ml IL-2 für 3 Tage inkubierten Zellen aktiviert wurden, NK-sensitive und NK-resistente Tumorzellen zu lysieren. Bei der Kultur mit 100 U/ml IL-2 dagegen wurden nur die NK-sensitiven Zellen lysiert. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß durch die Stimulierung in hohen IL-2-Dosen die NK-ähnlichen MV-Zellen sich zu Effektorzellen mit LAK-Aktivität entwickelten.

Tab.5. *Wirkung von IL-2-Dosen auf NK-ähnliche MV-Zellen*

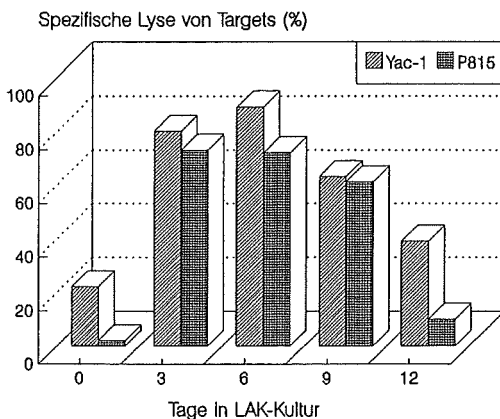
Kulturbedingung	Zytotoxizität (LU/10 <sup>7</sup> Zellen)	
	Yac-1	P815
100 U/ml CSF-1 + 100 U/ml IL-2	325	0
100 U/ml CSF-1 + 1000 U/ml IL-2	824	455

NK-ähnliche MV-Zellen wurden unter den dargestellten Kulturbedingungen für 3 Tage kultiviert und dann durch einen 16-stündigen Zytotoxizitätstest auf die lytische Aktivität gegen Yac-1 und P815 getestet. Die lytischen Einheiten wurden berechnet wie unter 2.12.2 beschrieben.

### 3.3.2. Kinetik der LAK-Induktion

NK-ähnliche MV-Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten ( $2 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l Medium pro Loch) mit 1000 U/ml IL-2 kultiviert. Diese Mikrokulturen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium und IL-2 gefüttert und ihre LAK-Aktivität wurde am Tag 0, 3, 6, 9 und 12 der LAK-Kultur untersucht, um die Kinetik der LAK-Induktion in den Zellen zu verfolgen. Abbildung 16 zeigt, daß die LAK-Aktivität in der Kultur in den ersten 3-6 Tagen zunimmt und danach abfällt, trotz ständiger Ergänzung mit frischem Medium und dem stimulierenden Faktor IL-2. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Grimm et al. beschriebenen Befunden überein, daß die *in vitro* von IL-2 induzierte LAK-Aktivität erst nach 3-tägiger Kultur nachweisbar ist und nur ungefähr eine Woche lang in der Kultur zu finden ist [Grimm et al., 1982].

### Kinetik der LAK-Induktion in IL-2 stimulierten MV-Zellen



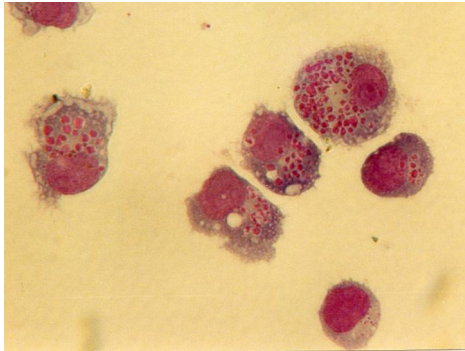
**Abb.17.**  $2 \times 10^5$  NK-ähnliche MV-Zellen pro Loch wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit 1000 U/ml IL-2 (LAK-Kultur) inkubiert. An verschiedenen Tagen wurden  $^{51}\text{Cr}$ -markierte Targetzellen ( $1 \times 10^4$ /Loch) hinzugegeben und die LAK-Aktivität der Kulturen durch einen 16-stündigen Zytotoxizitätstest untersucht.

#### 3.3.3. Morphologie der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern entwickelten LAK-Zellen

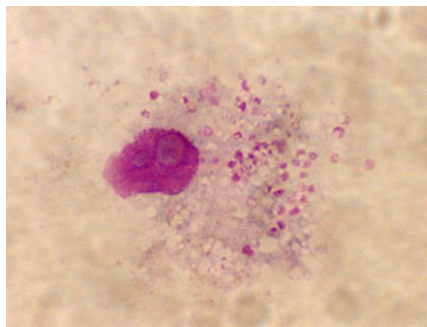
Zu den Zeitpunkten für den LAK-Aktivität-Test (Tag 3, 6, 9 und 12) wurden Zellproben aus der LAK-Kultur abgenommen, mit Hilfe der "Cytospin" Zentrifuge auf Objektträger gebracht, luftgetrocknet und nach Pappenheim gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine auffällige morphologische Veränderung der Zellen: in diesen Zellen war eine starke Vermehrung der zytoplasmatischen Granula zu beobachten (Abb. 18). Je länger die LAK-Kultur dauerte, desto dichter und größer wurden die Granula. Schließlich (ungefähr an Tag 8-10 der Kultur) begannen die LAK-Effektoren, die reichlich Granula enthielten, zu



fragmentieren (Abb. 19). Die Abnahme der LAK-Aktivität, beobachtet nach 9 Tagen LAK-Kultur (siehe Abb. 17), ist auf das massenhafte Zellsterben in der Kultur zurückzuführen.



**Abb. 18.** Morphologie der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.

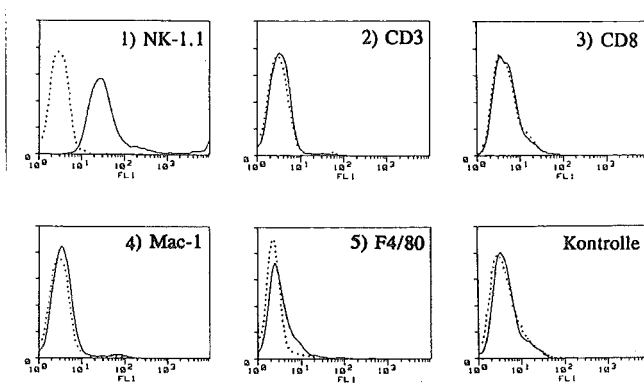


**Abb.19.** Fragmentierung der LAK-Zellen, beobachtet am Tag 9 der LAK-Kultur.

### 3.3.4. Phänotyp der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufer entwickelten LAK-Zellen

Die zu untersuchenden LAK-Zellen wurden am Tag 4 der LAK-Kultur, die mit den gereinigten NK-ähnlichen MV-Zellen angefangen hatte, geerntet. Zu dieser Zeit übten die Zellen hohe LAK-Aktivität aus und sie waren noch in gutem Zustand. Nach dreimaligem Waschen wurden je  $1-5 \times 10^5$  Zellen in kleine Polyäthylenröhrchen (0,6 ml Greiner) überführt, und es wurde eine direkte oder indirekte Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker durchgeführt. NK-1.1, F4/80, Mac-1, anti-CD3 und anti-CD8 wurden jeweils für die Färbung verwendet, um den Phänotyp der LAK-Effektoren zu untersuchen. Dabei konnte auch die Möglichkeit, daß Lymphozyten in der LAK-Kultur herangewachsen waren, geprüft werden.

In Abbildung 20 wird deutlich, daß die LAK-Effektoren, im Vergleich zu der NK-ähnlichen MV-Ausgangspopulation (siehe Abb.9), die Mac-1 und F4/80 Marker völlig verloren hatten. Diese Zellen waren positiv für NK-1.1 aber negativ für die T-Zell Marker CD3 und CD8, also ein typischer Phänotyp der beschriebenen, aus NK-Zellen induzierten LAK-Zellen [Hercend & Schmidt, 1988].



**Abb.20.** Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.

### 3.4. Perforin Produktion von Makrophagen-Vorläuferzellen

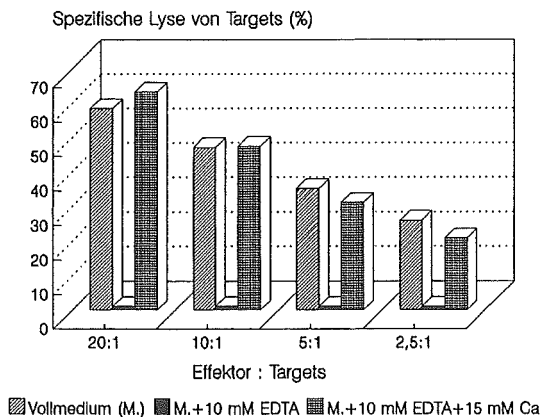
In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß das Auftreten von zytoplasmatischen Granula eng mit der zytotoxischen Funktion der Zellen zusammenhing. Nun sollte geprüft werden, ob diese Granula das lytische Protein Perforin enthalten. Zu diesem Zweck wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

#### 3.4.1. Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Ein Hauptmerkmal der Perforin-vermittelten Zytotoxizität ist ihre Kalzium-Abhängigkeit: in Abwesenheit von Kalzium tritt die Zytotoxizität nicht mehr auf. Es ist beschrieben worden, daß Perforin strukturell und funktionell der Komplement Komponente C9 ähnelt [Tschopp & Nabholz 1990]. In Anwesenheit von Kalzium bewirken die Perforine Löcher in der Zellmembran von Zielzellen und die Zielzellen lysieren. Deshalb gilt eine Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität als Hinweis auf die Wirkung von Perforin.

Wie in Material und Methoden (2.12.3) beschrieben wurden drei Testmedien hergestellt: depletiertes Medium ohne freie  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen durch Zugabe von 10 mM EDTA, rekonstituiertes Medium durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (15 mM Endkonzentration) zum depletierten Medium, und Vollmedium. In diesen drei Medien wurde mit Effektorzellen aus 4-tägiger Hauptkultur mit CSF-1 + IL-2 (je 500 U/ml) jeweils der Zytotoxizitätstest mit Yac-1 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Es ist deutlich, daß die Anwesenheit von Kalzium essentiell für die Lyse der Zielzellen ist.

### Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität von NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen



**Abb.21.** Die Effektorzellen wurden aus einer 4-tägigen Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) geerntet, gewaschen, und dann in verschiedenen Testmedien mit Yac-1 als Targets zur Untersuchung der Zytotoxizität für 4 Stunden inkubiert.

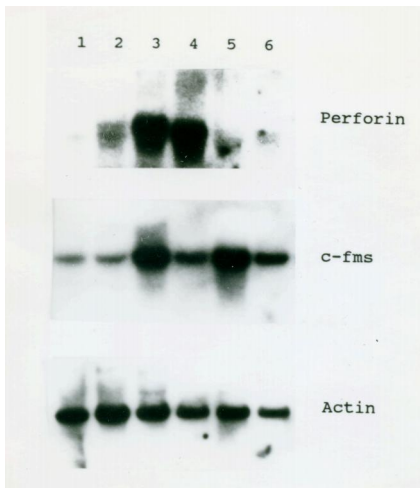
#### 3.4.2. Nachweis der Perforin mRNA durch Northern-Blot

Mittels Northern-Blot Analyse wurde untersucht, ob die aus MV-Zellen isolierten RNA Präparate Messenger-RNA enthielten. Dazu wurde, wie unter 2.14.1 beschrieben, die gesamte RNA aus verschiedenen MV-Zellproben extrahiert, im Gel aufgetrennt, auf eine N<sup>+</sup>-Nylonmembran übertragen und mit <sup>32</sup>P-markierten cDNA Sonden hybridisiert. Drei cDNA Sonden, spezifisch komplementär zu a) mRNA für murines Perforin [Lowrey et al. 1989]; b) mRNA für CSF-1 Rezeptor [Rothwell & Rohrschneiden 1987]; und c) mRNA für Aktin [Cleveland et al. 1980], wurden hintereinander mit der gleichen Membran hybridisiert. Die

untersuchten MV-Zellproben waren folgende:

1. NK-inaktive MV-Zellen isoliert aus KM-Vorkultur mit GM-CSF (2.10.3);
2. NK-ähnliche MV-Zellen isoliert aus KM-Vorkultur mit GM-CSF+IL-2;
3. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 für 3 Tage;
4. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit IL-2 für 3 Tage;
5. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit CSF-1 für 3 Tage;
6. NK-inaktive MV-Zellen in Hauptkultur mit IL-2 für 3 Tage.

In Abbildung 22 wird gezeigt, daß die mRNA für Perforin eindeutig in den NK-ähnlichen MV-Zellen beziehungsweise in diesen Zellen nach weiterer Kultur mit CSF-1 +IL-2 oder IL-2 allein zu finden war. Dieser Befund weist auf eine Beziehung zwischen der Expressierung von Perforin mRNA und der zytotoxischen Funktion der Zellen hin, weil nur die im Zytotoxizitätstest (siehe Tab.6) als lytisch bestätigten Zellen positiv für die Perforin mRNA waren. Alle Zellproben zeigten sich positiv für c-fms, ein wichtiger Hinweis für die Zugehörigkeit der Zellen zur Makrophagenreihe [Baccarini & Stanley 1990]. Die Aktin-Banden dienten als Kontrollen und deuten daraufhin, daß von jeder Zellprobe gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde.



