

Aus dem Gustav-Embden-Zentrum der Biochemie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Prakash Chandra)
Biochemie der Hormone
(Leiter: Prof. Dr. L. Träger)

Durchflußzytometrische Bestimmung der Enzym- bzw. Retinoidwirkung
auf die Funktion von NK-Zellen und
zytotoxischen T-Lymphozyten *in vitro*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Bora Akoglu
aus
Darmstadt

Frankfurt am Main, 1999

Dekan: Prof. Dr. med. G. von Jagow

Referent: Prof. Dr. L. Träger

Korreferent: PD Dr. Dr. med. J. Stein

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2000

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. L. Träger, der mich 1995 in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir somit diese vorliegende Arbeit ermöglichte. In dieser Zeit habe ich nicht nur die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens gelernt, was meinen heutigen Werdegang bis jetzt mindestens genauso stark beeinflusst hat wie der Abschluß meines Medizinstudiums an unserer Universitätsklinik, sondern ich hatte auch das große Glück mit Menschen zusammen zu arbeiten, die mein Leben menschlich wie auch ideell sehr bereicherten. Dazu hat im besonderen Maße noch beigetragen Herr Dipl.-Biol. Dirk Henrich, der durch seine Kollegialität, Ehrlichkeit und Fachkompetenz mir stets zur Seite stand und ebenfalls ein guter Lehrer, Freund und Korrektor war. Ferner möchte ich Herrn Professor Dr. Ohlenschläger erwähnen, der mich nach dem Physikum in diese Abteilung vermittelte und oft mit mir angeregte Diskussionen führte und auch inspirierte. Dankend für die aufschlußreichen Ratschläge bei auftretenden Problemen möchte ich erwähnen Frau B. Wittke (MTA), Frau Dipl.-Biol. Marissa Penna Martinez, Frau Dr.rer.nat. B. Donnerstag, Herrn Dipl.-Biol. Patrick Jelitto, Herrn Dipl.Ing. Manfred Stegmüller, Herrn Dr.rer.nat. E. Boecklen, und Herrn Dipl.-Chem. Sven Flindt.

Mein spezieller Dank gilt meiner geliebten Freundin Sonja Weber, Ärztin im Praktikum, für ihre Hilfe beim Korrekturlesen.

Bedanken möchte ich mich noch bei Herrn Dipl.-Päd. Stefan Drolshagen, Frau Dipl.Päd. U. Kersken-Nülens, Herrn Dr. R. Lohölter, Frau Fröhlich, Herrn Weiche, Herrn Joachim, Frau Weber, Frau Kamer und Herrn Prof. Dr. G. v. Jagow, die mir während meines Studiums und der Promotion einen außerordentlich guten und flexiblen „Studentenjob“ im Dekanat ermöglicht haben.

Danken möchte ich noch Eric, Markus und Nicole.

Mein jedoch größter Dank gilt meinen Eltern, die mir meine schulische Ausbildung und mein Studium ermöglicht haben.

„HABE ERFURCHT VOR DEM ALTEN
UND MUT DAS NEUE FRISCH ZU WAGEN,
BLEIBE TREU DER EIGENEN NATUR
UND TREU DEN MENSCHEN DIE DU LIEBST“

Kuppelinschrift am Aufgang der Mathildenhöhe Darmstadt

Meinen Eltern und Freunden und Lehrern gewidmet

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
BC	Buffy coat
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CoA	Coenzym A
CRABP	Cytoplasmatisches Retinsäurebindendes Protein
CRBP	Cytoplasmatisches Retinolbindendes Protein
Ct	Chymotrypsin
DIO	Dioctadecyloxycarbocyanin-perchlorat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaacetsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetsäure
EFM	Einfriermedium
ENZ	Enzyme
Eu	Europium
FACS	Fluoreszenz-activated cellsorter
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1,2,3	Fluoreszenzablenkung 1,2,3
FSC	Foreward scatter
HEPES	Hydroxyethylpiperazinbutansulfonsäure
http	Hypertext transfer protocol
IL2	Interleukin 2
Kap.	Kapitel
KIR	Killerzellrezeptor
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen

MHC	Major Histo Compatibility-Komplex
MS	Microsoft®
NAD+	Nicotin Adenin Dinucleotid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium Iodid
PSA	Proteolytische Serumaktivität
pur	Ohne Substanzzugaben
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
ROH	Retinol
RXR	Retinsäurerezeptor X
SP	Spontanrelease
Spont	Spontantod
SSC	Sideward scatter
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Totalrelease
www	World wide web
ZR	Zentrifugenröhrchen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Geschichtliches zur Enzymtherapie	2
1.2 Einteilung der Enzyme	3
1.3 Kenndaten der Enzyme	6
1.4 Resorption von Enzymen	8
1.5 Anwendungsgebiete von Enzympräparationen	10
1.6 Geschichtliches der Vitamin A- und Retinoidtherapie	12
1.7 Einteilung von Vitamin A und der Retinoide	13
1.8 Kenndaten zu Retinol und Retinsäure	14
1.9 Resorption und Pharmakodynamik des Vitamin A und der Retinoide	14
1.10 Anwendungsgebiete von Vitamin A und der Retinoide	18
1.11 Die Immunantwort	19
1.12 Major histocompatibility complex MHC, der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex	21
1.13 Clusters of Differentiation	26
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Vorbereitung zur Durchführung von zytotoxischen Testmethoden	28
3.1.1 Isolierung von peripheren Blut Lymphozyten (PBL)	28
3.1.2 Zelllinien	30
3.1.3 Kultivierung der Zelllinien K562,Raji und PBL	30
3.1.4 Bestimmung der Vitalität und Zellzahlen vor der Testung	31

3.2	Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität	32
3.2.1	Europium releaseassay	32
3.2.2	Das Durchflußzytometer (Flowzytometer)	36
3.2.3	Prinzip der durchflußzytometrischen Bestimmung der Lymphozytenaktivität	42
3.3	Versuchsdurchführung	48
3.3.1	Einmalgabe von Enzymen	49
3.3.2	Mehrfachgabe von Enzymen	50
3.3.3	Retinol und Retinsäure gelöst in DMSO, mit DMSO Kontrolle	52
3.4	Messung und Auswertung der Daten	54
3.5	Messung und Auswertung der Korrelation der zwei Zytotoxmethoden Europium-releaseassay und Flowzytometer	55
3.6	Literaturrecherche	55
4.	ERGEBNISSE	
4.1	Einmalgabe von Enzymen	57
4.1.1	K562, NK-Zellaktivität	57
4.1.5	Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten	61
4.2	Mehrfachgabe (Impulsgabe) von Enzymen	63
4.2.1	K562, NK-Zellaktivität	63
4.2.5	Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten bei Mehrfachgabe	67
4.3	Einmalgabe von DMSO, Retinol und Retinsäure	70
4.3.1	K562, NK-Zellaktivität	70
4.3.2	NK-Zellaktivität nach Inkubation mit DMSO	71
4.3.3	NK-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinol	72
4.3.4	NK-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinsäure	73
4.3.5	Signifikanzen von 4.3.2 – 4.3.4	74

4.3.6	Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten	75
4.3.7	Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten nach Inkubation mit DMSO	76
4.3.8	Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten nach Inkubation mit Retinol	77
4.3.9	Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten nach Inkubation mit Retinsäure	78
4.3.10	Signifikanzen 4.3.7 – 4.3.9	79
4.4	Vergleichsreihe der zwei Zytotoxmethoden Europium – releaseassay und Flowzytometrie	80
4.4.1	Tabellarische Auflistung der Vergleichswerte	80
4.4.2	Korrelationskoeffizienten der beiden Methoden	80
4.5	Färbereihe mit DIO bei den Zelllinien K562 und Raji	82
5.	DISKUSSION	84
5.1	Durchflußzytometrische Bestimmung der zytotoxischen Aktivität peripherer Blut Lymphozyten (PBL)	84
5.2	Anfärbbarkeit der Zelllinien Raji und K562 mit dem Membranfarbstoff DIO	87
5.3	Wirkungen der Enzymmischung auf die PBL	88
5.4	Wirkungen der Retinoide auf die PBL	93
6.	ZUSAMMENFASSUNG	96
7.	LITERATUR	98

I. EINLEITUNG

In der Medizin gibt es oft die eine oder andere „Modeerscheinung“, seien es Vitamine, Enzyme, verschiedene Peptide wie Glutathion, Melatonin oder Spurenelemente, wie Selen, Zink u.a., die zur Therapie herangezogen werden. Um eine Systematik in diese Vielfalt von Ansichten und Meinungen zu bringen, bedarf es einer objektivierbaren Beweisführung zur Sicherung der jeweiligen Wirkungen auf verschiedene Bereiche der belebten Materie. Was macht nun die Schwierigkeit einer Beweisführung für solche Bereiche aus ? Abgesehen von ethischen Problemen, z.B. in Bereichen wie der Onkologie, ist es schwer, für kontrovers diskutierte Präparate einen Platz zu finden, weil nur zu oft zwischen „entweder oder“ entschieden, und nicht als supportive Maßnahme im Rahmen einer Studien-Therapie angesehen wird. Die Wirkungen verschiedener Enzyme auf das Immunsystem werden seit einigen Jahren kontrovers diskutiert. Der Markt für nicht verschreibungspflichtige Pharmaka hat sich in Form von sog. Enzympräparaten auf seine eigene Art und Weise daran beteiligt.

Einer unserer Professoren (Prof. Böhles) hat uns Studenten im Rahmen einer Vorlesung gesagt, daß es für ihn nicht *die* Schulmedizin oder *die* Alternativmedizin gibt, sondern nur wirksame (auf welcher Ebene und Form auch immer) und unwirksame Medizin.

Die Aufgabe des Verfassers in dieser Arbeit ist es nicht, für eine dieser verschiedenen Seiten „Flagge“ zu zeigen, und auch nicht zwischen den Fronten zu vermitteln, sondern davon unbeeinflußt Ergebnisse der Wirkungen von Enzymen und Retinoiden auf das menschliche Immunsystem vorzustellen.

1.1 Geschichtliches zur Enzymtherapie

Die Ursprünge der Enzymtherapie liegen in der Erfahrungsmedizin, deren Wurzeln man bis in die frühe Menschheitsgeschichte zurückverfolgen kann. In Mittel- und Südamerika nutzten die Indianer seit jeher Blätter und Früchte des Melonenbaums (Papaya ; Papain) oder die Ananasfrucht als Heilmittel, selbst in der Bibel ist ein interessanter Bericht zu finden: „Als Hiskia in jenen Tagen auf den Tod erkrankte, begab sich der Prophet Jesaja, der Sohn des Amoz, zu ihm und sagte zu ihm „So hat der Herr gesprochen: Bestelle dein Haus, denn du mußt sterben und wirst nicht wieder gesund werden!“ Da kehrte er sein Gesicht gegen die Wand hin und betete zum Herrn: „Ach, Herr, denke doch daran, wie ich in Treue und mit ungeteiltem Herzen vor deinem Angesicht gewandelt bin und getan habe, was dir wohlgefällt“. Hierauf brach Hiskia in heftiges Weinen aus. Als nun Jesaja den inneren Vorhof des Palastes noch nicht verlassen hatte, da erging das Wort des Herrn an ihn: „Kehre um und sage zu Hiskia, dem Fürsten meines Volks: So hat der Herr, der Gott deines Ahnherrn David, gesprochen: „Ich habe dein Gebet gehört und deine Tränen gesehen; so will ich dich denn wieder gesund werden lassen: schon übermorgen sollst du zum Tempel des Herrn hinaufgehen. Ich will zu deinen Lebenstagen noch fünfzehn Jahre hinzufügen.“ Darauf sagte Jesaja: „Bringt ein Feigenpflaster her!“ Da holten sie ein solches und legten es auf das Geschwür, da wurde er gesund.“ (2. Buch der Könige, 20. Kapitel, 7. Vers). Es war das Enzym „Ficin“ aus der Feige, das das Geschwür abheilen ließ. Im mittelalterlichen Europa brachte man den Saft von Wolfsmilchgewächsen auf Furunkel, Geschwüre und Warzen auf. Diese Therapie wird mit Proteasenkegel heute noch beim Ulcus cruris angewendet (81).

Die Geschichte der systemischen Verabreichung von Enzymen beginnt wahrscheinlich bei dem schottischen Arzt John Beard, der um die Jahrhundertwende einen Preßsaft aus frischem Pankreas von Ferkeln und Lämmern krebserkrankten Patienten verabreichte. Seine berichteten

Erfolge konnten in den Jahrzehnten danach nicht wiederholt werden und gerieten in Vergessenheit, vermutlich waren weitere Versuche mit nicht frisch zubereiteten Präparaten durchgeführt worden. Vor ca. 60 Jahren wurde die Enzymtherapie von Freund und Kaminer wiederentdeckt. Ihre in-vitro-Beobachtungen besagten, daß Tumorzellen durch Zugabe von Serum gesunder Menschen zerstört werden, daß das Serum krebskranker Patienten jedoch diesen Effekt nicht erreichte. Freund vermutete, daß dieser Effekt auf einen Hemmstoff im Serum krebskranker zurückzuführen war. Max Wolf, ein Kollege Freunds, fand heraus, daß durch Zugabe von kleinen Mengen Chymotrypsin und Plasmin dieser Effekt aufgehoben wurde. Dies war der Anlaß, in-vivo Versuche bei krebskranken Menschen zu starten. Wolf stellte fest, daß bestimmte proteolytische Enzyme im Serum gesunder Menschen eine selektive Lyse von Tumorzellen induzierten. Wolf und die Zellbiologin Benitez und später auch Ransberger konnten zeigen, daß die Kombination von pflanzlichen und tierischen Enzymen den größten Effekt erzielte. Diese Erkenntnisse waren die Grundlage der *WoBe*-Enzympräparationen in den nachfolgenden Jahren. (40)

Die in den nachfolgenden Versuchen angewendete Enzympräparation setzt sich aus Papain, Trypsin und Chymotrypsin zusammen im Verhältnis 2,5:1:1.

1.2 Einteilung der Enzyme

Enzyme (gr. en hinein, innerhalb; zyme Sauerteig) sind so alt wie die belebte Natur selbst. Sie spielten eine Rolle bereits in einer Zeit, in der sich unbelebte in belebte Materie umwandelte und ein Zusammenschluß von mehreren Molekülen das erste primitive Leben ermöglichte. Vielfältige und sehr komplexe Regulationsmechanismen in den verschiedensten Organismen sorgen in Form von Enzymen (Biokatalysatoren) für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechsellage. Enzyme beschleunigen chemische

Reaktionen, d.h. sie erhöhen die Umsatzgeschwindigkeit einer Reaktion, die auch ohne Katalysator, wenngleich viel langsamer ablaufen würde. Bei der Reaktion geht der Katalysator für kurze Zeit eine Verbindung mit dem reagierenden Stoff ein. Nach Beendigung der Reaktion kehrt der Katalysator in den ursprünglichen Zustand zurück. (77). Ursprünglich wurden für die Enzyme einfache Trivialnamen benutzt, die mit der Silbe „-in“ endeten (Trypsin etc.). Im Laufe der Zeit wurde versucht, den Substratnamen mit der Endung „-ase“ als Nomenklaturgrundlage einzuführen. Da aber verschiedene Enzyme die gleichen Substrate veränderten, führte dieser Versuch zur Verwirrung. Letztendlich wurde die Nomenklatur der Enzyme von den EC-Gremien (Enzyme Commission der Internationalen Union für Biochemie) international verbindlich festgelegt. Die Klassifikation der Enzyme folgt nun ausschließlich ihren katalytischen Eigenschaften. Tabelle 1.1.1 soll diese verdeutlichen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (Papain, Trypsin und Chymotrypsin) gehören zu der Gruppe 3 der Hydrolasen. Die klassischen Enzymnamen wurden hier beibehalten. (77).

Tabelle Nr 1.1.1 Aufstellung über die Einteilung der Enzyme in sechs Unterklassen (modifiziert nach 77)

Hauptgruppen und Untergruppen und schematisches Beispiel	
1. Oxyreduktasen - Dehydrogenasen - Oxydasen und Oxygenasen	Biologische Oxidation bzw. Reduktion: s. Bsp. 1 S und S' = Substrate
Bsp.1: $S_{red.} + S'_{ox.} \rightleftharpoons S_{ox.} + S'_{red.}$	
2. Transferasen	Übertragung einer chemischen Gruppe zwischen mind. 2 Molekülen: s. Bsp 2 G = Gruppe, S und S' = Substrate
Bsp.2: $S-G + S' \rightleftharpoons S'-G + S$	
3. Hydrolasen - Esterasen - Glycosidasen - Proteasen	Aufspalten von Verbindungen (Fette, Zucker, Proteine...) unter „Einlagerung“ von Wasser: s.Bsp 3 S,S', S'' = Substrate
Bsp.3: $S+H_2O \rightleftharpoons S' + S''$	
4. Lyasen	Nichthydrolytische Spaltung von Gruppen , wobei Doppelbindungen entstehen können: s. Bsp. 4 G1,G2 = Gruppen, S = Substrat, R=Rest
Bsp. 4: $G_1-S-G_2-R \rightleftharpoons G_1-G_2 + S=R$	
5. Isomerasen	Umlagerung von Molekülteilen : s. Bsp. 5 S= Substrat, L,D=Drehrichtung im polarisierten Licht
Bsp. 5: $S(L) \rightleftharpoons S(D)$	
6. Ligasen - DNA-Synthetasen - Sythetasen - Carboxylasen	Aufbau von chemischen Verbindungen unter Verbrauch von Energie: s. Bsp 6 xTP = energiereiche Triphosphat- Bindung xDP = energiereiche Diphosphat- Bindung P = Phosphat nach Abspaltung S,S' = Substrate
Bsp. 6: $xTP + S + S' \rightleftharpoons xDP + P + S-S'$	

1.3 Kenndaten der Enzyme

Papain:

Gewinnung und Aktivität:

Papain (MG 23000-27000) wird aus dem Milchsaft (Latex) unreifer Früchte des tropischen Melonenbaums *Carica papaya* Linné durch fraktionierte Zentrifugation und Ultrafiltration gewonnen. Das Konzentrat aus Papaya-Peptidase 1 oder Papain wirkt endoproteolytisch und katalysiert die Spaltung von Peptid-, Amid- und Esterbindungen, an denen die Aminosäuren Arginin, Lysin und Phenylalanin gebunden sind. Das Enzym ist im pH-Bereich von 3-10 aktiv. (81)

Chymotrypsin (Ct):

Gewinnung und Aktivität:

Ct wird durch Extraktion in wässrigem Medium und durch fraktionierte Fällung aus dem sauren Pankreassaft von Rindern (kontrollierte Bestände) hergestellt und in leicht alkalischem Milieu in die aktivierte Form überführt. Nach Ultrafiltration und chromatographischer Aufreinigung wird das Enzym in kristalliner Form gewonnen.

Das Gemisch aus Ct A und B hydrolysiert Peptid-, Amid- und Esterbindungen, an denen die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan sowie weniger intensiv Leucin, Methionin oder Glutaminsäure gekoppelt sind. Der aktive Bereich ist zwischen pH 2 und 10.(81)

Trypsin:

Gewinnung und Aktivität:

Trypsin wird aus dem sauren Pankreassaft von Hausschweinen (kontrollierte Bestände) durch fraktionierte Fällung im wässrigen Milieu und durch Aktivierung des Trypsinogens im leicht alkalischen pH-Bereich gewonnen. Das Gemisch aus Alpha-, Beta- und Gammatrypsin hydrolysiert Peptid-, Amid- und Esterbindungen, an denen die basischen

Aminosäuren Arginin und Lysin beteiligt sind. Die Aktivierung des Trypsinogens wird durch Ca^{++} -Ionen beschleunigt. Der aktive pH-Bereich ist zwischen 2 und 9. Näheres s. Tab. 1.3.1 . (81)

Tabelle 1.3.1 Chemische Kenndaten pflanzlicher (Papain, Bromelain) und tierischer (Trypsin, Chymotrypsin) Enzyme (75).

	Papain	Bromelain	Trypsin	Chymotrypsin
Bezeichnung	EC Nr. 3.4.22.2	EC Nr. 3.4.22.4	EC Nr. 3.4.21.4	EC Nr. 3.4.21.1
Klassenbezeichnung	Cysteinprotenase	Cysteinprotease	Serinprotease	Serinprotease
Molekularmasse	ca. 22900	17800–20000	24000	25310 (A) 24850 (B)
isoelektrischer Punkt	8,75	9,4 9,7 5,6	10,1	8,5
Bandenzahl	2	3 (5)	2	1
Begleitstoffe	Peptide, Aminosäuren, KH 8%, Lipide 2%	2% Kohlenhydrate		
Fremdaktivitäten	Lysozym Chymopapain	saure Phosphatase Peroxidase	Chymotrypsin	Trypsin
Stabilitätsoptimum	pH 4,5–6,5	pH 4,5	pH 3,0	pH 2,0
Aktivitätsoptimum	pH 6,4	pH 6,6	pH 7,0–9,0	pH 7,0–9,0
Inaktivierung	pH < 4 pH > 10	pH < 3 pH > 8		pH < 2, > 10
Temperaturstabilität	55–60° C	50° C	25° C	25° C
Temperaturinaktivierung	> 70° C	> 68° C		
spezifische Aktivatoren	Reduktionsmittel -SH, Nucleophile EDTA	Reduktionsmittel -SH, Nucleophile EDTA	Ca^{2+}	Ca^{2+}
spezifische Inhibitoren	Oxidationsmittel Übergangsmetalle Jodacetat	Oxidationsmittel Übergangsmetalle -S-S-	Ts-Lys- CH_2 Aprotinin u. a.	Ts-Phe- CH_2 Chymostatin u. a.
Spezifität	-lys-, -arg-, -phe -peptide -ester	lys-, ala-, tyr-, gly-, -peptide -ester	arg-, lys- -peptide, -amide -ester	tyr-, trp-, phe-, leu-, -peptide -ester

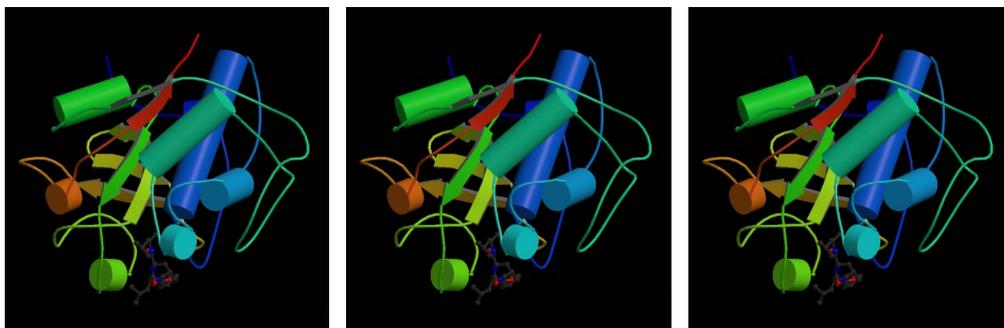


Abb. 1.3.2 Röntgenkristallographische Darstellung von Papain, Trypsin und Chymotrypsin (82)

1.4 Resorption von Enzymen

Schwierig gestaltet sich die Verabreichung von Enzympräparaten als Fremdproteine: die orale Verabreichung beinhaltet den nicht unerheblichen Abbau des Wirkstoffes durch körpereigene Enzyme, systemisch steht die bedeutende Frage einer potentiellen anaphylaktischen Reaktion des menschlichen Organismus im Raum.

Mehrere Arbeiten haben die Resorption hochmolekularer Proteine beschrieben (28;51;42;72), die Resorptionsraten schwanken je nach Bestimmungsmethoden zwischen weniger als 1% bis zu 30-40% (60). Andere Untersuchungen ermittelten mittels radioaktiver und immunologischer Nachweismethoden substanzbezogene Resorptionsraten (65) :

7 % Papain

28% Trypsin

16% Chymotrypsin

Als Resorptionsmechanismen werden die Endozytose über die zylindrischen (M-) Zellen oberhalb der Peyerschen Plaques, „vagabundierende“ Lymphozyten (35;60;64;65) und die Persorption (parazelluläre Resorption) (35;71) beschrieben. Diese Resorptionsmechanismen finden auch bei der enteralen Aufnahme körpereigener Pankreasenzyme, einem enteropankreatischen Kreislauf folgend, statt. (41;42;43;44;60). Untersuchungen der Magensaftresistenz von Trypsin und Chymotrypsin zeigten eine 5-8 mal höhere Magensaftresistenz von Chymotrypsin gegenüber Trypsin (s. Abb. 1.3.2)

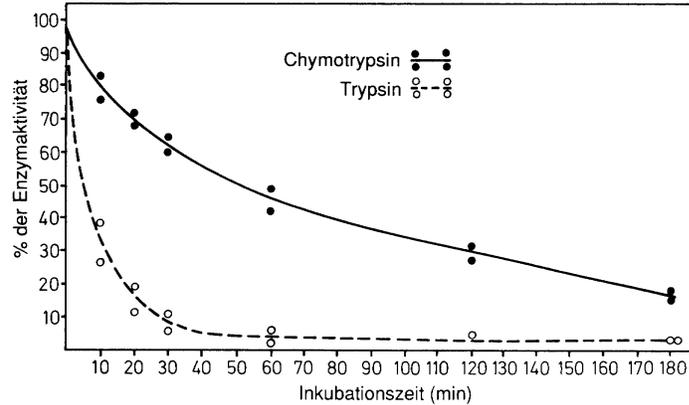


Abb. 1.4.1 Enzymatische Stabilität von Trypsin und Chymotrypsin im menschlichen Magensaft (nach Connell et al. 1963 aus 75)

Da die Resorption von Makromolekülen eine aktive Stoffwechsellleistung ist und die Transportsysteme eine begrenzte Kapazität aufweisen, treten starke interindividuelle Schwankungen auf. (22;73). Bestes Beispiel ist hier das Insulin. Der Versuch der oralen Applikation kam bis heute nicht zur klinischen Anwendung, da die unterschiedlichen Resorptionsraten außerhalb der therapeutischen Breite liegen. (18;26).

1.5 Anwendungsgebiete von Enzympräparationen

Tab. 1.5.1 Auszug von Einsatzgebieten der Enzymtherapie (aus 80)

HNO/Zahnchirurgie	<p>Besserung von chronischen Sinusitiden unter Enzymtherapie (R.Wohlrab)</p> <p>Besserung des postoperativen Verlaufs nach Zahnextraktionen und einer Strahlenmukositis (K.Vinzenz et al.)</p>
Geriatric	Positive Einflüsse im Alterungsprozeß (M.Vogler)
Gynäkologie	<p>Behandlung des Lymphödems (M.Wald, M.Korpan)</p> <p>Behandlung der fibrozystischen Mastopathie (J.Adamek)</p> <p>Behandlung bei Mastopathie und Adnexitis (E.Rammer)</p> <p>Schwellungsreduktion bei der Episiotomie (L.N. Baumgartner)</p> <p>Einsatz bei der Endometriose (F.-W. Dittmar)</p>
Infektiologie	<p>Positiver Einfluß bei Lyme-Arthritis (R.Gasser)</p> <p>Schmerzreduktion bei Herpes Zoster (P. Billigmann)</p>
Neurologie	<p>Supportiver Einsatz bei Multipler Sklerose (U. Baumhackl)</p> <p>Positiver Einfluß auf autoimmune T-Zell-Antwort durch Enzyme (P.V. Lehmann)</p>
Onkologie	<p>Gute Erfahrungen bei supportiver Tumorthherapie (H.Wrba)</p> <p>Therapiealternative beim multiplen Myelom im Anfangsstadium (A.Sakalova)</p> <p>Supportive Therapie beim multiplen Myelom (L.Desser)</p>

Weiter Tab. 1.5.1 Auszug von Einsatzgebieten der Enzymtherapie (aus 80)

	<p>Supportive Therapie beim Mamma Ca (O.v. Rokitansky)</p> <p>Reduktion von Strahlennebenwirkungen (F.Beaufort)</p> <p>Verringerung von Bleomycin induzierten Nebenwirkungen (G.Stauder)</p>
Phlebologie	<p>Positiver Einfluß beim Postthrombotischen Syndroms (H.-D. Klimm)</p> <p>Supportive Behandlung bei Thrombophlebitis und Ulcus cruris (D. Berg)</p>
Rheumatologie	<p>Einsatz bei chronischer Polyarthritis (K.Miehlke)</p> <p>Positiver Einfluß auf den Zytokinhaushalt bei rheumatischen Erkrankungen (W. Kullich)</p> <p>Behandlung des M. Bechterew (G.Stauder)</p> <p>Positive Ergebnisse einer Praxisbehandlung des Weichteilrheumatismus (K. Uffermann)</p>
Traumatologie	<p>Verbesserter Hämatomabbau. (M.W. Kleine)</p> <p>Positiver Einfluß auf Sportverletzungen (N.Bachel, Van Eimeren et. al.)</p> <p>Besserung von Schmerzen nach Sprunggelenksdistorsionen (H.-D. Rahn)</p> <p>Besserung bei Wirbelsäulenschmerzsyndromen (H.Tischler)</p>
Urologie	<p>Positive Ergebnisse bei der Behandlung chronisch abakteriellen Prostatitiden. (K.Kerbl)</p> <p>Besserung von Behandlungsergebnissen bei chronischen Harnwegsinfekten (P.Schlüter)</p>

Tab. 1.5.1 stellt eine Teilübersicht über die heutigen Einsatzgebiete der Enzymtherapie dar. Es ist zu sehen, daß immunologische Aspekte bei einem Großteil Anwendungen beteiligt sind. Im Diskussionsteil soll näher auf dieses Thema eingegangen werden.

1.6 Geschichtliches der Vitamin A- und Retinoidtherapie

In dem Ebers Papyrus, das ca. 1500 v.Chr. verfaßt wurde, berichtet Ebell 1973, wird eine Therapieanleitung zur Behandlung der Nachtblindheit mit Vitamin A vorgestellt (30). Nur wurde sehr lange Zeit verkannt, daß in dieser rituellen Verabreichungsformen (topisch) von gerösteter Ochsenleber auf das Auge eine Nachtblindheit (Hemeralopie) nicht zu heilen ist, sondern nur eine Verhinderung überschießender Produktion von trockenem verhornendem Epithel (Xerophthalmie) dieser Therapieform zugänglich ist. *Hussaini et al.* konnten dieses Mißverständnis aufklären, da dieses Ritual nahezu identisch in Java praktiziert wurde mit dem Unterschied, daß hier Lammleber gebraucht wurde, aus der der gewonnene „Lebersaft“ topisch aufgetragen und die Leber selbst nicht verworfen, sondern den Kindern zur „Beruhigung“ zum Essen gegeben wurde (39).

Auch Hippocrates (460-327 v. Chr.) beschäftigte sich mit der Nyktalopie (nyktos=Nacht, alaos=blind, opteo=Auge) und erwähnte, daß hauptsächlich Kinder mit Infektionskrankheiten wie der Otitis, dem Soorachen und Fieber von der Nyktalopie befallen wurden. Als Therapie wird hier die Verabreichung von roher Rindsleber „so groß wie möglich“ und getränkt in Honig (vermutlich um die Angelegenheit ein wenig schmackhafter zu gestalten) empfohlen. Galen, ein Schüler des Hippokrates, empfiehlt das kontinuierliche Essen von Ziegenleber, eine frühe Form der kontinuierlichen Vitamin-A Substitution (46). Des weiteren fand *Bates* bei Vitamin A mangelernährten Vorschulkindern aus Indonesien, daß diese deutlich immungeschwächt waren. (7)

Um 1842 entdeckte *Budd*, daß Vitamin A Mangel epitheliale Defekte begünstigte (20). Er bezog seine Beobachtungen an einen von Magendie durchgeführten Versuch (1817). Magendie verabreichte Hunden Wasser und Zucker als einzige Nahrung. Nach nur drei Wochen wurden die Hunde krank und bekamen u.a. Ulzerationen an der Kornea, die nicht abheilten. Er führte dies auf einen Mangel an Amininen zurück (*vita (lat.) = das Leben*). *Budd* postulierte in seiner Arbeit, daß ein Vitamin A Mangel für diese Erscheinungen verantwortlich sein müßte und verwies auf Beobachtungen von Seefahrern mit ähnlichen Erscheinungen bei relativer Mangelernährung.

Viele andere Arbeiten am Ende des letzten und Anfang dieses Jahrhunderts wurden an selektiv Vitamin A mangelernährten Tieren durchgeführt, an denen die hauptsächlichen Mangelsymptome wie Sehverschlechterung, verminderte Epitheldifferenzierung und schlechtes Wachstum erforscht wurden (79).

1930 wurden die beiden Hauptformen des Vitamin A, Retinol und sein Vorläufer *b*-Carotin, beschrieben. (47)

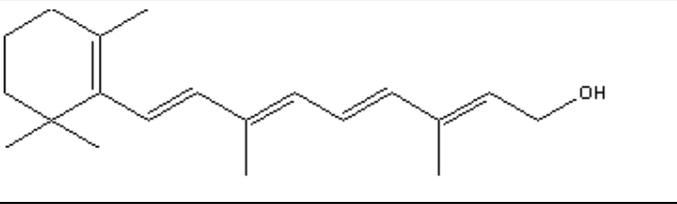
1.7 Einteilung von Vitamin A und der Retinoide

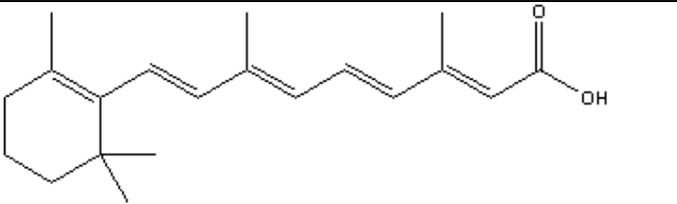
Nach der Definition der internationalen Nomenklatur (IUPAC,1991) werden unter dem Oberbegriff der Retinoide alle wirksamen Vitamin A-Derivate vereint. Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch werden unter Retinoiden die Retinsäure und ihre synthetischen bzw. natürlichen Derivate verstanden. Im Gegensatz dazu wird unter Vitamin A die Bezeichnung für natürliche Derivate mit allen Vitamin A-Wirkungen verwendet. Retinsäure kann durch seine Wirkungen nicht dem Begriff des Vitamin A zugeordnet werden, da es nicht alle biologischen Wirkungen unterstützen kann wie, z.B. den Sehvorgang oder den Einfluß auf die Spermio-genese. Der Grund liegt in der Endgültigkeit des Stoffwechselweges (s. Abb. 1.8.1) der Retinsäure, als einem am höchsten oxidierten Produkt ohne eine Möglichkeit der Reduktion zu Retinal oder

Retinol. Retinol kann im Gegensatz dazu aus allen anderen Derivaten im Vitamin A-Stoffwechsel entstehen. (47)

1.8 Kenndaten zu Retinol und Retinsäure

Die in dieser Arbeit verwendeten Vitamin A-Derivate sind *all-trans-Retinol* und *all-trans-Retinsäure*. (82)

all-trans-Retinol	
Strukturformel:	
Summenformel:	$C_{20}H_{30}O$
Molekulargewicht:	286.46
Schmelzpunkt:	62-64 C°
Siedepunkt:	137-138 C°

all-trans-Retinsäure	
Strukturformel:	
Summenformel:	$C_{20}H_{28}O_2$
Molekulargewicht:	300.44
Schmelzpunkt:	180-181 C°
Siedepunkt:	

1.9 Resorption und Pharmakodynamik des Vitamin A und der Retinoide

Retinol findet sich in tierischen Quellen (Leber, Eier, Milch und Milchprodukte), *b*-Carotin hingegen in pflanzlichen (Karotten, Spinat, Tomaten, Kohl und Blumenkohl).

b-Carotin wird durch das Enzym Dioxygenase in der intestinalen Mucosa in zwei Moleküle Retinal aufgespalten (s.Abb. 1.9.1), welches wiederum durch $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu Retinol reduziert oder zu Retinsäure oxidiert werden kann.

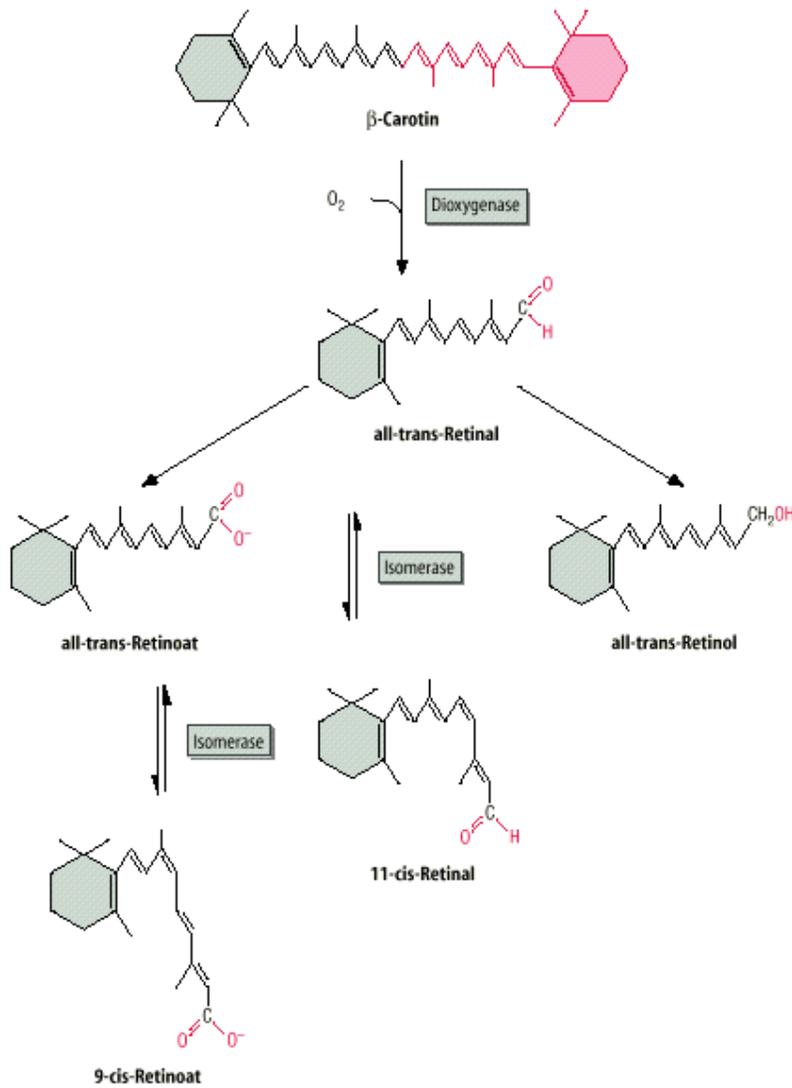


Abb. 1.9.1 Spaltung des *b*-Carotins in zwei Moleküle all-trans-Retinal durch eine Dioxygenase (77)

b-Carotin wird nur teilweise, zu etwa 15%, zu Retinol metabolisiert (32). Dieser Metabolismus ist abhängig vom Nahrungsprotein- und, Fettanteil, Vitamin E und Zink (36). Hohe Vitamin A-Plasmaspiegel führen zu einer negativen Rückkopplung der Resorption und enzymatischen Konversion des *b*-Carotin. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß eine hohe *b*-Carotin Zufuhr im Gegensatz zum Retinol nur gering toxisch wirkt (10;11). Die Vitamine werden in der Leber gespeichert und zusammen mit dem Retinol-Bindenden Protein für den täglichen Bedarf von 1000 µg Retinol-Äquivalent freigesetzt oder über die Galle ausgeschieden. Die Oxidierung zur Retinsäure ist irreversibel. (Abb. 1.9.2).

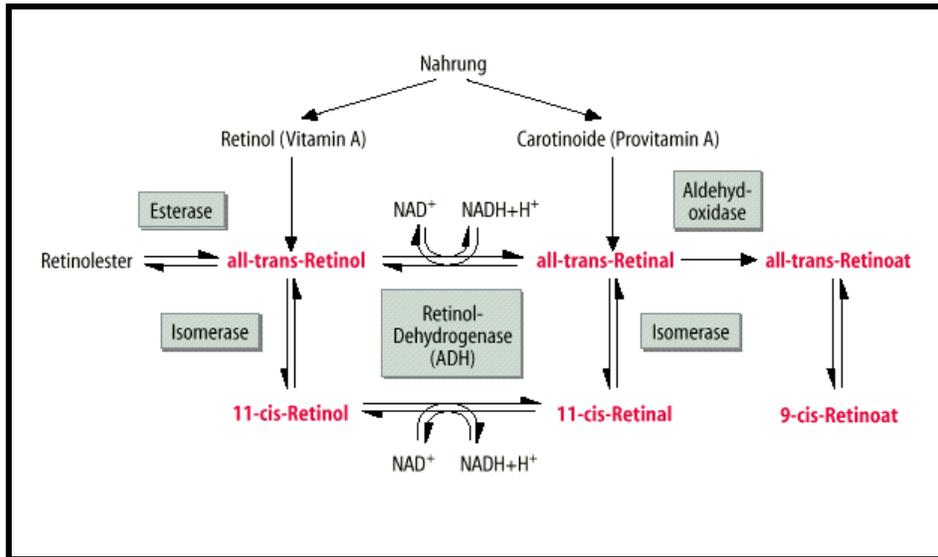


Abb 1.9.2 Stoffwechsel des Retinols und der Carotinoide (aus 77).

Wie oben erwähnt, gilt eine Konversionsrate von 15% . Falls das *b*-Carotin nicht gespalten wird, kann es nachträglich in der Leber aber auch in der Lunge zu Retinol verstoffwechselt werden.

Die Resorption von Retinol vollzieht sich im Dünndarm und erfordert die Anwesenheit von Gallensalzen zur Mizellenbildung. Die Aufnahme von Retinol in physiologischen Konzentrationen erfolgt durch einen trägervermittelten passiven energieunabhängigen Transport in die

Mucosazellen. Befinden sich höhere Konzentrationen im Darmlumen, erfolgt der Transport durch passive Diffusion. In der Mucosazelle wird Retinol mit langkettigen Fettsäuren (Palmitat und Stearat (Acyl-CoA)) verestert. Bei diesem Prozeß wird Retinol vermutlich durch ein zytoplasmatisch retinolbindendes Protein (CRBP II) transportiert. Anschließend erfolgt die Einschließung als Retinylester in Chylomikronen und der Transport über den Ductus thoracicus in die Blutbahn (40). Die Resorption von Retinsäure verläuft anfangs ähnlich. Die Retinsäure gelangt, ohne den Ductus thoracicus zu durchlaufen, direkt in die Blutbahn. Von der Pfortader kann die Retinsäure in der Leber glukuronidiert werden und unterliegt von nun an dem enterohepatischen Kreislauf. Die Retinylester werden von peripheren Geweben teilweise aufgenommen (11) und können dort auch gespeichert werden (9;10). Der überwiegende Teil verbleibt in den Chylomikronen und wird in der Leber kurzfristig (Parenchymzellen) oder langfristig (Stellatumzellen) gespeichert. Aus den Speichern erfolgt die Ausscheidung des Hydrolysats Retinol, welches an das retinolbindende Protein (RBP) gebunden und im Blut an Transthyretin (Präalbumin) gekoppelt transportiert wird. An der Zielzelle angelangt, wird das Retinol über einen spezifischen Rezeptor in die Zelle aufgenommen (CytoplasmaticRetinolBindingProtein). In der Zelle wird Retinol an ein zytoplasmatisches retinolbindendes Protein gebunden bzw. zu Retinsäure oxidiert. Die Retinsäure hat ihr eigenes Bindungsprotein, das cytoplasmatische Retinsäure bindende Protein (CytoplasmaticRetinoicAcidBindingProtein). Dieses transportiert die Retinsäure direkt zum Kernrezeptor und regelt hier die Expression von Wachstumsfaktoren, die für die Differenzierung und das Wachstum der verschiedenen Gewebe verantwortlich sind (14) Dieser Kernrezeptor gehört zu der Familie der Steroid-Thyroidhormonrezeptoren. Je nach Rezeptortyp (RAR, α , β , τ , RXR) werden durch die unterschiedliche Verteilung in den verschiedenen Geweben das Wachstum und/oder die Differenzierung der Zellen verschiedenartig beeinflusst. Die Bindung von Retinsäure und den Retinoiden bewirkt eine Konformationsänderung des

Rezeptors und die Hemmung bzw. Aktivierung der Gene, die „retinsäuresensitiv“ sind. Da die Gewebsverteilung der verschiedenen Rezeptoren sehr verschieden ist, können so die quantitativ und qualitativ verschiedenen gewebstypischen Wirkungen erklärt werden (21). (s. Abb. 1.9.3)

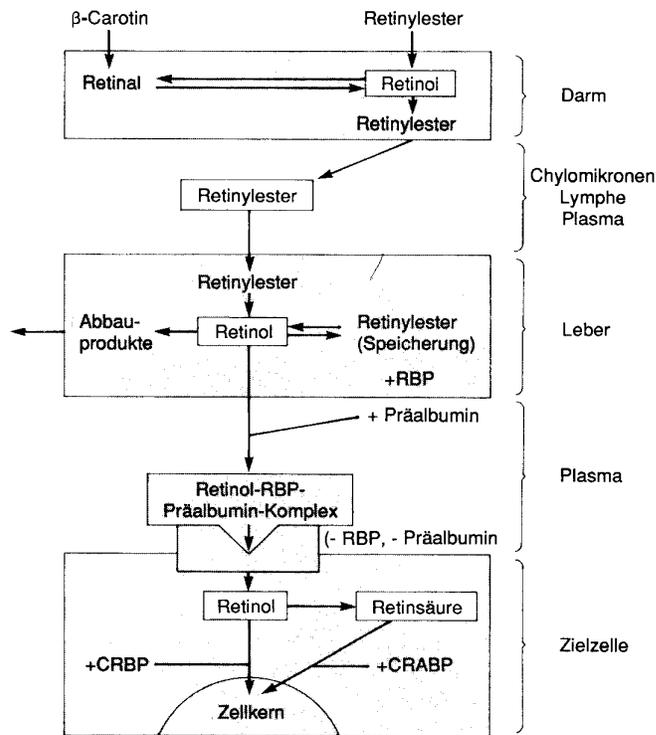


Abb 1.9.3 Stoffwechselweg von Retinol (aus 53)

1.10. Anwendungsgebiete von Vitamin A und der Retinoide

Neben den bekannten Anwendungsgebieten von Vitamin A und seinen Derivaten bei Mangelerscheinungen mit Manifestationsort an den Augen wie der Hemeralopie (Nachtblindheit), der Xerophthalmie (überschießende Mehrproduktion von Epithel auf der Cornea) und der Psoriasis (Schuppenflechte) der Haut, wurde in den letzten Jahren vermehrt versucht, Vitamin A und die Retinoide in der onkologischen Therapie zu

etablieren. Wirkungen auf die Differenzierung von Epithelien, die Kanzerogenese und das Immunsystem sind in zahlreichen Arbeiten untersucht worden, und Anwendungsgebiete übertragen (7;8).

1.11 Die Immunantwort

In der Vielfalt seiner Funktionen läßt sich das Immunsystem mit dem Nervensystem vergleichen. Beide Systeme sind nicht klar abgegrenzt und durchdringen die meisten Gewebe des Körpers. Beim Menschen wiegen alle Bestandteile des Immunsystems zusammen knapp ein Kilogramm. Dazu gehören ungefähr 10^{12} Zellen, die Lymphozyten, sowie rund 10^{20} Moleküle, die Antikörper, die von Lymphozyten produziert und sezerniert werden. Das Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, daß es fremde wie auch eigene Muster von Moleküloberflächen zu erkennen vermag. (87).

Die erste Antwort des Immunsystems auf ein Pathogen besteht in einer angeborenen stereotypen Reaktion, an der Makrophagen und Granulozyten beteiligt sind. Sie dient der Begrenzung der Infektion für einige Tage, bis die adaptive Immunantwort einsetzt. Diese wird von den T- und B-Lymphozyten getragen. Vorläufer beider Zelltypen werden im Knochenmark gebildet. Während die B-Lymphozyten im Knochenmark ihre endgültige Reifung durchmachen, verlassen Vorläuferzellen der T-Lymphozyten das Knochenmark und wandern in den Thymus ein. Bei der Reifung der Lymphozyten im Knochenmark bzw. Thymus machen die Zellen einen mehrstufigen Differenzierungsprozeß durch, im Rahmen dessen es zu einer Umlagerung von Genen für den T-Zellrezeptor bei den T-Lymphozyten und für den B-Zellrezeptor bei den B-Lymphozyten kommt. Durch die genetische Rekombination von Genen für die variablen und konstanten Anteile der Ketten für diese Rezeptoren entsteht ein extrem großes Repertoire von B- und T-Lymphocyten, von denen jeder einzelner seinen individuellen Rezeptor trägt. Bevor die Zellen den Thymus bzw. das Knochenmark wieder verlassen, werden sie auf ihre Funktion und die Unterscheidung von selbst und nichtselbst selektioniert.

Im Blut zirkulieren diese Zellen als naive T- und B-Lymphozyten, die nach Kontakt mit dem passenden Antigen aktiviert werden.

Antigene sind körperfremde Substanzen, die meist Proteincharakter haben, aber auch bakterielle Polysaccharide oder sogar Nucleinsäuren sein können. B-Lymphocyten binden extrazelluläre, häufig lösliche Antigene, die beim erstmaligen Kontakt internalisiert und partiell proteolytisch gespalten werden. Die dabei entstehenden Fragmente werden an den Proteinen des MHC-II-Komplexes präsentiert. Diese kommen auch auf Makrophagen vor, wo sie eine ähnliche Aufgabe erfüllen. Von MHC-II-Rezeptoren auf der Zellmembran präsentierte Peptide werden von T-Lymphocyten mit CD4-Korezeptoren erkannt. Dies löst über die Produktion von Zytokinen eine Aktivierung von B-Lymphocyten aus. T-Lymphocyten erkennen ausschließlich Peptidfragmente, die durch intrazelluläre Proteolyse von infektiösen Organismen oder infolge Transformation synthetisierter fremder Proteine entstehen, die mit dem MHC-I-Komplex präsentiert werden und prinzipiell auf allen Körperzellen vorkommen können. Die Bindung derartig präsentierte Antigene löst die Aktivierung der T-Lymphocyten aus.(77)

Wird ein einzelner Lymphozyt aktiviert (auch z.B. durch Lymphokine bzw. Zytokine), so setzt zunächst eine klonale Expansion ein, und die Nachkommen der Zellen differenzieren zu Effektorzellen, die im Falle der B-Lymphocyten als Plasmazellen Antikörper bilden und sezernieren, während T-Lymphocyten zytotoxisch wirksam sind oder Helferfunktion entfalten.

Plasmazellen bilden zunächst pentamere IgM-Moleküle, später kommt es dann zu einer Umschaltung auf die Immunglobulin-Isotypen IgG, IgA oder IgE, die unterschiedliche biologische Funktionen besitzen. IgG ist placentagängig, IgA im Schleimhautbereich wirksam und IgE an allergischen Reaktionen vom Soforttyp beteiligt. Für die Umschaltung der Immunglobulinklassensynthese ist die Wechselwirkung mit Blut T-Lymphocyten erforderlich, die durch Oberflächenmoleküle und Zytokine vermittelt wird.

Das Komplement-System ist sowohl Bestandteil der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Die Aktivierung des Systems fördert die Opsonierung von Bakterien und anschließende Phagozytose, wirkt chemotaktisch auf Granulozyten und zerstört Bakterien direkt durch die Bildung membranangreifender Komplexe.(77)

Die in dieser Arbeit betrachteten Immunantworten beziehen sich, wie schon erwähnt, auf die Aktivität von NK-Zellen und CD 8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Diese basieren auf einer zellulären, nicht Antikörper gesteuerten Immunantwort, auf die nachfolgend vertieft eingegangen wird.

1.12 Major histocompatibility complex MHC, der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

Die MHC-Moleküle waren schon lange bekannt, bevor man ihre eigentliche Funktion im Immunsystem richtig einschätzen konnte. Die MHC-Moleküle verhalten sich als zentrale Zielstrukturen bei Transplantations-Reaktionen. Wenn man Gewebe auf ein Individuum derselben Art (Allo-Transplantat) oder auf ein Individuum einer anderen Art (Xeno-Transplantat) überträgt, wird es gewöhnlich abgestoßen. In den 50er Jahren wurde durch Experimente mit Haut-Transplantationen zwischen verschiedenen Mäusestämmen nachgewiesen, daß es sich bei der Transplantat-Abstoßung (graft rejection) um eine Immunantwort gegen fremde Antigene auf der Oberfläche der transplantierten Zellen handelt (86). Später stellte sich heraus, daß diese Reaktionen hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt wurden, die sich gegen genetisch „fremde“ Versionen von Oberflächen-Antigenen richteten, auch Histokompatibilitäts- (Gewebeverträglichkeits) Antigene genannt. Dabei sind die Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene mit Abstand am wichtigsten. Sie werden von einem Komplex von Genen codiert, dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (Major histocompatibility complex, MHC). Alle höheren Vertebraten besitzen MHC-Moleküle der einen oder anderen

Form auf der Plasmamembran ihrer Zellen. MHC-Moleküle wurden zuerst in Mäusen nachgewiesen und dort H-2 -Antigene (Histokompatibilitäts-Antigene 2) genannt. Da man sie bei Menschen zunächst auf Leukozyten entdeckte, heißen sie hier HL-Antigene (humane Leukozyten-Antigene). Nachfolgend sind die 3 Haupteigenschaften aufgeführt: Erstens bilden MHC-Antigene bei der T-Zell-vermittelten Transplantations-Abstoßungsreaktion das Hauptangriffsziel. Zweitens ist ein größerer Anteil von T-Zellen in der Lage, gegen fremde MHC-Antigene zu reagieren: Während gewöhnlich weniger als 0,001 % aller T-Zellen eines Individuums gegen ein z. B. typisch virales Antigen gerichtet ist, steigt dieser Anteil bei einem einzigen fremden MHC-Antigen auf über 0,1 % an. Drittens zeigen die für die MHC-Glykoproteine codierenden Loci den stärksten Polymorphismus, den man bei höheren Wirbeltieren kennt. Dies bedeutet, daß innerhalb einer Art an jedem dieser Loci eine außergewöhnlich große Zahl von Allelen (in manchen Fällen bis zu hundert) — also alternative Formen des gleichen Gens — angetroffen werden und jedes dieser Allele in recht hohen Frequenzen auftritt. Diese große Zahl von Allelen zusammen mit der Tatsache, daß jedes Individuum über fünf oder mehr unterschiedliche für MHC-Glykoproteine codierende Gen-Loci verfügt, macht es so schwierig, zwei Individuen zu finden, die genau die gleichen MHC-Antigene haben. Nur dann könnte man, wie oben bereits ausgeführt, gefahrlos Gewebetransplantationen vornehmen (wie z. B. bei genetisch identischen Zwillingen).(83)

Ein Wirbeltier muß sich unter natürlichen Bedingungen nicht gegen Invasionen von fremden Zellen anderer Mitglieder der gleichen Art wehren. Diese Eigenschaft der T-Zellen auf Reaktionen gegen fremde MHC-Antigene und deren großer genetischer Polymorphismus waren lange nicht bekannt. Die Lösung kam erst nach der Entdeckung, daß MHC-Moleküle dazu dienen, T-Lymphozyten auf die mit fremden (z. B. viralen) Antigenen beladenen Körperzellen aufmerksam zu machen. T-Zellen reagieren auf fremde MHC-Moleküle nämlich genau in derselben

Weise wie sie auf eigene MHC-Moleküle reagieren, die fremdes Antigen gebunden haben.(84;85)

Bis heute wurden zwei Klassen von MHC-Molekülen identifiziert, MHC-I und MHC-II. (Abb.1.12.1).

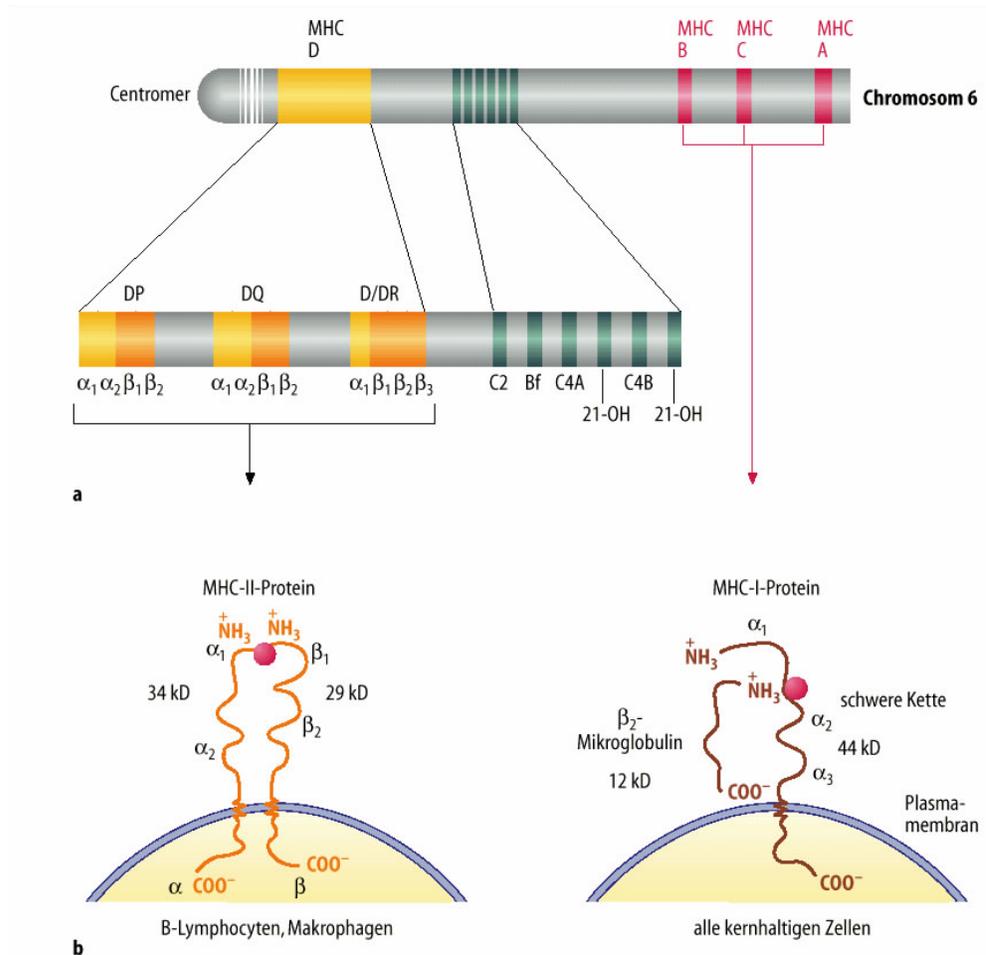


Abb. 1.12.1 MHC-Proteine an der Zelloberfläche. a) Genloci auf Chromosom 6, kurzer Arm, b) MHC als monomeres bzw. dimeres integrales Membranprotein. (aus 77)

Ihre wesentliche Funktion liegt in der Präsentation fremder Antigene gegenüber cytotoxischen- T-Zellen bzw. Helfer- T-Zellen. Während Klasse I-MHC-Moleküle auf nahezu allen Vertebraten -Zellen exprimiert werden, beschränken sich Klasse II-MHC-Moleküle normalerweise nur auf wenige

mit Helfer-TZellen in Kontakt tretende Zelltypen, wie z. B. B-Lymphozyten und Makrophagen. Beide Klassen von MHC-Molekülen haben Immunglobulin-ähnliche Domänen und eine Peptid-bindende Furche, die kleine Peptid-Fragmente als Abbauprodukte von Fremdproteinen binden kann. Jedes MHC-Molekül kann eine große und charakteristische Auswahl von Proteinen binden. (93) Nach ihrer Bildung im Zellinneren werden die Peptid/MHC-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Zusätzlich zu ihren Antigen-spezifischen Rezeptoren, die für die Erkennung der Peptid/MHC-Komplexe an der Zelloberfläche zuständig sind, exprimieren T-Zellen auch CD4- oder CD8-Co-Rezeptoren, die die nicht-polymorphe Regionen von MHC-Zellen auf der Zielzelle erkennen können: Helfer- T-Zellen exprimieren CD4, welches Klasse II-MHC-Moleküle erkennt, während cytotoxische T-Zellen CD8 exprimieren, welches Klasse I-MHC-Moleküle erkennt.(84;94)

Wie zuvor erwähnt, arbeiten cytotoxische T-Zellen gegen intrazellulär wachsende Mikroorganismen wie z. B. Viren, die also außerhalb der Reichweite von Antikörpern liegen. Cytotoxische T-Zellen können im Gegensatz zu Antikörpern derart infizierte Zellen erkennen, weil Klasse I-MHC-Moleküle ständig Protein-Fragmente zur Zelloberfläche transportieren und sie dort für T-Zellen erkennbar machen.

Der erste Beweis dafür, daß MHC-Moleküle den T-Zellen fremde Antigene präsentieren, stammte aus folgendem Experiment : Es wurde gezeigt, daß cytotoxische T-Zellen aus einer Virus-infizierten Maus in Kultur gehaltene Zellen, die mit demselben Virus infiziert worden waren, nur dann töten konnten, wenn diese Kulturzellen dieselben MHC-Moleküle exprimierten wie die Maus selbst . Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß T—Zellen jedes beliebigen Individuums spezifische Antigene nur dann erkennen werden, wenn dieses an die körpereigene genetische Variante des MHC-Moleküls gebunden ist — was man auch als *MHC-Restriktion* bezeichnet(97). In Experimenten mit Zellen, die mit dem Influenza-Virus infiziert worden waren, stellte sich heraus, daß einige der

Virus-aktivierten cytotoxischen T-Zellen spezifisch gegen interne Virus-Proteine gerichtet waren, die bei einem intakten Virus-Partikel gar nicht zugänglich wären. Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß die T-Zellen die Abbauprodukte von internen Virus-Proteinen erkannten. Weil eine T-Zelle äußerst geringe Mengen von Antigen erkennen kann (nur einige hundert Moleküle sind notwendig), genügt es, wenn nur ein geringer Teil der Fragmente abgebauter Virus-Proteine an die Zelloberfläche gelangt, um die Aufmerksamkeit einer cytotoxischen T-Zelle auf sich zu ziehen. Trotz allem gibt uns dieser Vorgang dennoch Rätsel auf (95).

Da man schon lange weiß, daß nahezu alle zelleigenen Proteine kontinuierlich abgebaut werden, war es auch kein Problem zu verstehen, wie die Produktion von Peptid-Fragmenten interner Virus-Proteine innerhalb einer infizierten Zelle abläuft. Schwieriger wird jedoch die Frage, wie diese Fragmente auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Wie gewöhnliche Zell-Proteine, werden Virus-Proteine an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert. Solche Proteine sind auf spezielle Mechanismen angewiesen, wenn sie das Cytoplasma verlassen, die Membran durchqueren und ein anderes Zell-Kompartiment erreichen sollen. Ein Protein, das für die Zelloberfläche bestimmt ist, beginnt seine Reise im Cytoplasma und dringt dann in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) ein. Die Frage, wie Virus-Proteine die Zelloberfläche trotzdem erreichen, wurde mit der Entdeckung eines bemerkenswerten Transportsystems gelöst, mit dessen Hilfe Vertebratenzellen solche Peptide vom Cytoplasma aus in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums transportieren. Einmal dort angekommen, findet die Begegnung mit den MHC-Molekülen statt, an die die Peptide binden, und mit denen zusammen sie dann an die Zelloberfläche transportiert werden (96).