**Abb.22.** Northern-Blot Analyse für die Expressierung der Perforin-Messenger-RNA durch MV-Zellen. Die Nummern 1-6 der RNA Proben entsprechen den oben dargestellten Zellproben 1-6. Der Film wurde für ca.48 Std. exponiert.

Tab. 6. *Zytotoxizität gegen Yac-1 von verschiedenen MV-Zellproben*<sup>a</sup>

Nr. <sup>b</sup>	Zellproben	Zytotoxizität (LU/10 <sup>7</sup> )
MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit:		
1.	GM-CSF 200 U/ml	0
2.	GM-CSF 200 U/ml+IL-2 100 U/ml	35
NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit:		
3.	CSF-1 500 U/ml+IL-2 500 U/ml	375
4.	IL-2 500 U/ml	380
5.	CSF-1 500 U/ml	0
NK-inaktive MV-Zellen in Hauptkultur mit:		
6.	IL-2 500 U/ml	0

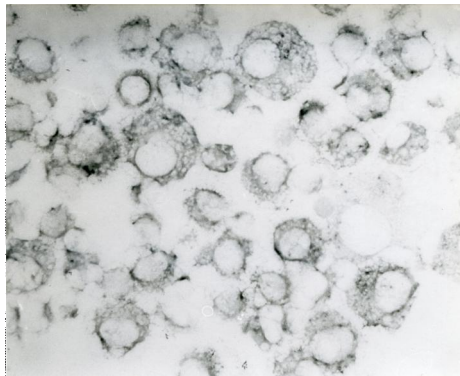
<sup>a</sup> Die zu testenden Zellen wurden in den entsprechenden Kulturen für 3 Tage kultiviert. Am Tag 4, als sie für Northern-Blot Analyse zur Untersuchung der Perforin Messenger-RNA geerntet wurden, wurde jeweils ein Teil jeder Zellprobe für den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Der Zytotoxizitätstest wurde bei 37°C für 4 Stunden durchgeführt. Die lytischen Einheiten (LU/10<sup>7</sup>) wurden berechnet wie unter 2.12.2 beschrieben.

<sup>b</sup> Die Nummern 1-6 der Zellproben entsprechen den in dem Northern-Blot (Abb. 22) dargestellten Lane 1-6.

### 3.4.3. Nachweis der Perforin mRNA durch *in situ* Hybridisierung

Es wurde nun weiter versucht, mit den auf Objektträger fixierten Zellen eine *in situ*

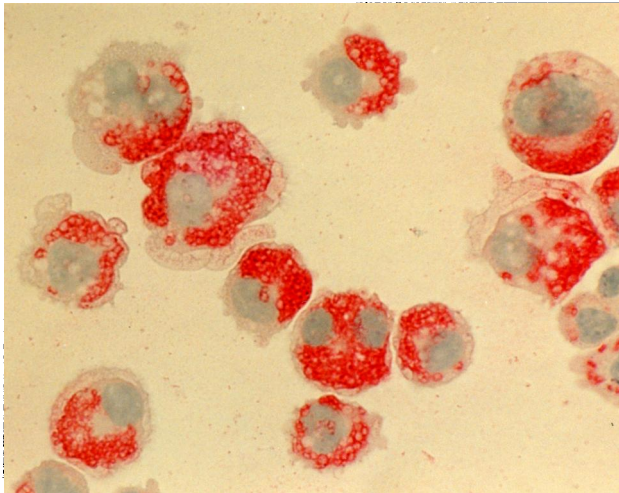
Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin mRNA durchzuführen, um Perforin mRNA in den Zellen direkt nachzuweisen. Wie unter 2.14.2. beschrieben, wurden die zu untersuchenden Zellen, isoliert aus 4-tägiger Hauptkultur in CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml), auf Objektträger gebracht. Nachdem sie luftgetrocknet worden waren, wurden sie fixiert, permeabilisiert, und schließlich mit DIG-markierter cDNA gegen Perforin Messenger für 16-20 Std. hybridisiert. Ein Zytopräparat mit normalen Makrophagen diente als Kontrolle. Nach der Hybridisierung wurden die Zytopräparate in mehreren Schritten (siehe 2.14.2.5) gewaschen und dann mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper inkubiert. Am Ende wurde die Hybridisierung durch Zugabe von NBT+X-Phosphat, deren Farbe sich bei Katalyse durch alkalische Phosphatase von gelb in blau umwandelt, sichtbar gemacht. Die dunkelblau angefärbten Zellen waren positiv für Perforin mRNA. Abbildung 23 ist die lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen nach der Hybridisierung mit DIG-markierter anti-Perforin cDNA.



**Abb.23.** Ergebnis von *in situ* Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin. Die NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen wurden aus einer 4-tägigen Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) isoliert und dann mit DIG-markierter Perforin cDNA *in situ* hybridisiert (siehe 2.14.2).

### 3.4.4. Nachweis des Perforin Proteins durch immunhistochemische Färbung

Monoklonaler Antikörper spezifisch gegen Maus-Perforin wurde für die immunhistochemische Färbung angewendet, um festzustellen, ob Perforin Proteine in den Zellen vorhanden sind und wo sie lokalisiert sind. Hierzu wurden die Zytopräparate von hoch lytischen Effektorzellen aus 4-tägiger Hauptkultur in CSF-1 + IL-2 (je 500 U/ml), wie unter 2.11.5 beschrieben, vorbereitet, fixiert, mit mAk Ratte gegen murines Perforin und anschließend mit polyklonalem Antikörper gegen Ratten IgG aus den Ziege, gekoppelt an alkalische Phosphatase, inkubiert. Fast-Red-TR, ein Substrat für alkalischer Phosphatase [Dejong et al. 1985], wurde für die Farbreaktion benutzt. In Abbildung 24 ist zu sehen, daß fast alle zytoplasmatischen Granula angefärbt sind. Im Gegensatz dazu waren die Zellen, die agranulär und NK-inaktiv waren, völlig negativ für diese Färbung.



**Abb.24.** Immunhistochemische Färbung mit mAk gegen murines Perforin. Die NK-ähnlichen MV-Zellen isoliert aus der KM-Vorkultur wurden in Hauptkultur mit CSF-1 + IL-2 (je 500 U/ml) für 4 Tage inkubiert und danach mit anti murines Perforin Antikörper immunhistochemisch (2.11.5) auf Perforin Protein untersucht.



### 3.5. Zytokin-Freisetzung von NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

Außer der Zytotoxizität üben NK-Zellen eine andere wichtige Funktion aus: Sie setzen Zytokine frei. Dies geschieht bei Stimulierung der NK-Zellen durch ihre Zielzellen, durch Faktoren, oder durch eine Kombination von beiden. Die am häufigsten studierten Bedingungen für eine spezifische Aktivierung der NK-Zellen sind folgende: 1) Inkubation mit Zielzellen; 2) Inkubation mit Zielzellen+IFN- $\gamma$ ; und 3) Inkubation mit IL-2+Liganden für den CD16FcR [Herman et al., 1986; Peters et al., 1986; Cuturi et al., 1989]. Außerdem benutzt man unspezifische Stimulatoren, um NK-Zellen zu stimulieren, wie den Protein Kinase C Aktivator Phorbol ester PMA und Ca<sup>2+</sup>-Ionophor [Paya et al., 1988; Anegón et al., 1988; Cuturi et al., 1989]. In den folgenden Experimenten wurden die NK-aktiven MV-Zellen unter ähnlichen Stimulationsbedingungen behandelt. Es wurden Yac-1, Yac-1+IFN- $\gamma$ , Yac-1+IL-2, PMA (Phorbol ester), sowie Ionomycin (Ca<sup>2+</sup>-Ionophor) als Stimulatoren mit NK-ähnlichen MV-Zellen inkubiert. Vollmedium, P815, IFN- $\gamma$  oder IL-2 allein dienten dabei als Kontrolle. Nach der Inkubation wurden die Überstände von den Kulturen abgenommen und anschließend auf Zytokine untersucht. Zum Vergleich wurden die NK-inaktiven MV-Zellen unter gleichen Bedingungen behandelt und auch getestet.

#### 3.5.1. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Zielzellen und Zytokinen

##### 3.5.1.1. TNF- $\alpha$

NK-Zellen können beim Kontakt mit den Zielzellen oder Zielzellen+IFN- $\gamma$  TNF freisetzen [Peters et al. 1986]. Vermutlich ist TNF durch Auslösung der Apoptose-Wirkung bzw. DNA-Fragmentierung an dem Abtöten der Zielzellen durch NK-Zellen beteiligt [Young et al. 1990]. In diesem Experiment wurde ermittelt, ob auch NK-ähnliche MV-Zellen durch

Zugabe von NK-Zielzellen aktiviert werden konnten, TNF zu sezernieren. Hierzu wurden die Effektorzellen (MV-Zellen) in 96-well Mikrotiterplatten mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Loch ausplattiert und jeweils mit Yac-1 (als Zielzellen) beziehungsweise P815 (als Kontrolle) allein oder in Kombination mit IFN- $\gamma$  inkubiert. Das Verhältnis von MV-Zellen zu Tumorzellen war 4:1. Nach ca. 20 Stunden wurden die Überstände von den Kulturen abgenommen und zur Bestimmung der TNF-Aktivität auf die TNF-sensitiven L929-Zellen seriell titriert (siehe 2.13.7). In Tabelle 7 ist zu sehen, daß NK-ähnliche MV-Zellen nach Inkubation mit Yac-1 aktiv TNF produzierten. Zugabe von IFN- $\gamma$  führte zu einer deutlichen Erhöhung der TNF-Produktion. NK-resistente P815-Zellen zeigten nur eine ganz geringe Wirkung auf die TNF-Freisetzung durch MV-Zellen. Mit IFN- $\gamma$  konnte die Wirkung etwas verbessert werden. In dem Experiment, in dem die NK-inaktiven MV-Zellen eingesetzt wurden, führten weder Yac-1 oder P815 allein noch die Kombination von Tumorzellen mit IFN- $\gamma$  zu nennenswerter TNF Produktion.

Tab.7. *Freisetzung von TNF aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive MV
	TNF (U/ml)		TNF (U/ml)
	ohne anti-TNF $\alpha$	mit anti-TNF $\alpha$	
Vollmedium	0		0
IFN $\gamma$	0		0
Yac-1	32 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	0	1
Yac-1+IFN $\gamma$	58 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	0	2
P815	4 $\pm$ 1	0	1
P815+IFN $\gamma$	8 $\pm$ 1	0	2

MV-Zellen/Tumorzellen = 4:1 IFN $\gamma$ : 500 U/ml.

<sup>a</sup>  $p < 0,001$  Yac-1 vs. P815

<sup>b</sup>  $p < 0,001$  Yac-1+IFN- $\gamma$  vs. P815+IFN- $\gamma$

Um den Typ des von NK-ähnlichen MV-Zellen freigesetzten TNFs zu definieren, wurde ein Hemmungstest mit spezifischem monoklonalem anti-murinen TNF- $\alpha$  Antikörper (siehe 2.13.7.) gemacht, indem L929-Zellen in Gegenwart von anti-TNF- $\alpha$  mit TNF-haltigen Überständen inkubiert wurden. In Tabelle 7 ist gezeigt, daß die TNF-Aktivität von anti-TNF- $\alpha$  vollständig inhibiert wurde. Dies weist daraufhin, daß NK-ähnlichen MV-Zellen TNF- $\alpha$  freisetzen.

### 3.5.1.2. IL-1

Da beschrieben wurde, daß NK-sensitive (jedoch nicht NK-resistente) Tumorzellen NK-Zellen zur Produktion von IL-1 stimulieren konnten [Herman & Rabson 1986], wurden NK-ähnliche sowie NK-inaktive MV-Zellen jeweils mit Yac-1 und P815 (beide Tumorzellen produzieren selbst kein IL-1) für 20 Stunden inkubiert und danach die Überstände auf IL-1-Aktivität untersucht. Der Nachweis der IL-1-Aktivität erfolgte durch einen kolorimetrischen Bioassay mit Hilfe der IL-1-abhängigen Zelllinie D10 (siehe 2.13.1). In Tabelle 8 ist gezeigt, daß die höchste IL-1-Produktion von den NK-aktiven MV-Zellen bei der Inkubation mit den

Tab.8. *Freisetzung von IL-1 aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive MV	
	O.D. <sub>570nm</sub>	IL-1(U/ml)	O.D. <sub>570nm</sub>	IL-1(U/ml)
Vollmedium	0,244 ± 0,008 <sup>b</sup>	2	0,090 ± 0,002	0
Yac-1	0,882 ± 0,026 <sup>a</sup>	8	0,282 ± 0,040 <sup>c</sup>	2
P815	0,242 ± 0,022	2	0,066 ± 0,015	0

MV-Zellen/Tumorzellen = 4:1      <sup>a</sup> p < 0,001 Yac-1 vs. P815

<sup>b</sup> p < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive      <sup>c</sup> p < 0,001 Yac-1 vs. Vollmedium

Yac-1 beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den NK-inaktiven MV-Zellen waren die NK-aktiven spontan in der Lage, geringe Menge von IL-1 zu sezernieren. P815 Tumorzellen wiesen dagegen keine IL-1-induzierende Wirkung auf. Bei der Inkubation von NK-inaktiven MV-Zellen mit Yac-1 wurde eine geringe IL-1 Produktion gefunden.

### 3.5.1.3. IL-6

Zu den inflammatorischen Faktoren, die von NK-Zellen freigesetzt werden können, gehört auch IL-6. Es wurde beschrieben, daß die Aktivierung von NK-Zellen durch IL-2 zu starker IL-6 Gen-Exprimierung führt [Vitolo et al., 1993]. Im folgenden wurden die MV-Zellen jeweils mit IL-2, Yac-1, oder einer Kombination von beiden für 20 Stdn. aktiviert, und die Überstände mittels der IL-6-abhängigen Zelllinie 7TD1 auf ihren IL-6-Gehalt untersucht (2.13.2). P815 Tumorzellen wurden bei diesem Test nicht verwendet, weil sie selbst IL-6-Produzenten sind. In Tabelle 9 ist gezeigt, daß sowohl NK-aktive als auch NK-inaktive MV-

Tab.9. *Freisetzung von IL-6 aus MV-Zellen bei Aktivierung mit IL-2 und Yac-1*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV	NK-inaktive MV
	IL-6 (U/ml)	IL-6 (U/ml)
Vollmedium	20±0,4	0
IL-2	26±0,5	0
Yac-1	4000±80 <sup>a</sup>	268±25
Yac-1+IL-2	7200±24 <sup>b</sup>	557±35

MV-Zellen:Yac-1 = 4:1

IL-2: 500 U/ml

<sup>a, b</sup> P < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive

Zellen bei der Stimulierung durch Yac-1 allein oder Yac-1+IL-2 aktiviert wurden, IL-6 freizusetzen. Die NK-aktiven MV-Zellen sezernierten jedoch ca. 10-fach höhere Mengen von IL-6 als die NK-inaktiven. Geringe spontane IL-6-Freisetzung wurde bei den NK-aktiven MV-Zellen beobachtet, aber nicht bei den NK-inaktiven Zellen. Die Aktivierung mit IL-2 allein zeigte in diesem Experiment keinen signifikanten Einfluß auf die IL-6-Freisetzung von den Zellen.

#### 3.5.1.4. IL-10

Es ist noch unklar, ob NK-Zellen IL-10 (auch "Cytokine-Synthese-Inhibitory-Factor, CSIF" genannt) produzieren können. Bekannt ist, daß dieser relativ neu entdeckte Faktor nicht nur von Th2 (T-Helfer 2)-Zellen, B-Zellen, sondern auch von Monozyten/Makrophagen [Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991b] freigesetzt werden kann. In den folgenden Versuchen wurden die NK-aktiven sowie die NK-inaktiven MV-Zellen mit einer Reihe von Stimulatoren, wie in Tabelle 10 angegeben, inkubiert und danach mit einem ELISA IL-10 in den Überständen bestimmt (2.12.5 und 2.13.3). Es wurde festgestellt, daß MV-Zellen nach Inkubation mit Yac-1 IL-10 sezernierten (siehe Tab.10). Yac-1+IFN- $\gamma$  regte sowohl NK-aktive als auch NK-inaktive MV-Zellen an, IL-10 zu produzieren, die NK-aktiven Zellen waren jedoch schon nach dem Kontakt mit Yac-1 ohne IFN- $\gamma$  in der Lage, große Menge von IL-10 zu sezernieren. Dies vermochten die NK-inaktiven Zellen nicht. Die Zugabe von IL-2 führte zu keiner signifikanten Erhöhung der IL-10-Sekretion aus MV-Zellen. Eine Freisetzung des IL-10 aus Yac-1 Zellen ist ausgeschlossen, weil alle Überstände aus Yac-1 Zellen allein oder mit Faktoren (IL-2, IFN $\gamma$ ) negativ für die IL-10 waren. Die P815 Tumorzellen stimulierten keine Sekretion von IL-10 in MV-Zellen.

Tab.10. *Freisetzung von IL-10 aus MV-Zellen*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV	NK-inaktive MV
	IL-10 (U/ml)	IL-10 (U/ml)
Vollmedium	0	0
IFN- $\gamma$	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	22,0 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,4
Yac-1+IFN- $\gamma$	37,3 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	19,4 $\pm$ 1
Yac-1+IL-2	25,9 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	2,6 $\pm$ 0,5
P815	0	0
P815+IFN- $\gamma$	0	0
P815+IL-2	0	0

MV-Zellen/Tumorzellen = 4:1. IFN- $\gamma$ : 500 U/ml. IL-2: 500 U/ml.

<sup>a,b,c</sup> P < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive

### 3.5.1.5. IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$ -Produktion ist eine der wichtigsten funktionellen Eigenschaften der NK-Zellen, denn IFN- $\gamma$  zeigt eine starke antivirale Aktivität und wirkt antimitotisch auf transformierte Zellen. IFN- $\gamma$ -Synthese durch NK-Zellen findet hauptsächlich nach der Aktivierung durch Antigen plus IL-2 statt [Cuturi et al., 1989]. In den folgenden Experimenten wurden NK-aktive und NK-inaktive MV-Zellen mit Tumorzellen allein oder mit Tumorzellen+IL-2 inkubiert.

Danach wurde der IFN- $\gamma$ -Gehalt in den Überständen mittels ELISA bestimmt (siehe 2.12.5 und 2.13.6). Es wurde beobachtet, daß die NK-aktiven MV-Zellen sich von den NK-inaktiven funktionell deutlich unterschieden. Im Gegensatz zu den NK-inaktiven MV-Zellen, die unter getesteten Bedingungen niemals IFN- $\gamma$  freisetzten, sezernierten die NK-aktiven MV-Zellen nach Aktivierung durch einer Kombination von Tumorzellen mit IL-2 IFN- $\gamma$  (Tab. 11). Hierbei zeigten Yac-1 Zellen und P815 Zellen eine ähnlich starke Wirkung auf die NK-aktiven Zellen. Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen kann somit von anderen Zellen als NK-Zielzellen angeregt werden.

Tab.11. *Freisetzung von IFN- $\gamma$  aus MV-Zellen*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV	NK-inaktive MV
	IFN- $\gamma$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
Vollmedium	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	0	0
Yac-1+IL-2	6,3 $\pm$ 0,1	0
P815	0	0
P815+IL-2	6,4 $\pm$ 0,2	0

MV-Zellen : Tumorzellen = 4:1      IL-2: 500 U/ml

### 3.5.2. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Phobolster/Ca<sup>2+</sup>-Ionophor

In folgenden Tests wurden die MV-Zellen in 24-well Mikrotiterplatten (1x10<sup>6</sup> Zellen in 2 ml Medium/Loch) jeweils mit PMA (0,2 µg/ml) und Ionomycin (1,2 µg/ml) für 20 Stdn. aktiviert. Die nach der Aktivierung von den Zellen freigesetzten Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6, IL-10 und IFN-γ wurden entweder mit dem kolorimetrischen Bioassay oder durch ELISA bestimmt. Wie in Tabelle 12 dargestellt, rief die Aktivierung der MV-Zellen durch den Protein Kinase C Aktivator PMA keine Freisetzung von IL-10 oder IFN-γ hervor, ebensowenig die Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin. Der TNF-Test wurde nur mit den von Ionomycin aktivierten Proben gemacht (weil PMA eine toxische Wirkung auf die L929-Zellen hat). Es wurde jedoch keine TNF-Aktivität in den getesteten Überständen beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten die Freisetzungen von IL-1 und IL-6 aus MV-Zellen durch PMA oder Ionomycin aktiviert werden. NK-aktive und NK-inaktive Zellen verhielten sich bei dieser Untersuchung ähnlich, allerdings produzierten die NK-aktiven MV-Zellen mehr IL-6 als die NK-inaktiven, besonders nach Aktivierung mit Ionomycin.

Tab.12. *Zytokin-Freisetzung aus MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA und Ionomycin*

Zytokin	NK-aktive MV		NK-inaktive MV	
	PMA	Ionomycin	PMA	Ionomycin
TNF U/ml		0		0
IL-1 U/ml	6	13	2	6
IL-6 U/ml	620	2500	267	257
IL-10 U/ml	0	0	0	0
IFN-γ ng/ml	0	0	0	0

Dauer der Aktivierung: 20 h                      PMA: 0,2 µg/ml.                      Ionomycin: 1,2 µg/ml



### 3.5.3. Produktion von hämatopoietischen Wachstumsfaktoren

Berichte über Produktion von hämatopoietischen Wachstumsfaktoren durch NK-Zellen haben gezeigt, daß nach Aktivierung, hauptsächlich durch IL-2, oder IL-2+NK-Liganden, oder Phorbol ester/ $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor, m-RNA von GM-CSF, IL-3, sowie M-CSF in NK-Zellen exprimiert wurde [Cuturi et al., 1989; Murphy et al., 1992]. Dabei wurde erwähnt, daß der Nachweis solcher Wachstumsfaktoren durch Bioassays schwierig sei, weil die zu testenden Überstände auch Proliferation-hemmende Faktoren wie TNF,  $\text{IFN-}\gamma$  enthalten konnten. In den folgenden Experimenten wurden die Untersuchungen auf CSFs nur mit denjenigen Überständen gemacht, die frei von TNF,  $\text{IFN-}\gamma$ , und IL-10 waren. Nur die Überstände, die nach der Inkubation der MV-Zellen mit PMA, Ionomycin, oder IL-2 erhalten wurden, entsprachen dieser Anforderung (siehe Tab. 10, 11, 12). Da die aus NK-ähnlichen MV-Zellen entwickelten LAK-Effektorzellen (siehe unter 3.3.) sich den von anderen Forschern beschriebenen in IL-2-kultivierten NK-Zellen ähnelten, wurden sie auch in entsprechenden Versuchen mitgetestet.

#### 3.5.3.1. GM-CSF/IL-3

Der kolorimetrische Bioassay mit der GM-CSF/IL-3 abhängigen Zelllinie FDCP1 (2.9.2) wurde wie unter 2.13.5. beschrieben durchgeführt. Die zu testenden Überstände, gesammelt von den Kulturen mit NK-aktiven oder NK-inaktiven MV-Zellen oder LAK-Effektorzellen, wurden in Mikrotiterplatten mit FDCP1 Zellen inkubiert. Vollmedium diente als Kontrolle. Um die IL-3-Aktivität von der GM-CSF-Aktivität zu unterscheiden, wurde spezifischer anti-IL-3 Antikörper in die entsprechenden Test-Löcher hinzupipettiert und der Hemmungsgrad getestet. Wie in Tabelle 13 dargestellt, wurde GM-CSF/IL-3 Aktivität nur in den Überständen aus NK- und LAK-aktiven Zellen gefunden. Ionomycin stimulierte nur die IL-3-Produktion von NK- und LAK-aktiven Zellen, denn das Zellwachstum von FDCP-1 wurde vollständig durch anti IL-3 Ak gehemmt. IL-2-Aktivierung dagegen stimulierte offenbar nur

die LAK-Zellen, GM-CSF zu sezernieren.

Tab.13. *Freisetzung von GM-CSF oder IL-3 aus den stimulierten MV-Zellen*

Zellen und Stimulatoren	O.D.570 nm		GM-CSF (U/ml)	IL-3 (U/ml)
	ohne $\alpha$ -IL-3	mit $\alpha$ -IL-3		
<b>1) NK-inaktive MV</b>				
Vollmedium	0,010 $\pm$ 0,003		0	0
PMA	0,066 $\pm$ 0,001		0	0
Ionomycin	0,096 $\pm$ 0,004		0	0
IL-2	0,034 $\pm$ 0,006		0	0
<b>2) NK-aktive MV</b>				
Vollmedium	0,072 $\pm$ 0,002		0	0
PMA	0,098 $\pm$ 0,000		0	0
Ionomycin	0,426 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	0,068 $\pm$ 0,001	0	1,5
IL-2	0,082 $\pm$ 0,007		0	0
<b>3) LAK-aktive MV</b>				
Vollmedium	0,036 $\pm$ 0,000		0	0
PMA	0,097 $\pm$ 0,004		0	0
Ionomycin	0,486 $\pm$ 0,070 <sup>b</sup>	0,070 $\pm$ 0,002	0	1,75
IL-2	0,488 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,430 $\pm$ 0,032	16	0

Dauer der Inkubationszeit mit den Stimulatoren: 20 h.

PMA: 0,2  $\mu$ g/ml.