1.13 Clusters of Differentiation (CD)

Der Thymus besteht aus mehreren Lobuli, die jeweils corticale (äußere) und medulläre (zentrale) Bereiche enthalten. Die in den *Cortex* des Thymus gelangten unreifen T-Zellen treten zunächst in eine Phase intensiver Proliferation ein. An die starke Vermehrung der Population schließt sich die Differenzierung an, im Rahmen derer die Zellen eine Reihe unterschiedlicher Stadien durchlaufen, die durch Umlagerungen der für den T-Zellrezeptor codierenden Gene und sekundär durch qualitative und quantitative Änderungen der Expression von Oberflächenmolekülen gekennzeichnet sind. Die letzteren können mit der FACS-(Fluoreszenz-aktivierter Cell Sorter) *Analyse* voneinander unterschieden werden. Dazu werden Zelloberflächenproteine über ihre Reaktion mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Von diesen auch als *Differenzierungsantigene* (clusters of differentiation, CD, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung numeriert) bezeichneten Oberflächenproteinen sind heute über 130 bekannt (CD1, CD2, CD3 etc.), die auf den verschiedensten Zellen des Immunsystems vorkommen. Erkenntnisse über ihre Funktion und Struktur wurden häufig erst lange nach ihrem erstmaligen Nachweis gewonnen.(77) CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten enthalten in ihrem Zellinnerem zytotoxische Proteine (Perforine, Granzyme) die sie beim Erkennen eines Antigens freisetzen, und die Zielzellen zerstören. Stimuliert werden die Zellen durch IL2. Durch Zugabe von IL2 in ein Kulturmedium kann die LAK Aktivität gesteigert werden. (98)

CD56 positive Zellen, die den Natürlichen Killerzellen zugeordnet werden, können durch Bildung von Zytokinen wie TNF- α eine Zielzelle zerstören. Die Aktivierung erfolgt hier ebenfalls durch Zytokine, die durch eine Aktivierung des Immunsystems oder durch Zugabe in das Kulturmedium bereitgestellt werden. (99)

II. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Etablierung einer durchflußzytometrischen Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von peripheren Blutlymphozyten. Mit dieser Methode soll der Einfluß potentieller Immunmodulatoren (Papain, Trypsin, Chymotrypsin und Vitamin A) auf die Funktion von PBL untersucht werden, um Kenntnisse über Dosierung und Wirkdauer der Immunmodulatoren *in vitro* zu erhalten.

III. Material und Methoden

3.1 Vorbereitung zur Durchführung von zytotoxischen Testmethoden

3.1.1 Isolierung von peripheren Blut Lymphozyten (PBL)

Lösungen und Blut

Buffy coat (BC) mit (Blutspendedienst
EDTA, ohne Plasma Frankfurt)

Ficoll-Histopaque-Lösung (d=1.007g/cm³) (Sigma, München)

Phosphate-buffered-saline (PBS) PH 7,2 steril

136 mM NaCl	(Merck, Darmstadt)
3 mM KCl	(Merck, Darmstadt)
0,5 mM MgCl ₂ 6H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
1,5 mM KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
1 mM CaCl ₂	(Merck, Darmstadt)

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM pH 7,2	(Gibco, Eggenstein)
10 % Fötales Kälber Serum (FCS)	(Gibco, Eggenstein)
2 mM L-Glutamin	(Gibco, Eggenstein)
1000 E/mg/ml Penicillin/Streptomycin	(Gibco, Eggenstein)
10mM HEPES	(Sigma, München)
18mM NaHCO ₃	(Merck, Darmstadt)
1 µl Inteleukin2 10.000 U/ml	(Biotest, Dreieich)

Medium (bei Lymphozytenkultivierung)

Die Isolierung von PBL aus Buffy Coat erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von Böyum et al.. Jeweils 25 ml des BC wurden vorsichtig auf 25 ml Ficoll-Histopaque-Lösung aufgeschichtet und 30 Minuten bei 350 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren erfolgte mit einer sterilen Transferpipette (Elkay, Dietzenbach) die Absaugung des weißen Lymphozytensaums (der eigentliche BC), der sich als sog. Interphase über dem Ficollkissen befand, während Erythrozyten und Granulozyten wegen ihrer höheren spez. Dichte unter der Ficollschicht auf dem Boden des ZR sedimentierten. Anschließend wurden die Lymphozyten in ein neues ZR 50 ml überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand abgegossen und in PBS resuspendiert (1. Waschschrift).

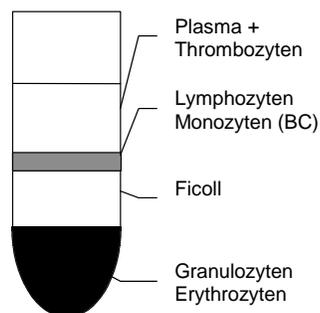


Abb. 3.1.1.2 Isolierung von Blutkomponenten mit einem Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten

Es erfolgten drei weitere Waschschriffe. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment in 30 ml Medium resuspendiert, dann in einer großen

sterilen Zellkultivierungsflasche (Fläche:175cm², NUNC Wiesbaden) in 220 ml Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 U IL2 /ml Medium.

3.1.2 Zelllinien

Die kommerziellen Zelllinien K562 und Raji sind bei der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) (23) erhältlich.

Bei der K562 Zelllinie (ATCC CLL 243) handelt es sich um eine menschliche, immortalisierte Zelllinie, die von Lozzio et al. (49;23) aus dem Pleuraerguß einer ca. 53 Jahre alten Frau mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) im terminalen Blastenstadium isoliert und etabliert wurde. Die Besonderheit dieser Zelllinie ist, daß sie keine MHC-I Oberflächenantigene exprimieren, daher spezifisch NK-Zell-sensitiv ist und somit zur Ermittlung der NK-Zellaktivität im Zytotoxizitätstest mit PBL dienen kann.

Die Zelllinie Raji (ATCC CLL 86) wurde von Pulvertaft (23) aus einer Infiltration des Unterkiefers eines 11 jährigen Jungen durch ein Burkitt-Lymphom Zellen etabliert. Diese lymphoblastenähnlichen Zellen weisen eine hohe MHC-I Expression auf, sind daher NK-Zell-resistent und werden zur Bestimmung der nicht MHC-abhängigen Lymphokin-aktivierten-Killerzell (LAK)-Aktivität von PBL herangezogen (Zytotoxische, T-Lymphozyten, (CD8+))

3.1.3 Kultivierung der Zelllinien K562, Raji und der PBL

Lösung zur Kultivierung der Zelllinien K562 und Raji:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| DMEM pH 7,2 | (Gibco, Eggenstein) |
| 10 % Fötale Kälber Serum (FCS) | (Gibco, Eggenstein) |
| 2 mM L-Glutamin | (Gibco, Eggenstein) |

1000 E/mg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein)
10mM HEPES (Sigma, München)
18mM NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)

Die Zelllinien K562 und Raji wurden im o.g. DMEM Medium in einem Gasbebrütungsschrank (Heraeus, Hanau) mit 5% CO₂ unter gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in sterilen Zellkultivierungsflaschen (Nunc Wiesbaden) gelagert. Das Medium wurde dreimal die Woche gewechselt. Die PBL wurden drei Tage nach erfolgter IL2 Stimulierung entsprechend nach Miescher et al. (52) in die Testphase überführt und zweimal pro Woche mit 1 ml DMEM aufgefüllt.

3.1.4 Bestimmung von Vitalität und Zellzahlen vor der Testung

Mit Trypanblau (Sigma, München) werden die Zelllinien auf ihre Vitalität hin geprüft. Das Prinzip ist, daß durch eine intakte Zellmembran kein Trypanblau in die Zellen dringen kann, und intakte Zellen somit nicht anfärbbar sind. Die Zellsuspension wird mit einer sterilen Pipette (Eppendorf, Deutschland) aus der Kulturflasche entnommen, 1:1 mit 0,5%iger Trypanblaulösung durchmischt und unter einem Lichtmikroskop (Olympus, Japan) in einer Thoma-Zählkammer (Schreck, Hofheim) mit ca. 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die Vitalität sollte über 95% liegen. Die PBL wurden vor jeder Testung in einer Thomakammer zum Einstellen der gewünschten Zellzahlen gezählt.

3.2 Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität

Zwei Testmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden hier eingesetzt. Die erste Methode ist der Europium releaseassay (12;16;19;48;55).

3.2.1 Europium releaseassay

Lösungen

Puffer A pH 7,4

50 mM HEPES	(Sigma, München)
93mM NaCl	(Merck, Darmstadt)
5 mM KCl	(Merck, Darmstadt)
2 mM MgCl ₂ 6H ₂ O	(Merck, Darmstadt)

Markierungspuffer (Labelpuffer) für K562-Zelllinie

870 µl Puffer A	
50µl DTPA (25mM in 0,01 M NaOH)	(Merck, Darmstadt)
50µl Eu-acetathydrat (10mM)	(Merck, Darmstadt)

Markierungspuffer (Labelpuffer) für Raji-Zelllinie

770 µl Puffer A	
100 µl DTPA (25mM in 0,01 M NaOH)	(Merck, Darmstadt)
100 µl Eu-acetathydrat (10mM)	(Merck, Darmstadt)

Waschmedium pH 7,2

DMEM	(Gibco, Eggenstein)
10% FCS	(Gibco, Eggenstein)
10mM HEPES	(Sigma, Eggenstein)
18mM NaHCO ₃	(Merck, Darmstadt)
1,6 mM CaCl ₂	(Merck, Darmstadt)

Inkubationsmedium

DMEM	(Gibco, Eggenstein)
10% FCS	(Gibco, Eggenstein)
10mM HEPES	(Sigma, München)
18mM NaHCO ₃	(Merck, Darmstadt)
1,6 mM CaCl ₂	(Merck, Darmstadt)
1000 E/mg/ml Penicillin/Streptomycin	(Sigma, München)
Enhancementlösung	(Pharmacia, Freiburg)

Prinzip

Mit einem Europium--Komplex (Eu-Diethylentriaminpentaacetat) markierte K562 oder Raji (=Targetzellen) werden mit PBL (=Effektorzellen) inkubiert. Der durch die Effektorzellen vermittelte Lyse der Targetzellen freigesetzte Eu-Komplexes bildet nach Zugabe einer Verstärkungslösung (=Enhancementlösung) einen fluoreszierenden Chelatkomplex. Die Menge des freigesetzten Eu-Komplex ist proportional zur Anzahl lysierter Targetzellen und kann in einem Fluorometer (Wallac, Turku Finnland) gemessen werden . Dazu werden Zelllinien folgendermaßen auf eine 96 Lochplatte (Wells) (Nunc,Wiesbaden) aufgetragen.

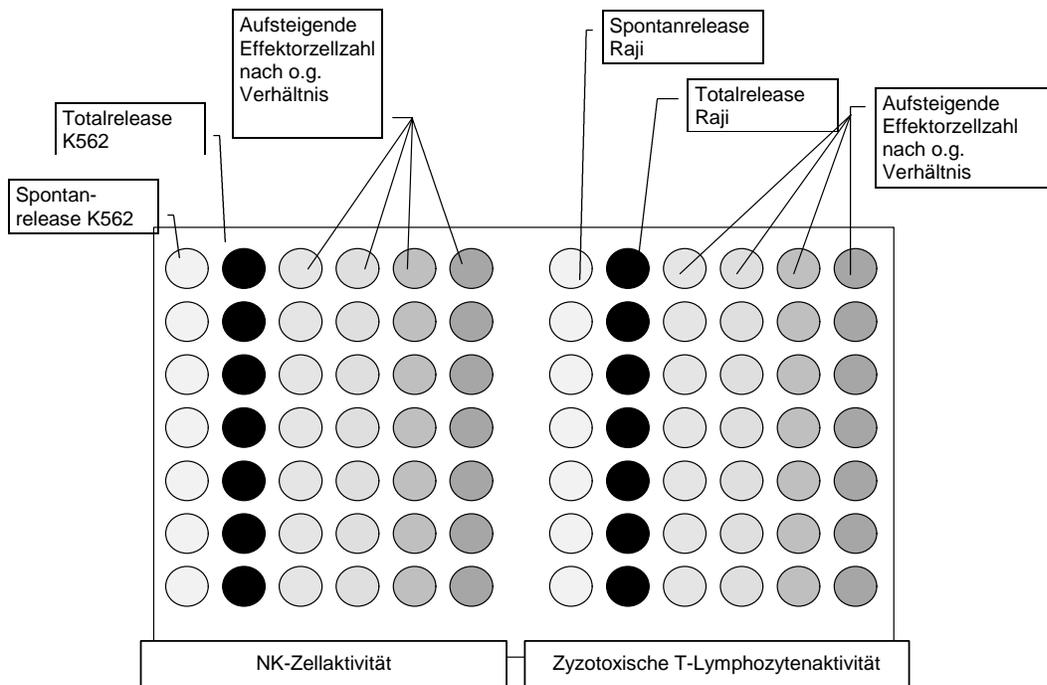


Abb. 3.2.1.1 Schematisierte Darstellung des Auftragemusters der ersten Reihe als Muster für die folgenden Reihen: Spontanrelease (SP) =spontan freiwerdende Eu-Komplexe; Totalrelease (TR) = durch eine zytolytisch wirkende Substanz erzwungene maximale Freisetzung von Eu-Komplexen; Meßreihe (s.Verhältnis) = in aufsteigendem Verhältnis von Targetzellen zu Effektorzellen aufgetragene Zellsuspensionen (1:5,1:10,1:20,1:40)

Durchführung des Tests

Einen Tag vor dem Test wurden die Targetzellen mit frischem Medium versorgt.

Ansetzen des Markierungspuffers:

K562: 870 µl Puffer A, 50 µl DTPA (25mM in 0,01 M NaOH),
50 µl Eu-acetathydrat (10mM) auf Eis lagern.

Raji: 770 µl Puffer A, 100 µl DTPA (25mM in 0,01 M NaOH),

100 µl Eu-acetathydrat (10mM) auf Eis lagern.

Labeling (Markierung) der Targetzellen:

Die Targetzellen wurden gezählt und auf ihre Vitalität überprüft (Trypanblau), 5×10^6 K562 und 1×10^7 Raji, 10 Minuten bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Sediment anschließend in 2 ml NaCl [0,9%] resuspendiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, um mögliche Chelat-Komplex-Bildner auszuwaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment der Zelllinien zu dem entsprechenden Markierungspuffer dazugegeben und die Zellen im Markierungspuffer resuspendiert, mit 33 µl Dextran vermenget, 30 Minuten auf Eis gelegt und alle zehn Minuten aufgeschüttelt.

Vorbereitung der PBL (=Effektorzellen):

Die berechnete Anzahl PBL wurden aus der Kulturflasche entnommen und 10 Minuten bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Eine Verdünnungsreihe wurde angelegt, um das vorgegebene Verhältnis von Target zu Effektorzellen einzuhalten. In die SP Wells wurden 100 µl Medium vorgelegt, in den TR Wells jeweils 100 µl einer Detergenz (hier Triton X 100 Riedel, 1% in DMEM, Seelze). In den Wells mit den aufsteigenden Effektorzahlverhältnissen wurden im Mehrfachansatz (mind. dreifach) jeweils 100 µl der PBL-Lösung hinzupipettiert. Die 96 Loch (Well) Platten wurden bis zur weiteren Bearbeitung in den Brutschrank gelegt.

Weiterverarbeitung der Targetzellen:

Nach der Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von jeweils 30 µl CaCl_2 (0,1 M), die Proben wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 350 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment im 2 ml Waschpuffer resuspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und 10 Minuten mit 350 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Targetzellen auf $5 \times 10^3 / 100\mu\text{l}$ eingestellt und auf die entsprechenden Bohrungen verteilt.

Die Platten wurden für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Platten bei Zimmertemperatur 10 Minuten bei 400g zentrifugiert.

Aus den Wells wurden je 20 μl Überstand vorsichtig herauspipettiert und in eine neue 96-Wellplatte (immunomodule, Nunc, Wiesbaden) überführt. Zu jedem neuen Well wurden 200 μl Enhancementlösung hinzupipettiert und 10 Min inkubiert; die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{(\text{Messwert} - \text{SR}) * 100 \%}{(\text{TR} - \text{SR})}$$

3.2.2 Das Durchflußzytometer (Flowzytometer)

Flowzytometer sind opto-elektronische Meßsysteme, die optische Signale unterschiedlicher Qualität (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) erfassen. Diese Methode ermöglicht die Erfassung individueller Zellparameter einer signifikanten Anzahl von Zellen innerhalb von wenigen Sekunden (100).

In der nachfolgenden Aufstellung ist ein Ausschnitt der Einsatzgebiete der Flow-Zytometrie dargestellt, (31).

Eigenschaft	Anwendung
Oberflächenantigene	Immunphänotypisierung Leukämie / Lymphom Diagnostik Transplantationsüberwachung HLA-B-27 Screening Zellaktivierung
Intrazelluläre Parameter	Zellulärer DNA/RNA Gehalt Zellproliferation

	Chomosomenanalyse Retikulozytenzählung Proteingehalt pH-Wert
Funktionelle Parameter	Phagozytose von Bakt. und Hefen Enzymaktivitäten
Zellmembranbeständige Parameter	Medikamentenaufnahme Kalziumeinstrom

Grundsätzlich sind folgende Bauelemente in jedem Flowzytometer enthalten:

Laser hier ein Argon-Laser (488nm)

Durchflußzelle: Dies ist die Analysenküvette des Flowzytometers.

Hier werden die einzelnen Zellen von Flüssigkeit umspült, in einer Perlschnurformation hintereinander aufgereiht und nacheinander durch den Laser geführt. Der Hüllstrom für die Umspülungsflüssigkeit sorgt dafür, daß die Zellen sich im Zentrum der Meßzelle befinden, und jede Zelle im Fokus des Lasers gemessen werden kann (Kapillardurchmesser 50-100 µm).

Das

opto-elektronische

Detektionssystem: Diese System quantifiziert die Fluoreszenz- und

Streulichtwerte jeder einzelnen Zelle, die die Durchflußzelle passiert. Das System besteht aus einer Reihe von Filtern, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen bereiche voneinander trennen und den Detektoren zuleiten.

Der Detektor für das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) erfaßt die Zellgröße, und das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) die Granularität. Anhand dieser Detektoren ist es möglich, die Hauptleukozytenpopulationen voneinander zu trennen (s.Abb.3.2.2.2).

Ferner werden drei Fluoreszenzwellenlängenbereiche (FL1, FL2 und FL3) erfaßt, die in einer Zweiparameter oder Einparameterdarstellung visualisiert werden können. Die in Abb. 3.2.2.2 gewählte Darstellung wird Zweiparameterdarstellung genannt. Abb. 3.2.2.3, 3.2.3.1 und 3.2.3.2 zeigen eine Einparameterdarstellung (Histogramm).

Das in dieser Arbeit verwendete Flow-Cytometer FACScan (Fluorescence Activated Cellsorter, FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) wird in der klinischen Immunphänotypisierung von lymphatischen Zellen und zur DNA-Analyse von Tumoren eingesetzt. Dazu werden Zellen mit spezifischen Immunfluoreszenzmarkern oder anderen Substanzen markiert und quantitativ analysiert.

Zur Bestimmung der Oberflächenantigene werden die zu messenden Zellen mit spez. fluoreszierenden Oberflächen - Ak (z.B. Fluorescein-isothiocyanat: FITC; Phycoerythrin: PE usw.) oder spez. Substanzen gekoppelt und anschließend bei verschiedenen Wellenlängen erfaßt. Die Anregung dieser Substanzen wird durch einen Argon-Laser mit der Wellenlänge 488nm erzeugt. Die digitale Erfassung (Hewlett Packard Computer) von Größe, Granularität und Anfärbbarkeit bzw. Markierung mit oberflächenspez. AK wird mit Hilfe eines Computerprogramms (LYSYS 2, Palo Alto, California, USA) erreicht.

Anregungswellenlänge des Argon-Laser und Empfindlichkeitsbereiche der Detektoren :

Lichtquelle :

Argon-Laser : 488nm

Detektoren :

SSC : 488 nm Zellgranularität

FSC : 488 nm Zellgröße

FL-1 : um 520 nm grün

FL-2 : um 580 nm orangerot

FL-3 : um 670 nm rot

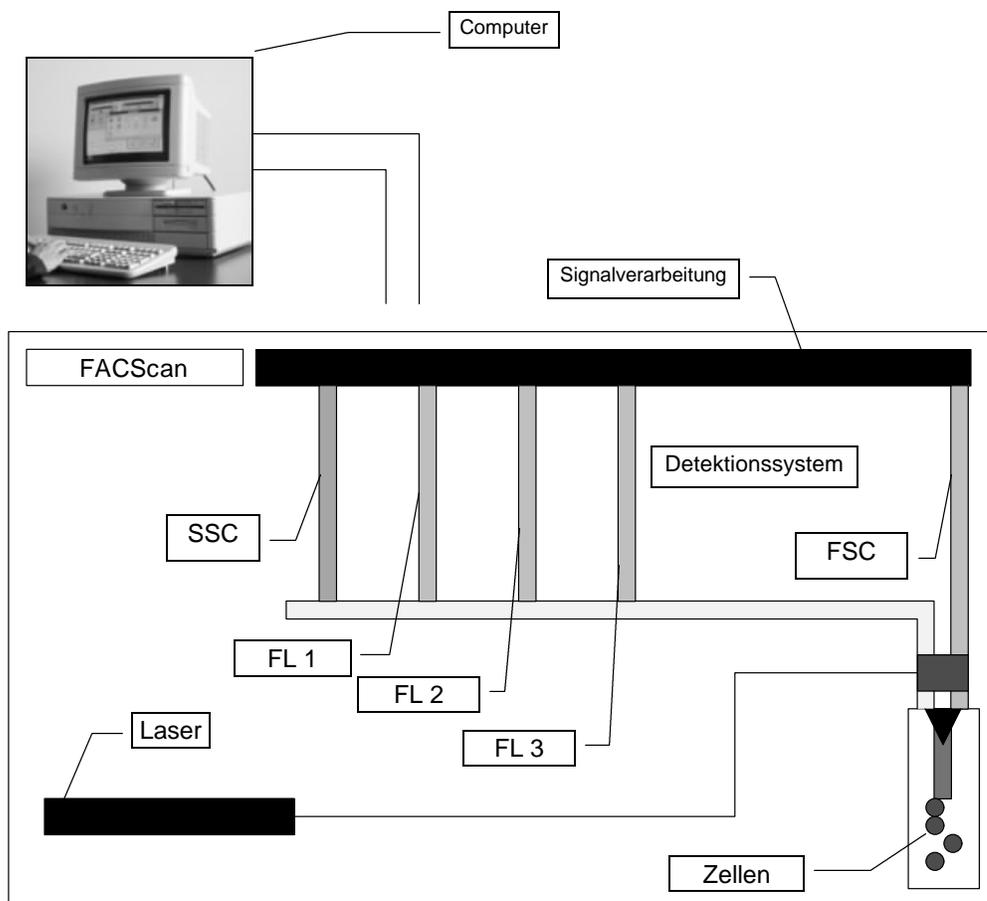


Abb. 3.2.2.1 Funktionsweise eines Flowzytometers (Schema)

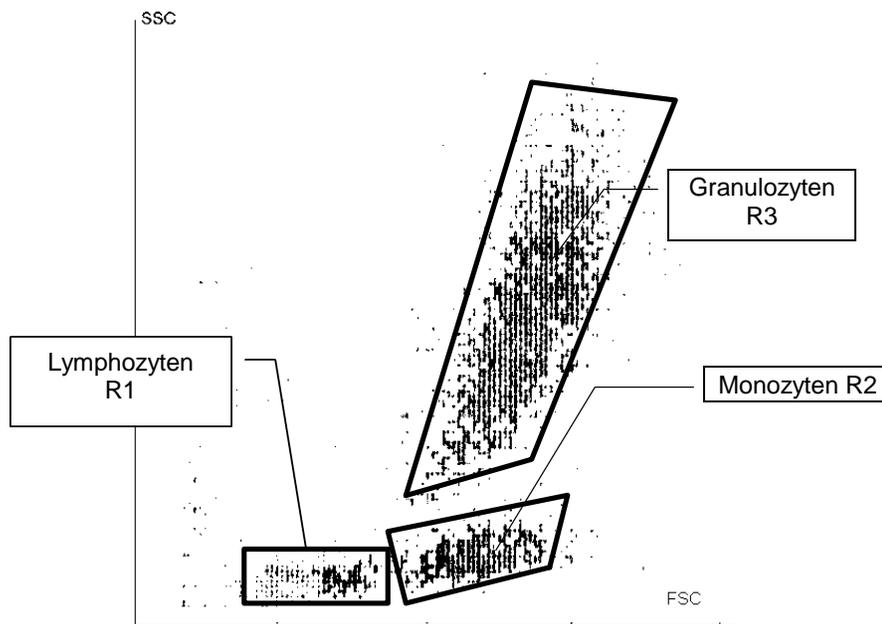


Abb. 3.2.2.2 Mit den beiden Nicht-Fluoreszenzparametern kann man die Verteilung verschiedener Zellpopulationen nach Größe und Granularität erkennen (Zweiparameterdarstellung eines BC)

Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Granularität der Hauptleukozytenpopulationen ergibt sich im sog. Dot-Plot das in Abb. Nr. 3.2.2.2 dargestellte Bild. Wenn eine bestimmte Population im Dot-Plot erfaßt werden soll, wird ein bestimmter Bereich markiert (R1, R2 o. R3), einem sog. Gating unterzogen und in einer sog. Einparameterdarstellung (z.B. Histogramm) dargestellt. Das Gating ermöglicht das „Filtern“ eines bestimmten Bereiches. Die Einparameterdarstellung (s. Abb. 3.2.3.2) erfaßt die Fluoreszenzintensität einer Population, die entweder die Eigenfluoreszenz der Zellen oder die Fluoreszenz eines best. Farbstoffes bzw. Antikörper wiedergibt, mit dem die Zellpopulation vorher markiert wurde.

Diese Methode ist zum Trennen von verschiedenen Subpopulationen humaner Lymphozyten geeignet. Werden in einer Probe aber zwei

grundverschiedene Zelllinien betrachtet, besteht die Problematik der visuellen Differenzierung in einem Dot-Plot.

Die Grenzen zwischen PBL und Targetzellen verwischen in einem Dot-Plot so sehr, das ein Gateing nicht mehr möglich ist.

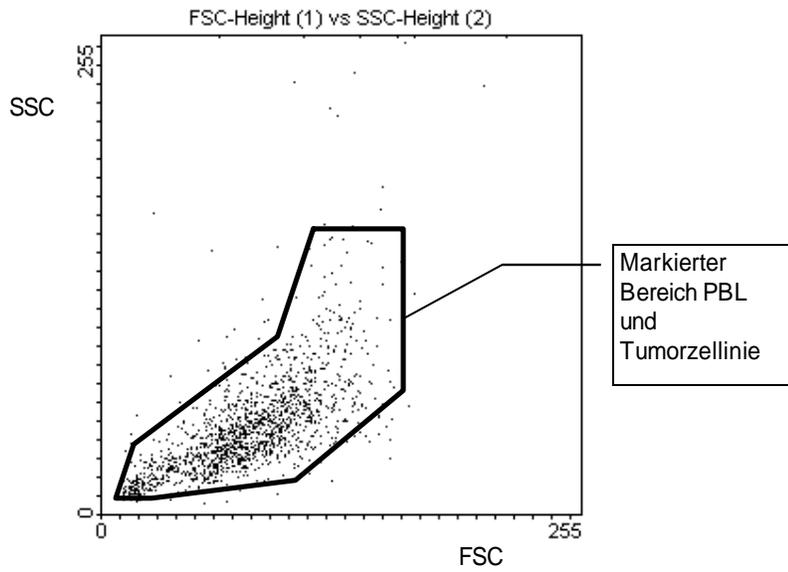


Abb. 3.2.2.3 Zweiparameterdarstellung des Gemisches Targetzellen (K562) und PBL. Ausschnitt von R1, R2 und R3. Die Grenzen in dem Bereich verwischen durch das Vorhandensein von einer Tumorzelllinie.

Das Hauptproblem einer Testmethode mit dem Flowzytometer zur Bestimmung der Lymphozytenaktivität mit einer zweiten Zelllinie ist somit die Abgrenzung von Effektorzellen (PBL) und den Targetzellen (Raji oder K562).

3.2.3 Prinzip der durchflußzytometrischen Bestimmung der Lymphozytenaktivität

Wie oben erwähnt ist das Hauptproblem die Trennung von Effektor und Targetzellen zur Bestimmung der Lymphozytenaktivität in der Flowzytometrie das Hauptproblem dar. Die Substanz

3,3 Dioctadecyloxacarbocyanin-perchlorat $C_{53}H_{85}ClN_2O_6$ (DIO)
(Sigma, München)

ermöglicht die Unterscheidung von Target- und Effektorzellen durch Anfärben der inneren Zellmembran der Tumorzellen, ohne diese dabei zu schädigen. (4;38).

Die Anregungswellenlänge beträgt 485 nm und die Emmisionswellenlänge 500 nm (4). Durch Gating sind nur die DIO gefärbten Zellen (FL-1) „herausfilterbar“. Die durch die PBL-Aktivität entstandenen defekten bzw. lysierten Zellen werden durch Inkorporation mit Propidium Jodid (PI) nachgewiesen (rote Fluoreszenz), wobei dieser Farbstoff mit ein- oder doppelsträngiger DNA bzw. RNA intercaliertbindet (56).

Die mit DIO angefärbten Targetzellen sind in einem FL 1-Histogramm zwischen der Intensität 10^3 und 10^4 zu sehen. Wenn nun ein selektives Gate an dieser Stelle gesetzt wird, können in einem FL 3-Histogramm nach Anfärben mit PI die intakten von den defekten Zellen getrennt und ausgezählt werden (s.Abb. 3.2.3.2).

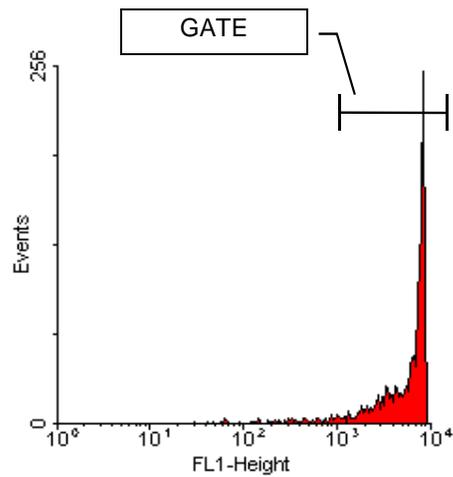


Abb 3.2.3.1 FL1-Histogramm einer mit DIO angefärbten Zellpopulation: Zwischen der Intensität 10^3 und 10^4 sammeln sich die DIO gefärbten Zellen im Histogramm in FL1 an (grüne Fluoreszenz). Die Achse mit Events zeigt die Zählereignisse der Zellen, die in FL 1-Height fluoreszieren. Durch Gating sind diese in z. B. FL^{M3} (rote Fluoreszenz) darstellbar (s.nächste Abb.)