Ionomycin: 1,2  $\mu$ g/ml.

IL-2: 500 U/ml

<sup>a</sup> p < 0,001 Ion. vs. VM.

<sup>b</sup> p < 0,001 Ion. vs. VM.

<sup>c</sup> p < 0,001 IL-2 vs. VM.

## 3.5.3. M-CSF

Zur Untersuchung der M-CSF-Aktivität wurde der Soft-Agar Assay angewendet (siehe 2.12.6). Überstände von MV-Zellen, die durch PMA, Ionomycin, oder IL-2 aktiviert worden waren, wurden in 3,5-cm Kulturschalen im Verhältnis 1:1:8 mit 0,35%igem Agar und frischer KM-Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) versetzt. Dadurch wurden die Überstände 1:10 verdünnt. Nach einer 7-tägigen Inkubation wurden die Kolonien auf dem Agar unter dem Lichtmikroskop gezählt. Um die Zelltypen in den Kolonien zu bestimmen, wurden die Soft-Agar-Scheibe mit Kolonien auf Objektträger gebracht, luftgetrocknet, fixiert, und schließlich mit der Esterase-Doppelfärbung (2.11.3) gefärbt. Die braun angefärbten Zellen waren Monozyten/Makrophagen [Li et al., 1973]. Es wurde beobachtet, daß die NK-aktiven MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA Kolonie-bildenden-Faktor (CSF) freisetzen. Da nach der doppelten Esterase-Färbung alle Zellen in den gebildeten Kolonie braun angefärbt wurden, mußte M-CSF in den Überständen vorhanden sein. Die induzierende Wirkung von PMA auf CSF-Freisetzung wurde bei NK-inaktiven MV-Zellen nicht gefunden.

Tab.14. *Produktion von M-CSF durch MV-Zellen*

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive MV
	Kolonie-Zahl	CFU/ml	Kolonie-Zahl
Vollmedium	0	0	0
PMA	$28,5 \pm 11,2$	285	0
Ionomycin	0	0	0
IL-2	0	0	0

PMA: 0,2 µg/ml.      Ionomycin: 1,2 µg/ml.      IL-2: 500 U/ml

---

Um einen Überblick über Zytokin-Freisetzungsfähigkeit von MV-Zellen zu geben, ist Tabelle 15 hergestellt worden. Daten von NK-aktiven und NK-inaktiven Zellen werden getrennt in Tab.15.a und 15.b präsentiert (siehe Seite 90).

Tab.15.a **Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen**

Stimulator	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF-alpha (U/ml)	IFN-gamma (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
unspezifisch:								
PMA	6	0	620	0		0	0	285
Ionomycin	13	1,5	2500	0	0	0	0	0
spezifisch:								
Yac-1	8		4000	22	32	0		
Yac-1 + IFN-gamma				37	58			
Yac-1 + IL-2			7200	24		6,3		
Kontrolle:								
Vollmedium	2	0	20	0	0	0	0	0
IFN-gamma				0	0			
IL-2		0	26	0	0	0	0	0
P815	2			0	4	0		
P815 + IFN-gamma				0	8			
P815 + IL-2				0		6,4		

Tab.15.b **Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-inaktiven MV-Zellen**

Stimulator	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF-alpha (U/ml)	IFN-gamma (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
unspezifisch:								
PMA	2	0	267	0		0	0	0
Ionomycin	6	0	257	0	0	0	0	0
spezifisch:								
Yac-1	2		268	3	1	0		
Yac-1 + IFN-gamma				19	2			
Yac-1 + IL-2			557	3		0		
Kontrolle:								
Vollmedium	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN-gamma				0	0			
IL-2		0	0	0	0	0	0	0
P815	0			0	1	0		
P815 + IFN-gamma				0	2			
P815 + IL-2				0		0		

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Sind NK-Zellen IL-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer ?

In den letzten 20 Jahren haben Wissenschaftler mit starkem Interesse nach dem Ursprung der NK-Zellen, nach ihrer Abstammung, und nach ihrer Entwicklung von Vorläufern zu reifen Effektor-Zellen geforscht, um diese aktiv an der Abwehr des Körpers gegen Tumoren, Virus- und Mikroben-Infektionen beteiligten Zellen näher kennenzulernen und zu identifizieren. 1977 wurde von Haller et al. durch *in vivo* Experimente in der Maus gezeigt, daß das Knochenmark der Ursprungsort von NK-Zellen ist [Haller et al. 1977]. Dieses Ergebnis wurde später von Hackett et al. mit den Daten aus *in vitro* Untersuchungen ergänzt. Sie zeigten, daß das Knochenmark-Milieu für die Differenzierung der NK-Zellen essentiell ist [Hackett et al. 1986]. Studien in Ratten- und Human-System haben später bestätigt, daß die NK/LAK-Zellen von Knochenmarkvorläufern abstammen [Sarneva et al. 1989, Keever et al. 1990]. Alle diese Daten führten zu der Schlußfolgerung, daß die NK/LAK-Effektorzellen sich aus Knochenmarkvorläufern entwickeln.

Eine offene Frage in der NK/LAK-Forschung ist noch, zu welcher Zellreihe die NK/LAK-Zellen gehören und was der Wachstums-Faktor für diese Zellen ist. Obwohl IL-2 der wichtigste Faktor für die NK/LAK-Kulturen zu sein scheint, ist die Wirkung von IL-2 auf die Zellen eher stimulierend für die Zytotoxizität als für die Proliferation. Olabuenaga et al. berichteten beispielsweise bereits 1983, daß IL-2 allein für das Wachstum einer klonierten NK-Zell-Linie nicht ausreicht [Olabuenaga et al. 1983]. Ein paar Jahre später bestätigten mehrere Forschungsgruppen, die mit den NK/LAK-Zellen aus Milz oder aus Knochenmark-Kultur arbeiteten, daß für die Proliferation der NK/LAK-Zellen außer IL-2 noch ein anderer Faktor benötigt wird [Gunji et al. 1989, Van-Den-Brink et al. 1990, Ayroldi et al. 1992]. Dieser andere Faktor ist bis heute nicht identifiziert worden.

Da der Wachstumsfaktor für NK-Zellen unbekannt ist, ist es in der Tat schwer, mittels der *in vitro* Kultur, insbesondere mittels der Knochenmark-Kultur die Entwicklung der NK-Zellen von den Vorläufern bis zu den Effektorzellen zu erforschen. In den letzten fünf Jahren wurden fast alle Studien über die Knochenmarkvorläufer der NK/LAK-Effektoren in Ratte, Mensch und Maus nur mittels "LTBMC" (long-term bone marrow culture) gemacht [Vanden-Brink et al. 1990, Pollack et al. 1992, Sitnicka & Hansson 1992, und Vecchini et al. 1993]. Unter "LTBMC"-Bedingungen wurden die gesamten Knochenmarkzellen bei einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Medium (RPMI1640 + 5%FKS +  $50 \mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol) ohne exogene Faktoren vorkultiviert, um eine adhärenzte Stroma-Zellschicht zu erhalten. Nach einer 4-wöchigen Vorkultur hatten weniger als 3,5% der Zellen von der Ausgangspopulation überlebt [Vecchini et al. 1993]. Unter den überlebenden Zellen waren zum großen Teil adhärenzte Stroma-Zellen und wenige nicht adhärenzte Zellen, die locker an der Stroma-Zellschicht hafteten. Dann wurde IL-2 in die Kultur gegeben. Die nicht adhärenzten Zellen entwickelten sich während einer 3-6 tägigen Inkubation mit IL-2 zunächst zu NK- und weiter zu LAK-Effektor-Zellen, deswegen wurden sie als NK-Vorläufer angesehen [Sitnicka & Hansson 1992]. In allen diesen Studien zeigten die Autoren übereinstimmend, daß das Stroma für die Generation der NK-Zellen in der Knochenmark-Kultur nötig ist, und daß unter "LTBMC"-Bedingungen die Entwicklung von Vorläufern zu NK-Zellen eine Zusammenwirkung von IL-2 und einem Wachstumsfaktor, der von dem Stroma gebildet wird, benötigt [Ayroldi et al. 1992, Vecchini et al. 1993]. Eine konkrete Beschreibung dieses Wachstumsfaktors aus Stroma ist in der Literatur nicht zu finden.

"LTBMC"-Bedingungen haben offensichtlich folgende Nachteile: (i) Die Kultur dauert sehr lange, daher ist sie gefährdet, kontaminiert zu werden; (ii) Das Stroma dient als Quelle für viele Zytokine, so daß es schwierig ist, einen Wachstumsfaktor für NK-Vorläufer zu definieren; und (iii) Die Kultur enthält in den ersten 4 Wochen keine exogen zugesetzte Faktoren, dies kann in einem massenhaften Tod der Stammzellen resultieren, dadurch kann

die Ausbeute der NK-Vorläufer-Zellen stark herabgesetzt sein. Wegen dieser Probleme gilt die "LTBMC"-Kultur weder als praktische noch als ideale Knochenmark-Kulturbedingung für die Erforschung der NK-Vorläufer.

Die vorliegende Arbeit basierte auf dem Gedanken, daß die NK-Effektorzellen mit Promonozyten verwandt sein könnten [Lohmann-Matthes et al. 1979]. Statt nach anderen Wachstumsfaktoren zu suchen, wurden die myeloischen Wachstumsfaktoren, GM-CSF und CSF-1, angewendet, um die Proliferation der Knochenmarkvorläufer für die NK-Effektorzellen zu stimulieren. Dies hatte sofort Erfolg. Sowohl die aus frischem Knochenmark angereicherte NK-Vorläufer-Population als auch die aus einer 3-tägigen KM-Vorkultur isolierte und gereinigte NK-aktive Zellpopulation sind im [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau-Test als CSF-abhängige Zellen zu erkennen (Abb.2 und Abb.10). Im Vergleich zu der "LTBMC"-Kultur hat unsere Knochenmark-Kultur folgende Vorteile: (i) Einschließlich der KM-Vorkultur und der Haupt-Kultur braucht sie nur 3-7 Tage, um die NK- und LAK-Aktivität hervorzubringen. Sie ist also viel kürzer als die 4-wöchige "LTBMC"-Kultur; (ii) Unsere Knochenmark-Kultur wird mit bekannten exogenen Faktoren gestartet. Daher ist der Verlauf der Kultur leicht abzuschätzen und zu steuern; (iii) Von unserer Kultur wird eine hohe Zellausbeute erhalten. Von einer Maus werden bereits nach einer 3-tägigen Vorkultur 3-5x10<sup>6</sup> Vorläufer-Zellen, die alle zu NK/LAK-Effektor-Zellen ausdifferenzieren können, gewonnen. Diese Zellzahl ist 10-fach höher als die aus "LTBMC" gewonnene [Vecchini et al. 1993]; und (iv) In unserer Knochenmark-Kultur mit CSF plus IL-2 sind die Stroma-Zellen für die Erzeugung der NK/LAK-Aktivität nicht nötig. Die Kultur kann mit einer reinen Zellpopulation laufen. Dies schafft die Voraussetzung, die Entwicklung der Zellen zu verfolgen.

Bei der Oberflächenmarker-Analyse der Zellen aus der "LTBMC"-Kultur wurde häufig gefunden, daß die als NK-Vorläufer geltenden, nicht adhärennten Zellen verschiedene



Phänotypen haben. Sitnika et al. berichteten beispielsweise, daß in der "LTBMC"-Kultur die nicht adhärenen Zellen zum Teil positiv für den T-Zellmarker CD3 waren [Sitnika & Hansson 1992]. Nach der Definition für NK-Zellen sollte CD3 nicht von NK-Zellen exprimiert werden [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988]. Daher kann der Befund der CD3<sup>+</sup> Zellen nur bedeuten, daß die nicht adhärenente Population in der "LTBMC"-Kultur aus heterogenen Zellen besteht. Aus diesem Grund ist es nicht korrekt, die nicht adhärenen Zellen in der "LTBMC"-Kultur eine NK-Vorläufer Population zu nennen. Bisher ist nur ein Oberflächenmarker auf den Knochenmarkvorläuferzellen für die NK/LAK-Effektoren bestimmt worden, nämlich der spezifische Marker für NK-Zellen, also in der Maus NK-1,1 [Hackett et al. 1986, Vecchini et al. 1993]. So betrachtet, ist die aus unserer Kultur isolierte Vorläufer-Population, im Vergleich zu der aus "LTBMC", eindeutig in besserem Zustand hinsichtlich ihrer Expressierung von NK-1.1 (mehr als 95% Zellen positiv, siehe Abb.9) und ihres Reinheitsgrads (komplett negativ für T-, B-Zellmarker, siehe Abb.9).

Die NK-1.1 positiven Knochenmarkvorläufer aus unserer Kultur erwiesen sich als bipotente Zellen, die durch IL-2 Aktivierung schnell zu aktiven NK/LAK-Effektoren differenzierten, aber auf der anderen Seite, in Abwesenheit von IL-2, unter dem Einfluß von CSF-1, zu Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>) herausreifen konnten (Abb.14 und 15). Diese zweite Eigenschaft haben sie mit den in der Literatur definierten Knochenmarkvorläufern für Makrophagen [Crocker & Gordon 1985] gemeinsam. Das Vorhandensein von NK-1.1 Markern auf reifen Makrophagen (siehe Abb.15) weist auf einen gemeinsamen Ursprung der beiden Zellarten hin. Vor kurzem berichteten Koo et al. ebenfalls, daß die F4/80 positiven Makrophagen aus Maus den NK-1.1 Marker tragen [Koo et al. 1991].

Seit 15 Jahren wird die Beziehung zwischen den Zellen aus dem Makrophagensystem und den NK-Effektor-Zellen diskutiert [Lohman-Matthes et al. 1979, Decker et al. 1986, und Baccarini et al. 1985, 1986, 1988, 1989]. Obwohl schon lange bekannt ist, daß die NK-

Zellen einen typisch myeloischen Marker, Mac-1, tragen [Zarling & Kung 1980, Tai & werner 1980, Ortaldo et al. 1981], nehmen viele Autoren an, daß die NK-Zellen zu den Lymphozyten gehören. Das Hauptargument dafür ist, daß die Entstehung der NK-Aktivität von IL-2 abhängig ist und IL-2 ein bekannter Wachstumsfaktor spezifisch für Lymphozyten ist [Herberman et al 1987]. Wie oben erwähnt, ist IL-2 bei den NK-Zellen nicht für die Zellproliferation sondern für die zytotoxische Funktion verantwortlich [Gunji et al. 1989, Vanden-Brink et al. 1991, Ayroldi et al. 1992]. Außerdem ist die Expression des IL-2-Rezeptors auf Monozyten und Granulozyten (siehe Einleitung 1.2) ein Hinweis, daß die Wirkung von IL-2 nicht spezifisch auf Lymphozyten beschränkt ist. Der IL-2 Bedarf der NK/LAK-Effektorzellen ist kein Beweis dafür, daß die NK/LAK-Zellen Lymphozyten sind.

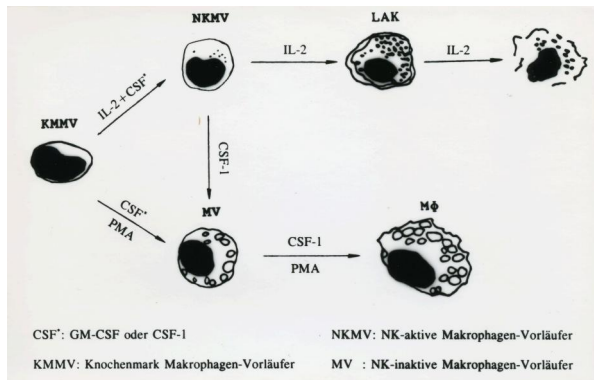
In dieser Arbeit wurde ein noch nicht beschriebenes jedoch wichtiges Phänomen bei der Entwicklung der Makrophagen-Vorläufer aus dem Knochenmark beobachtet, nämlich: wenn diese Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks in frühem Stadium dem IL-2 Stimulationssignal begegnen, werden sie potent sein, zu NK/LAK-Effektoren zu differenzieren. Da diese Effektorzellen morphologisch, phänotypisch, funktionell sowie zytochemisch alle typischen Charaktermerkmale der NK-Zellen aufweisen, sind wir der Ansicht, daß diese von IL-2 aktivierten Makrophagen-Vorläuferzellen die NK-Zellen sind. Unsere KM-Kultur beginnt allerdings nicht mit den gesamten Knochenmarkszellen sondern nur mit der leichten Perkoll-Fraktion, aber es wurde durch den IL-2 Stimulationstest überprüft, daß die Zellen in den schweren Perkoll-Fraktionen kaum NK-Vorläuferzellen enthielten (siehe Tab.1). Silvennoinen et al. zeigten ebenfalls, daß die Knochenmarkvorläufer der NK-Zellen nur in den leichten Perkoll-Fraktionen zu finden sind [Silvennoinen et al. 1986].

Aus den obengenannten Gründen kann vermutet werden, daß die von anderen Autoren beschriebenen NK/LAK-Effektor-Zellen aus den Knochenmarkvorläufern stammen, die entweder durch IL-2-Aktivierung zu NK/LAK-Zellen oder durch CSF-1-Stimulierung zu

Makrophagen differenzieren können. Unsere Ergebnisse sind teilweise mit denen von Sitnicka et al. vereinbar. Diese Autoren zeigten mit den Experimenten aus der "LTBMC"-Kultur, daß die KM-Vorläufer für NK/LAK-Zellen unter dem Einfluß von GM-CSF allein zu Granulozyten-Makrophagen ausdifferenzierten [Sitnicka & Hansson 1992]. Wir stimmen darin überein, daß es im Knochenmark einen gemeinsamen Vorläufer für die NK-Zellen und die myeloischen Zellen gibt. Das Stadium der Vorläufer wird jedoch von uns unterschiedlich definiert. Sitnicka und Hasson sind der Meinung, daß diese Vorläufer noch die pluripotenten Stammzellen sind, die entweder zu lymphoiden oder zu myeloiden Zellen differenzieren können. Unsere Daten zeigen aber, daß diese Vorläufer-Zellen schon in die myeloische Linie eingetreten sind, weil der Lymphozyten-Wachstumsfaktor IL-2 die Zellen weder zum Proliferieren (siehe Abb.2 und 10) noch zum Differenzieren zu T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) stimulieren konnte (siehe Abb. 20).

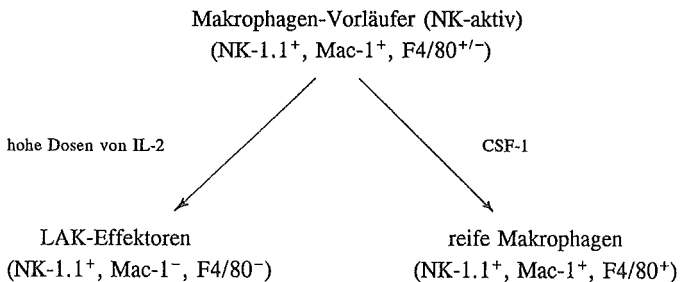
#### 4.2. Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks unter dem Einfluß von CSF-1 und IL-2

Beruhend auf den Daten dieser Arbeit wird eine Hypothese über die Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks, wie in Abb.26 dargestellt, vorgeschlagen:



**Abb.26.** Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks.

Während der Differenzierungsvorgänge verändert sich der Phänotyp der MV-Zellen je nach den Kulturbedingungen. Unter den getesteten monoklonalen anti-Oberflächenmarker Antikörper war NK-1.1 der einzige gemeinsame Oberflächenmarker für alle Differenzierungsstadien der MV-Zellen. F4/80, ein typischer Marker für die reifen Makrophagen [Anstyn & Gordon 1981], konnte nur schwach auf den NK-aktiven Zellen aber nicht auf den LAK-aktiven Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb.9 und 20). Ebenso wurde ein noch deutlichere Abnahme der Expressierung von Mac-1 bei der Entwicklung von NK-aktiven zu LAK-aktiven Zellen beobachtet (Abb.9 und 20). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Phänotyp von KM Makrophagen-Vorläufern sich unter den Einfluß von IL-2 oder CSF-1 folgendermaßen entwickelt:



Unsere Beobachtung, daß bei der LAK-Induktion mit hohen Dosen IL-2 die MV-Zellen ihre Oberflächenmarker Mac-1 und F4/80 verlieren, stimmt mit den Ergebnissen von anderen Forschern überein. Grimm et al. fanden bei der LAK-Kultur, daß die LAK-Effektorzellen negativ für Mac-1 Marker sind [Grimm et al. 1982]. Parr et al. beschrieben, daß die viel Perforin enthaltenden NK/LAK-ähnlichen Zellen keinen F4/80 Marker exprimieren [Parr et al. 1990]. Wie solche Zellmarker durch IL-2 Stimulation herunterreguliert werden, bleibt

noch zu untersuchen.

Diese Arbeit zeigt, daß die Wirkung von IL-2 auf die Makrophagen-Vorläufer auf der Genebene abläuft. In den MV-Zellen, die durch IL-2 aktiviert worden waren, wurde Perforin Messenger-RNA gefunden (Abb.22 Lane 2,3,4), die von den normalen MV-Zellen (nur mit CSF kultiviert) konstitutiv nicht exprimiert wurde (Abb.22 Lane 1). Das Anschalten des Gens zum Synthetisieren der Perforin Messenger-RNA erscheint durch eine frühzeitige IL-2-Stimulation bedingt zu sein, weil die MV-Zellen, die in CSF allein nur für 3 Tage vorkultiviert waren, nicht mehr fähig waren, unter der Stimulation mit IL-2 die Perforin-mRNA zu synthetisieren (siehe Abb.22 Lane 6). Auch die Daten aus dem NK-Aktivitätstest bestätigen, daß eine frühzeitige Zugabe von IL-2 wesentlich für die NK-Induktion ist (siehe Abb.4). Wenn IL-2 erst 24 h später in eine Vorkultur mit CSF allein hinzugefügt wurde, wurde die Induktion der NK-Aktivität dramatisch reduziert; wurde IL-2 erst 48 h später hinzugegeben, dann war keine Induktion mehr zu beobachten. Dies kann dadurch erklärt werden, daß der Reifungsprozeß zur Makrophagen-Entwicklung die Perforin-Produktionsfähigkeit der MV-Zellen vermindert. Vor kurzem haben Ayroldi et al. berichtet, daß die von IL-2 induzierte NK-Entwicklung in Knochenmark-Kulturen durch PMA inhibiert wurde [Ayroldi et al. 1993]. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, daß PMA den Reifungsprozeß von Vorläuferzellen zu Makrophagen beschleunigt (siehe Abb.6). Es kann daher vermutet werden, daß PMA die Induktion der NK-Aktivität dadurch verhindert, daß PMA die jungen Knochenmarkvorläufer, die mit IL-2 reagieren können, rasch in ein reiferes Stadium treibt. Somit sind die Zellen trotz der Anwesenheit von IL-2 nicht mehr in der Lage, Perforin zu synthetisieren, dessen Vorhandensein für die NK-Aktivität wesentlich ist. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ab welchem Stadium ein Vorläufer nicht mehr zur Perforin-Produktion stimulierbar ist.

Wurde der Kultur IL-2 entzogen, verschwanden sowohl Perforin-mRNA in den Zellen (siehe

Abb.22 Lane 5) als auch die NK-Aktivität (Tab.6. Nr. 5). Die Zytotoxizität der MV-Zellen gegen NK-Targetzellen (Yac-1) ist also streng IL-2-abhängig. Der Befund der vorliegenden Arbeit bringt einen neuen Aspekt zu der langjährig umstrittenen Frage, ob die NK/LAK-Zellen zu Lymphozyten oder zum Makrophagensystem gehören. Viele Autoren präsentierten Daten über die IL-2-Abhängigkeit der NK/LAK-Aktivität, um zu beweisen, daß die NK/LAK-Effektorzellen zu Lymphozyten gehören. Zusätzlich wurde gezeigt, daß in der Kultur nur mit CSF-1 keine NK-Zytotoxizität zu finden ist [Ortaldo et al. 1984, Koo & Manyak 1986]. Deshalb wurde angenommen, daß die Zellen des Makrophagensystems keine NK-Aktivität haben können. Unsere Daten stimmen zwar mit diesen Ergebnissen überein, jedoch kommen wir zu anderen Schlußfolgerungen. Da die Makrophagen-Vorläufer IL-2 zum Synthetisieren des Perforins benötigen, ist die NK-Aktivität, die auf das Vorhandensein des Perforin angewiesen ist, von IL-2 abhängig. Hingegen übt CSF-1 nur eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum aus, daher ist zu erwarten, daß die Zellkultur mit CSF-1 allein nicht zu NK-Aktivität führt. In früheren Studien über die Ähnlichkeiten zwischen Promonozyten und NK-Zellen wurde die wichtige Rolle des IL-2s für die Induktion der NK-Aktivität in Makrophagen-Vorläufern nicht erkannt. Die damaligen Knochenmark-Kulturen wurden mit gesamten Knochenmarkzellen in L-Zell konditioniertem Medium durchgeführt [Lohman-Matthes et al. 1979, Baccarini et al. 1985, 1988]. Der einzige bekannte Faktor in der Kultur war CSF-1. Seit rekombinantes CSF-1 in den KM-Kulturen angewendet wird und die Kulturen mit den fraktionierten KM-Zellen beginnen, ist NK-Aktivität in den Kulturen ohne Zugabe von IL-2 nicht zu beobachten. Dies weist darauf hin, daß die KM-Kulturen in früheren Studien wahrscheinlich die NK-Aktivität-stimulierende Faktoren, wie IL-2, selbst produzierten. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Wirkung von IL-2 auf Makrophagen-Vorläufer könnte eine wichtige Ergänzung für die Differenzierungstheorie der Makrophagen-Vorläufer beitragen.