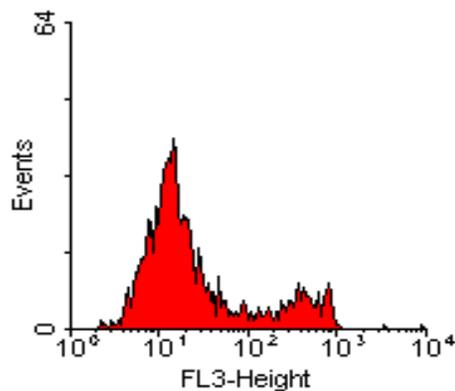
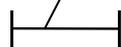


Abb. 3.2.3.2 DIO gefärbte Targetzellen aus Gate 1 (vorh. Abb.) in FL3-Histogramm Darstellung. Der in FL 3 als M 1 markierte Bereich zeigt die defekten Zellen, die mit Propidium Iodid (PI) angefärbt wurden.

Zwischen der relativen Fluoreszenzintensität 10^2 und 10^3 zeigen sich die defekten mit PI angefärbten Zellen in diesem Bereich, da PI markierte

(defekte) Zellen eine höhere Fluoreszenz besitzen als nicht markierte (intakte) Zellen. (56).

Vorbereitung und Durchführung von Messungen

Markierung der Targetzellen:

Lösungen:

DIO Stammlösung:

3 mg DIO	(Sigma, München)
100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, München)
900 µl Ethanol reinst	(Merck, Darmstadt)

Kristalle werden abfiltriert,
die Lösung wird kühl (bei -20°C) gelagert

Propidium Jodid (PI) Stammlösung	(Sigma, München)
100 µg/ml PI in PBS	

Einfriermedium (EFM)

DMSO : FCS 1:9

Die Zelllinien K 562 und Raji wurden auf 10^5 Zellen pro ml eingestellt und einen Tag vorher mit DMEM versorgt. Mit 15 µl DIO/ml Zellsuspension für K 562 und 20 µl DIO/ml Zellsuspension für Raji erfolgte die Anfärbung. Nach 30 minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Suspensionen mit PBS 2mal gewaschen und zentrifugiert. (10 Min. bei 350 g). Für weitere Versuche an den Folgetagen wurden diese Zellsuspensionen auf mehrere 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt im Verhältnis 1000 µl Zellsuspension auf 500 µl EFM und in jeweils 200 µl Portionen auf mehrere Eppendorfcups aliquotiert. Anschließend wurden

die Zellen bei -80°C gelagert. Nach Lagerung lag die Vitalität bei ca. 75-95%.

Durchführung der Messungen:

Von der Zubereitung bis zur eigentlichen Messung wurde jeder Schritt in einem FACS-Probenröhrchen (Falcon) durchgeführt. Die Effektorzellen wurden so eingestellt, daß sie ein Effektor : Target Ratio von jeweils 5:1, 10:1, 20:1 und 40:1 ergaben.

Die zuvor eingefrorenen Targetzellen wurden in einem Becherglas mit warmem Wasser aufgetaut, in Kompletmedium gewaschen und bei 350 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in DMEM resuspendiert. Die Targetzellen wurden auf 10^4 Zellen/ml eingestellt. Die Targetzellen wurden in 100 μl Portionen auf FACS-Röhrchen verteilt. Pro Targetzelllinie wurde ein Kontrollansatz benötigt, um die Spontanlyse (Kontrolle) zu ermitteln. Die Effektorzellen wurden so eingestellt, daß sie pro 150 μl in der o.g. Ratio in 150 μl Portionen verteilt werden können. Die Kontrolle wurde lediglich mit 150 μl DMEM aufgefüllt. Somit ergab sich pro FACS-Röhrchen eine Zellsuspension von jeweils 250 μl . (s. *Abb.3.2.3.4*)

Die FACS-Röhrchen wurden auf dem Vortex durchmischt und anschließend 3 Minuten bei 100 g zentrifugiert, um eine Clusterformierung der Zellen zu erreichen. Die Röhrchen wurden anschließend vier Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach vier Stunden wurden zu den Zellsuspensionen jeweils 5 μl PI hinzugegeben. und wieder mit dem Vortex durchgemengt. Die Röhrchen wurden dann für 10 Minuten bei 0°C abgedunkelt inkubiert, (56).

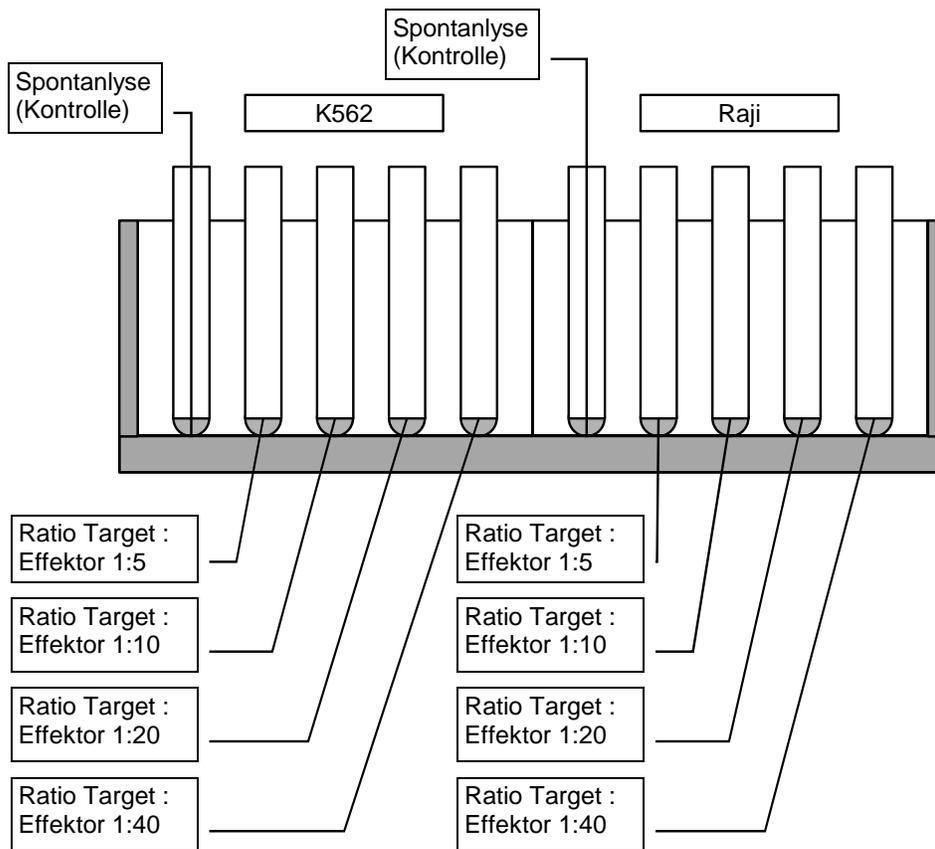


Abb.3.2.3.4 Bestimmung der NK-Zellaktivität und T-Zell-Aktivität: Verteilungsschema für die Versuchsdurchführung für K562 und Raji in jeweils 5 FACS-Röhrchen in einem dafür vorgesehenen Gestell.

Messung und Auswertung

Messung:

Dieser Schritt muß bei jeder zu testenden Targetzelllinie durchgeführt werden, um den Fluoreszenzbereich der mit DIO gefärbten Targetzellen und später deren Vitalität zu ermitteln. Die zu messende Zellanzahl wurde auf 3000 / Testansatz eingestellt , eine Region zum Gating auf das FL1 Maximum gesetzt (s. Abb. 3.2.3.1) und als Region 1 (R1) definiert. Im Run-Protokoll wurde [accept R1] angewählt, damit bei der folgenden Messung nur die DIO-markierten Zellen gemessen wurden. Die Messung

wurde wiederholt und das Ergebnis auf der Festplatte abgespeichert. Die abgespeicherte Datei diente zur Bestimmung Spontansterblichkeit (Spontanlyse) der Targetzellen. Anschließend erfolgte die Messung der Proben mit den Effektorzellen. Die zu zählenden Zellen wurden auf 1500 gesetzt. Die gezählten Zellen bezogen sich nur auf die in der Region 1 (R1) markierten Zellen, ohne daß andere Zellen wie nicht markierte Zellen oder Effektorzellen mitgezählt wurden. Diese Daten wurden ebenfalls auf der Festplatte gespeichert.

Auswertung:

In den Analysis-Mode wechseln; Um die Spontanlyse zu ermitteln, wurde die erste gespeicherte Datei als FL3-Histogramm dargestellt. Anhand des Histogramms konnte die Vitalität bzw. Spontanlyse der Targetzellen bestimmt werden. Der erste Peak zeigt die intakten Zellen, der zweite Peak, zwischen der Intensität 10^3 und 10^4 , die PI-markierten defekten Zellen. Dieser zweite Bereich konnte nun mit der programmeigenen statistischen Auswertung ermittelt werden indem eine Region über den zweiten Peak definiert wurde (a. Abb M1). Die Spontanlyse der Kontrolle lag in der Regel zwischen 1% und 10%.

Mit den Proben der Effektorzell-/Targetzellsuspension wurde in gleicher Weise verfahren. Zur Veranschaulichung soll nachfolgende Grafik dienen.

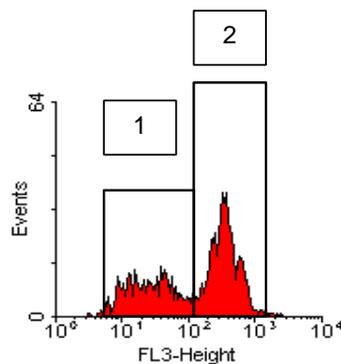


Abb. 3.2.3.4 FL3-Histogramm eines Testansatzes: Gezeigt ist die spezifische Lyse einer Targetzelllinie durch PBL. Die defekten Targetzellen

weisen eine höhere Rotfluoreszenz auf ($10^2 - 10^3$) und werden in Peak 2 aufsummiert.

Die spezifische Lyse einer Probe errechnet sich nach:

Spezifische Lyse (%) = Meßwert (%) - Spontanlyse (%)

3.3 Versuchsdurchführung

Nachdem die Effektorzellen einer Kulturflasche (Nunc,Wiesbaden) entnommen und gleichmäßig auf 6-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) verteilt wurden, werden die Effektorzellen (ca. $1,5 \times 10^3$ /ml) jeweils mit verschiedenen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert.

1) Enzymmischung (Papain:Trypsin:Chymotrypsin 2,5:1:1) gelöst in PBS

a) Einmalgabe und

b) Mehrfachgabe im mehrtägigen Abstand (s. 3.3.2)

2) Retinol und Retinsäure gelöst in DMSO, mit DMSO Kontrolle

Die Enzyme Papain, Trypsin, Chymotrypsin (Wobenzym, Mucos, München) wurden mit einer Feinwaage (Heraeus, HU) im Verhältnis 2,5:1:1 abgewogen und in PBS in einem 5 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc,Wiesbaden) suspendiert. Die Aktivität der Enzyme wurde photometrisch bestimmt (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Messung erfolgte analog zu dem o.g. Verfahren abgewandelt mit den hier nachfolgenden Modifikationen in Bezug auf das Effektor:Target Ratio, den verschiedenen Konzentrationen der Effektorzellen und Enzymen.

Für jede Targetzelllinie (K562,Raji) wurde ein Mehrfachansatz (5-fach) durchgeführt.

Die Zelllinien wurden vor jeder neuen Meßreihe mit DIO eingefärbt und die Effektorzellen isoliert. Durch Vorversuche wurde ermittelt, daß der

Zeitraum in den ersten 5 Tagen die größte Ergebnis-Relevanz hat. Das Target:Effektor Ratio wurde auf 40:1 eingestellt.

3.3.1 Einmalgabe von Enzymen

Die Effektorzellen wurden gleichmäßig auf 6-Lochplatten verteilt, in DMEM suspendiert und in den Konzentrationen (20,40,80,160 und 320µg/ml), ermittelt durch Vorversuche, mit der Enzymmischung durchmischt und als Einmalgabe vor dem ersten Testtag verabreicht:

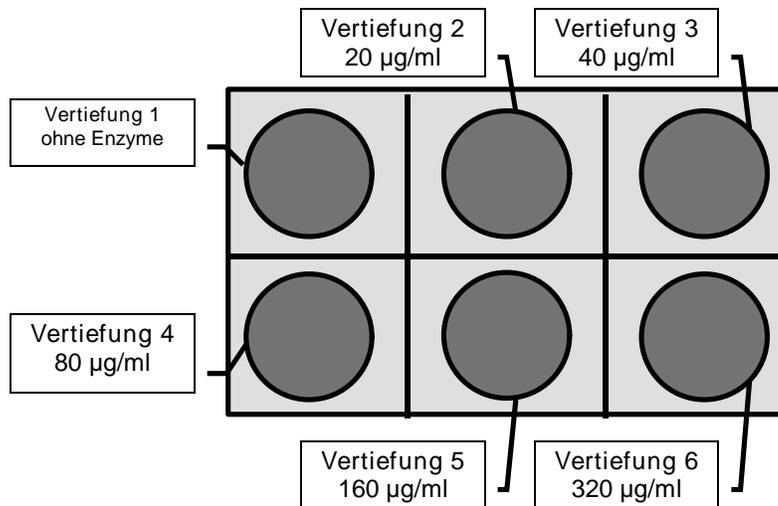


Abb.3.3.1.1 Auftragungsschema der Enzyme auf eine 6-Lochplatte.

Die Effektorzellen wurden über einem Zeitraum von 408 h (=17 Tage) inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraumes haben an 9 Tagen die Messungen (s.o.) stattgefunden: Tag 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11 und 17

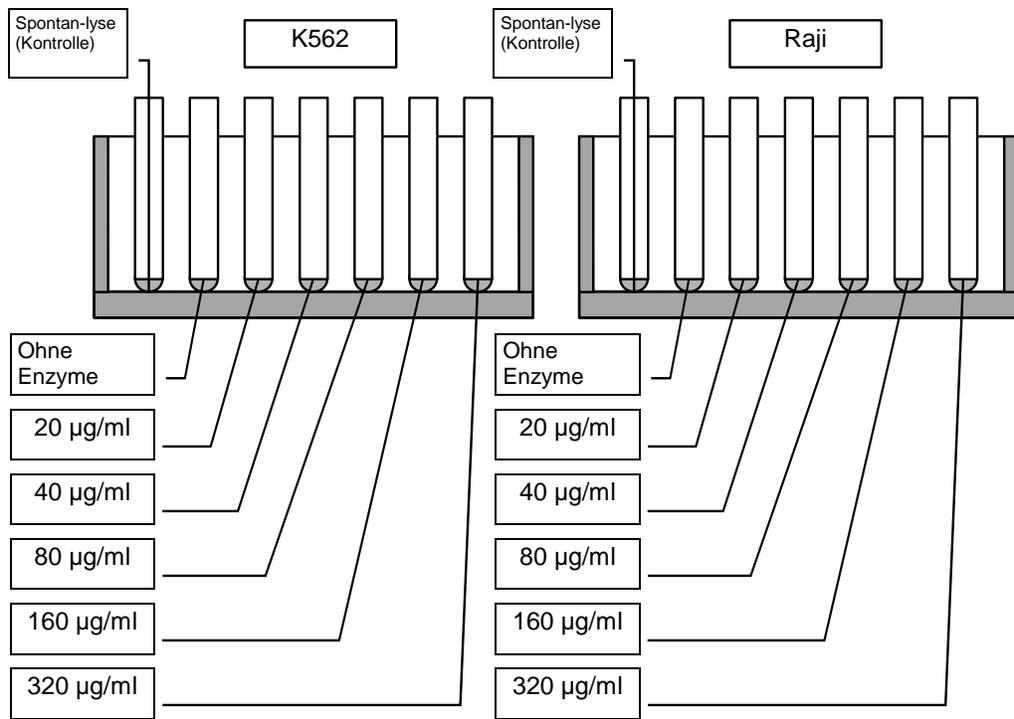


Abb.3.3.1.2 Bestimmung der NK-Zellaktivität und T-Zell-Aktivität bei Eimalgabe von Enzymen: Das Verteilungsschema in die FACS-Röhrchen unter Berücksichtigung beider Tumorzelllinien mit einem Target:Effektor Ratio von 40:1.

3.3.2 Mehrfachgabe von Enzymen

Die Effektorzellen wurden gleichmäßig auf 6-Lochplatten verteilt, in DMEM suspendiert und in folgenden Konzentrationen, ermittelt durch Vorversuche, mit der Enzymmischung durchmischt und als Mehrfachgabe (4 Enzymgaben) verabreicht:

Zugabe 1 : Vor dem ersten Meßtag

Zugabe 2 : 72 h (3.Tag)

Zugabe 3 : 168 h (7.Tag)

Zugabe 4 : 240 h (10.Tag)

Die Impulsgaben erfolgten nach der Messung an dem jeweiligen Tag bzw. an meßfreien Tagen.

Die Messungen haben analog zu der Einmalgabe stattgefunden am:
Tag 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11 und 17

Die Konzentrationen wurden hier modifiziert (10, 20, 40 und 80 µg/ml)
(Abb. 3.3.2.1)

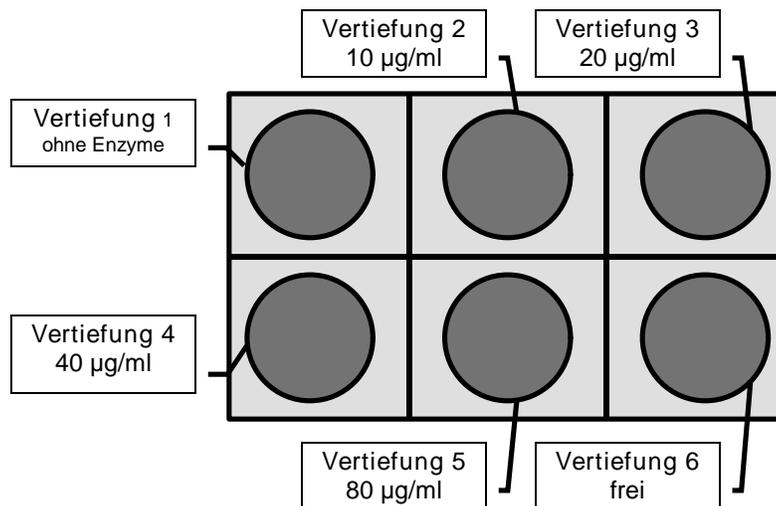


Abb.3.3.2.1 Verteilungsschema bei der Impulsgabe von Enzymen mit modifizierten Enzymkonzentrationen bei Mehrfachgabe.

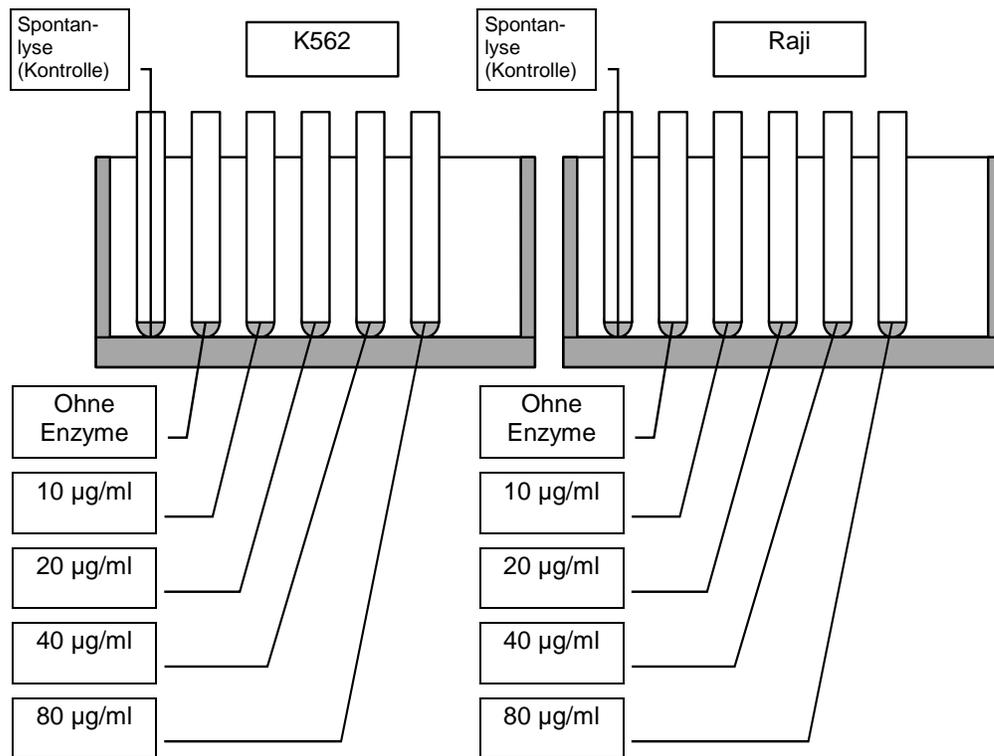


Abb.3.3.2.2 Bestimmung der NK-Zellaktivität und T-Zell-Aktivität bei Mehrfachgabe von Enzymen: Das Verteilungsschema in die FACS-Röhrchen Effektor: Target Ratio von 40:1.

3.3.3 Retinol und Retinsäure gelöst in DMSO, mit DMSO Kontrolle

Retinol (ROH) und Retinsäure (RA) wurden in einer Konzentration von 10^{-2} M in DMSO gelöst (Sigma, München) und in den Konzentrationen 10^{-4} M, 10^{-6} M und 10^{-8} M unter Abdunklung zubereitet. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Ansätze mit DMSO (Dimethylsulfoxid) in den vorgegebenen Konzentrationen zubereitet. Die vorbereiteten Lösungen wurden bei -80°C in Eppendorfcups (Eppendorf, HH) eingefroren und vor Testbeginn

schonend in einem Wasserglas aufgetaut. In einem 5 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc,Wiesbaden) wurde der Inhalt der Eppendorfcups in einer definierten Menge von PBS aufgelöst und in den o.g. Konzentrationen auf die zu inkubierenden Effektorzellen, die in DMEM + FCS suspendiert sind, als Einfachgabe vor dem 1. Testtag hinzugegeben; pro Versuchsansatz wurden zwei 6-Lochplatten verwendet. Das Procedere der Messung erfolgte analog zu dem zuvor genannten Verfahren, abgewandelt durch die hier nachfolgend aufgeführten Modifikationen in Bezug auf Effektor:Target : Ratio (40:1), die verschiedenen Inkubationskonzentrationen der Effektorzellen und Gaben von DMSO, ROH und RA.

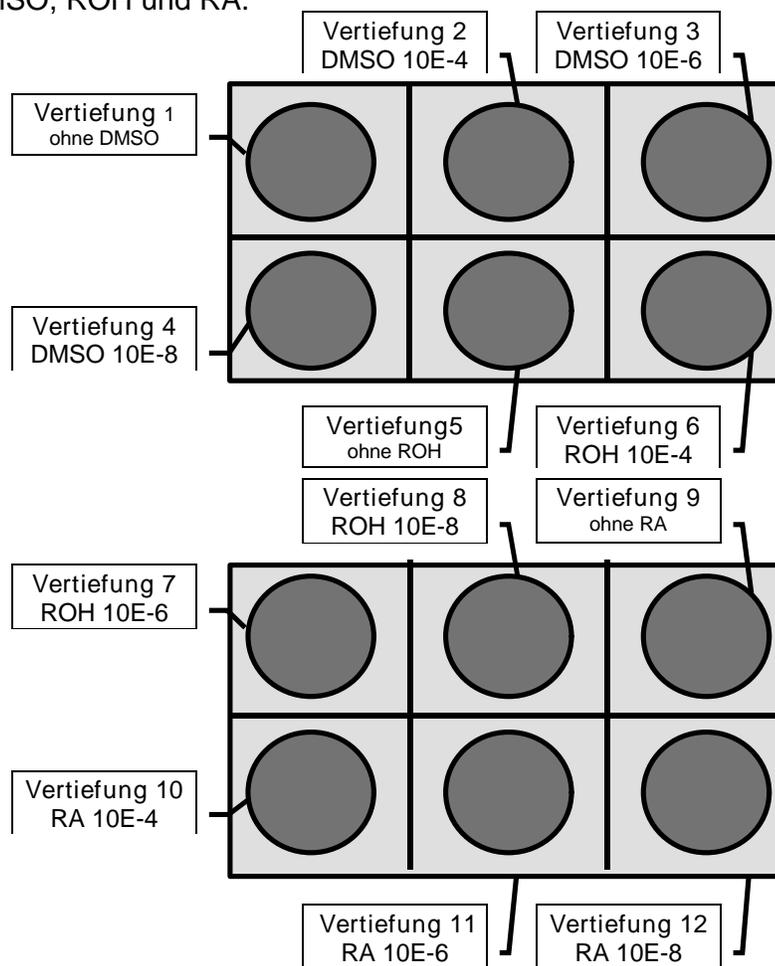


Abb. 3.3.3.1 Verteilungsschema von DMSO, ROH und RA auf zwei 6-Lochplatten zur Inkubation der Effektorzellen.

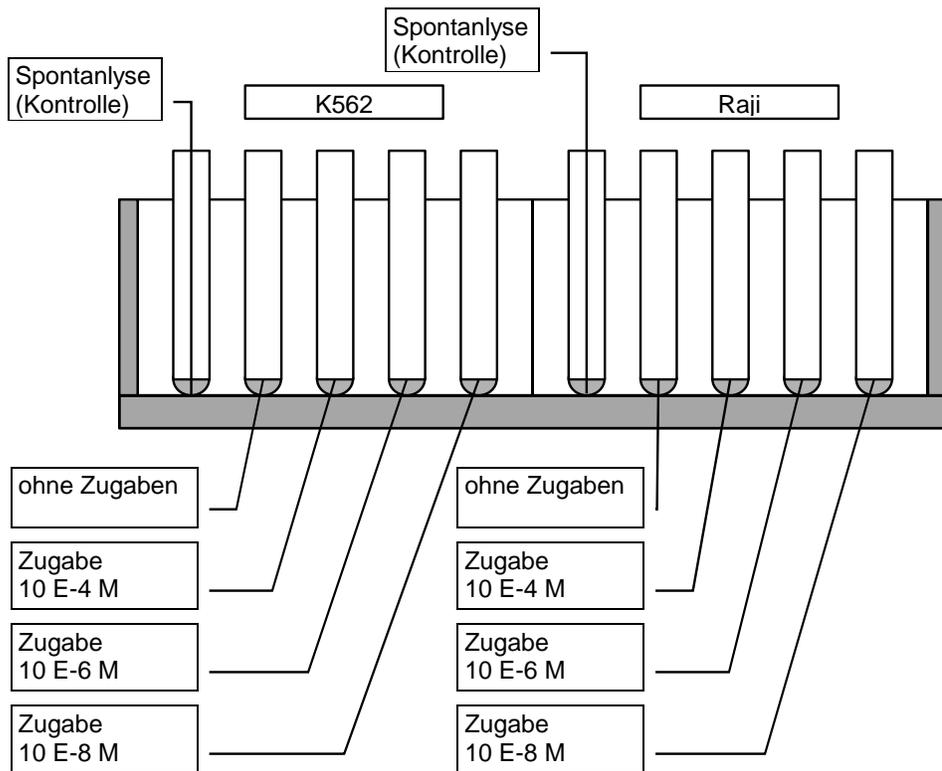


Abb.3.3.3.2 Bestimmung der NK-Zellaktivität und T-Zell-Aktivität bei Einmalgabe von DMSO, ROH und RA: Verteilungsschema der FACS-Röhrchen

Als Zugaben wurden hier jeweils 5 Ansätze für jeweils DMSO, ROH und RA vorbereitet.

3.4 Messung und Auswertung der Daten

Die Messungen wurden mit dem Flowcytometer FACScan (BD,HD) durchgeführt, mit dem Programm Lysys 2 bearbeitet und unter Zuhilfenahme von WinMDI 2.5 (Windows Multiple Document Interface 2.5, Joseph Trotter, Scripps Institute, USA) ausgewertet. Die nachfolgend aufgeführten Berechnungen wurden mit Hilfe von Winstat 7.0 (Winstat) durchgeführt.

Die Signifikanzen wurden aus den Einzelwerten der Messungen errechnet. Der Test gilt für biologische Phänomene, welche nicht normalverteilt sind.(Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test, nach Sachs 1992).

3.5 Messung und Auswertung der Korrelation der zwei Cytotoxmethoden Europium-Releaseassay und Flowzytometer

Die Zelllinien Raji und K562 wurden in einem aufsteigenden Effektor-Targetzell-Ratio von 5:1, 10:1, 20:1 und 40:1 mit der jeweiligen Meßmethode (Europiumreleaseassay und Durchflußzytometrie) getestet und anschließend der ermittelte Durchschnittswert im Korrelationstest (Pearson) auf ihre Korrelation hin bewertet. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten beziehen sich auf das steigende Effektor-Targetzell-Ratio, und somit auf die NK-Zellaktivität (Targetzelllinie 1: K562) und die Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten (Targetzelllinie 2: Raji) im jeweiligen Zytotoxtest.

3.6 Literaturrecherche

Zur Literaturrecherche wurde das Ovidweb (<http://medline.stub.uni-frankfurt.de/ovidweb.cgi>) für Publikationen von 1966-1998 verwendet. Für aktuelle Publikationen ist PubMed zum Einsatz gekommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Der Zugang wurde über den Internetaccount des Hochschulrechenzentrums der Johann Wolfgang Goethe-Universität gewährleistet.

IV. Ergebnisse

4.1 Einmalgabe von Enzymen

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurden die Effektorzellen einmalig mit Enzymen einen Tag vor Testbeginn inkubiert.

Die Inkubationsdauer betrug 408 h (= 17 Tage). Innerhalb dieser Inkubationsdauer fanden an 9 Tagen Messungen statt.

Die Konzentrationen der Enzymlösung betragen 20, 40, 80, 160, 320 µg/ml. Für die Zelllinien K 562 und Raji wurden jeweils fünf Ansätze durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Für jede Messung wurde ein Kontrollansatz (ohne Substanzzugabe) durchgeführt.

4.1.1 K562, NK-Zellaktivität

Messungen an

Tag 1 (24h)

Tag 2 (48h)

Tag 3 (72h)

Tag 4 (96h)

Tag 5 (120h)

Tag 8 (192h)

Tag 11 (264h)

Tag 17 (408h)

Konzentrationen

20 µg/ml

40 µg/ml

80 µg/ml

160 µg/ml

320 µg/ml

(s. nachfolgende Tabelle)

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen der jeweiligen Werte in die Wertetabelle bei (+/-) eingetragen.

Tabelle Nr 4.1.2 Gemittelte Messwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen (NK-Zellaktivität). Im 2. Schritt (untere Tabelle) finden sich die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle verglichen zum Ausgangswert (0h).

Ermittelte Meßwerte

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
Kontrolle	14,4	11,7	4,4	9,9	4,5	14,3	1,9	11,1	3,6	15,3	3,1	17,7	2,9	18,2	5,0	17,0	2,9
0 µg/ml	43,0	43,3	6,5	48,1	6,0	46,1	9,3	51,7	8,9	40,1	14,3	48,9	6,0	34,0	13,4	32,0	7,3
20 µg/ml	43,0	48,3	6,9	51,7	4,9	51,4	7,5	53,9	8,7	41,6	13,1	49,2	5,8	32,3	15,9	15,1	6,6
40 µg/ml	43,0	48,9	8,5	55,8	6,1	53,5	5,9	57,1	11,0	44,0	12,2	49,3	5,8	28,1	14,6	7,5	7,1
80 µg/ml	43,0	53,4	5,2	57,1	4,1	55,1	5,4	56,6	10,5	44,2	11,9	42,2	12,6	13,0	11,2	6,9	6,4
160 µg/ml	43,0	54,4	6,3	56,9	3,4	52,2	6,1	48,8	11,1	38,9	10,7	6,5	3,3	2,9	6,1	-0,6	6,2
320 µg/ml	43,0	42,5	9,1	40,0	7,6	17,1	11,9	-0,6	1,2	-4,7	5,1	-7,4	1,5	-6,3	1,9	-6,2	2,1

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
20 µg/ml	0,0	5,0	2,6	3,5	3,8	5,3	4,0	2,3	2,2	1,5	4,0	0,3	4,0	-1,7	3,9	-16,8	10,4
40 µg/ml	0,0	5,6	2,4	7,6	5,8	7,5	4,4	5,5	3,2	3,9	4,6	0,4	3,2	-5,9	4,5	-24,5	12,3
80 µg/ml	0,0	10,1	2,8	9,0	5,7	9,0	6,5	5,0	4,1	4,1	5,2	-6,6	9,8	-21,0	15,2	-25,1	12,1
160 µg/ml	0,0	11,1	2,1	8,8	5,4	6,1	6,0	-2,8	6,3	-1,2	9,3	-42,3	7,5	-31,1	16,4	-32,6	11,4
320 µg/ml	0,0	-0,8	8,4	-8,2	11,5	-29,0	20,0	-52,3	9,0	-44,8	13,6	-56,3	6,7	-40,3	14,2	-38,1	7,5

Die Auswertung wurde in 2 Schritten durchgeführt. Der erste Schritt beinhaltet die gemessenen Werte, die mit Lysys II und WinMDI ausgewertet wurden (Abb 4.1.3). Der zweite Schritt gibt die Werte nach Abzug der Spontanlysis und Kontrolle wieder (Abb 4.1.4)

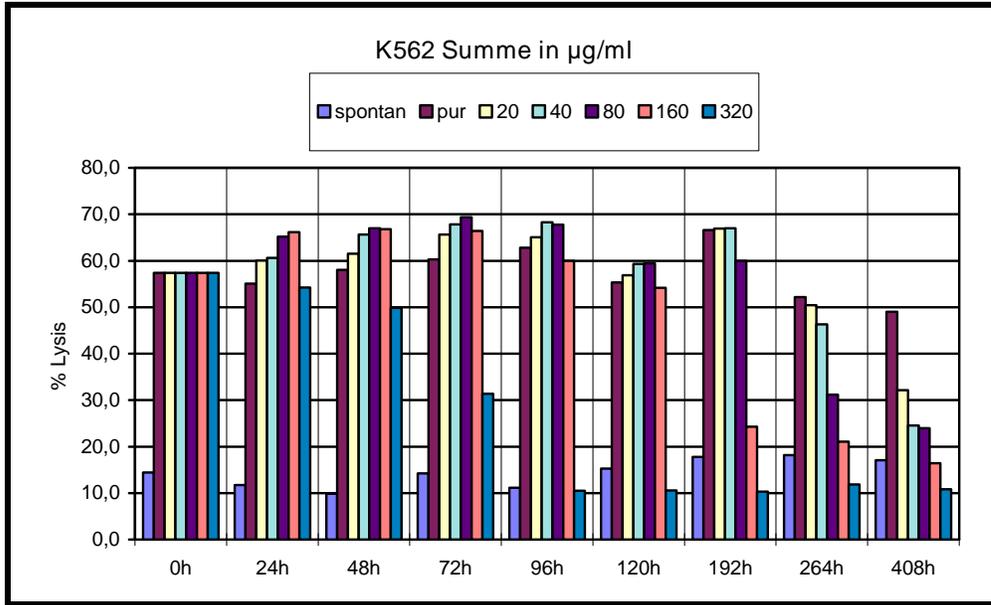


Abb. 4.1.3 NK-Zellaktivität, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle. (pur=ohne Zugabe von Substanz)

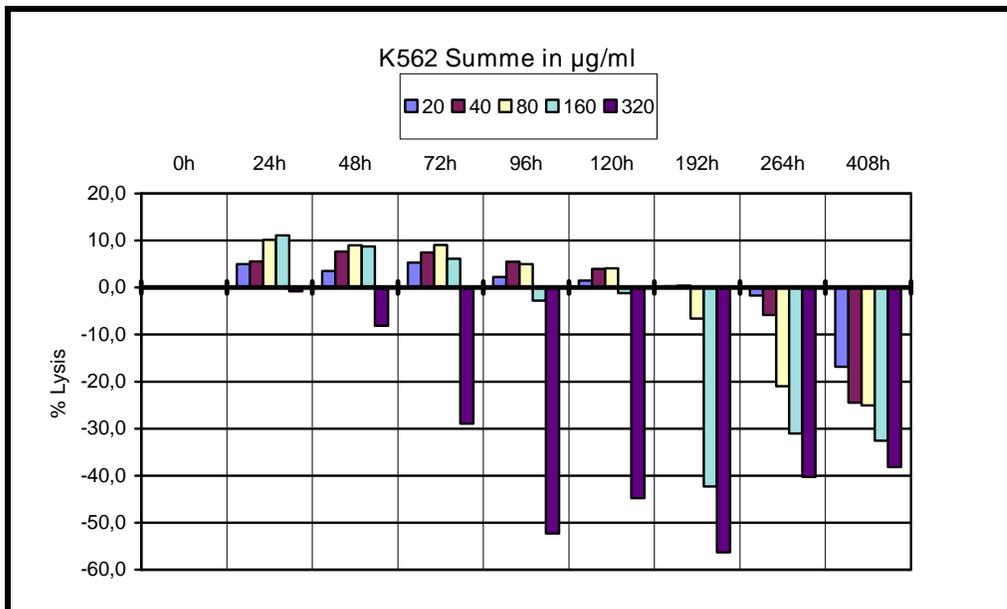


Abb 4.1.4 NK-Zellaktivität, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

Bei einer Enzymkonzentration von 20 µg/ml und 40 µg/ml sind signifikante Steigerungen der Lysis im Verhältnis zu den unbehandelten Effektorzellen bei 24h und 72h nach Enzymgabe ($P < 0.01$) zu verzeichnen. Nach 408h kam es zu einem signifikanten Abfall der Lysis um -16.8% im Verhältnis zu den unbehandelten Effektorzellen ($P < 0.01$).

Bei der Enzymkonzentration von 80 µg/ml sind signifikante Steigerungen bei 24h, 48h und 72h ($p < 0.01$) zu verzeichnen. Der signifikante Abfall der Lysopotenz ist erfolgt schon nach 264h ($p < 0.01$).

Bei 160 µg/ml Enzymkonzentration ist eine signifikante Steigerung der Effektorzellen nur bei 24h ($p < 0.01$) zu verzeichnen, der signifikante Abfall erfolgte bei 192h ($p < 0.01$).

Wenn die Enzymkonzentration 320µg/ml beträgt, ist keine signifikante Steigerung der Lysopotenz der Effektorzellen zu verzeichnen. Der signifikante Abfall erfolgt jedoch schon nach 72h ($p < 0.05$), 96h, 120h, 192h, 264h und 408h ($p < 0.01$).

4.1.5 Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten

Tabelle Nr.4.1.6 Gemittelte Messwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen (T-Zellaktivität). Im 2. Schritt (untere Tabelle) finden sich die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle verglichen zum Ausgangswert.(0h)

Ermittelte Meßwerte

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
Kontrolle	20,8	16,1	6,1	20,3	7,4	21,7	4,4	16,7	5,9	24,8	5,1	22,3	3,8	20,2	9,7	24,6	3,4
0 µg/ml	59,3	58,3	7,1	61,0	6,2	67,5	4,2	65,2	5,6	61,4	4,6	61,6	5,2	53,1	7,9	46,3	11,4
20 µg/ml	59,3	57,0	7,4	63,9	6,1	70,9	2,3	68,8	5,8	62,7	4,0	65,0	5,1	51,3	7,6	32,3	6,9
40 µg/ml	59,3	61,1	6,3	67,3	4,8	73,9	4,7	67,8	4,9	62,1	4,3	60,7	6,0	43,2	6,3	28,7	5,3
80 µg/ml	59,3	64,9	4,5	69,2	5,6	73,2	3,6	68,9	4,0	64,8	3,2	55,7	12,1	35,7	8,7	27,5	6,0
160 µg/ml	59,3	65,9	3,7	66,4	5,4	62,8	3,4	55,8	4,5	53,4	7,4	27,5	8,1	27,6	9,2	18,1	5,3
320 µg/ml	59,3	52,4	7,3	53,5	7,3	35,0	12,7	13,9	5,4	16,4	5,1	12,4	5,4	15,3	5,3	15,6	2,4

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
20 µg/ml	0,0	-1,2	1,5	2,8	2,6	3,5	3,6	3,6	2,9	1,4	3,1	3,4	2,7	-1,9	1,6	-14,0	11,0
40 µg/ml	0,0	2,8	2,8	6,2	2,4	6,5	4,7	2,7	2,8	0,7	3,7	-0,9	2,8	-10,0	6,6	-17,6	13,2
80 µg/ml	0,0	6,7	3,5	8,2	4,7	5,7	3,5	3,7	3,7	3,4	2,0	-5,9	9,1	-17,4	11,2	-18,8	13,3
160 µg/ml	0,0	7,6	3,9	5,4	3,5	-4,6	3,5	-9,4	3,7	-8,0	6,3	-34,2	10,6	-25,5	15,3	-28,2	13,4
320 µg/ml	0,0	-5,9	7,9	-7,5	8,7	-32,5	13,5	-51,3	9,4	-45,0	8,9	-49,2	10,5	-37,8	12,9	-30,7	10,7

Die Auswertung wurde in 2 Schritten durchgeführt. Der erste Schritt beinhaltet die Angabe der gemessenen Werte, die mit Lysys II und WinMDI ausgewertet wurden (Abb 4.1.7). Der zweite Schritt gibt die Werte nach Abzug der Spontanlysis und Kontrolle wieder (Abb 4.1.8)

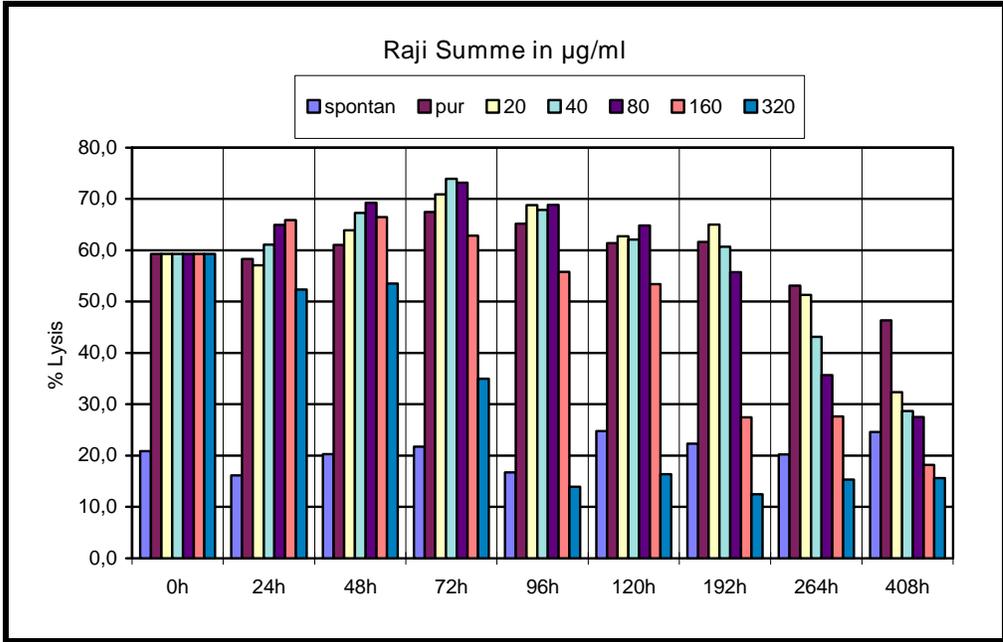
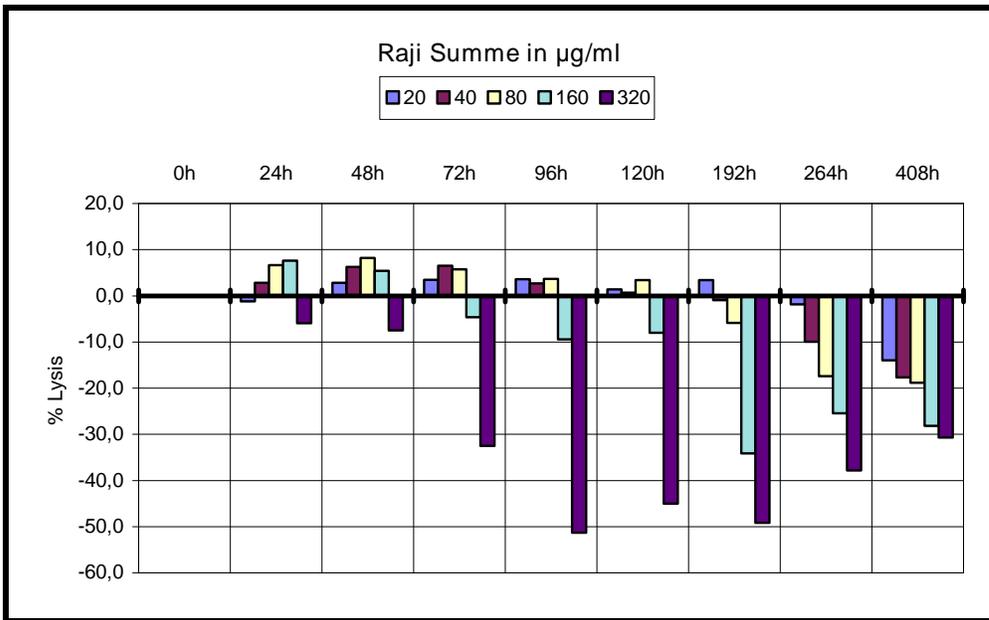


Abb. 4.1.7 T-Zellaktivität, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle. (pur=ohne Zugabe von Substanz)



.Abb 4.1.8 T-Zellaktivität, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

Bei einer Enzymkonzentration von 20 µg/ml erfolgt ein signifikanter Abfall der Lysis im Verhältnis zu unbehandelten Effektorzellen bei 24h, 264h ($p < 0.05$) und 408h ($p < 0.01$). Ein signifikanter Anstieg ist nur nach 192h zu verzeichnen ($p < 0.01$).

Bei 40 µg/ml ist ein signifikanter Anstieg nach 48h ($p < 0.01$) zu beobachten. Der signifikante Abfall erfolgt nach 264h und 408h ($p < 0.01$).

Bei der Enzymkonzentration von 80 µg/ml sind signifikante Steigerungen bei 24h, 48h, 72h, und 120h ($p < 0.01$) zu verzeichnen. Der signifikante Abfall ist bei 264h und 408h zu sehen ($p < 0.01$).

Bei 160 µg/ml Enzymkonzentration ist die signifikante Lysopotenz der Effektorzellen bei 24h und 48h am höchsten ($p < 0.01$). Der signifikante Abfall erfolgt nach 192h, 264h und 408h ($p < 0.01$).

Wenn die Enzymkonzentration 320 µg/ml beträgt, sind keine signifikante Steigerungen der Lysopotenz zu verzeichnen. Der signifikante Abfall beginnt bei 48h ($p < 0.05$) und ist konstant über 72h, 96h, 120h, 192h, 264h und 408h ($p < 0.01$).

4.2 Mehrfachgabe von Enzymen

4.2.1 K562, NK-Zellaktivität

Analog zu der Versuchsdurchführung bei der Einmalgabe von Enzymen werden hier jedoch andere Konzentrationen verwendet. Das Protokoll sieht wie folgt aus :

Messungen an

Tag 1 (24h)

Tag 2 (48h)

Tag 3 (72h)

Tag 4 (96h)

Tag 5 (120h)

Tag 8 (192h)

Tag 11 (264h)

Tag 17 (408h)

Gaben an

Impuls 1 : Vor dem ersten Meßtag

Impuls 2 : 72h (3.Tag)

Impuls 3 : 168h (7.Tag)

Impuls 4 : 240h (10.Tag)

Konzentrationen für jede Gabe

10 µg/ml

20µg/ml

40µg/ml

80µg/ml

s. nachfolgende Tabelle

Tabelle Nr.4.2.2 Mehrfachgabe, gemittelte Messwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen (NK-Zellaktivität). Im 2. Schritt finden sich die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle zum Ausgangswert (0h).

Ermittelte Meßwerte

	0h	24h (+/-)	48h (+/-)	72h (+/-)	96h (+/-)	120h (+/-)	192h (+/-)	264h (+/-)	408h (+/-)
Kontrolle	17,8	23,7 0,5	10,5 0,0	14,8 0,7	16,9 1,1	20,7 0,6	19,1 0,8	19,4 1,3	17,1 0,5
0 µg/ml	56,4	56,5 0,7	51,4 2,9	62,3 1,9	72,0 2,6	59,4 5,3	67,0 2,5	59,3 3,9	22,9 0,9
10 µg/ml	56,4	50,3 3,0	53,2 2,1	64,7 2,8	71,4 3,6	61,3 7,1	64,3 6,3	54,7 6,2	20,3 0,9
20 µg/ml	56,4	49,6 0,5	54,3 1,7	65,5 1,7	71,5 1,6	67,9 5,2	67,0 6,5	53,2 7,7	18,9 1,4
40 µg/ml	56,4	54,1 2,1	56,8 1,4	67,9 2,7	75,0 2,9	70,1 6,8	68,6 5,9	44,2 5,2	15,8 0,5
80 µg/ml	56,4	60,6 4,5	61,4 2,5	69,2 1,8	62,3 13,0		28,9 8,5	15,2 2,3	9,0 0,5

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

	0h	24h (+/-)	48h (+/-)	72h (+/-)	96h (+/-)	120h (+/-)	192h (+/-)	264h (+/-)	408h (+/-)
10 µg/ml	0,0	-6,2 2,3	1,7 3,3	2,4 1,0	-0,6 2,4	2,0 1,8	-2,7 4,5	-4,6 2,4	-2,6 0,2
20 µg/ml	0,0	-6,9 0,6	2,9 2,1	3,2 1,6	-0,5 1,6	8,5 1,5	0,0 4,3	-6,1 3,8	-4,0 1,6
40 µg/ml	0,0	-2,4 1,5	5,3 3,1	5,6 1,5	2,9 0,6	10,7 1,7	1,5 3,8	-15,1 1,6	-7,1 1,4
80 µg/ml	0,0	4,0 3,9	10,0 1,3	6,9 1,9	-9,7 13,4		-38,1 8,3	-44,1 2,0	-13,9 1,4

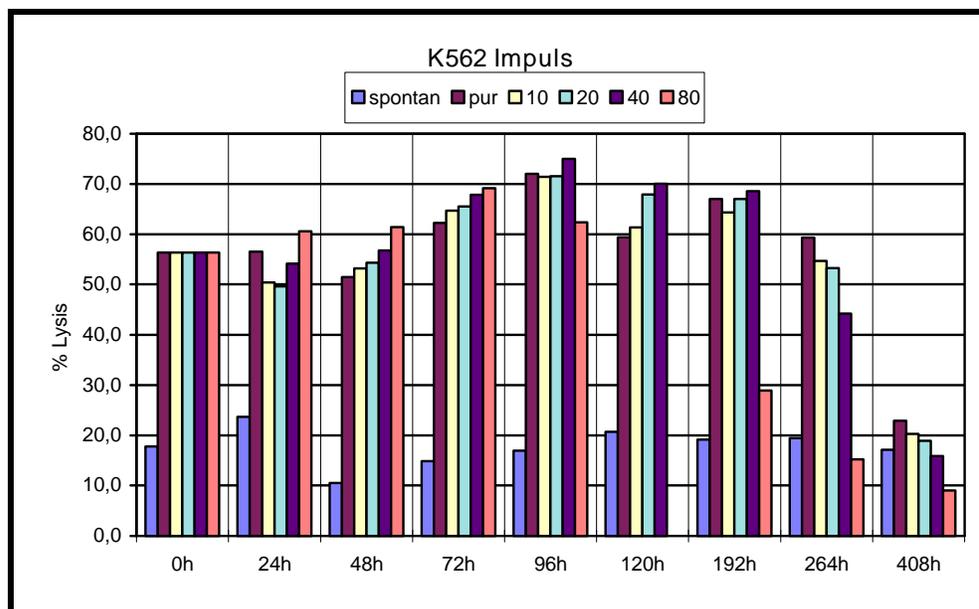


Abb. 4.2.3 NK-Zellaktivität Mehrfachgabe, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angaben als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.(pur=s.o.)

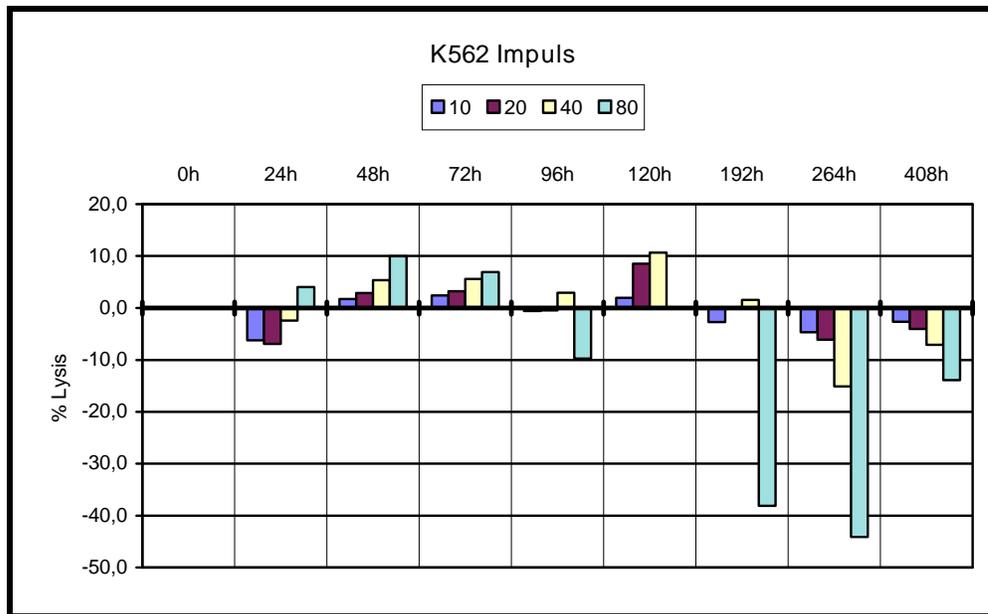


Abb 4.2.4 NK-Zellaktivität nach Mehrfachgabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

Bei einer Enzymkonzentration von 10 µg/ml erfolgt ein signifikanter Abfall der Lysopotenz bei 24h, 164h und 408h ($p < 0.01$). Eine signifikante Steigerung ist bei 72h ($p < 0.01$) zu verzeichnen.

Bei 20 µg/ml ist der signifikante Abfall bei 24h, 264h und 408h ($p < 0.01$), die signifikante Steigerung bei 72h und 120h ($p < 0.01$).

Beträgt die Enzymkonzentration 40 µg/ml, fällt die Lysopotenz signifikant bei 24h ($p < 0.05$), 264h und 408h ($p < 0.01$). Eine signifikante Steigerung ist bei 48h, 72h, 96h, und 120h ($p < 0.01$) zu beobachten.

Wenn die Enzymkonzentration 80 µg/ml beträgt, fällt die Lysopotenz signifikant bei 192h, 264h und 408h. Ein signifikanter Anstieg zeigt sich bei 48h und 72h ($p < 0.01$).

4.2.5 Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten bei Mehrfachgabe

Tabelle Nr.4.2.6 Mehrfachgabe, gemittelte Messwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen (T-Zellaktivität). Im 2. Schritt finden sich die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle zum Ausgangswert.(0h)

Ermittelte Meßwerte

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
Kontrolle	25,5	30,2	1,1	21,2	0,8	27,8	0,8	30,0	0,5	25,7	0,6	22,3	0,6	24,3	0,8	22,4	0,8
0 µg/ml	55,8	57,6	2,5	51,6	1,5	58,0	2,2	69,6	1,2	50,7	1,7	71,4	2,4	58,9	4,1	28,4	1,5
10 µg/ml	55,8	56,3	1,5	52,6	2,4	62,6	3,1	75,9	1,8	61,5	2,3	73,1	3,0	55,8	4,8	25,0	1,1
20 µg/ml	55,8	55,6	2,5	55,5	0,5	70,5	2,4	75,1	1,5	61,1	6,2	73,8	4,3	53,6	6,2	25,1	1,7
40 µg/ml	55,8	60,3	0,9	63,5	1,6	68,1	0,9	79,1	1,6	65,6	5,7	72,8	3,5	44,8	2,5	23,9	0,0
80 µg/ml	55,8	64,5	5,6	66,5	1,6	74,5	2,9	64,6	11,8	48,4	13,2	41,8	5,1	24,3	0,6	14,2	1,0

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

	0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)	192h	(+/-)	264h	(+/-)	408h	(+/-)
10 µg/ml	0,0	-1,3	4,0	1,0	1,9	4,6	5,3	6,3	0,9	10,8	1,6	1,6	0,6	-3,0	1,6	-3,4	1,1
20 µg/ml	0,0	-2,0	0,5	3,9	1,9	12,4	4,5	5,5	0,5	10,5	4,9	2,4	2,4	-5,3	2,1	-3,3	2,2
40 µg/ml	0,0	2,8	2,6	11,9	1,8	10,0	1,8	9,5	1,3	14,9	4,1	1,4	2,5	-14,1	1,8	-4,5	1,6
80 µg/ml	0,0	7,0	3,9	14,9	2,5	16,5	4,5	-5,0	13,0	-2,3	12,1	-29,7	2,7	-34,6	3,7	-14,2	1,2

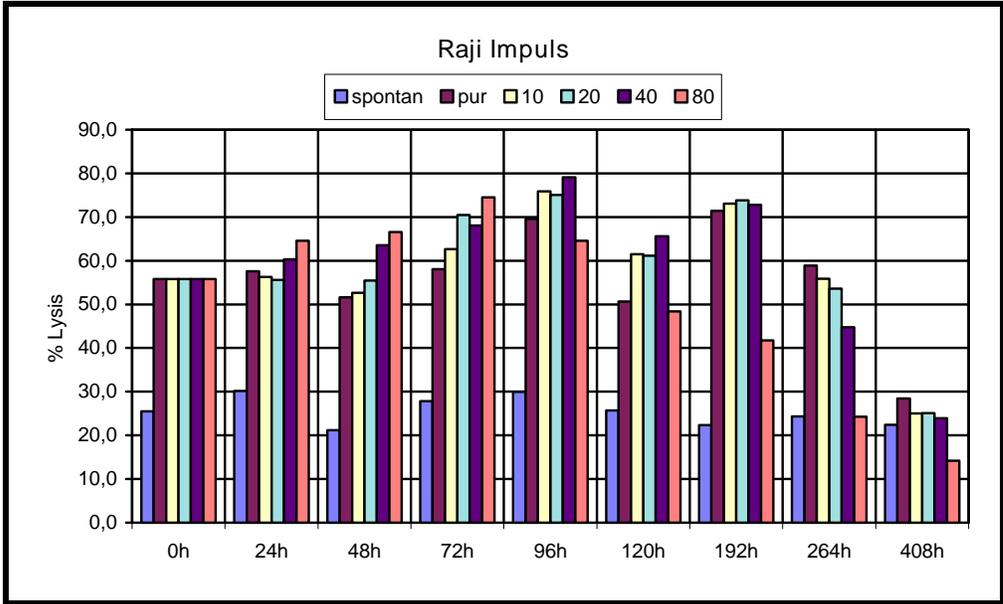


Abb. 4.2.7 T-Zellaktivität Mehrfachgabe, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle. (pur=ohne Zugaben)

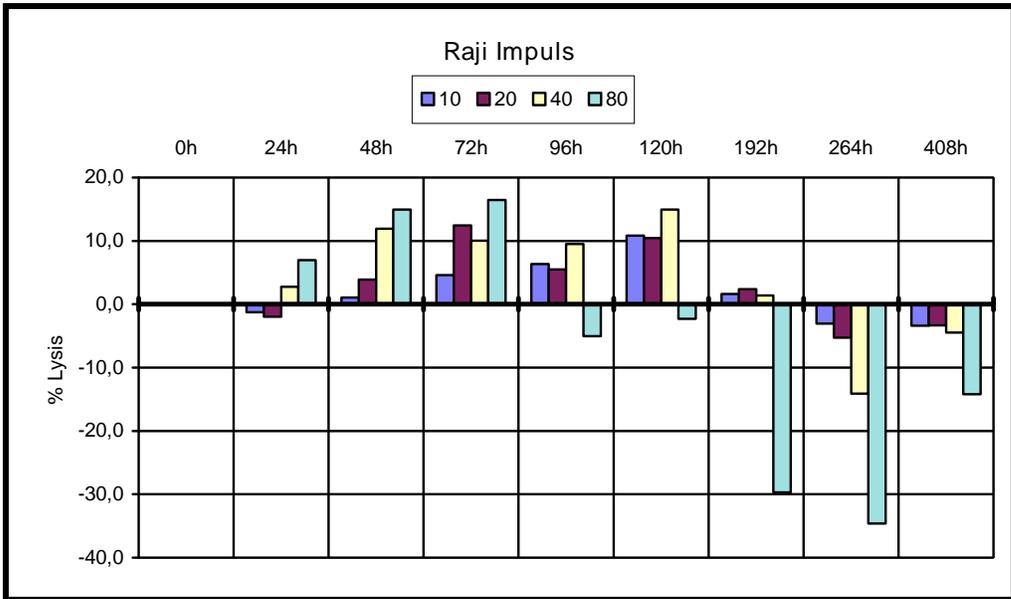


Abb. 4.2.8 T-Zellaktivität Mehrfachgabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

Bei einer Enzymkonzentration von 10 µg/ml erfolgt ein signifikanter Anstieg der Lysis bei 96h, 120h, und 192h ($p < 0.01$), der signifikante Abfall bei 264h und 408h.

Bei 20 µg/ml steigt die Lysis signifikant bei 48h, 72h, 96h und 120h ($p < 0.01$), der signifikante Abfall ist bei 24h, 264h und 408h ($p < 0.01$).

Bei 40 µg/ml ist ein signifikanter Anstieg bei 48h, 72h, 96h und 120h ($p < 0.01$). Der signifikante Abfall ist bei 264h und 408h.

Beträgt die Enzymkonzentration 80µg/ml, steigt die Lysis signifikant bei 24h, 48h und 72h ($p < 0.01$). Der signifikante Abfall ist bei 192h, 264h und 408h ($p < 0.01$).

4.3 Einmalgabe von DMSO, Retinol und Retinsäure

In dieser Testreihe werden die Substanzen wie im Material und Methoden Teil beschrieben einen Tag vor Testbeginn mit den Effektorzellen inkubiert.

4.3.1 K562, NK-Zellaktivität:

Tabelle Nr.4.3.1.1 Die Konzentrationen der Substanzen sind in mmol/ml angegeben. Gemittelte Messwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen. (NK-Zellaktivität). Im 2. Schritt sind die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle zum Ausgangswert angegeben

Ermittelte Meßwerte

		0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)
	spontan	24,1	18,0	0,9	24,4	7,4	28,4	2,8	29,8	4,9	26,1	6,2
DMSO	0 M	52,9	45,7	7,7	46,6	6,4	57,2	4,1	62,1	4,6	55,9	5,8
Abb. 4.3.2.1	10 ⁻⁴ M	52,9	47,4	8,7	47,9	9,5	59,9	3,8	51,7	17,8	59,1	3,9
	10 ⁻⁶ M	52,9	49,3	8,9	46,7	9,1	68,0	1,8	66,1	1,6	58,4	10,3
	10 ⁻⁸ M	52,9	46,3	7,5	48,4	11,6	65,9	3,6	65,0	5,8	57,6	8,3
Retinol	0 M	52,9	47,9	8,8	48,7	11,4	64,0	4,2	65,7	5,5	59,4	6,5
Abb. 4.3.3.1	10 ⁻⁴ M	52,9	20,6	0,8	27,4	5,1	37,5	1,5	31,8	9,0	29,6	7,4
	10 ⁻⁶ M	52,9	47,9	7,7	50,0	10,8	68,3	1,5	66,1	5,6	58,2	7,2
	10 ⁻⁸ M	52,9	48,4	10,5	49,7	11,5	68,5	1,0	68,7	3,0	60,7	5,0
Retinsäure	0 M	52,9	48,3	7,6	52,1	14,3	66,4	1,3	69,4	3,9	60,9	6,1
Abb.4.3.4.1	10 ⁻⁴ M	52,9	24,7	2,6	30,4	7,7	35,9	0,1	45,6	18,0	28,8	5,3
	10 ⁻⁶ M	52,9	50,8	10,4	46,3	11,4	67,6	0,6	65,9	6,1	58,5	6,5
	10 ⁻⁸ M	52,9	48,3	9,0	50,7	11,6	68,3	3,2	69,1	4,0	60,0	5,0

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

		0h	24h	(+/-)	48h	(+/-)	72h	(+/-)	96h	(+/-)	120h	(+/-)
DMSO	10 ⁻⁴ M	0,0	0,1	1,7	-1,2	1,4	-2,7	0,6	-14,1	20,0	0,4	2,4
Abb. 4.3.2.2	10 ⁻⁶ M	0,0	2,0	3,3	-2,4	1,5	5,4	1,4	0,4	3,7	-0,3	5,4
	10 ⁻⁸ M	0,0	-1,0	5,2	-0,8	4,8	3,4	0,5	-0,7	3,6	-1,1	2,9
Retinol	10 ⁻⁴ M	0,0	-26,7	7,0	-21,7	15,3	-25,1	4,6	-33,9	8,5	-29,1	10,5
Abb. 4.3.3.2	10 ⁻⁶ M	0,0	0,6	2,1	0,9	2,3	5,7	1,7	0,4	1,6	-0,5	4,1
	10 ⁻⁸ M	0,0	1,1	4,4	0,6	2,6	6,0	2,1	3,0	1,6	1,9	1,8
Retinsäure	10 ⁻⁴ M	0,0	-22,6	6,6	-18,7	18,1	-26,7	3,0	-20,1	15,0	-29,9	10,2
Abb. 4.3.4.2	10 ⁻⁶ M	0,0	3,5	4,5	-2,8	3,2	5,1	2,6	0,2	2,0	-0,2	4,9
	10 ⁻⁸ M	0,0	1,0	2,7	1,6	2,3	5,8	0,0	3,3	1,8	1,3	3,4

4.3.2 NK-Zellaktivität nach Inkubation mit DMSO

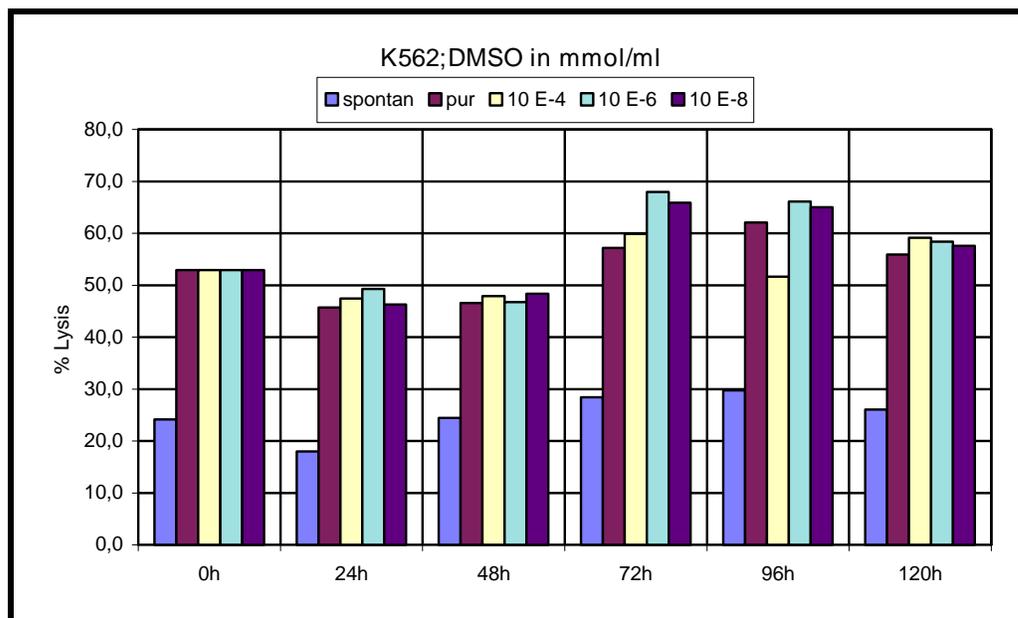


Abb.4.3.2.1 NK-Zellaktivität nach Inkubation mit DMSO, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

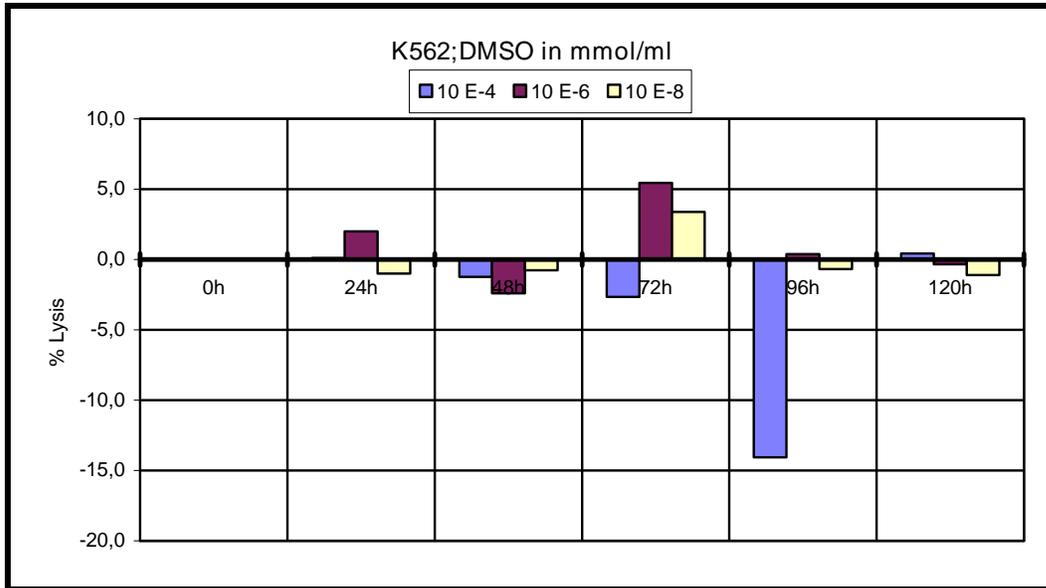


Abb. 4.3.2.3 NK-Zellaktivität bei DMSO-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.3 NK-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinol

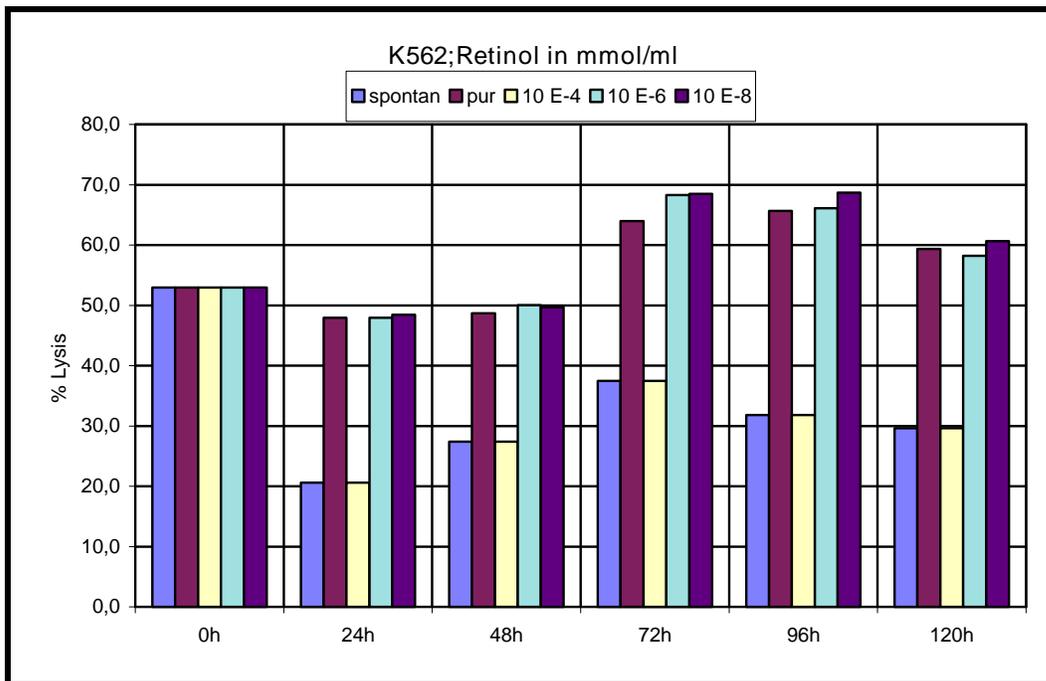


Abb.4.3.3.1 NK-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinol, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

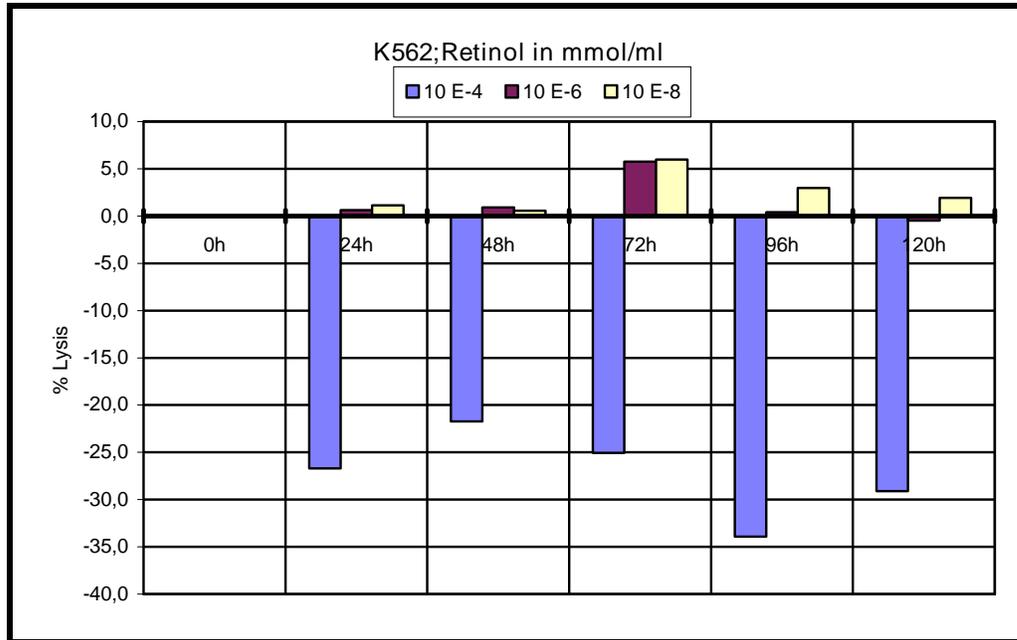


Abb. 4.3.3.2 NK-Zellaktivität bei Retinol-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.4 NK-Zellaktivität der T-Lymphozyten nach Inkubation mit Retinsäure

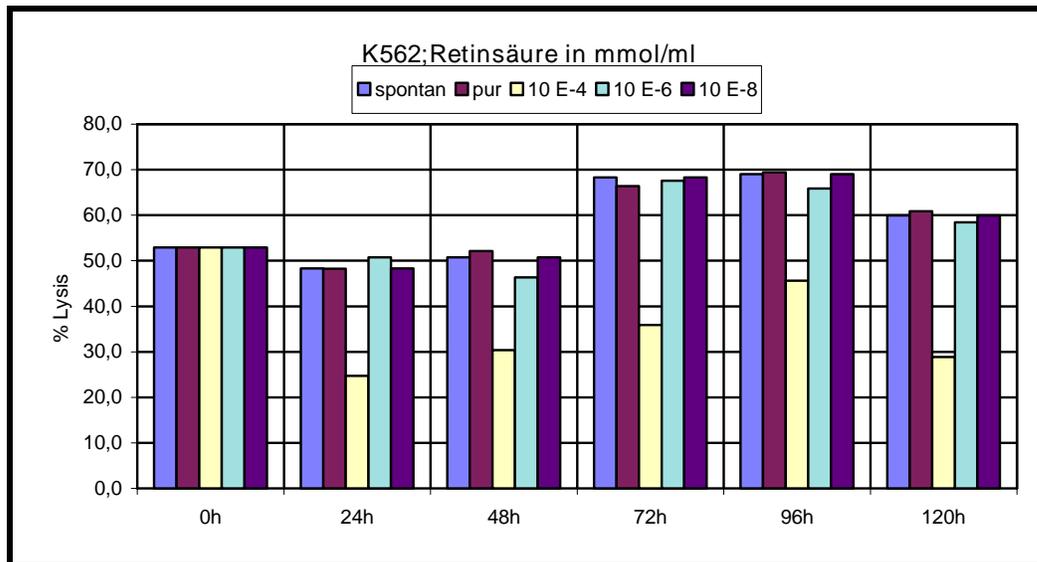


Abb.4.3.4.1 NK-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinsäure, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

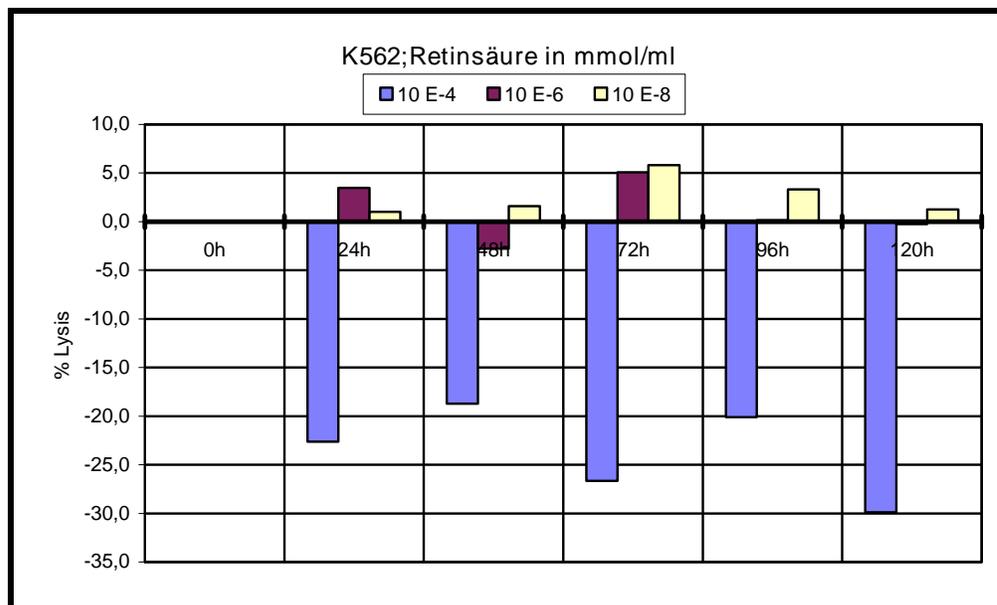


Abb. 4.3.4.2 NK-Zellaktivität bei Retinsäure-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.5 Signifikanzen 4.3.2 - 4.3.4

Signifikante Abfälle der Lysopotenz der Effektorzellen sind nach 96h bei Zugabe von DMSO in der Konzentration 10^{-4} M zu beobachten. ($p < 0.05$)

Mit Retinol und Retinsäure sind nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h bei 10^{-4} M signifikante Abfälle. ($p < 0.01$)

Eine Steigerung der Lysopotenz ist mit Retinol 72h bei 10^{-6} M und 10^{-8} M erreicht. ($p < 0.05$)

Ebenfalls eine signifikante Steigerung der Lysopotenz ist mit Retinsäure bei 72h mit 10^{-6} M und 10^{-8} M erreicht. ($p < 0.05$)

4.3.6 Raji, Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten

Tabelle Nr.4.3.6.1 Die Konzentrationen der Substanzen sind in mmol/ml angegeben. Gemittelte Meßwerte und die sich daraus ergebenden Berechnungen.(Zelllinie Raji).In der zweiten Tabelle sind die fett eingerahmten Werte als signifikante Steigerungen bzw. Abfälle zum Ausgangswert.(0h)

Ermittelte Meßwerte

		<u>0h</u>	<u>24h</u>	<u>(+/-)</u>	<u>48h</u>	<u>(+/-)</u>	<u>72h</u>	<u>(+/-)</u>	<u>96h</u>	<u>(+/-)</u>	<u>120h</u>	<u>(+/-)</u>
	spontan	26,7	22,4	2,5	28,5	4,6	28,2	0,1	31,7	2,8	29,5	3,8
DMSO	0 M	53,7	45,3	14,0	44,3	7,7	52,0	5,4	59,3	8,6	63,7	7,2
Abb. 4.3.7.1	10 ⁻⁴ M	53,7	41,3	8,2	43,2	10,2	51,4	3,3	48,9	8,7	59,9	7,4
	10 ⁻⁶ M	53,7	43,8	8,7	43,5	9,3	54,6	6,5	56,6	9,2	57,6	8,2
	10 ⁻⁸ M	53,7	45,8	10,5	43,6	7,1	52,2	2,8	58,4	9,9	59,1	8,0
Retinol	0 M	53,7	46,8	7,5	43,3	7,9	50,1	5,3	57,2	9,0	52,6	12,1
Abb. 4.3.8.1	10 ⁻⁴ M	53,7	22,9	1,4	29,1	4,9	33,9	0,3	33,0	4,1	30,0	2,4
	10 ⁻⁶ M	53,7	46,9	7,6	42,2	8,5	55,8	4,3	56,7	7,5	60,4	8,0
	10 ⁻⁸ M	53,7	49,4	9,3	45,0	7,5	56,8	5,1	60,1	7,5	58,6	8,5
Retinsäure	0 M	53,7	48,1	6,4	45,6	10,0	55,3	3,9	59,9	6,5	59,7	6,8
Abb. 4.3.9.1	10 ⁻⁴ M	53,7	28,8	1,5	30,9	3,9	34,3	1,2	46,7	16,3	32,7	2,4
	10 ⁻⁶ M	53,7	49,6	7,1	43,5	10,0	59,2	5,5	58,2	8,6	57,0	5,4
	10 ⁻⁸ M	53,7	50,7	8,5	47,1	9,9	59,9	4,4	60,7	7,9	61,3	3,8

Ermittelte Meßwerte abzüglich Spontanlysis und Kontrolle

		<u>0h</u>	<u>24h</u>		<u>48h</u>		<u>72h</u>		<u>96h</u>		<u>120h</u>	
DMSO	10 ⁻⁴ M	0,0	-5,5	1,0	-1,2	3,3	-1,1	1,6	-9,9	15,5	1,2	0,9
Abb. 4.3.7.2	10 ⁻⁶ M	0,0	-3,0	1,9	-0,9	2,0	2,1	1,6	-2,2	2,8	-1,1	1,5
	10 ⁻⁸ M	0,0	-1,0	3,1	-0,8	2,5	-0,2	2,0	-0,4	2,8	0,5	3,6
Retinol	10 ⁻⁴ M	0,0	-23,8	8,9	-15,3	11,5	-18,5	4,6	-25,8	8,2	-28,7	10,5
Abb. 4.3.8.2	10 ⁻⁶ M	0,0	0,1	4,0	-2,2	0,6	3,3	0,5	-2,1	0,9	1,7	2,6
	10 ⁻⁸ M	0,0	2,6	4,7	0,6	1,4	4,3	0,2	1,3	1,1	0,0	4,4
Retinsäure	10 ⁻⁴ M	0,0	-18,0	9,2	-13,5	10,5	-18,2	3,6	-12,1	9,3	-25,9	10,7
Abb. 4.3.9.2	10 ⁻⁶ M	0,0	2,8	3,2	-0,8	3,1	6,7	0,6	-0,6	3,1	-1,7	3,7
	10 ⁻⁸ M	0,0	3,9	4,4	2,7	3,6	7,4	0,5	1,9	1,9	2,7	5,6

4.3.7 Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten nach Inkubation mit DMSO

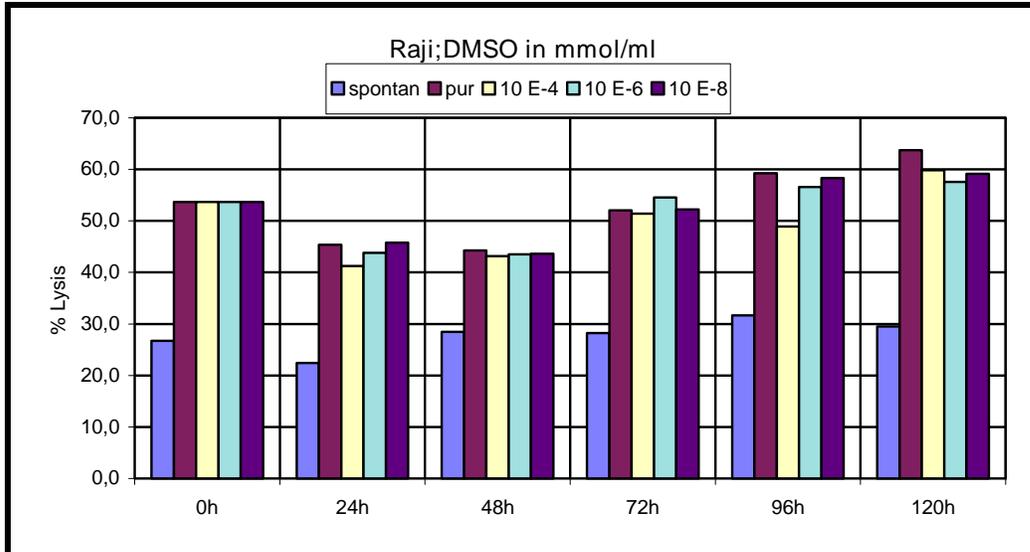


Abb.4.3.7.1 T-Zellaktivität nach Inkubation mit DMSO, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angabe als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

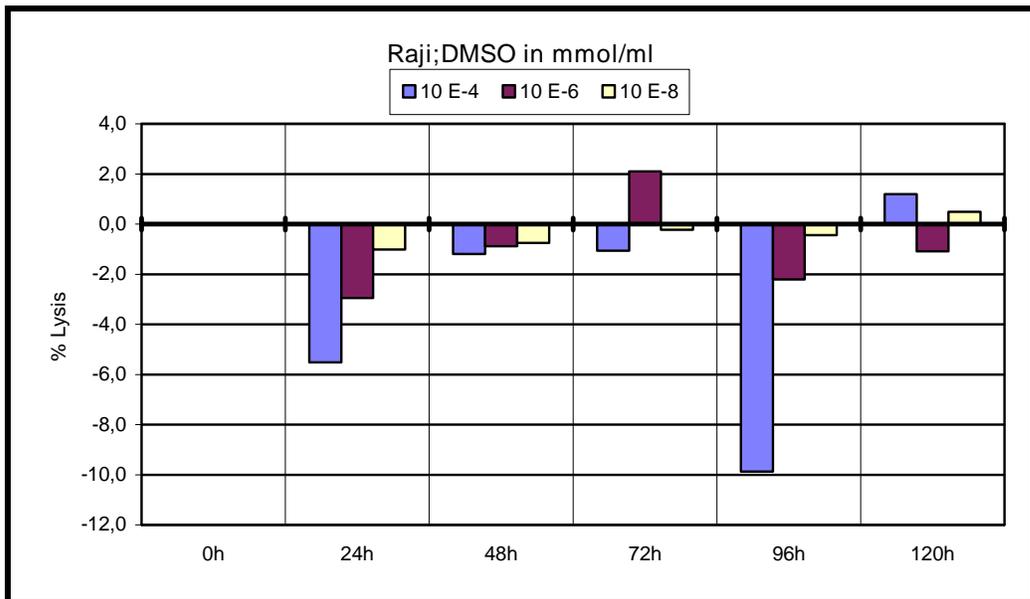


Abb. 4.3.7.2 T-Zellaktivität bei DMSO-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.8 Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten nach Inkubation mit Retinol

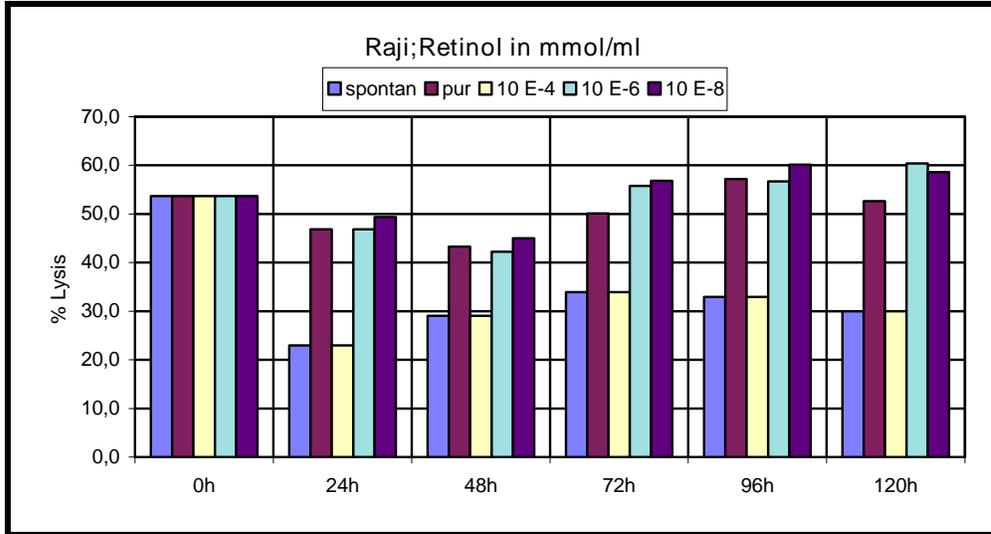


Abb.4.3.8.1 T-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinol, Ermittlung der Werte Messung im Flowcytometer. Angaben als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

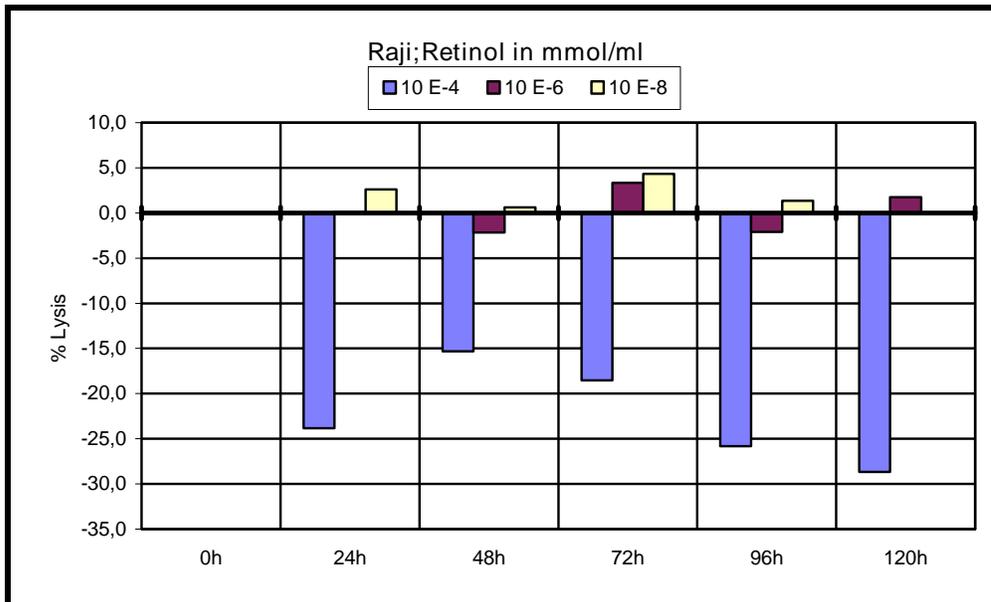


Abb. 4.3.8.2 T-Zellaktivität bei Retinol-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.9 Aktivität nicht MHC-restringierter T-lymphozyten nach Inkubation mit Retinsäure

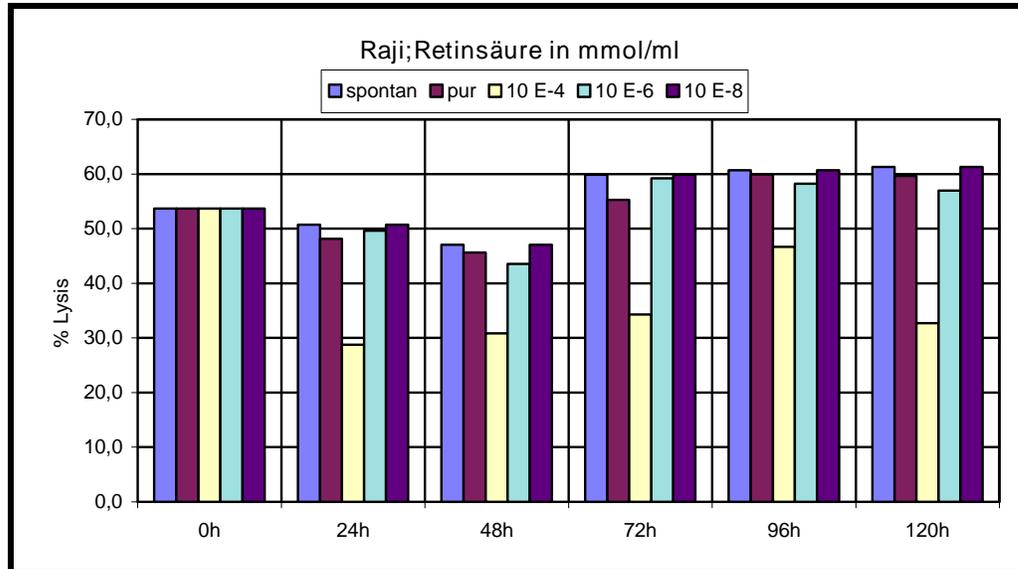


Abb.4.3.9.1 T-Zellaktivität nach Inkubation mit Retinsäure, Ermittlung der Werte nach Messung im Flowcytometer. Angaben als Prozentwerte der gemessenen Lysis ohne Abzug der Spontanlysis und Kontrolle.

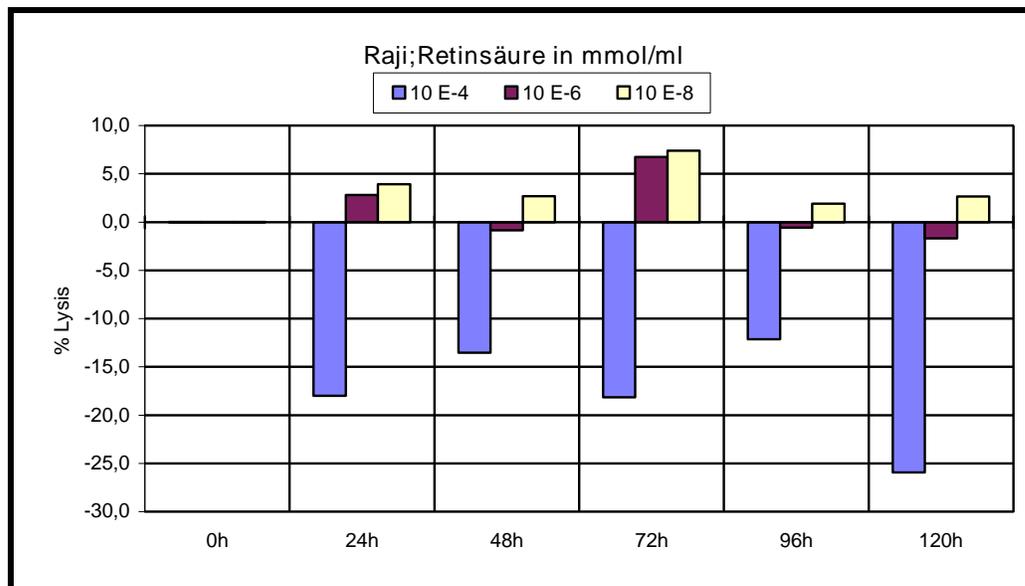


Abb. 4.3.9.2 T-Zellaktivität bei Retinsäure-Gabe, Lysisrate nach Abzug von Spontanlysis und der Lysis der Kontrolle.

4.3.10 Signifikanzen 4.3.7 - 4.3.9

Mit Retinol und Retinsäure bestehen nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h bei 10^{-4} M signifikante Abfälle. ($p < 0.01$)

Eine signifikante Steigerung der Lysopotenz ist mit Retinsäure 72h bei 10^{-6} M und 10^{-8} M erreicht. ($p < 0.05$)

4.4. Vergleichsreihe der zwei Cytotoxmethoden
Europiumreleaseassay und Flowcytometrie

Tabelle Nr. 4.4.1: In der nachfolgenden Tabelle ist ein 6-Fach Ansatz in aufsteigendem Target:-Effektorzell (T:E) Ratio aufgetragen. Getestet wurden hier die Zelllinien Raji und K562.

FACS:	Raji	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Mittelwert	(+/-)	Ratio-spont
	spontan	7,7	12,4	14,1	11,4	10,1	12,0	11,3	2,0	
T:E	1:05	22,7	29,4	13,7	27,2	25,6	28,9	24,6	5,3	13,3
T:E	1:10	32,1	35,1	26,3	35,1	33,9	35,6	33,0	3,2	21,7
T:E	1:20	36,8	36,8	46,3	38,0	37,6	37,7	38,9	3,4	27,6
T:E	1:40	40,7	39,3	53,5	41,2	41,6	40,6	42,8	4,8	31,5
FACS:	K562	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Mittelwert	(+/-)	Ratio-spont
	spontan	8,4	14,8	9,5	12,6	10,9	14,0	11,7	2,3	
T:E	1:05	31,0	31,2	9,8	32,3	31,9	32,2	28,1	8,2	16,4
T:E	1:10	39,3	36,7	26,1	39,3	39,9	38,4	36,6	4,8	24,9
T:E	1:20	42,3	37,7	37,3	41,4	42,7	40,4	40,3	2,1	28,6
T:E	1:40	60,5	39,3	46,0	51,4	56,1	46,1	49,9	7,0	38,2
EURO-PIUM	Raji	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Mittelwert	(+/-)	spez.Lyse
	spontan	123	120	113	130	121	132	123,2	6,4	24,2
	total	608	640	615	652	643	640	633,0	15,9	
T:E	1:05	141	135	130	129	140	139	135,7	4,7	2,5
T:E	1:10	162	163	153	144	160	159	156,8	6,6	6,6
T:E	1:20	189	191	141	185	183	194	180,5	18,0	11,2
T:E	1:40	252	245	246	238	236	252	244,8	6,2	23,9
EURO-PIUM	K562	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Mittelwert	(+/-)	spez. Lyse
	spontan	44	41	38	38	39	43	40,5	2,4	37,0
	total	138	145	149	145	160	163	150,0	8,8	
T:E	1:05	46	46	44	43	42	50	45,2	2,6	4,3
T:E	1:10	65	49	45	48	49	50	51,0	6,5	9,6
T:E	1:20	53	56	53	52	51	56	53,5	1,9	11,9
T:E	1:40	73	68	69	65	64	66	67,5	3,0	24,7

4.4.2 Korellationskoeffizienten der beiden Meßmethoden

Korrelationskoeffizient im Test für die Aktivität nicht MHC-restringierter T-Lymphozyten (Zelllinie Raji) : 0,90

Korrelationskoeffizient im Test für die NK-Zellaktivität
 (Zelllinie K562) : 0,97

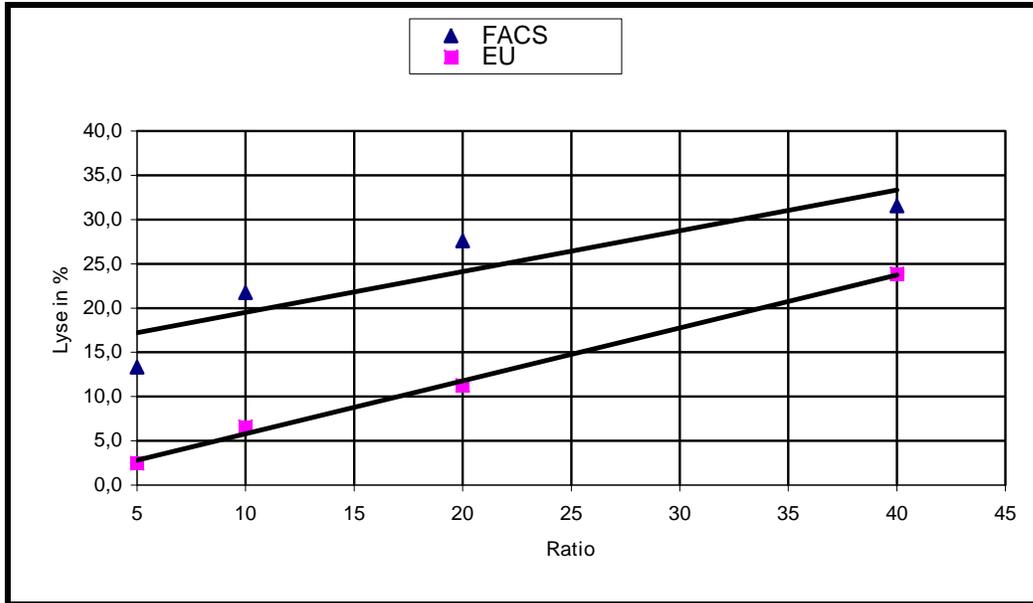


Abb. 4.4.3 Trendlinien Raji für FACS und Europium-Immunoassay (EU)

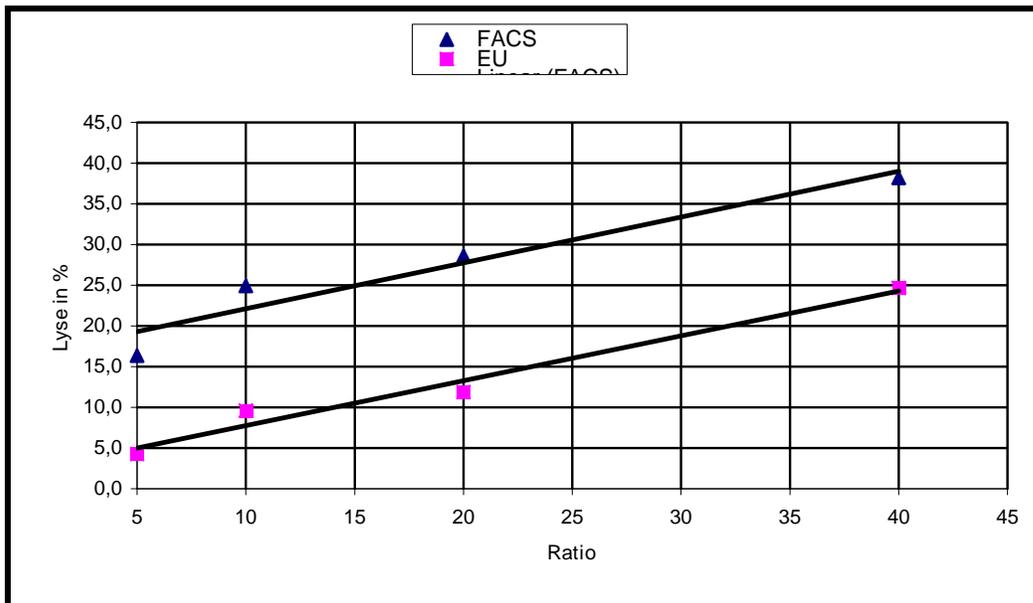


Abb. 4.4.4 Trendlinien K562 für FACS und Europium-Immunoassay (EU)

4.5. Färbereihe mit DIO bei den Zelllinien K562 und Raji.

Tabelle 4.5.1 Färbereihe mit DIO: In dieser Testreihe werden die Targetzellen in steigender Konzentration mit dem Membranfarbstoff DIO (s. Material u. Methoden) angefärbt. Nach Anfärbung mit Propidiumjodid (PI) wurde auch die Spontanlyse (Spontansterblichkeit) der Zellen ermittelt.

Raji		Abb. 4.5.2			
DIO-Menge in µg/ml	Anfärbbarkeit %FL1 > 10 ³ der Targetzellen	Spontanlyse %			
0	0	0			
5	63	6			
10	77	6			
15	84	8			
20	86	9			
25	89	9			
K562		Abb. 4.5.3			
DIO-Menge in µg/ml	Anfärbbarkeit %FL1 > 10 ³ der Targetzellen	Spontanlyse %			
0	0	0			
5	79	2			
10	84	3			
15	87	3			
20	93	6			
25	91	6			

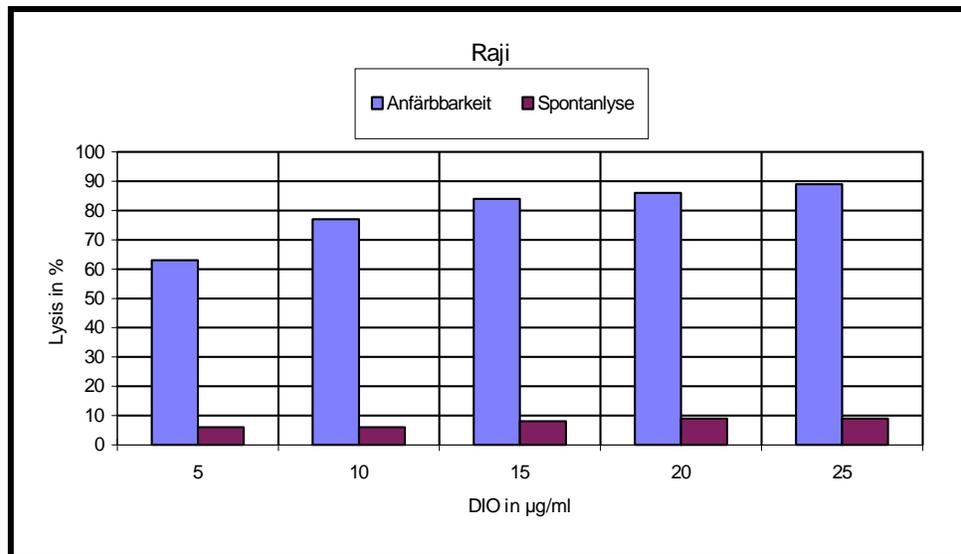


Abb. 4.5.2 Anfärbbarkeit und Spontanlyse von Raji in Abhängigkeit von DIO

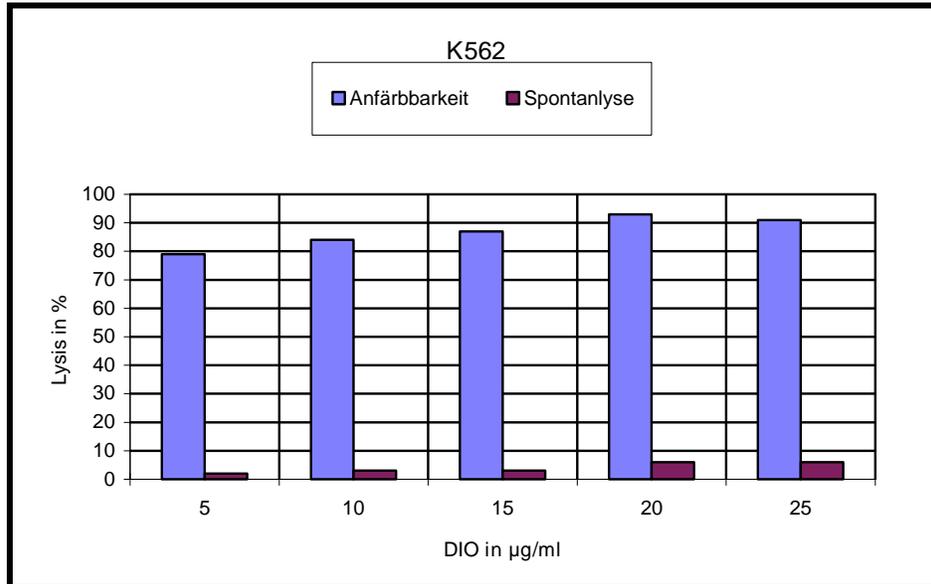


Abb. 4.5.3 Anfärbarkeit und Spontanlyse von K562 in Abhängigkeit von der DIO Konzentration.

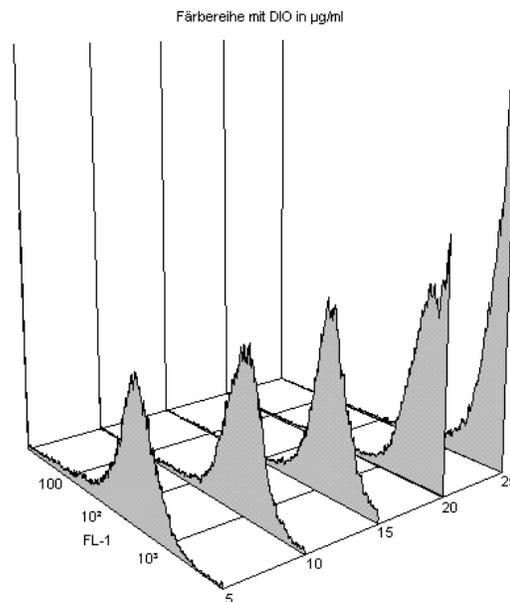


Abb. 4.5.4 Histogramm DIO-Färbereihe exemplarische Zelllinie: Raji.

Für die Testreihen wurde die Zelllinie Raji mit 20-25 µg/ml und K562 mit 15-20 µg/ml DIO eingefärbt.

V. Diskussion

Die in dieser Arbeit entwickelte durchflußzytometrische (flowzytometrische) Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität wurde dazu eingesetzt, die Wirkungen von Enzymen und Retinoiden auf periphere Blut Lymphozyten (PBL) zu ermitteln. Die Versuche mit den Enzympräparationen und Retinoiden haben gezeigt, daß eine von Dosis und Inkubationsdauer abhängige signifikante Steigerung der Aktivität nicht MHC-restringierter CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyten und CD56+ NK Zellen *in vitro* erfolgte. Nachfolgend werden Methode und die Wirkungen der Substanzen diskutiert.

5.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der zytotoxischen Aktivität peripherer Blut Lymphozyten (PBL)

Die in dieser Arbeit zuerst verwendete Methode zur Bestimmung der Lymphozytenaktivität, der Europiumreleaseassay, hatte sich nur bedingt bewährt. Die Anfälligkeit in Hinsicht auf systematische Fehler war relativ hoch. Die hohe Anzahl der Pipettierschritte auf zuvor markierte Zellen verursachten gelegentlich eine ungewollte Freisetzung des Europiumkomplexes in die umliegende Flüssigkeit, sei es durch Einstechen der Pipettenspitze in das Pellet oder durch zu schnelle Abgabe der Reagenzien auf die Zellen. Diese Methode ist stark abhängig von der Genauigkeit des Experimentators. Ferner war der Aufwand für hohe Testzahlen zu hoch.

Es ergab sich die Notwendigkeit, aufgrund der hohen Testzahlen eine einfache, günstige und sichere Methode zu finden, die es ermöglicht, Untersuchungen mit höheren Testzahlen ohne größere durchzuführen.

Die Messung der zytotoxischen Aktivität von PBL haben bis jetzt nur wenige Arbeitsgruppen versucht. Meist waren die Prinzipien schlecht nachvollziehbar und brachten ungenaue Ergebnisse (56). In dieser Arbeit beschrieb Papa, daß nach 90 minütiger Inkubation von K562 Zellen mit

Peripheren Blut Lymphozyten (PBL) durch anschließende Zugabe von Propidium Jodid (PI) die defekten Zellen markiert werden und in der Zweiparameterdarstellung im Forward scatter (FSC) und Siedeward scatter (SSC) die Lymphozyten herausgefiltert werden können. Das was nach der Filterung „übrig“ bleibt, sollen die K562 Zellen sein. Doch wie die Abb 5.1.1 zeigt, ist eine Differenzierung von Lymphozyten und Tumorzellen nicht möglich, da die Targetzellen eine sehr inhomogene Größenverteilung besitzen.

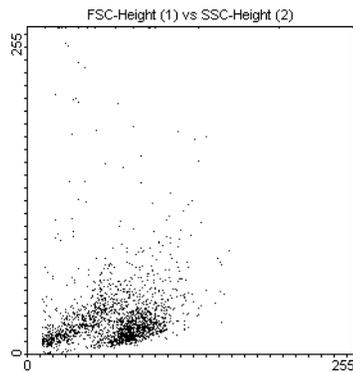


Abb. 5.1.1 Zweiparameterdarstellung des Lymphozyten (BC) Tumorzell-gemisches (K562) am FACScan.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode ermöglicht durch vorheriges markieren der Targetzellen mit dem Membranfarbstoff DIO (s. Kap III) die Trennung der Targetzellen von den PBL. Der Membranfarbstoff beeinflusst nur im geringen Ausmaß die Zell-Vitalität . (38).

Im Kap. 4.4 wurden die Europium-Release-Methode und die in dieser Arbeit verwendete flowzytometrische Methode, gegenübergestellt. Dabei ergab sich, daß in aufsteigenden Verhältnissen von PBL:Targetzellen eine Korrelation von 0.90 für die nicht MHC-restringierten CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (Bestimmung mit der Zelllinie Raji) und 0.97 für die CD56+ NK-Zellaktivität (Bestimmt mit der Zelllinie K562) ermittelt werden konnte. Ferner ist diese Methode im Verhältnis zu der Europium-Release-Methode in ihrer Durchführung einfach, in den Kosten gering, und kann in der

Bestimmung der nicht MHC-restringierten CD8+ und CD56+ NK Zellaktivität eingesetzt werden.

Tab. 5.1.2 Gegenüberstellung der FACS Methode und des Europium Release Assays (nach Henrich D., Akoglu B., Jelitto P, Böcklen E, Träger L.): Poster 1999 auf dem Kongreß für Flowzytometrie der DGFZ in Regensburg)

	<u>FACS</u>	<u>Europium Release Assay</u>
Präparation der Targetzellen	2 Waschschrte, 30 Min. Inkubationszeit. Einfrieren der Zellen möglich, d.h. Verkürzung der Vorbereitung um 40 Min, Dauer somit 10 Min.	6 Waschrte, 30 Min, Inkubationszeit, kein Einfrieren möglich, Dauer 120 Min
Präparation der Effektorzellen	1 Waschschrte. Einstellen der gewünschten E:T Ratio, 2 Fach Ansatz in jeweils einem FACS-Röhrchen	1 Waschschrte. Einstellen der E:T Ratio, 5-Fach Ansatz in 96 Loch Mikrotiterplatten. (Langwierige Pipettierschritte)
Inkubation	4h	2,5h
Messung	Zugabe von PI, Messung pro Röhrchen 30s	Mikrotiterplatten 1x zentrifugieren, Überstand abpipettieren und Zugabe von Enhancement-Lösung, Messung in einem Fluoreszenzphotometer
Ergebnisse	Einfache Auswertung, Bestimmung zusätzlicher Parameter der Zellen.	Langwierige Auswertung und keine zusätzlichen Parameter der Zellen.

Wenn die zwei Methoden im Gesamtaufwand gegenübergestellt werden, so ergibt sich durch die Vorbereitung der Zellen vor dem Testtag ein zusätzlicher Aufwand (s. Material und Methoden) bei dem Europium Release Assay. Die Targetzellen können bei der flowzytometrischen Methode in Aliquots eingefroren werden und sind bei -80°C über einen längeren Zeitraum verwendbar. Die reine Arbeitszeit ist um mehr als die Hälfte reduziert. Ferner ist zu beachten, daß bei der flowcytometrischen Methode einzelne Zellen quantifiziert werden, bei dem Europium Immun Assay wird dagegen indirekt die Zellyse über freigesetztes Europium und anschließende Komplexbildung mit der Enhancementlösung bestimmt.

5.2 Anfärbarkeit der Zelllinien *Raji* und *K562* mit dem Membranfarbstoff DIO

Für die flowzytometrische Bestimmung der Lymphozytenaktivität wurden die Targetzellen K562 und Raji mit dem Membranfarbstoff DIO angefärbt. Hierzu wurde eine Eichreihe mit aufsteigenden Konzentrationen ermittelt. Dies ermöglichte eine individuelle Anpassung der Farbstoffkonzentrationen in Bezug auf die Vitalität der gefärbten Zellen (s. Ergebnisse) und außerdem das Anfärben verschiedenster Zelltypen für weitere Bestimmungen. (eigene Daten)

5.3 Wirkungen der Enzymmischung auf die PBL

Es ergibt sich in dieser Arbeit die Frage, warum die Enzyme auf der einen Seite bei einer bestimmten Konzentration die Aktivität der PBL stimulieren, aber auf der anderen Seite bei höheren Konzentrationen hemmen. Zuerst soll hier die systemische (in vivo) Wirkung diskutiert werden. Die im Blutserum vorkommenden endogenen Proteinase werden in ihrer Wirkung unter Anderem durch Serumantiproteinase gehemmt. Diese Antiproteinase gehören den Akut-Phase-Proteinen an. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym Papain (=Cysteinprotease) wird durch Cystein-Antiproteinase (=Cystatine) und durch α 2-Makroglobulin gehemmt; die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin (=Serinproteinase) hingegen durch Serin-Antiproteinase (=Serpine) (6).

Aus der gegenseitigen Beeinflussung proteolytischer Enzyme, Antiproteinase und dem α 2-Makroglobulin reguliert die sogenannte proteolytische Serumaktivität (PSA). Die PSA reguliert durch ihre Aktivität die Konzentrationen der verschiedenen Serumproteine. Ferner werden auch Zelloberflächenmoleküle modifiziert und/oder abgebaut. Damit ermöglicht die PSA eine Immunhomöostase, zumal globuläre Peptide in erhöhten Konzentrationen eine immunsupprimierende Wirkung entfalten (2;15).

Ein möglicher wichtiger Sachverhalt ist die erhöhte PSA bei leichter sportlicher Betätigung (68). Dies könnte ein Indiz für eine verbesserte Immunfunktion bei erhöhter PSA sein (74). Dabei darf natürlich nicht außer acht gelassen werden, daß zahlreiche andere Faktoren (Durchblutung, Körpergewicht, Endorphine usw.) ebenfalls eine große Rolle spielen. Einige Veröffentlichungen sprechen für eine durch proteolytische Enzyme hervorgerufene Freisetzung von Zytokinen aus PBL. Erwähnt werden hier die Bestandteile von Wobenzym oder einzelne Enzyme wie Bromelain, Papain und Trypsin die Bildung von TNF- α induzieren (27;28;29).

TNF- α besitzt eine antitumorale und antivirale Wirkung (57;66). Zytotoxische Effekte an Targetzellen können einmal über ein monomeres, membranständiges 17kDa schweres TNF- α Molekül vermittelt werden, das in direktem Zell-zu-Zell-Kontakt (Effektor-Target) seine Wirkung entfaltet.(1;50;57). Ferner kann von PBL auch ein trimeres TNF- α Molekül gebildet werden, das an α 2-Makroglobulin gebunden und transportiert wird. (58;67;78). Das vom α 2-Makroglobulin freigesetzte TNF- α bewirkt die Zerstörung der Zielzelle (37). Nahezu alle Zellen (außer Erythrozyten) besitzen TNF-Rezeptoren mit 55 bzw. 75 kDa, an die das TNF-Molekül binden kann (54). Die Selektivität der Zerstörung von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen ist im Detail noch unklar. Es ist davon auszugehen, daß die Apoptose hier eine wichtige Rolle spielt (63). Abb 5.3.1 stellt eine schematische Aufgliederung der apoptotischen Mechanismen dar.

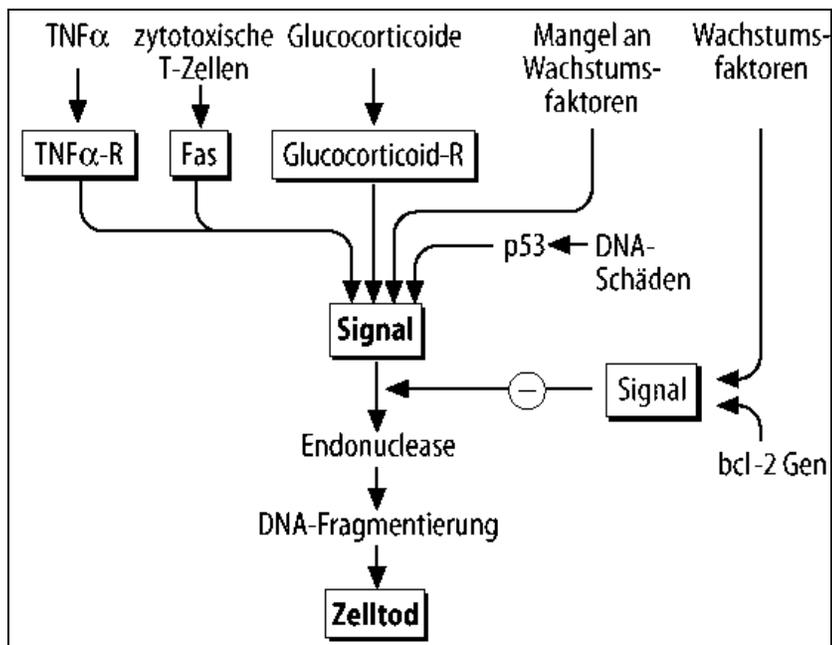


Abb. 5.3.1 Apoptose: Darstellung der verschiedenen Signalwege beim Start des programmierten Zelltodes (Aus 12)

In einer weiteren Publikation von *Desser et al.* (28) wurde neben der TNF- α Freisetzung auch die gesteigerte Produktion von IL-1 β und IL-6 durch PBL beschrieben. Signifikante Erhöhungen von IL-1 β und IL-6 wurden aber nur nach Inkubation der PBL mit einer bestimmten Menge Interferon α und γ erreicht, während die alleinige Gabe der Interferone (IFN) keine signifikante Erhöhung der Zytokine erbrachte. Diese Ergebnisse implizieren einen Synergismus zwischen den beiden Substanzgruppen Enzympräparation und IFN. Die Signifikanzen werden für die Ergebnisse ohne und mit Zugabe von IFN jedoch nicht zwischen den einzelnen Enzymkonzentrationen ermittelt.. Die großen Standardabweichungen der verschiedenen Enzymkonzentrationen ohne IFN-Zugabe würden vermutlich auch keine signifikanten Werte ergeben (bei IL1- β und IL-6). Die Standardabweichungen bei der TNF- α Produktion in Gegenwart verschiedener Enzymkonzentrationen sind jedoch weit geringer und würden die vorherigen Ergebnisse der Arbeit von *Desser et al.* bestätigen (27;28;29). In der zuletzt genannten Arbeit wurde ein maximaler Effekt der Enzympräparationen auf die TNF- α Produktion nach ca. 12h-20h erreicht.

Ein signifikanter Anstieg der Lysis der K562 Zellen, die wiederum die NK-Zellaktivität widerspiegelt, ist bei einer Konzentration von 20,40,80 und 160 $\mu\text{g/ml}$ und nach 24 h Inkubation gegeben ($P < 0.01$). (s. auch Kap. 4.1). Die signifikante Steigerung der NK-Zellaktivität nach schon 24 h kann durch die Sekretion von TNF- α aus NK-Zellen (45) erklärt werden. Je höher jedoch der anfängliche Stimulus durch die Enzympräparationen war, desto stärker nahm die Langzeitwirkung ab und die direkte zytotoxische Wirkung der Präparate. *Desser et al.* (27;28;29) haben ferner beschrieben, daß bei Enzymkonzentrationen von 1000 $\mu\text{g/ml}$ keine zytotoxischen Effekte zu erwarten waren. Eine signifikante Verminderung der NK-Zellaktivität ist jedoch bereits bei 320 $\mu\text{g/ml}$ nach 72h zu sehen. ($P < 0.01$). Dies spricht für eine zytotoxische Wirkung der Enzyme auf die PBL. Auch in der Zellkultur waren die Zellzahlen der PBL bei 320 $\mu\text{g/ml}$ in allen Ansätzen stark reduziert. Die hier ermittelten Ergebnisse sprechen

gegen die von *Desser et al.* (29) angegebene Konzentration von 1000 µg/ml als noch nicht direkt zytotoxisch.

Betrachtet man die Lysis der Raji Zellen, die die Aktivität der zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten widerspiegelt, bietet sich ein ähnliches Bild. Unterschiede bestehen in einem früheren Abfall der T-Zellaktivität (320 µg/ml) nach schon 48h. ($p < 0.05$). Dies kann für eine frühere Schädigung der CD8+ Zellen sprechen. Für beide Zelllinien gilt bei einer einmaligen Stimulierung mit Enzymen eine signifikante Aktivitätssteigerung innerhalb der ersten 72h. Die Lysen beider Zelllinien bzw. die Aktivität beider Immunzelltypen in Hinsicht auf Zytotoxizität und Zytokinsekretion sind nahezu identisch (45). Dies würde die relative Deckungsgleichheit der NK- bzw. T-Zellaktivität erklären.

Wie die Ergebnisse weiterhin gezeigt haben, ist auch eine Mehrfachstimulierung der NK- bzw. CD8+ Zellen möglich. Während bei der Einfachstimulierung ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität zu beobachten war, konnte bei einer zweiten Gabe der Enzympräparation am 3. Tag (72h) 48h später ein erneuter Anstieg beobachtet werden (s. Kap IV Abb. 4.2.5 und 4.2.10), der die Aktivität der zwei Meßtage davor übertrifft. Dieser erneute Anstieg war bei 120h signifikant für beide Zelllinien ($p < 0.01$). Dies zeigt, daß die NK-Zellen und die CD8+ Zellen durch die Enzympräparationen mehrfach stimulierbar sind.

Lanier et al. (45) beschreiben, daß durch die Herabregulation des MHC-1 Rezeptors virusinfizierter Zellen die natürlichen Killerzellen vermehrt die infizierten Zellen lysieren. Möglicherweise vermögen proteolytische Enzyme diesen MHC-Komplex entarteter Zellen anzudauen und somit diese für den Angriff der Killerzellen zugänglich zu machen. Die Papain-Komponente in der Präparation kann Antikörper spalten. Antikörper bestehen aus einer schweren und einer leichten Kette (Heavy chain und light chain).

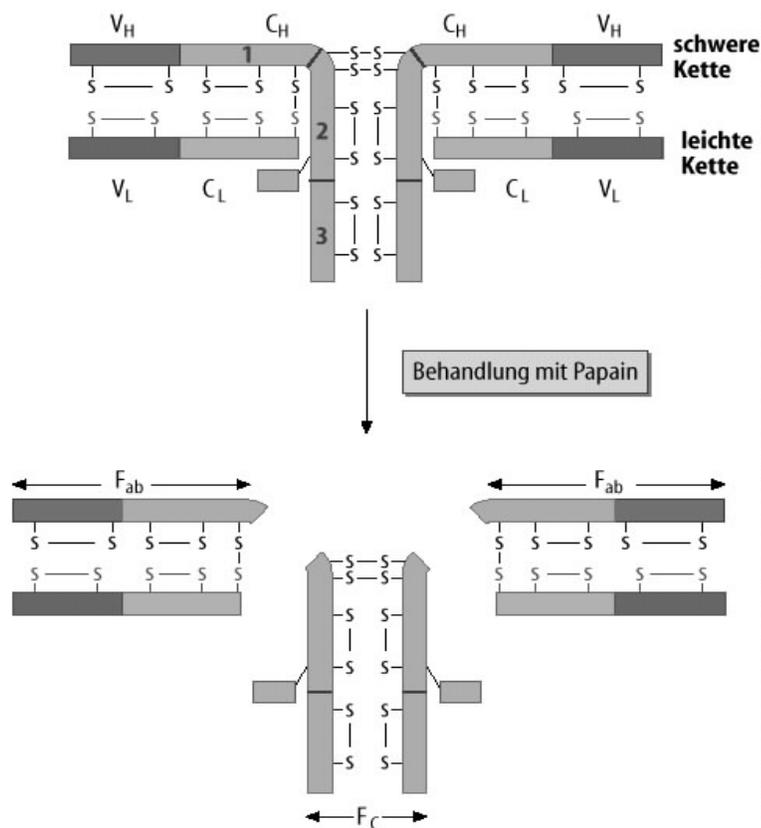


Abb 5.3.2: Spaltung eines Antikörpers durch Papain (Aus 77)

Antikörper können in Immunkomplexen gebunden sein, die als sogenannte „blocking factors“ bestimmte Immunfunktionen wie die Wirkung des TNF- α durch Komplexbildung hemmen oder inaktivieren können (24;73). Durch die Zugabe von Papain ergibt sich die Möglichkeit solche Blockingfaktoren zu hemmen oder nach Eintritt der Wirkung den Effekt zu vermindern. Dies könnte aber auch bedeuten, daß bei der Bestimmung von TNF- α im Serum von Patienten durch die Aufschließung des TNF- α Komplexes auch die Freisetzung von ungebundenem TNF- α erfolgt, so daß dessen Serumkonzentration ansteigt. *Vladimir Bazil (9)* beschrieb einen physiologischen Abwurfprozeß verschiedener Membranbestandteile, das sogenannte cleavage, bei Leukozyten. Diese

Bestandteile wiederum, u.a. auch Antikörper und deren Fragmente, können auch zur Komplexbildung von freigesetztem TNF- α führen. Bei einem gesunden Menschen steht der Auf- und Abbau der „gecleavten“ Membranbestandteile im Gleichgewicht. Bei einem immungeschwächten oder anderweitig schwer kranken Menschen ist es möglich, durch Zugabe von proteolytischen Enzymen den Wirkungsverlust auszugleichen.(69;70). *Lanier et al. (45)* beschreiben einen sogenannten KIR (Killerzell Inhibitory Receptor), der die Funktion der Killerzellen inhibiert. Auch hier wäre denkbar, daß Typ-MHC-1-Rezeptoren durch die proteolytische Aktivität der Enzympräparation angedaut werden und seine inhibitorische Wirkung gesenkt wird.

5.4 Wirkungen der Retinoide auf die PBL

Durch Zugabe von Retinoiden ist eine Stimulierung der PBL bei bestimmten Retinoidkonzentration möglich. Retinsäure und Retinol steigern signifikant die NK-Zellaktivität bei einer Konzentration von 10^{-6} M und 10^{-8} M nach 72h Inkubation ($p < 0.05$). Die Aktivität zytotoxischer CD8+ T-Lymphozyten konnte durch die Zugabe von 10^{-6} M und 10^{-8} M Retinsäure nach 72h Inkubation signifikant gesteigert werden ($p < 0.05$). Die Zugabe von Retinol in den genannten Konzentrationen erbrachte keine signifikante Aktivitätssteigerung. In Gegenwart des Lösungsmittels DMSO (Dimethylsulfoxid) werden Aktivitätssteigerungen gemessen, die jedoch nicht signifikant sind. Der Anteil von DMSO in den Zellsuspensionen (S. Kap III) der Versuchsansätze liegt unter 0,1 %.

In den letzten zehn Jahren wurden viele Untersuchungen über die Immunstimulation von PBL durchgeführt. *Prabhala et al.(59)* zeigen , daß Retinsäure in einer Konzentration von 10^{-8} M die T-Helferzellzahl steigert und geringfügig die T-Supressorzellzahl vermindert, ohne die Gesamtzellzahl zu verringern. Bei höheren Konzentrationen wurde der stimulatorische Effekt aufgehoben (10^{-4} bzw. 10^{-5} M). Aktivierungsmarker, wie z.B. die Expression des Transferrinrezeptors und die des IL-2

Rezeptors, waren bei den o.g. Konzentrationen signifikant erhöht. Die Hochregulation dieser Rezeptoren ergibt die Möglichkeit, die Wirkung der Zytokine zu steigern. Dagegen sprechen aber eigene Vorversuche, die keine Wirkungspotenzierung durch Enzyme und Retinoide gezeigt haben. *Allende et al.* (3) berichten, daß Retinoide durch die Hochregulation von CD3-Rezeptoren das Immunsystem stimulieren, doch Gleichzeitig kommt es zu einer Herabregulierung des Fas-Liganden womit die Ausschüttung der eigenen Zytokine und damit die Apoptose verhindert werden. Die T-Zell Proliferation wird durch die Expression des Retinsäurerezeptors (RAR) gesteigert (34). Die Aktivierungskonzentration in der o.g. Arbeit von *Allende et al.* wurde mit 10^{-7} M beschrieben, welche sehr gut mit den hier verwendeten, aktivierenden Konzentrationen für die NK-Zellen und CD8+ T-Lymphozyten korreliert. Im Überstand der zentrifugierten Lymphozyten nach Inkubation mit Retinol wurden erhöhte Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IFN-gamma gefunden, was die erhöhte Aktivität der Lymphozyten erklären würde. Diese Ergebnisse waren jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Signifikante Ergebnisse wurden nur bei selektiv Vitamin-A mangelernährten Versuchstieren gefunden. *Bates* (7;8) hat gezeigt, daß bei Kindern mit einer Xerophthalmie signifikant erniedrigte Helferzellzahlen zu finden sind. Die Impfantwort bei einer Tetanus-Schutzimpfung war ebenfalls erniedrigt. Hier stellt sich jedoch die Frage, ob generell unterernährte Individuen ein gestörtes oder insuffizientes Immunsystem haben. Die dazugehörige Placebo kontrollierte Doppelblindstudie zeigte eine signifikante Zunahme der oben beschriebenen Parameter nach einer Vitamin A Gabe von 60 mg. *Ross* (50) konnte in einer Studie zeigen, daß die Immunantwort von Vitamin A mangelernährten Ratten nach Gabe von Kapselpolysacchariden und Protein Antigenen signifikant vermindert war. Die Antikörperantwort auf Lipopolysaccharid Antigene hingegen war unbeeinträchtigt. Die Zellzahlbestimmungen von B, CD4+ und CD8+ Zellen waren nicht verringert, die NK-Zellaktivität hingegen vermindert, was auf einer Verminderung der Zellzahl, insbesondere der reifen NK-

Zellen zurückzuführen war. Nach Zugabe von Retinoiden konnten diese Effekte rückgängig gemacht werden.

VI. Zusammenfassung

Methodik

Die in dieser Arbeit entwickelte flowzytometrische Methode ist aufgrund der guten Korrelation zur gängigen Europium Immune Release Methode zur Bestimmung der NK-Zell bzw. CD 8+, zytotoxischen T-Lymphozyten-Aktivität gut geeignet. Der geringe Zeit- und Kostenaufwand sprechen für die Anwendung dieser Methode.

Enzympräparation

Die in dieser Arbeit verwendete Enzympräparation kann die NK-Zell- bzw. CD 8+, zytotoxischen T-Lymphozyten Aktivität signifikant steigern. Eine signifikante Mehrfachstimulation ist ebenfalls möglich. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer erhöhten Freisetzung von TNF- α durch die Effektorzellen, die die Targetzellen zum (programmierten) Zelltod bringen. Ferner wird über die Freisetzung weiterer Zytokine berichtet, die eine Stimulierung der Effektorzellen bewirken (durch IL1 β und IL6). Immunkomplex gebundene TNF- α Moleküle können durch die proteolytische Aktivität freigesetzt werden. Die Ergebnisse weisen auf eine unspezifische Veränderung der Membranbestandteile der Effektorzellen hin, welche eine Freisetzung von Zytokinen bewirkt. Ferner kann die proteolytische Aktivität der Enzympräparate verschiedene Immunkomplexe und sogenannte Blockingfaktoren auflösen.

Fazit: Eine signifikante und konzentrationsabhängig immunstimulierende Wirksamkeit der Enzyme ist gegeben. Diskussionswürdig dürfte hier nur die enterale Resorption bzw. Persorption sein (s.Kap I). Die parenterale Applikation ist wegen einer anaphylaktischen Reaktion risikoreich. Denkbar wäre eine ex vivo „Therapie“ isolierter humaner Lymphozyten mit anschließender Wiederaufnahme in den Kreislauf.

Die Aktivierenden Konzentrationen für die Enzyme liegen im Bereich von 20 bis 160 µg/ml bei einer Einfachstimulation. Bei höheren Konzentrationen als 320 µg/ml beginnt der toxische Bereich. Bei der Mehrfachstimulation von Lymphozyten liegt der aktivierende Bereich zwischen 10 bis 80 µg/ml, wobei die höheren Konzentrationen toxisch wirken.

Retinoide

Eine konzentrationsabhängige signifikante Steigerung der NK-Zell bzw. CD 8+, zytotoxischen T-Lymphozyten Aktivität ist gegeben. Die NK-Zellaktivität konnte bei Konzentrationen von 10^{-8} bzw. 10^{-6} M mit Retinsäure und Retinol gesteigert werden, die Aktivität von CD 8+ zytotoxischen T-Lymphozyten hingegen nur durch Retinsäure. Das Lösungsmittel DMSO bewirkte keine signifikante Aktivitätsänderungen. Diskutiert wird hier eine erhöhte Expression des IL2-Rezeptors sowie die des CD3 Rezeptors, als Ursache für die Aktivitätssteigerung führen soll. Der Fas-Ligand hingegen wird herabreguliert, was eine „Selbsttötung“ der Effektorzellen verhindert. Die vermehrte Produktion von Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IFN-gamma), deren Gehalt die im Überstand Retinol behandelte Zellen zunimmt, kann ebenfalls zur Aktivitätssteigerung führen.

VII. Literaturverzeichnis

- (1) Abe Y., A. Hornuchi, Y. Osuka:
Studies of Membrane-Associated and Soluble (Secreted)
Lymphotoxin in Human Lymphokine-Activated T-Killer Cells in
vitro.
Lymphokine and Cytokine Research 11, 2 115-121, (1992)
- (2) Adams D. O. et al.:
Phagocytic cells: Cytotoxic activities of macrophages. In: J. I.
Gallin, I. M. Goldstein, R. Snyderman (eds.) „Inflammation -
basic principles and clinical correlates".
Raven Press New York, (1989)
- (3) Allende LM, Correll A., Madrono A., Gongora R., et al.
Retinol (vitamin A) is a cofactor in CD3-induced human T-
lymphocyte activation
Immunology 90(3), 288-96, (1997)
- (4) Badley RA, et al.
Dynamic behavior of fluorescent probes in lipid bilayer model
membranes.
Biochemistry. 12(2), 268-75. , (1973)
- (5) Barrett A. J., G. Salvesen, (eds.):
Proteinase inhibitors.
Elsevier, Amsterdam, (1986)
- (6) Barrett A. J., P. M. Starkey:
The Interaction of alpha2-M with proteinases.
Biochem. Journal. 133 709, (1973),

- (7) Bates, C.:
Vitamin A and infant immunity,
The Lancet, 341(88-6), (1993)
- (8) Bates, C.J.:
Vitamin A.
The Lancet. 345 (31-35), (1995)
- (9) Bazil V:
Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane
molecules.
Immunology Today 16, 135-140,(1995)
- (10) Biesalski, H.K., H. Weiser:
Microdetermination of Retinyl esters in Guinea pig Tissues
under different vitamin A-Status conditions,
Micronutrient Analysis, 797-116 , (1990)
- (11) Biesalski, H.K.:
Wirksamkeit von Beta-Carotin bei der Prävention von Krebs.
Wunsch oder Wirklichkeit?
Vit.Min.Spur. 5, 1-32, (1990)
- (12) Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell
activity. II. A novel non-radioactive method based on time-
resolved fluorescence. Significance and specificity of the
method.
Journal Immunol Methods.;92(1), (117-23.), (1986)

- (13) Blomhoff, R., Green, M.H., Norum K.R.:
Vitamin A:Physiological and biochemical processing.
Annual Reviews Nutrition 12, 37-57, (1992)
- (14) Bollag, W., Holdener, E.E.,:
Retinoids in cancer Prevention and Therapy.
Ann. Oncol. 3, 513-526, (1992)
- (15) Borth W., R. D. Feinman, S. L. Gonias et al.(eds.):
Biology of a Macroglobulin - its Receptor, and Related
Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 737, (1994)
- (16) Bouma GJ, van der Meer-Prins PM, van Bree FP, van Rood
JJ, Claas FH
Determination of cytotoxic T-lymphocyte precursor frequencies
using europium labeling as a nonradioactive alternative to
labeling with chromium-51.
Human Immunol. Oct;35(2), 85-92, (1992)
- (17) Boyum A:
Seperation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (21), suppl. 97, (1986)
- (18) Bradley D.:
Is a pill on the way for diabetes?
New Scientist 27 (1992), 7
- (19) Bruns C, Schafer H, Wolfgarten B, Pichlmaier H
Effect of surgical trauma on NK cell activity in esophageal
carcinoma after transmediastinal
dissection vs. Transthoracic en bloc resection
Langenbecks Arch Chir 381(3) ,175-81,(1996)

- (20) Budd, G. :
Disorders resulting from defective nutriment,
London medical Gazette, 2, 632-749, (1842)
- (21) Byers, T., S. Graham, B.P. Haughey, J.R. Marschall, M.K. Swanson: Diet and lung cancer risk: findings from the western New York diet study.
Am. J. Epidemiol. 125, 351-356,(1987)
- (22) Caspary W. F.:
Physiology and pathophysiology of intestinal absorption.
Am. J. Clin. Nutr. 55, 299-308, (1992)
- (23) Catalogue of Cell Lines & Hybridomas / ATCC
7th edition, 1992
- (24) Clayman G. L., D. L. Taylor, F. J. Liu et al.:
Serum and Acute Phase Protein Modulation of the Effector Phase of Lymphokine-Activated Killer Cells.
Laryngoscope 103, 299-307, (1993)
- (25) Connell,J.F., Prytz, B., Smith, G.:
Chymotrypsin-surgical evaluation of an anti inflammatory agent. Amer. Med. Ass., Scientific Section, Atlantic City/N.J., 16-20, (1963)
- (26) Crane C. W., G. R. W. N. Luntz:
Absorption of Insulin from the Human Small Intestine.
Diabetes 17, 10, 625-627,(1968)

- (27) Desser L, Rehberger A, Kokron E, Paukovitis W:
Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of polyenzyme preparations.
Oncology Nov-Dez;50(6):403-7, 1993
- (28) Desser L, Rehberger A, Paukovitis W:
Proteolytic enzymes and amylase induce cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro.
Cancer Biotherapy Fall 9(3):, 253-63, 1994
- (29) Desser L, Rehberger A:
Induction of tumor necrosis factor in human peripheral-blood mononuclear cells by proteolytic enzymes.
Oncology; 47(6): 475-7, (1990)
- (30) Ebell B.:
The Papyrus Ebers. The Greatest Egypt Document,
Munksgaard and Oxford University Press, Copenhagen (1937)
- (31) Eckhardt
Grundlagen der Durchflußzytometrie
Coulter Systeme (1993)
- (32) Food an Nutrition Board, Anonymous:
Vitamin A. In: The recommended dietary allowances.
Washington D.C.: National Academy of Sciences, 55-60,
(1980)
- (33) Forth W.:
Bioverfügbarkeit - abhängig von vielen Faktoren.
Deutsch. Ärzteblatt 90, 30, 2125 (1993),

- (34) Friedman A., Halevy O., Schrift M., Arazi Y., Sklan D.
Retinoic acid promotes proliferation and induces expression of
retinoic acid receptor- α gene in murin T-Lymphocytes
Cellular Immunology 152, 240, (1993)
- (35) Gardner M. L. G., K.-J. Steffens (eds.):
Absorption of Orally Administered Enzymes.
Springer Verlag Stuttgart, (1995)
- (36) Goodman, T:
The Biochemistry of the carotenoids.,
Chapman and Hall, New York, 173-95, (1984)
- (37) Hernandez-Caselles T., O. Stutman:
Immune Functions of Tumor Necrosis Factor. I. Tumor
Necrosis Factor Induces Apoptosis of Mouse Thymocytes and
can also Stimulate or Inhibit IL-6-Induced Proliferation
Depending on the Concentration of Mitogenic Costimulation.
Journal of Immunology 151, 8, 3999-4012, (1993)
- (38) Honig MG et al.:
Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of
identified origin to be studied in long term cultures,
Journal of cell Biology, 103(1): 171-87,(1986)
- (39) Hussaini, G. Tarwotjo, I, Sommer A. :
Cure for night-blindness.
American Journal Clinical Nutrition 31, 1489, (1978)
- (40) Klaschka F.:
Neue Perspektiven in der Tumorthherapie
Forum Verlagsgesellschaft (1992)

- (41) Lake-Bakaar G., C. E. Rubio, S. McKavanagh, B. J. Potter, J. A. Summerfield:
Metabolism of ¹²⁵I-labelled trypsin in man: evidence for recirculation.
Gut ,21580, (1980)
- (42) Lake-Bekaar G., G. Smith-Laing, J. A. Summerfield:
Origin of circulating serum immunoreactive trypsin in man. *Dis. Science* 27 143, (1982)
- (43) Lake-Bekaar G., J. Dolley, S. McKavanagh, J. h. Summerfield:
Biliary clearance of immunoreactive trypsin.
Clin. Sci. 57 80, (1979)
- (44) Lake-Bekaar G., J. Dooley:
Biliary immunoreactive trypsin in man.
Hepato-gastroenterol. 34,103,(1980)
- (45) Lanier L., Corlis B. Phillips J.H., :
Arousal and inhibition of human NK cells.
Immunological Reviews 155,145-153, (1997)
- (46) Littré, E.:
Oeuvres Completes de Hippocrate J.B.,
Ballière, Paris, Vol. IX pp. 156-160,(1861)
- (47) Lorenz, J, Biesalski, H.K.:
Pneumologie, Georg Thieme Verlag,47, 657-665 ,(1993)

- (48) Lovgren J, Blomberg K
Simultaneous measurement of NK cell cytotoxicity against two target cell lines labelled with fluorescent lanthanide chelates.
J Immunol Methods. 173(1):119-25, (1994)
- (49) Lozzio CB, Lozzio BB:
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.
Blood. Mar;45(3), 321-34 (1975)
- (50) Luettig B., T. Decker, M.-L. Lohmann-Matthes:
Evidence for the Existence of two Forms of membrane Tumor Necrosis Factor: An Integral Protein and a Molecule attached to its Receptor.
J. Immunol. 143, 12, 4034-4038, (1989)
- (51) Matthews D. M.:
Protein Absorption – Development and Present State of the Subject. Willey-Liss. Inc. New York, (1990)
- (52) Miescher S, et al.
Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes.
J Immunol. Mar 1;136(5):1899-907, (1986)
- (53) Mutschler E. , M. Schäfer-Korting:
Arzneimittelwirkungen,
Lehrbuch der Pharmakologie, 6. Auflage (1991)

- (54) Naume B., R. Shalaby, W. Lesslauer et al.:
Involvement of the 55- and 75-kDa Tumor Necrosis Factor Receptors in the Generation of Lymphokine-activated Killer Cell Activity and Proliferation of Natural Killer Cells.
J. Immunol. 146, 9 3045-3048,(1991)
- (55) Pacifici R, Di Carlo S, Bacosi A, Altieri I, Pichini S, Zuccaro P
Modified procedure for labelling target cells in a europium release assay of natural killer cell activity.
J Immunol Methods. 161(1), 135-7,(1993)
- (56) Papa S.:
Quantification of NK Cytotoxicity,
Handbook Of Flow Cytometry Methods, 186, (1985)
- (57) Perez C., I. Albert, K. DeFay et al.:
A nonsecretable cell surface mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) kills by cell-to-cell contact.
Cell 63, 251-258, (1990)
- (58) Petersen C. M., A. Nykjaer, B. S. Christiansen et al.:
Bioactive human recombinant tumor necrosis factor- α : an unstable dimer?
Eur. J. Immunol. 19, 1887-1894, (1989)
- (59) Prabhalla RH, Maxey V., Hicks MJ., Watson RR.
Enhancement of the expression of activation markers on human PBMC by in vitro culture with retinoids and carotenoids
Journal of leucocyte Biology 45(3), 249-54, (1989)

- (60) Ransberger K., G. Stauder, P. Streichhan:
Enzymkombinationspräparate - Wobenzym N,
Musal N und Phlogenzym - wissenschaftliche Monographie zur
Prälinik.
Forum Medizin Gräfelfing, 1991
- (61) Ross C
Vitamin A Deficiency and Retinoid Repletion Regulate the
Antibody Response to Bacterial Antigens and the Maintenance
of Natural Killer Cells
Clinical Immunology and Immunopathology 80, 63-72, (1996)
- (62) Schiller J. H., P. L. Wirt, B. Storer et al.:
Clinical and biologic Effects of Combination Therapy with
Gamma-Interferon and Tumor Necrosis Factor.
Cancer 69, 2, 562-571, (1992)
- (63) Schulze-Osthoff K.:
The Fas/APO-I receptor and its deadly ligand.
Trends in Cell Biology 4, 421-426, (1994)
- (64) Seifert J.:
Resorption von Makromolekülen aus dem Magen-Darmtrakt.
In: W. F. Caspary (ed.)
„Lehrbuch der Inneren Medizin". Springer Verlag Heidelberg,
394-418, (1983)
- (65) Seifert J., P. Siebrecht, J. P. Lange:
Quantitative Untersuchungen zur Resorption von Trypsin,
Chymotrypsin, Amylase, Papain und Pankreatin aus dem
Magen-Darmtrakt nach oraler Applikation.
Allgemeinmedizin 19, 132-139, (1990)

- (66) Shiiki S., S. Fuchimoto, K. Orita:
A Comparison of the Antitumor Effects of Natural Human
Tumor Necrosis Factors α and β : the Roles of Arachidonic
Acid Metabolism and Intracellular cAMP.
Jpn. J. Clin. Oncol. 20, 252-258, (1990)
- (67) Smith R. A., C. Baglioni:
The Active Form of Tumor Necrosis Factor is a Trimer.
J. Biol. Chem. 262, 15, 6951-6954, (1987)
- (68) Speiser W., W. Langer, A. Pschaik et al.:
Increased Blood Fibrinolytic Activity after Physical Exercise:
Comparative Study in Individuals with Different Sporting
Activities and in Patients after Myocardial Infarction taking Part
in a Rehabilitation Sports Program.
Thrombosis Research 51, 543-555, (1988)
- (69) Steffen C., J. Menzel:
Grundlagenuntersuchungen zur Enzymtherapie bei
Immunkomplexkrankheiten.
Wiener klin. Wschr. 97 525, (1985)
- (70) Steffen C., J. Menzel:
Enzymabbau von Immunkomplexen.
Zeitschr. f. Rheumatol. 42, 249, (1983)
- (71) Steffens K.-J.:
Was ist Persorption? - Kritik und Zustimmung in der Literatur.
PZ 137, 14, 929-938, (1992)

- (72) Streichhan P.:
Native Resorption enteral applizierter Makromoleküle.
In: H.-J. Reimann: Nahrungsmittelallergie27-42, Dustrri-Verlag,
2. Aufl. , (1989)
- (73) Tartaglia L. A., R. F. Weber, I. S. Figari et al.:
The two different receptors for tumor necrosis factor mediate
distinct cellular responses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9292-9296, (1991)
- (74) Uhlenbruck G.:
Sport, Alter und Immunsystem.
Med welt 44, 303-308, (1993)
- (75) Van Eimeren, Biehl, Tuluweit
Therapie traumatisch verursachter Schwellungen
Thieme (1994)
- (76) Villa ML, Herrario E, Trabationi D et al.
Retinoids, breast cancer and NK-cells
British Journal of Cancer 68, 845, (1993)
- (77) Weis L., Löffler, Petrides,
Lehrbuch Physiologische Chemie, 4. Auflage
- (78) Wingfield P., R. H. Pain, S. Craig:
Tumour necrosis factor is a compact trimer.
FEBS Letters 211,2, 179-184, (1987)

- (79) Wolf, G. :
A History of Vitamin A and Retinoids,
FASEB Journal 10(9), 1102-7, (1996)
- (80) Wrba H., M.-W. Kleine, K.Miehlke, F.-W. Dittmar, R.E.
Weissenbacher:
Systemische Enzymtherapie Aktueller Stand und Fortschritte
MMV-Medizinverlag (1996)
- (81) *Wrba H., Pecher I.:*
Wirkstoffe der Zukunft,
Orac-Verlag (1993)
- (82) Internet Bildquellen:
<http://www.rcsb.org/pdb/searchlite.html>
<http://www.chemfinder.com>
- (83) Auffray. C.; Strominger, J. L.
Molecular genetics of the human histocompatibility complex.
Adv. Human Genet. 15:197—247, (1987).
- (84) Bach, F. H.; Sacks, D.H.
Transplantation immunology.
N. Engl. J. Med. 3 17:489—492, (1987)
- (85) Möller, G., ed. Molecular Genetics of Class 1 and II MHC
Antigens.
Immunol. Rev. 84 and 85, (1985)

- (86) Hood, L.; Steinmetz, M.; Malissen, B. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 1:529—568, (1983)
- (87) Jerne N.K.,
Das Immunsystem aus: Immunsystem
Spektrumverlag (1988)
- (88) Cambier, J. C.
Signal transduction by T- and B-cell antigen receptors:
converging structures and concepts.
Current Opinion Immunology 4:257—264, (1992).
- (89) Izquierdo, M.; Cantrell, D. A.
T-cell activation.
Trends Cell Biology 2:268—271, (1992)
- (90) Klausner, R. D.; Samelson, L. E.
T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosin kinase
connection.
Cell 64:875—878, (1991)
- (91) Malissen, B.; Schmitt-Verhulst, A.-M.
Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3
complex.
Current Opinion Immunology 5:324—333, (1993).
- (92) Weiss, A.
T cell antigen receptor signal transduction:
a tale of tails and cytoplasmatic protein-tyrosine kinases.
Cell 73:209—212, (1993)

- (93) Bjorkman, P. J.; Parham, P.
Structure, function and diversity of class 1 major histocompatibility complex molecules.
Annu. Rev. Biochem. 59:253—288, (1990)
- (94) Matsumura, M.; Fremont, D. H.; Peterson, P. A.; Wilson, I. A.
Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class 1 molecules.
Science 257:927—934, (1992)
- (95) Townsend, A. R.
Recognition of influenza virus proteins by cytotoxic T lymphocytes.
Immunol. Res. 6:80—100, (1987)
- (96) Yewdell, J. W.; Bennink, J. R. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class 1 molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52:1—123, (1992)
- (97) Zinkernagel, R. M.; Doherty, P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determine T-cell restriction specificity, function and responsiveness.
Adv. Immunol. 27:51—177, (1979)
- (98) Londei N., Clayton J., Feldmann M.,
T-Cells and cytokines
Cytokines, A practical Approach. 151-169, (1991)

- (99) Loudon W., Grimm E.,
T-Cells and cytokines
Cytokines, A practical Approach. 171-186, (1991)
- (100) Ormerod M.G.
Flow Cytometry second edition
Microscopy handbooks, Springer (1999)

LEBENS LAUF

Name: Bora Akoglu

Geboren am: 27.07.72 in Darmstadt

Staatsbürgerschaft: Bundesrepublik Deutschland

Familienstand: ledig

Eltern: Hasan Bedri Akoglu, Dipl-Architekt
Evin Akoglu, geb. Bati, Sekretärin

Sprachen: Fließend : Deutsch, Englisch, Türkisch
Grundkenntnisse : Französisch, Italienisch

Werdegang: 1977 – 81 Christian Morgenstern Grundschule, Darmstadt
1981 - 83 Schuldorf Bergstraße Förderstufe, Seeheim
1983 – 91 Seminar /Kolleg Marienhöhe Gymnasium, Darmstadt
1991 Abitur Note 2,2 (LK Mathematik und Chemie)
1991 –92 Zivildienst im Stadtkrankenhaus Darmstadt und beim
Club Behinderter und ihrer Freunde
1992/93 Studium der Medizin an der JWG
Universität Frankfurt
1995 Physikum Note 3,3
1996 1. Staatsexamen Note 3
1998 2. Staatsexamen Note 2,6
27.5.1999 3. Staatsexamen Note 1 , Gesamtnote 2,1
01 .06.1999 Arzt im Praktikum am Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt / M.
Medizinische Klinik II / Prof. W.F. Caspary

Arbeits-
erfahrungen
in der Studienzzeit: 1993 - 94 Mitorganisation + Redaktion der
Türkisch – Deutschen Gesundheitsstiftungszeitung für
das Rhein - Main – Gebiet
1995 - 97 Tutor für die vorklinischen Semester am Haus der
Didaktik, Uniklinik Frankfurt
1997 – 99 Koordination des Praktischen Jahres
Dekanat, Uniklinik Frankfurt, 1998
zum PJ -Sprecher der Uniklinik FFM gewählt

Weitere Tätigkeiten:	Mitwirkung bei der Erstellung einer türkischen Patientenbroschüre für die Uniklinik Frankfurt /Vorstand
	Erstellung einer Datenbank für das Promotionsbüro der Uniklinik Frankfurt /Dekanat
	Organisation und Durchführung einer Befragung der an die Uniklinik Frankfurt angeschlossenen Lehrkrankenhäuser zur Erstellung einer PJ-Broschüre
Promotion:	Beginn 1995 im Gustav-Embden-Zentrum der Biochemie, bei Herrn Professor Dr. L. Träger.
Teile der Promotion wurden publiziert:	HNO-Kongreß Nürnberg 1997 Wirkungen von Enzymen und Retinoiden auf Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich
	DGFZ: 1999 Regensburg über die Bestimmung von zytotoxischer Aktivität von peripheren Blutlymphozyten unter Einbeziehung der Flowzytometrie (FACS)
	DEGEM Wien 2000: Durchflußzytometrische Bestimmung der Wirkung von Retinoiden auf NK- und T-Zellen
Praktisches Jahr:	1. Tertial HNO - Universitätsklinik Frankfurt
	2. Tertial Innere Medizin Universitätsklinik Frankfurt (Hämatologie / Onkologie, Nephrologie / Kardiologie, Medizinische Notaufnahme)
	3. Tertial Chirurgie Universitätsklinik Frankfurt (Abdominalchirurgie/Poliklinik/Urologie)
Famulaturen:	1995 Chirurgie, Elisabethenstift Darmstadt
	1996 Gesichtschirurgie /HNO, bei Ted A. Cook, MD. ENT, OHSU (Oregon Health Sciences University) Portland, Oregon /USA)
	1997 Pädiatrie, Uniklinik Frankfurt, bei Professor Dr. G. Jacobi
	1997 HNO Praxis PD Dr. J. Lindenberger, Dr. R. Roitman

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Durchflußzytometrische Bestimmung der Enzym- bzw.
Retinoidwirkung auf die Funktion von NK-Zellen und
zytotoxischen T-Lymphozyten *in vitro*

aus dem Gustav Embden Zentrum der Biologischen Chemie
(GD: Prof. Dr. P. Chandra)
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

unter Leitung von
Herrn Professor Dr. L. Träger

mit Unterstützung durch
Herrn Dipl. Biol. D. Henrich

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main

im Januar 2000

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'H. Träger', written over a circular stamp or seal.