IL-2 kann auch die Zytokin-Produktionsfähigkeit der MV-Zellen stark beeinflussen. In dieser

Arbeit wurde beispielsweise beobachtet, daß die durch IL-2 aktivierten, NK-aktiven MV-Zellen IFN- $\gamma$  sezernierten, während die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen kein IFN- $\gamma$  produzierten (Tab.11). Der Einfluß von IL-2 auf die Zellen scheint im frühen Stadium sehr wichtig, denn bei dem Zytokin-Induktionsexperiment konnte derselbe Stimulator (Tumorzellen+IL-2) die NK-aktiven MV-Zellen zu IFN- $\gamma$ -Freisetzung stimulieren, aber die normalen MV-Zellen nicht. Es ist bekannt, daß IFN- $\gamma$  von aktivierten T-Zellen [Trinchieri et al. 1985] und NK-Zellen [Michael et al. 1989] produziert wird, aber nicht von Monozyten/Makrophagen. Da unsere NK-aktive MV-Zellpopulation frei von T-Zellen war (siehe Abb.9), ist es ausgeschlossen, daß das in dieser Arbeit gefundene IFN- $\gamma$  von kontaminierenden T-Zellen freigesetzt wurde. Außerdem haben wir beobachtet, daß die von IL-2 aktivierten, NK-aktiven MV-Zellen bei der Produktion von TNF (Tab.7), IL-6 (Tab.9), IL-10 (Tab.10), sowie Kolonie-stimulierenden Faktoren (Tab.13,14) viel aktiver sind als die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen.

Die aktive Zytokin-Produktion, insbesondere CSF-Freisetzung von NK/LAK-Zellen spricht dafür, daß die langjährige Kontroverse über die Proliferationswirkung von IL-2 auf NK/LAK-Zellen wahrscheinlich auf einen oder mehrere von IL-2 induzierten Faktor/en zurückzuführen ist. 1989 beobachteten Gunji et al. bei einer *in vitro* Kultur mit den NK/LAK-Zellen aus Milz, daß außer IL-2 noch ein "konditioniertes Medium", das aus einer 3-tägigen Vorkultur derselben Zellen mit IL-2 (1000 U/ml) stammte, in die Kultur eingesetzt werden mußte, um die Proliferation der NK/LAK-Zellen zu bewirken. Aufgrund unserer Daten (siehe Tab.13. LAK-aktive) und denen aus anderen Labors [Cuturi et al. 1989], die zeigen, daß IL-2 die NK/LAK-Effektoren zur CSF-Synthese stimuliert, kann vermutet werden, daß dieses "konditionierte Medium" wahrscheinlich die Kolonie-stimulierenden Faktoren, wie z.B. GM-CSF, CSF-1, oder IL-3, enthält, die für die Vermehrung der NK/LAK-Zellen verantwortlich sind.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten über die Fähigkeit der NK-aktiven MV-Zellen Zytokine zu produzieren stimmen mit denen aus der NK-Zellen Forschung (siehe Einleitung 1.5) annähernd überein. Die von IL-2 aktivierten MV-Zellen reagierten auf die Stimulierung durch NK-Zielzellen (Yac-1) deutlich empfindlicher als die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen hinsichtlich ihrer TNF-, IL-1-, und IL-10-Produktion (siehe Tab. 7, 8, 10). Die Ergebnisse aus der IL-10-Untersuchung weisen darauf hin, daß ganz unabhängig von der IL-2 Stimulierung die MV-Zellen die Yac-1-Zellen erkennen können, weil beide NK-aktive und NK-inaktive MV-Zellen bei den Stimulationen mit Yac-1 und P815 nur spezifisch auf Yac-1-Zellen mit IL-10-Freisetzung reagierten (siehe Tab. 10). IL-10 ist ein relativ neu entdeckter Faktor, der sowohl hemmende Wirkungen auf Th1 (T-Helfer 1) Zellen und Monozyten/Makrophagen [Fiorentino et al. 1991a,b, De-Waal-Malefyt et al. 1991,1993] als auch stimulierende Wirkungen auf B-Zellen [Go et al. 1990, Defrance et al. 1992], zytotoxische T-Zellen [Chen & Zlotnik 1991], sowie Mastzellen [Thompson-snipes et al. 1991] ausübt. Welche Bedeutung diese IL-10 Freisetzung aus MV-Zellen hat, ist noch unklar.

#### **4.3. *in vivo* Anwendung der kultivierten LAK-Zellen und Analyse der Ursache für die Nebenwirkungen der Immunotherapie mit LAK-Zellen plus hohe Dosen IL-2**

Vor ein paar Jahren wurde berichtet, daß Immunotherapie mit *in vitro* kultivierten NK/LAK-Zellen zu einer Regression von Tumoren führte [Lafreniere & Rosenberg 1985]. Bedauerlicherweise steht bis heute keine effektive Kulturbedingung für eine schnelle *in vitro* Expansion der NK/LAK-Zellen zu Verfügung. Aus der vorliegenden Arbeit kann vielleicht eine neue *in vitro* Kulturbedingung, die aus CSF als Wachstumsfaktor und IL-2 als Zytotoxizität-stimulierendem Faktor besteht, für die Kultivierung der NK/LAK-Effektoren hervorgehen. Bei der Immunotherapie wurden häufig die *in vitro* kultivierten LAK-Zellen mit hohen Dosen IL-2 (als LAK-Aktivität stimulierender Faktor) eingesetzt. Dabei beobachtet



man sowohl Regression von Tumoren als auch stark toxische Nebenwirkungen, wie z.B. "vascular leak syndrome" [Rosenberg et al. 1985, Lotze et al. 1986, Rosenstein et al. 1986, und Peace et al. 1989]. Der Grund dafür ist noch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, daß hohe Dosen IL-2 eine erhebliche Vermehrung des zytolytischen Perforins in NK/LAK-Effektorzellen hervorruft (Abb.18 und 24), und daß die mit vielen Perforin-Granula gefüllten LAK-Zellen schließlich fragmentieren und somit eine Freisetzung von Perforin aus den LAK-Zellen stattfindet (Abb.19). Dies könnte eine Ursache für die toxischen Nebenwirkungen sein. Andererseits zeigen unsere Ergebnisse, daß IL-2 zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung führt (Tab.9). Wie in der Einleitung 1.4 erwähnt, hat IL-6 eine synergistische Wirkung auf die von IL-2 induzierte Perforin-Synthese, deshalb ist es vorstellbar, daß die Perforin-Vermehrung in den LAK-Zellen wegen des Vorhandensein des IL-6s noch effektiver und schneller abläuft. Als Folge kommt es früher zur Zersetzung der LAK-Zellen im Körper. Daher scheint es nicht empfehlenswert zu sein, hohe Dosen IL-2 zusammen mit LAK-Zellen *in vivo* einzusetzen. Die anderen Nebenwirkungen könnten von den aus NK/LAK-Zellen ausgeschütteten Zytokine verursacht werden. Daher könnten die Zytokin-Produktionsdaten dieser Arbeit für die *in vivo* Anwendung der NK/LAK-aktiven Zellen nützlich sein, um manche Nebenwirkungen zu vermindern.

#### **4.4. Vergleich der Eigenschaften von den unstimulierten Makrophagen-Vorläufern, den durch IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufern, und den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen.**

Basierend auf den Ergebnisse vorliegender Arbeit werden die wichtigsten Charaktermerkmale der beiden Typen von MV-Zellen, nämlich der normalen (NK-inaktiven) und der NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer, in Tabelle 16 (siehe nächste Seite) zusammengefaßt präsentiert und mit den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen vergleichend dargestellt.

Tab. 16 *Vergleich der Eigenschaften von MV-Zellen mit denen von NK/LAK-Zellen*

Eigenschaften	MV-Zellen			in der Literatur beschriebene NK/LAK-Zellen
	normale	NK-aktive	LAK-aktive	
1) Allgemein:				
Größe	16-20 $\mu\text{m}$	16-20 $\mu\text{m}$	20-25 $\mu\text{m}$	16-20/20-25 $\mu\text{m}$
K/Z * Verhältnis	hoch	hoch	mittel	hoch/mittel
Adhärenz	-	-	+	-/+
Perforin Granula	-	+	++	+/++
2) Oberflächenmarker:				
Mac-1	+	+	-	+/-
NK-1.1	+	+	+	+/+
F4/80	schwach	schwach	-	?/-
3) Zytotoxizität:				
gegen Yac-1	-	+	++	+/++
gegen P815	-	-	++	-/++
4) Zytokin-Freisetzung:				
IL-1	+	+		+
IL-3	-	+	+	+
IL-6	+	++		++
IL-10	+	++		
TNF- $\alpha$	+	++		++
IFN- $\gamma$	-	+		+
GM-CSF	-	-	+	+
M-CSF	-	+		+

\* K/Z: Kern/Zytoplasma

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, daß die Knochenmarkvorläuferzellen des Makrophagensystems zu zytolytischen NK/LAK-Effektorzellen differenzieren können.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine günstige Knochenmark-Kulturbedingung zum Expandieren der NK/LAK-Effektorzellen etabliert. Diese Knochenmark-Kultur enthält CSF (CSF-1 oder GM-CSF) als Wachstumsfaktor und IL-2 als NK/LAK-Aktivität stimulierenden Faktor und kann innerhalb von 3-6 Tagen zirka 10-fach mehr NK/LAK-Effektorzellen produzieren als die heutzutage allgemein benutzte LTBMK ("long-term bone marrow culture"), die normalerweise 4 Wochen dauert und als die einzige geeignete Knochenmark-Kulturbedingung für NK/LAK-Zellen beschrieben wurde [Vecchini et al. 1993].

Die aus der Knochenmark-Kultur mit CSF+IL-2 isolierten NK-aktiven Zellen zeigten eine "large-granular lymphocyte" (LGL)-ähnliche Morphologie und konnten bis auf >90% gereinigt werden. Der Phänotyp (Oberflächenantigen-Profil) der gereinigten Zellen war positiv für Mac-1 und NK-1.1 und negativ für alle typischen T- und B-Zell-Marker, wie Lyt-1, Lyt-2 (CD8), L3T4 (CD4) und B220. Diese NK-1.1 positiven, NK-aktiven Zellen proliferierten in Gegenwart von CSF (CSF-1 oder GM-CSF), aber nicht von IL-2, und differenzieren unter dem Einfluß von PMA (Phobol-12-Myristate-13-Acetate), welches die Differenzierung stimuliert, innerhalb von 24 Stunden zu reifen Makrophagen aus. Deshalb wurden sie als Makrophagen-Vorläufer identifiziert.

Die NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer konnten ihre Zytotoxizität in Gegenwart von IL-2 aufrechterhalten. Wurde IL-2 der Kultur entzogen, war die Zytotoxizität am nächsten Tag nicht mehr nachweisbar. Auf der anderen Seite erwarben diese NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer LAK-Aktivität (lytisch gegen sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Zielzellen), wenn sie mit hohen Dosen IL-2 kultiviert wurden. Der Phänotyp der LAK-aktiven Zellen (NK-1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, Mac-1<sup>-</sup> und F4/80<sup>-</sup>) entsprach dem der in der Literatur beschriebenen LAK-Zellen. Die zytolytische Aktivität der durch IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufer basiert auf einem von Perforin vermittelten Mechanismus.

Die Untersuchungen auf Zytokin-Freisetzung zeigten, daß die durch IL-2 stimulierten, NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen auch aktive Zytokin-Produzenten waren. Sie setzten deutlich höhere Mengen von IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  frei als die nicht stimulierten, NK-inaktiven (normalen) Makrophagen-Vorläufer. Außerdem wurden IFN- $\gamma$ , Koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF und IL-3 von IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufer-Zellen sezerniert, was bei normalen Makrophagen-Vorläuferzellen nicht zu beobachten war. Dieses Spektrum freigesetzter Zytokine entspricht dem Zytokin-Muster, welches von den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen sezerniert wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus dieser Arbeit, daß durch IL-2-Aktivierung die Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks sich zu Zellen mit typischen Merkmalen der NK/LAK-Zellen entwickeln können.

---

## 6. LITERATUR

**Aarden, L. A.**, et al. (1979) Letter to the Editor, Revised nomenclature for antigen-non specific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.* 123 : 2928.

**Anegón I.**, Cuturi, M. C., Trinchieri, G., and Perussia, B. (1988) Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 167 : 452.

**Anstyn, J.M. & Gordon, S.** (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11 : 805.

**Ayroldi, E.**, Cannarile, L., D'Adamio, F., Delfino, D., Migliorati, G., and Riccardi, C. (1992) Long-term cultures of mouse bone marrow cells: a model for studying the generation of natural killer cells. *Nat. Immun.* 11(6) : 317.

**Ayroldi, E.**, Cannarile, L., Migliorati, G., Riccardi, C. (1993) PMA inhibits NK cell generation, cytotoxic activity and NK-1.1 expression. *Int. J. Immunopharmacol.* 15 (1) : 11.

**Baccarini, M.**, Bistoni, F., and Lohmann-Matthes, M. L. (1985) In vitro natural cell-mediated cytotoxicity against *Candida albicans*: macrophage precursors as effector cells. *J. Immunol.* 134 : 2658.

**Baccarini, M.**, Bistoni, F., and Lohmann-Matthes, M. L. (1986a) Organ-associated macrophage precursor activity. Isolation of candidacidal and tumoricidal effectors from the spleen of cyclophosphamide-treated mice. *J. Immunol.* 136 : 837.

**Baccarini, M.**, Kiderlen, A. F., Decker, T., and Lohmann-Matthes, M. L.. (1986b) Functional heterogeneity of murine macrophage precursors from spleen and bone marrow. *Cell. Immunol.* 101 : 339.

**Baccarini, M., Hockertz, S., Kiderlen, A. F., and Lohmann-Matthes, M.-L.** (1988) Extracellular killing of *Leishmania* promastigotes and amastigotes by macrophage precursors derived from bone marrow cultures *J. Exp. Med.* 167 : 1487.

**Baccarini, M., Schwinzer, R. and Lohmann-Matthes, M.-L.** (1989) Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. Involvement of a receptor distinct from the Tac protein. *J. Immunol.* 142 : 118.

**Baccarini, M., and Stanley, E. R.** (1990) Colony stimulating Factor-1. Growth factors, Differentiation Factors and Cytokines. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* : 189.

**Baldwin, R. W.** (1976) Role of immunosurveillance against chemically induced rat tumors. *Transplant Rev.* 28 : 62.

**Biron, C. A. & Welsh, R. M** (1982) Activation and role of natural killer cells in virus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 170 : 155.

**Blumenthal, R. P., Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynold, C. W., and Henkart, P. A.** (1984) Liposome as targets for granule cytolysin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 5551.

**Ceuppens, J. L., Bloemmen, F. J., and Van-Wauwe, J. P.** (1985) T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J. Immunol.* 135 3882.

**Chen, W.-F. & Zlotnik, A.** (1991) IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.* 147 : 528.

**Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single Step Method of RNA isolation by Acid-Guanidin-thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. biochem.* 162 : 156.

Cleveland, B.W., Lopate, M.A., MacDonald, R. J. and Kirschner M. W. (1980) Number and evolutionary conservation of alpha- and beta-tubulin and cytoplasmic beta- and gamma-actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell* 20 : 95.

Crocker P. R. and Gordon S. (1985) Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 162 : 993.

Cudkowiez, G. und Hochman, P. S. (1979) Do natural killer cells engage in regulated reactions against self to ensure homeostasis ? *Immunol. Rev.* 44 : 13.

Cuturi, M. C., Anegon, I., Sherman, F., London, R., Clark, S. C., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169 : 569.

Decker, T., Baccarini, M. and Lohmann-Matthes, M. L. (1986) Liver-associated macrophage precursors as natural cytotoxic effectors against *Candida albicans* and Yac-1 cells. *Eur. J. Immunol.* 16 : 693.

Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992) Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175 : 671.

Dejong A.S.H., Van Kessel-Van Vark, M., and Raap, A. K. (1985) Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochemical Journal* 17 : 1119.

De-Waal-Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and De-Vries, J. E. (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174 : 1209.

De-Waal-Malefyt, R., Yssel, H., and De-Vries, J. E. (1993) Direct effects of IL-10 on



subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation *J. Immunol.* 150 : 4754.

Djeu J. Y., Liu, J. H., Wei, S., Rui, H., Pearson, C. A., Leonad, W. J. and Blanchard, D. K. (1993) Function associated with IL-2 receptor-beta on human Neutrophils. *J. Immunol.* 150 : 960.

Espinoza-Delgado, I., Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R., Sugamara, K., Varesio, L., and Longo, D. C. (1990) Expression and role of p75 interleukin-2 receptor on human monocytes. *J. Exp. Med.* 171 : 1821

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Bioch.* 132 : 6.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., and O'Garra, A. (1991a) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146 : 3444.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R. Howard, M., and O'Garra, A. (1991b) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147 : 3815.

Fitzgerald-Bocarsly, P., Herberman, R., Hercend, T., Hiserodt, J., Kumar, V., Lanier, L., Ortaldo, J., Pross, H., Reynolds, C., Welsh, R. and Wigzell, H. (1988) Box1. A definition of natural killer cells. *Immunology Today* 9(10) : 292.

Go, N., Castle, B. E., Barrett, R., Rastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., and Howard, M. (1990) Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 172 : 1625.

Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. & Rosenberg, S. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. I. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by

interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155 : 1823.

Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. A., Lachman, L. B., Wilson, D. J. & Rosenberg, S. A. (1983) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 158 : 1356.

Gunji, Y., Vujanovic, N., Hiserodt, J. C., Herberman, R. B. & Gorelik, E. (1989) Generation and characterization of purified adherent lymphokine-activated killer cells in mice. *J. Immunol.* 142 : 1748.

Hackett, J. Jr., Tutt, M., Lipscomb, M., Bennet, M., Koo, K., and Kumar, V. (1986) Origin and differentiation of natural killer cells II. Functional and morphologic studies of purified NK-1.1<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 136 : 3124.

Haller, O., Kiessling, R., Öre, A. & Wigzell, H. (1977) Generation of natural killer cells: an autonomous function of the bone marrow. *J. Exp. Med.* 145 : 1411.

Hanna, N., Fidler, I. J. (1980) The role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J. Natl. cancer Inst.* 65 : 801.

Hanna, N., Burton, R. (1981) Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J. Immunol.* 127 : 1754.

Henkart P. A., Miliard P. J., Reynolds C. W., and Henkart M. P. (1984) Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* 160 : 75.

Herberman, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 16 : 216.

**Herberman, R. B. und Holden, H. T.** (1978) Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* 27 : 305.

**Herbermann, R. B., Balch, C., Bolhuis, R., Golub, S., Hiserodt, J., Lanier, L., Lotzova, E., Philips, J., Riccardi, C., Ritz, J., Santoni, A., Schmidt, R., Uchide, A. & Vujanovic, N.** (1987) Most lymphokine activated killer (LAK) activity mediated by blood and splenic lymphocytes is attributable to stimulation of natural killer (NK) cells by interleukin-2 (IL-2). *Immunol. Today* 8 : 178.

**Hercend, T. and Schmidt, R. E.** (1988) Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunology Today* 9 (10) : 291-293.

**Herman, J. and A. R. Rabson.** (1986) Tumor cells stimulate interleukin 1 (IL-1) production from enriched large granular lymphocytes. *Clinical Imm. and Immunopatho.* 38 : 282-294

**Hoefsmit C. M., Schadee-Eestermans I. L., and Beelen R. H. J.** (1986) The development of the resident pattern of endogenous peroxidatic activity in mouse peritoneal macrophages coincides with the expression of the differentiation antigen F4/80. A combined method for immunoperoxidase labeling and endogenous peroxidase cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 34(5) : 633.

**Holter, W., Goldman, C., Casabo, L., Nelson, D., Greene, W., and Waldmann, T.** (1987) Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-gamma-stimulated human monocytes. *J. Immunol.* 138 : 2917.

**Kashima, N., Nishi-Takaoka, C., Fujita, T., Taki, S., Yamada, G., Hamuro, J., and Taniguchi, T.** (1985) Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature.* 313 : 402.

**Karre, K., Seeley, J. K., Eriksson, E., Barton, R. C., and Kiessling, R.** (1983) "Anomalous" Thy-1 + killer cells in allogeneic and F1-anti-parental mixed leukocyte culture. Relation to natural killer cells and allospecific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 157

: 385.

**Kaye, J., Porcelli, S., Tite, J., Joes, B., and Janeway, JR. C. A.** (1983) Both of monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned Helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J. Exp. Med.* 158 : 836.

**Keever, C. A., Pekle, K., Gazzola, M. V., Collins, N. H. and Gillio, A.** (1990) NK and LAK activities from human marrow progenitors. *Cell. Immunol.* 126 : 211.

**Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.** (1975a) "Natural" Killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Mononey leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5 : 112.

**Kiessling, R., Petranyi, G., Klein, G., Wigzell, H.** (1975b) Genetic variation of *in vivo* rejection potential of nonimmunized semisyngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int. J. Cancer.* 15 : 933

**Koo, G. C. and Manyak C.L.** (1986) Generation of cytotoxic cells from murine bone-marrow by humann recombinant IL-2. *J. Immunol.* 137 : 1751-56.

**Koo, G. C., Manyak, C. L., Dasch, J., Ellingsworth, L., and Schultz, L. D.** (1991) Suppressive effects of monocytic cells and transforming growth factor-beta on natural killer cell differentiation in autoimmune viable motheaten mutant mice. *J. Immunol.* 147 : 1194.

**Kuppen, P. J., Eggermont, A. M., Marinelli, A., De-Heer, E., Van-de-Valde, C. J., and Fleuren, G. J.** (1991) Induction of lymphokine-activated killer activity in rat splenocyte cultures: the importance of 2-mercaptoethanol and indomethacin. *Cancer. Immunol. Immunother.* 33 : 28.

**Lafreniere, R., and Rosenberg. S. A.** (1985) Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokin-activated killer cells and recombinant

interleukin 2. *Cancer Res.* 45 : 3735.

Li, C. Y., Lam, K. W., and Yan, L. T. (1973) Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21 : 1.

Lichtenheld, M. G., Olsen, K. J., Lu, P., Lowrey, D. M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E. R. (1988) Structure and function of human perforin. *Nature* 335 : 448.

Liu, C.-C., Perussia, B., Cohn, Z.A. and Young J.D.-E. (1986) Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. *J. Exp. Med.* 164 : 2061-76.

Liu, C.-C., Rafii, S., Granelli-Piperno, A., Trapani, J. A., Young, J. D.-E. (1989) Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. *J. Exp. Med.* 170 : 2105.

Lohmann-Mattes, M. L., Domzig, W., und Roder J. (1979) Promonocytes have the functional characteristics of natural killer cells. *J. Immunol.* 123 : 1883.

Lotze, M. T., Matory, Y. L., Rayner, A. A., Ettinghausen, S. E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., and Rosenberg, S. A. (1986) Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer* 58 : 2764.

Lotzova, E. and Savary, C. A. (1987) Generation of NK cell activity from human bone marrow. *J. Immunol.* 139 : 279.

Lotzova, E., Savary, C. A., and Champlin, R. E. (1993) Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34<sup>+</sup> CD33<sup>-</sup> bone marrow progenitors. *J. Immunol.* 150 : 5263.

Lowrey, D. M., Hameed, A., Lichtenheld, M., and Podack, E. R. (1988) Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine (interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Research* 48 : 4681.

- Lowrey, D.V.,** Aebischer, T., Olsen, K., Lichtenheld, M., Rupp, F., Hengartner, H., Podack, E.R. (1989) Cloning, analysis and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 247.
- Magee D. M. and Wing E. J.** (1989) Secretion of colony-stimulating factors by T cell clones. *J.Immunol.* 143 : 2336.
- Maghazachi, A.,** Vujanovic, N. L., Herberman, R. B. & Hiserodt, J. C. (1988) Lymphokine-activated killer cells in rats. IV. Development relationship among large agranular lymphocytes, large granular lymphocytes, and lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* 140 : 2846.
- Malkovsky, M.,** Lovenland, B., North, M., Asherson, G. L., Gao, L., Ward, P. & Fiers, W. (1987) Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325 : 262.
- Maniatis, T.,** Frisch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual (Cold spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.).
- Masson, D. and Tschopp, J.** (1985) Isolation of a lytic pore forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J. Biol. Chem* 260 : 9069.
- Metcalf, D.** (1987) The molecular control of normal and leukaemic granulocytes and macrophages. *Proc. R. Soc. Lond.* B230 : 389.
- Michael, A.,** Hachett, J. J., Bennett, M., Kumar, V., and Yuan, D. (1989) Regulation of B lymphocytes by natural killer cells, Role of IFN-  $\gamma$ . *J. Immunol.* 142 : 1095.
- Millard, P. J.,** Henkart, M. P., Reynolds, C. W., Henkart, P. A. (1984) Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumor. *J. Immunol.* 132 : 3197.

Migliotati, G., L. Canarile, R. Herbermann, A. Bartocci, E.R. Stanley, and C. Riccardi. (1987) Role of IL-2 and H-1 in the generation of mouse NK cells from primitive bone marrow precursor. *J. Immunol.* 138 : 3618.

Morgan, D. A. and Ruscetti, F. W. (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193 : 1007.

Morgan, D. R., Dupont, H. L., Gonik, B., and Konl, S. (1984) Cytotoxicity of human peripheral blood and colostral leukocytes against *Shigella* species. *Infect. Immun.* 46 : 25.

Morris, D. G. & Pross, H. F. (1989) Studies of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *J. Exp. Med.* 169 : 717.

Mosmann, T.R. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65 : 55.

Mule, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L., and Rosenberg, S. A. (1984) Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin 2. *Science* 225 : 1487.

Murphy, W. J., Keller, J. R., Harrison, C. L., Young, H., A., und Longo, D. L.. (1992) Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood.* 80(3) : 670.

Musso, T., Espinoza-Delgado, I., Pulkki, K., Gusella, G. L., Longo, D. L., and Varesio, L. (1992) IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J. Immunol.* 148 : 795.

Naparstek, E., Pierce, J., Metcalf, D., Shaddock, R. K., Ihle, J., Leder, A., Sakakeeny, M. A., Wagner, K., Falco, J., FitzGerald, T. J., and Greenberger, J. S. (1986) Induction of growth alterations in factor-dependent hematopoietic progenitor cell lines by cocultivation with irradiated bone marrow stromal cell lines. *Blood.* 67 : 1395.

- Nencioni, L., Villa, L., Borasschi, D., Berti, B., and Tagliabue, A. (1983) Natural and antibody-dependent cells-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J. Immunol.* 130 : 903.
- Nguyen H. Q., Hoffmann-Liebermann B., and Liebermann D. A. (1993) the zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72 : 197-209.
- Olabuena, S. E., Brooks, C. G., Gillis, S., and Henney, C. S. (1983) Interleukin 2 is not sufficient for the continuous growth of cloned NK-like cytotoxic cell lines. *J. Immunol.* 131 : 2386.
- Ortaldo, J. R., Sharrow, S. O., Timonen, T., Herberman, R., B. (1981) Analysis of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127 : 2401.
- Ortaldo, J., Mason, A., and Allavena, P. (1984) Studies of progenitors of human natural killer (NK) cells in blood and bone marrow. In *Thymic Factor Therapy*. ed. Byrom, N. A. and Hobbs, J. R. London: Academic.
- Ortaldo, J. R. and Herbermann R. B. (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Ann. Rev. Immunol.* 2 : 359-394.
- Parr, E. L., Young, L. H. Y., Parr, M. B., and Young, J. D.-E. (1990) Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.* 145 : 2365.
- Paya, C. V., Kenmotsu, N., Schoon, R. A. and Leibson, P. J. (1988) Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J. Immunol.* 141 : 1989.
- Peace, D. J. & Cheever, M. A. (1989) Toxicity and therapeutic efficacy of high-dose



interleukin 2. *J. Exp. Med.* 169 : 161.

**Peters, P. M., Ortaldo, J. R., Shalaby, M. R., Svedersky, L. P., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Hass, P. E., Aggarwal, B. B., Herbermann, R. B., Goeddel, D. V., and Palladino, M. A.** (1986) Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF- $\alpha$  but not TNF- $\beta$  (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J. Immunol.* 137 : 2592.

**Podack E. R. and Konigsberg P. J.** (1984) Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J. Exp. Med.* 160 : 695.

**Podack, E.R., Young, J. D.-E., and Cohn, Z. A.** (1985a) Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 8629.

**Podack E. R.** (1985b) The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunology Today*, 6 : 21.

**Podack E. R., Hengartner H., and Lichtheld M. G.** (1991) A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu. Rev. Immunol.* 9 : 129.

**Pollack, S.B. and Rosse, C.** (1987) The primary role of murine bone-marrow in the production of natural killer cells. *J. Immunol.* 139 : 2149.

**Pollack, S. B., Tsuji, J., and Rosse, C.** (1992) Production and differentiation of NK lineage cells in long-term bone marrow cultures in the absence of exogenous growth factors. *Cellular Immunology.* 139 : 352.

**Robb, R. J., Rusk, C. M., Yodoi, J., and Greene, W. C.** (1987) Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: Analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 2002.

Rosenberg, E. B., Herberman, R. B., Levine, P. H., Halterman, R. H., McCoy, J. L., Wunderlich, J. R. (1972) Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int. J. Cancer.* 9 : 648.

Rosenberg, S. A., Grimm E. A., McGrogan, M., et al. (1984) Biological activity of recombinant interleukin 2 produced in *Escherichia coli*. *Science* 223 : 1412.

Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C., and Reichert, C. M. (1985) Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313 : 1492. 1485.

Rosenstein, M., Yron, I., Kaufmann, Y., and Rosenberg, S. A. (1984) Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2. *Cancer Res.* 44 : 1946.

Rosenstein, M., Ettinghausen, S. E., and Rosenberg, S. A. (1986) Extravasation of intravascular fluid mediated by systemic administration of recombinant interleukin-2. *J. Immunol.* 137 : 1735.

Rothwell, V.M. and Rohrschneider, L.R. (1987) Murine c-fms cDNA : Cloning, sequence, analysis and retroviral expression. *Onkogene research.* 1 : 311.

Ruff, M.R. & G.E. Gifford (1981) Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 125 : 1671.

Ruscetti, F. W., Morgen, D. A. and Gano, R. C. (1977) Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J. Immunol.* 119 : 131.

Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Enomoto, M., Narita, N., Motoyoshi, K., Ichijo, M. (1993) Cytokine production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early

pregnancy decidua. *Int. Immunol.* 5(5) : 559.

**Salup, R. R., Mathieson, B. J. & Wiltrot, R. H.** (1987) Precursor phenotype of lymphokine-activated killer cells in the mouse. *J. Immunol.* 138 : 3635.

**Sarneva, M., Vujanovic, N. L., Van-Den-Brink, M. R. M., Herberman r. B., and Hiserodt, J. C.** (1989) Lymphokine-activated killer cells in rats: generation of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells from bone marrow progenitor cells. *Cell. Immunol.* 118 : 448.

**Sharon, M., Klausner, D. R., Cullen, R. B. Chizzonite, R., and Leonard, J. W.** (1986) Novel Interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions *Science* 234 : 859.

**Sharon, M., Gnarra, R. J., and Leonard, J. W.** (1989) The  $\beta$ -chain of the IL-2 receptor (p70) is tyrosine phosphorylated on YT and HUT-102 B2 cells. *J. Immunol.* 143 : 2530.

**Siegel, P. J., Sharon, M., Smith, L. P., and Leonard, J. W.** (1987) The IL-2 receptor  $\beta$  chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 238 : 75.

**Silvennoinen, D., Renkonen, R., and Hurme, K.** (1986) Characterization of naturaek killer cells and their precursors in the murine bone marrow. *Cell. Immunol.* 101 : 1.

**Sitnicka** wurde als **Stinicka** falsch geschrieben

**Smith, K. A.** (1989) The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5 : 397.

**Smyth, M.J., Ortaldo, J. R., Shinkai, Y.I., Yagita, H., Nagata, M., Okumura, K., and Young, H.A.** (1990a) Interleukin 2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8<sup>+</sup> Tcells. *J.Exp. Med.* 171 : 1269.

**Smyth, M. J., Ortaldo, J. R., Bene. W., Yagita, H., Okumura, K., and Young, H. A.** (1990b) IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and

cytotoxic potential of human peripheral blood t cells. *J. Immunol.* 145 : 1156. 1159.

**Stanley, E. R.,** Guilbert, L. J., Tushinski, R. J. & Bartelmez, S. H. (1983) CSF-1, a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J. Cell biochem.* 21 : 151.

**Stanley, E. R. & Heard, P. M.** (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. bio.Chem.* 252 : 4305.

**Stinicka, E. & Hansson, M.** (1992) Natural killer (NK) cell activity in human long-term bone marrow cultures (LTBMC): effects of interleukin-2 (IL-2) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the progenitor cells. *Immunology* 76 : 292.

**Tada H, Shisho, O.,** Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods.* 93 : 157.

**Tai, A. and Werner, N. L.** (1980) Biophysical and serological characterization of murine NK cells. *Natural cell-Mediated Immunity Against Tumors* Herberman R. B. ed. NY: Academic : 241.

**Takasugi, M.,** Mickey, M. R., and Terasaki, P. I. (1973) Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33 : 2898.

**Talmadge, J. E.,** Wiltrott, R. H., Counts, D. F., Herberman, R. B., Mcdonald, T., and Ortaldo, J. R. (1986) Proliferation of human peripheral blood lymphocytes induced by recombinant human interleukin 2: contribution of large granular lymphocytes and T lymphocytes. *Cellular Immunology* 102 : 261.

**Taniguchi, T.,** Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., and Yoshimoto, R. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302 : 305.

- Teshigawara, K., Wang, H-M., Kato, K., and Smith, K. A. (1987) Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.* 165 : 223.
- Thompson-Snipes, L.-A., Dhar, V., Bond, M. W., Mosmann, T. R., Moore, K. M., and Rennick, D. M. (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173 : 507.
- Trinchieri, G. and Perussia, B. (1985) Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunology Today.* 6 : 131.
- Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* 47 : 187.
- Tschopp, J. and Nabholz, M. (1990) Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T-lymphocytes. *Ann Rev. Immunol.* 8 : 279.
- Tsuda, M., Kozak, W. R., Goldman, K. C., and Waldmann, A. T. (1986) Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 9694.
- Tsuda, M., Goldmann, C. K., Bongiovanni, K. F., Chan, W. C., Winton, E. F., Yagita, M., Grimm, E. A., and Waldmann, T. A. (1987) The p75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 5394.
- Tutt, M. M., Kuziel, S. A., Hackett, J., Bennett, M., Tucker, P. W. and Kumar, V. (1986) Murine natural killer cells do not express functional transcripts of the  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -chain genes of the T-cell receptor. *J. Immunol.* 137 : 2998.
- Van-den-Brink, M.R., Boggs, S. S., Herberman, R. B. & Hiserodt, J. C. (1990) The generation of natural killer (NK) cells from NK precursor cells in rat long-term bone marrow culture. *J. Exp. Med.* 172 : 303.

- Van-Snick, J.**, Cayphas, S., Vink, A., Uytenhove, C., Coulle, P. G., Rubira, M. R., and Simpson, R. J. (1986) Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 9679.
- Vecchini, F.**, Delfino, D., Patrene, K. D., Deleo, A., Lu L., Herberman, R. B., Boggs S. S. (1993) Generation of natural killer cells from long-term cultures of mouse bone marrow. *Nat. Immun.* 12(1) : 1.
- Vitolo, D.**, Vujanovic, N. L., Rabinowich H., Schlesinger M., Herbermann R. B., and Whiteside T. L. (1993) Rapid IL-2-induced adherence of human natural killer cells. expression of mRNA for cytokines and IL-2 receptors in adherent NK cells. *J. Immunol.* 151 : 1926.
- Vujanovic, N. L.**, Herberman R. B., Olszowy, M. W., Cramer, D. V., Salup, R. R., Reynold, C. W. and Hiserodt, J. C. (1989) Lymphokine-activated killer cells in rats: analysis of progenitor and effector cell phenotype and relationship to natural killer cells. *Cancer Research* 48 : 884.
- Wahl, S. M.**, McCartney-Francis, N., Hunt, D. A., Smith, P. D., Wahl, L. M., and Katona, I. M. (1987) Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity. *J. Immunol.* 139 : 1342.
- White, M. V.**, Igarashi, Y., Emery, B. E., Lotze, M. T., and Kaliner, M. A. (1992) Effects of in vivo administration of interleukin-2 (IL-2) and IL-4, alone and in combination, on ex vivo human basophil histamin release. *Blood* 79 : 1491.
- Yang, J.**, Mule, J., & Rosenberg, S. (1986) Murine lymphokine activated killer (LAK) cells: phenotypic characterization of the precursor and effector cells. *J. Immunol.* 137 : 715.
- Young, J.D.E.**, Hengartner, H., Podack, E. R., Cohn, Z. A. (1986) Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with

---

natural killer activity. *Cell* 44 : 849.

**Young, L. H. Y., Liu, C.-C., Joag, S., Rafii, S., and Young, J. D.-E.** (1990) How lymphocytes kill. *Annu. Rev. Med.* 41 : 45.

**Zarling, J. M. & Kung, P. C.** (1980) Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic t lymphocytes. *Nature* 288 : 394.

## Lebenslauf

- 13.09.1957 geboren in Chongqing, Sichuan, China
- 9.1964-7.1969 Besuch der Grundschule in Chongqing
- 9.1969-7.1975 Besuch der Mittelschule in Chongqing
- 8.1975-2.1978 Landarbeitsdienst in Baxian, China
- 3.1978-1.1982 Studium der Biologie an der Sichuan Universität
- 2.1982-7.1983 Assistentin an der biochemischen Fakultät der Südwest-China Landwirtschaftlichen Universität
- 8.1983-10.1986 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Biochemie des Chengdu-Biologischen-Institutes der Academia Sinica
- 11.1986-11.1987 Stipendium für die Arbeit in der Abteilung Immunbiologie (Leitung Professor M. -L. Lohmann-Matthes ) des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie in Hannover
- 12.1987-jetzt wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Immunbiologie (Leitung Professor M. -L. Lohmann-Matthes) des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie