

**"Charakterisierung des immunmodulatorischen Potentials von
mesenchymalen Stammzellen und Keimzelltumor-Zelllinien"**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Olivia Döring

geb. am: 25.01.1982 in Meißen

Gutachter /in:

1. Prof. D.-H. Nies
2. Prof. B. Seliger
3. Prof. R. Dammann

Verteidigungsdatum: 07.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1. Das unspezifische und spezifische Immunsystem	1
1.1.2. Die drei Gruppen immunmodulatorischer Moleküle	2
1.2. Mesenchymale Stammzellen	6
1.2.1. Generelle Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen	6
1.2.2. Adipogene und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen....	10
1.3. Der Keimzelltumor	11
1.3.1. Generelle Eigenschaften von Keimzelltumoren	11
1.3.2. Somatische Differenzierung von Keimzelltumor-Zelllinien	13
1.4. Aufgabenstellung und Zielsetzung	14
2. Material	15
2.1. Zelllinien und primäre Zellen	15
2.2. Geräte.....	17
2.3. Verbrauchsmaterialien	18
2.4. Chemikalien	19
2.5. Komplettsysteme	20
2.6. Enzyme.....	21
2.7. Molekulargewicht- und Längenstandards.....	21
2.8. Allgemeine Stammlösungen, Puffer und Medien.....	21
2.8.1. Puffer für die Elektrophorese	21
2.8.2. Puffer für die Durchflusszytometrie	22
2.8.3. Puffer für die Proteinbiochemie	22
2.8.4. Eukaryotische Kulturen	22
2.8.4.1. Medien zur Induktion der Differenzierung.....	23
2.9. siRNS	24
2.10. Primer	24
2.11. Antikörper, Färbelösungen und Puffer.....	26
2.12. Datenverarbeitungsprogramme.....	27

3.	Methoden.....	28
3.1.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	28
3.1.1.	Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen	28
3.1.2.	Kultivierung von Suspensionszellen	28
3.2.	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	28
3.3.	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Vitalfärbung	29
3.4.	Induktion der Differenzierung von Stammzellen	29
3.4.1.	Adipogene und osteogene Differenzierung von MSC.....	29
3.4.2.	Somatische Differenzierung der testikulären KZT-Zelllinie H12.1	29
3.5.	Behandlung von adhärenenten Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Valproinsäure.....	30
3.6.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNS.....	31
3.7.	Aufarbeitung von Blutkonzentraten	31
3.8.	Isolierung CD8-positiver T-Lymphozyten aus PBMC mittels magnetischer CD8 MicroBeads.....	32
3.9.	Isolierung von NK-Zellen aus PBMC.....	32
3.10.	Aktivierung von NK-Zellen mit Interleukin-2 zur Generierung Lymphokin-aktivierter Killer	33
3.11.	Chromfreisetzungssassay.....	33
3.12.	Durchflusszytometrie (nach Janossy <i>et al.</i> , 2004; Shapiro, 2003)	34
3.12.1.	Messung der Proliferation von T-Zellen mittels CFDA-SE-Markierung	34
3.12.2.	Messung der IFN- γ Sekretion.....	36
3.12.3.	Apoptose-Messung mittels Annexin V- und 7 Amino-Aktinomycin D-Färbung	37
3.13.	Methoden der Molekularbiologie	37
3.13.1.	Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen.....	37
3.13.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.13.3.	Hydrolyse der DNS mittels DNase I	38
3.13.4.	Erststrang-cDNS-Synthese durch reverse Transkription	38
3.13.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion	39
3.13.6.	„Echt-Zeit“-quantitative-PCR.....	40
3.13.7.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	41
3.13.8.	Aufreinigung von DNS Fragmenten	42
3.13.9.	Untersuchung des Methylierungsstatus von DNS	42
3.13.10.	Sequenzierung.....	43
3.14.	Methoden aus der Proteinbiochemie.....	44
3.14.1.	Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen	44

3.14.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	44
3.14.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
3.14.4.	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	44
3.14.5.	Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion.....	45
3.14.5.1.	Immunoblot-Technik (Western Blot).....	45
3.14.5.2.	„Enzyme-linked immunosorbent assay“.....	45
4.	Ergebnisse	46
4.1.	Analyse des immunregulatorischen Potentials von MSC.....	46
4.1.1.	Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in MSC von kranken und gesunden Spendern.....	46
4.1.2.	Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in undifferenzierten und differenzierten MSC.....	54
4.1.3.	Expression der costimulatorischen Moleküle der B7-H1 - H4 in MSC.....	56
4.1.4.	Analyse der immunmodulatorischen Funktion der B7-H3-Zelloberflächenexpression auf MSC.....	60
4.1.4.1.	Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die Lyse von MSC durch zytotoxische T-Lymphozyten.....	61
4.1.4.2.	Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die Lyse von MSC durch NK-Zellen.....	63
4.1.5.	Expression des immunsuppressiven nicht-klassischen MHC-Klasse-I Moleküls HLA-G in MSC.....	66
4.2.	Analyse des immunregulatorischen Potentials von KZT-Zelllinien.....	71
4.2.1.	Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-4 in KZT-Zelllinien.....	71
4.2.2.	Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in KZT-Zelllinien.....	72
4.2.3.	Somatische Differenzierung und Expressionsanalyse wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM der testikulären KZT-Zelllinie H12.1.....	74
4.2.4.	Bedeutung der differenzierungs-vermittelten Erhöhung der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf H12.1 Zellen für die Immunantwort.....	85
4.2.4.1.	Bedeutung der erhöhten Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen für die Aktivierung allogener CD8 ⁺ T-Zellen.....	86
4.2.4.2.	Bedeutung der erhöhten Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen für die NK-Zell-vermittelte Lyse.....	91
4.2.5.	Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in KZT-Zelllinien.....	95

4.2.6.	Expression des nicht-klassischen MHC-Klasse-I Moleküls HLA-G in KZT-Zelllinien.....	101
5.	Diskussion.....	103
5.1.	Das immunregulatorische Potential von MSC	103
5.1.1.	Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in MSC gesunder und kranker Spender	104
5.1.2.	Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in undifferenzierten und differenzierten MSC.....	105
5.1.3.	Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in MSC - Die funktionelle Bedeutung von B7-H3.....	106
5.1.4.	DNS-Methylierung und Histon-Acetylierung als mögliche Mechanismen in der Regulation der HLA-G Expression in MSC	109
5.2.	Das immunregulatorische Potential von KZT-Zelllinien	111
5.2.1.	Die Bedeutung des Differenzierungsstatus von KZT-Zelllinien für die Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM.....	112
5.2.2.	Die Rolle der ATRA-vermittelten Differenzierung für die Immunogenität der testikulären KZT-Zelllinie H12.1	115
5.2.3.	Die Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in KZT-Zelllinien - Bedeutung des Differenzierungsstatus der Zelllinien und der DNS-Methylierung des B7-H1 Gens.....	121
5.2.4.	Die Expression von HLA-G in KZT-Zelllinien - Bedeutung des Differenzierungsstatus der Zelllinien und der DNS-Methylierung des HLA-G Gens.....	123
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	126
7.	Literaturverzeichnis.....	130
8.	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Aktinomycin D
Abb.	Abbildung
AFABP	„fatty acid binding protein“
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATRA	<i>all-trans</i> Retinsäure
Bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
dest.	destilliert
BSA	„bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
β_2 -MG	β_2 -Mikroglobulin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CC	Chorionkarzinom
CD	„cluster of differentiation“
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat, succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein, succinimidyl Ester
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
DC	dendritische Zelle
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DNase	Desoxyribonuklease
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidgemisch
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EC	Embryonales Karzinom

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Embryonale Stammzellen
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulich
h	Stunde
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HRP	„horse radish peroxidase“
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MEM	„minimum essential medium“
MHC	„major histocompatibility complex“
kg	Kilogramm
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MIC	„major histocompatibility complex class I chain-related“
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBMC	periphere Blutmonozyten
PBS	„phosphate buffered saline“
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol Myristat Azetat
PMT	Photomultiplier
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCC	Nierenzellkarzinom
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssDNS	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TBS	„tris buffered saline“
TE	Teratom
TGF- β	„transforming growth factor- β “
Th-Zellen	T-Helferzellen
TKZT	Testikulärer Keimzelltumor
T _m	Schmelztemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
TZR	T-Zell Rezeptor
ULBP	UL16-bindendes Protein
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Volt	Volt
YST	Dottersacktumor
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

1.1.1. Das unspezifische und spezifische Immunsystem

Das Immunsystem ist ein biologisches Abwehrsystem, das Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger oder durch entartete körpereigene Zellen verhindert. Im Laufe der Evolution entwickelten höhere Vertebraten neben einem angeborenen, unspezifischen auch ein spezifisches Abwehrsystem, das adaptive Immunsystem. Zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem gehören die Oberflächenepithelien, welche die erste Barriere gegen Infektionen bilden (Janeway & Travers, 2002), zelluläre Elemente und molekulare Bestandteile. Zu den zellulären Elementen gehören phagozytierende Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten), basophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Leberzellen, welche Entzündungsmediatoren sezernieren, sowie natürliche Killer (NK) Zellen (Moonis *et al.*, 1992). Zu den molekularen Bestandteilen des unspezifischen Immunsystems gehören von der Leber gebildete Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem und Zytokine.

Zusätzlich zum unspezifischen Immunsystem wird bei Eintritt von Fremdanitigenen auch das spezifische Immunsystem aktiviert. Die zellulären Träger des spezifischen Immunsystems erkennen Fremdanitigene (Allogene) und können diese von körpereigenen Substanzen (Autogene) unterscheiden. An dieser spezifischen Abwehr sind zwei Klassen von Lymphozyten beteiligt, B-Zellen und T-Zellen, welche auf ihrer Zelloberfläche individuelle Rezeptoren für ein nahezu unbegrenztes, spezifisches Spektrum von Antigenen exprimieren. B-Zellen erkennen Antigene außerhalb von Körperzellen (z.B. Bakterien) und differenzieren nach dem Antigenkontakt über komplexe zelluläre und molekulare Prozesse zu Plasmazellen, welche Antikörper sezernieren. Dieser Prozess wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Im Gegensatz zu B-Zellen können T-Zellen intrazelluläre Antigene detektieren. Dem spezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) wird ein Antigen als gebundenes Peptid auf den Molekülen des „major histocompatibility complex“ (MHC) bzw. Humanen Leukozyten Antigen (HLA) präsentiert (Zinkernagel & Doherty, 1974). Nach einem Antigenkontakt entwickeln sich die naiven T-Zellen zu diversen Effektorzellen, die unterschiedlich zur Abwehrreaktion beitragen. Den Effektorzellen werden weitere Antigene von MHC-Molekülen zweier unterschiedlicher Klassen präsentiert. (i) Spezifische T-Helferzellen (Th-Zellen), gekennzeichnet durch den Oberflächenmarker „cluster of differentiation“ 4 (CD4), erkennen Peptide von Krankheitserregern, die in Vesikel aufgenommen wurden und über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Sie lassen sich

weiter in die zwei funktionell verschiedenen Th1- und Th2-Zellen aufteilen. Th1-Zellen bilden Zytokine, wie Interleukin 2 (IL-2), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ), die für die Entwicklung der zellulären Abwehr durch T-Killerzellen wichtig sind. Th2-Zellen bilden u. a. die Zytokine IL-4 und IL-10, welche für die Förderung der B-Zellaktivierung im Rahmen der humoralen Abwehr essentiell sind (Refaeli & Abbas, 1998). (ii) Spezifische zytotoxische T-Zellen (ZTL, T-Killerzellen) sind durch den Oberflächenmarker CD8 charakterisiert und erkennen u. a. virale Peptide, die von MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert werden.

Die zellvermittelte Zytotoxizität von ZTL und NK-Zellen wird durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen vermittelt. (i) Das Granula Exozytose System, bei dem Perforine und Granzyme ausgeschüttet werden und (ii) das Fas Ligand/Fas Rezeptor-System (Henkart 1994; Kägi *et al.*, 1994b; Lowin *et al.*, 1994). Bei ZTL werden beide Prozesse antigenspezifisch ausgelöst und führen in der Zielzelle zu apoptotischen und nekrotischen Schädigungen (Green 1998). Neben der Bildung von B- und T-Effektorzellen entstehen bei der akuten Immunantwort auch Gedächtniszellen, welche bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger für eine schnelle und wirkungsvolle Sekundärantwort zuständig sind. Im Gegensatz zu ZTL besitzen NK-Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren, sondern zeichnen sich durch die Expression aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche aus. Die Interaktion der inhibitorischen Rezeptoren mit MHC-Klasse-I Molekülen verhindert, dass eine Zelle getötet wird. Bei Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen ist die Expression der MHC-Klasse-I Moleküle häufig herabreguliert (Seliger *et al.*, 1996 und 1997). Diese Zellen exprimieren verstärkt Proteine, wie z.B. MIC-A, MIC-B und ULBP1-3, die mit den aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen interagieren. Dies führt zur Aktivierung der zytotoxischen NK-Zellen (Pezzutto *et al.*, 1998). Es kommt zur Freisetzung zytotoxischer Granula an der Oberfläche der Zielzelle, die enthaltenen Effektorproteine durchdringen die Zellmembran und lösen den programmierten Zelltod aus (Janeway und Travers 2002).

1.1.2. Die drei Hauptgruppen immunmodulatorischer Moleküle

Die drei Hauptgruppen immunmodulatorischer Moleküle bestehen aus: (i) den Komponenten der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsmaschinerie (APM), (ii) den costimulatorischen Molekülen der B7-Familie und (iii) dem immunsuppressiven HLA-G Molekül. In den nächsten Abschnitten werden die Eigenschaften und die funktionelle Bedeutung dieser Gruppen beschrieben.

MHC-Klasse-I Moleküle präsentieren den ZTL antigene Peptidfragmente zytosolischen Ursprungs. Es handelt sich demnach um Selbstpeptide, die den regulären zytoplasmatischen Zellbestand widerspiegeln. Bei einer Infektion oder Tumorerkrankung werden dagegen auch Peptide mikrobiellen, viralen bzw. tumorösen Ursprungs auf der Zelloberfläche exprimiert (York *et al.*, 1999). MHC-Klasse-I Moleküle stellen Immunrezeptoren dar, die sich aus einer membranständigen α -Kette (schwere Kette) und einer daran nicht kovalent gebundenen β -Kette (leichte Kette, β_2 -Mikroglobulin) zusammensetzen (Abb. 1.1). Beide Ketten werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert (Madden, 1995). Die α -Kette besteht aus einer kurzen zytoplasmatischen, einer membrandurchspannenden sowie drei extrazellulären Domänen (α_1 - α_3). Die beiden Domänen α_1 und α_2 formen eine längliche Peptidbindungsfurche, in welcher ein aus 8 - 10 Aminosäuren bestehendes Peptid über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen nichtkovalent gebunden ist. Den größten Anteil an der Wechselwirkung nehmen Bereiche der α_1 -Helix ein, die mit so genannten „Ankeraminosäuren“ des Peptids interagieren. Die Tatsache, dass die Peptidbindungsfurchen der einzelnen HLA-Allelprodukte jeweils charakteristische chemische Verhältnisse aufweisen, führt dazu, dass jedem Allel ein spezifisches „Peptidmotiv“ zugewiesen werden kann (Falk *et al.*, 1991).

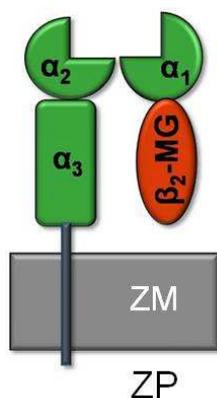


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I Moleküls.

Dargestellt ist ein MHC-Klasse-I Molekül, bestehend aus der α -Kette und der β -Kette (β_2 -Mikroglobulin: β_2 -MG). Die α -Kette setzt sich aus einem zytoplasmatischen und einem membrandurchspannenden Bereich sowie den extrazellulären α_1 - α_3 -Domänen zusammen. ZM - Zellmembran, ZP - Zytoplasma

Die Bildung der MHC-Klasse-I-Dimere erfolgt posttranslational und folgt einem komplexen Ablauf, an dem mehrere Chaperone beteiligt sind. Dieses Dimer, das Chaperon Tapasin und „transporter associated with antigen processing“ (TAP) sind wichtige Bestandteile des MHC-Klasse-I-Peptid-Beladungskomplexes. Mittels des heterodimeren TAP, bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, werden Proteasom-generierte Peptide ATP-abhängig vom Zytosol in das ER transportiert (Lankat-Buttgereit & Tampe, 2002). TAP vermittelt dabei den Transport von Peptiden mit einer Länge von 8 - 12 Aminosäuren. MHC-Klasse-I Moleküle präsentieren normalerweise Peptide mit einer Länge von 8 - 9 Aminosäuren. Die

Peptide werden von ER-residenten Proteasen verkürzt. Die so generierten Peptide werden anschließend auf neu synthetisierte MHC-Klasse-I Moleküle geladen und über den Transgolgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo sie als Erkennungsstrukturen für Peptid-spezifische ZTL fungieren (Bouvier, 2003).

Für die Aktivierung naiver T-Zellen ist die alleinige Bindung ihrer antigenspezifischen Rezeptoren sowie die Bindung der CD4- oder CD8-Corezeptoren an Peptid-MHC-Komplexe nicht ausreichend. Eine antigenspezifische klonale Vermehrung naiver T-Zellen erfordert ein weiteres, sogenanntes costimulierendes Signal, das von derselben antigenpräsentierenden Zelle (APZ) ausgesandt werden muss, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt (Appleman & Boussiotis, 2003). APZ binden mit dem costimulatorischen B7-Molekül an das CD28-Molekül der naiven T-Lymphozyten, die daraufhin das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) exprimieren, das wiederum mit noch höherer Affinität an B7 bindet (Freedman *et al.*, 1987, 1989; Linsley *et al.*, 1990, 1992). Die T-Zellen beginnen mit einer starken Sekretion verschiedener Zytokine, wie z.B. IFN- γ oder IL-2. Durch IFN- γ kann die Antigenpräsentation der APZ erhöht werden und IL-2 induziert eine zusätzliche T-Zell Aktivierung (Gimmi *et al.*, 1991; Kupier *et al.*, 1994). Eine Antigenerkennung, bei der kein costimulatorisches Signal vermittelt wird, führt bei den Lymphozyten zur Anergie (Gimmi *et al.*, 1993) mit nachfolgender Apoptose (Van Parijs & Abbas, 1996). Bisher wurden die costimulierenden Moleküle B7-1 und B7-2 am besten charakterisiert (Petroff & Perchellet, 2010). Diese B7-Glykoproteine und deren Rezeptor CD28 sind Homodimere, die zu einer Immunglobulin-Superfamilie gehören. Auf aktivierten T-Zellen werden weiterhin mit CD28 verwandte Proteine induziert, welche die costimulierenden Signale bei der Entwicklung der T-Zell-Antwort verändern. Eines dieser Proteine ist das oben genannte CTLA-4, welches der aktivierten T-Zelle ein inhibitorisches Signal aussendet, wodurch diese weniger sensitiv auf eine Stimulation durch die APZ reagiert und die Menge des autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 verringert wird. Ein weiteres mit CD28 verwandtes Protein, der „inducible costimulator of T cells“ (ICOS), kann T-Zell-Antworten verstärken und bindet an B7-H2. Somit entsteht zwischen APZ und T-Zellen ein costimulierender Dialog, bei dem über zahlreiche Moleküle aktivierende bzw. inhibitorische Signale ausgesendet und empfangen werden (Janeway und Travers 2002). Neben den erwähnten Molekülen B7-1, B7-2 und B7-H2 gibt es noch weitere Mitglieder der B7-Familie: B7-H1, B7-DC, B7-H3, B7-H4 und B7-H6, deren Rezeptoren teilweise noch nicht bekannt sind (Abb. 1.2).

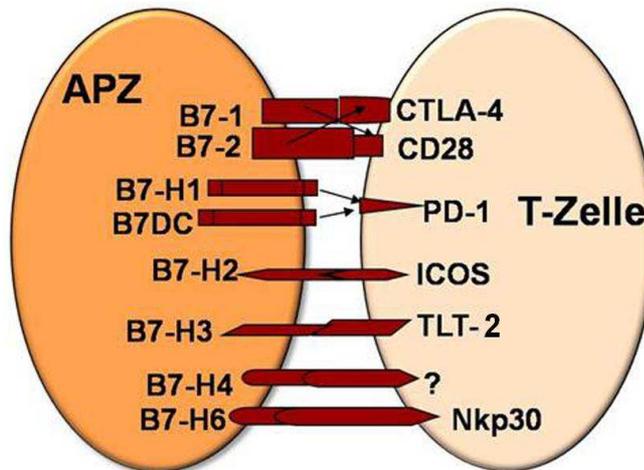


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der costimulatorischen Moleküle der B7-Familie und ihre Liganden.

Dargestellt sind die costimulatorischen Moleküle der B7-Familie auf der Zelloberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und ihre Liganden auf der Zelloberfläche einer T-Zelle. Der Ligand von B7-H4 wurde bisher nicht identifiziert. CTLA-4 - zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4, CD28 - „cluster of differentiation“ 28, PD-1 - „programmed cell death 1“, ICOS - „inducible costimulator of T cells“, TLT-2 - „Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-like transcript 2“, Nkp30 - Natürliches Killerzell-Protein 3.

Die Rolle dieser Moleküle in der APZ/T-Zell-Wechselwirkung wird derzeit intensiv untersucht (Petroff & Perchellet, 2010). Das Molekül B7-H1 wurde ebenfalls auf APZ identifiziert (Freeman *et al.*, 2000). B7-H1 bindet u. a. an den Rezeptor „programmed cell death 1“ (PD-1). Diese Bindung führt zur Apoptose von T-Zellen (Dong *et al.*, 2002; Mazanet und Hughes, 2002). B7-DC bindet ebenfalls an PD-1 und reduziert so eine T-Zell Aktivierung vergleichbar mit der Bindung von B7-H1 (Sharpe und Freeman, 2002). Die Expression von B7-DC kann auf APZ induziert werden, ist aber nicht auf diese Zellen beschränkt (Petroff & Perchellet, 2010). B7-H3 wird konstitutiv auf vielen Tumorzelllinien exprimiert, während die Expression auf APZ durch Zytokine induziert werden kann. Durch die Interaktion von B7-H3 mit „Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-like transcript 2“ (TLT-2) wird die T-Zell-Antwort stimuliert (Hashiguchi *et al.*, 2008; Leitner *et al.*, 2009). B7-H3 ist von besonderem Interesse, da es sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Eigenschaften besitzt (Chapoval *et al.*, 2001; Petroff *et al.*, 2005). Der Rezeptor von B7-H4, dessen Expression nicht so stark verbreitet ist, wurde bisher nicht identifiziert. Eine Induktion der B7-H4-Expression wurde für hämatopoetische Zellen beschrieben. Das Molekül inhibiert das Wachstum, die Zytokinsekretion und die Entwicklung der Zytotoxizität von T-Zellen (Sica *et al.*, 2003). Das kürzlich identifizierte B7-H6-Molekül fungiert als aktivierender Ligand für den NK-Zellrezeptor Rezeptor Natürliches Killerzell-Protein 30 (NKp30) und scheint in die

NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen involviert zu sein. Die Expression dieses Moleküls konnte bisher nur in Tumorzellen jedoch nicht in Normalgewebe nachgewiesen werden (Brandt *et al.*, 2009).

Die Immunantwort von NK- und T-Zellen kann durch das Binden des „nichtklassischen“ MHC-Klasse-I-Moleküls HLA-G an inhibitorische Rezeptoren der NK- und T-Zellen inhibiert werden (Adrian-Cabestre *et al.*, 1999; Amiot *et al.*, 2011; Gati *et al.*, 2001; Moretta *et al.*, 1997; Pende *et al.*, 1997). Im Vergleich zu dem „klassischen“ MHC-Klasse-I Molekül ist HLA-G weniger polymorph und wird u. a. auf immunprivilegierten Organen, wie z.B. dem Trophoblasten, der äußeren Schicht der Blastozyste, exprimiert. Vor diesem Hintergrund wird dem HLA-G Molekül eine schützende Funktion des Embryos vor den NK-Zellen der mütterlichen Gebärmutter Schleimhaut zugesprochen (Lee *et al.*, 1995/1998/2003). Die Expression dieses Moleküls stellt eine Strategie von Tumoren dar, der Immunerkennung zu entweichen (Amiot *et al.*, 2011; Gati *et al.*, 2001; Lesport *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Seliger *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010). HLA-G kann in sieben verschiedenen Spleißvarianten transkribiert werden, die für vier membrangebundene Proteine (HLA-G1-G4) und drei lösliche Formen (HLA-G5-G7) kodieren (Carosella *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2000).

1.2. Mesenchymale Stammzellen

1.2.1. Generelle Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen

Innerhalb des menschlichen Körpers existieren ca. 200 unterschiedliche Zelltypen, deren Ursprung die Zygote darstellt. Im Laufe der Embryonalentwicklung entstehen aus den undifferenzierten Vorläuferzellen, den sogenannten Progenitorzellen, spezialisierte Zelltypen. Während diesem Prozess können sich die jeweiligen Zellen entweder reproduzieren oder in der Differenzierung voranschreiten. Diese Zellen werden als Stammzellen bezeichnet, welche sich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden. Eine totipotente Stammzelle, z.B. die Zygote, zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, sowohl die der Plazenta zugehörige Trophoblastenhülle, als auch einen vollständigen Embryo zu generieren (Carlson, 1999). Pluripotente Stammzellen, wie z.B. die embryonalen Stammzellen (ES), bilden bis auf die Trophoblasten alle Zellen der drei Keimblätter eines adulten Organismus. Multipotente Stammzellen besitzen das Potential alle innerhalb eines Organkompartimentes notwendigen gewebespezifischen Zellen zu bilden (Verfaillie *et al.*, 2002a). Zu den multipotenten Stammzellen gehören u. a. die mesenchymalen Stammzellen (MSC), welche erstmals 1968

von Friedenstein *et al.*, beschrieben wurden. Es handelt sich hierbei um adhärenz, morphologisch den Fibroblasten ähnliche Zellen. Aufgrund ihrer Adhärenz und der fehlenden Oberflächenmarker CD14, CD34 und CD45 lassen sie sich von den ebenfalls im Knochenmark befindlichen multipotenten blutbildenden hämatopoetischen Stammzellen unterscheiden. Ein MSC-spezifischer Marker ist derzeit nicht bekannt. Über die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker CD51, CD54, CD73 und CD105 lassen sich MSC u. a. aus Knochenmark, Fettgewebe, peripherem Blut und aus Nabelschnurblut isolieren (Bieback *et al.*, 2004; Colter *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1999). Die Anzahl der MSC im Knochenmark ist gering, sie beträgt beim Neugeborenen etwa 10^2 MSC pro 10^6 kernhaltige Zellen und nimmt mit zunehmendem Alter exponentiell ab (Caplan *et al.*, 1994). Die *in vitro*-Vermehrungskapazität der MSC hängt sowohl vom Alter als auch vom Zustand eines Spenders ab (Digirolamo *et al.*, 1999; Caplan *et al.*, 1994).

Die Plastizität der MSC besteht in der Fähigkeit, sich zu Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten, Tenozyten, Stromazellen, Skelettmuskelzellen, längsgestreifte Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren (Bennett *et al.*, 1991; Ferrari *et al.*, 1998; Jaiswal *et al.*, 1997; Kopen *et al.*, 1999; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 2004; Wakitani *et al.*, 1995; Yoo *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2002). Das Differenzierungspotential beschränkt sich demnach nicht nur auf mesenchymales Gewebe, sondern es ist keimblattüberschreitend. Aufgrund der Heterogenität von MSC, welche durch die unterschiedliche Expression von Differenzierungsantigenen deutlich wird, ist das Differenzierungspotential der einzelnen Zellen verschieden. Beispielsweise lässt sich nur ein Drittel der MSC in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren, währenddessen zwei Drittel der MSC Osteozyten und Chondrozyten bzw. nur Osteozyten ausbilden kann. Versuche mit Einzelzellklonen aus MSC ergaben keine Klone, welche sich ausschließlich in Adipozyten und Osteozyten oder Adipozyten und Chondrozyten differenzieren ließen, sondern stets eine Mischung von Zelltypen (Hicok *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 1996).

Vor dem Hintergrund der Plastizität von MSC entwickelte sich in den letzten Jahren ein starkes Interesse am Einsatz der MSC für Transplantationen. MSC erscheinen sowohl für Gewebetransplantationen, zelluläre Therapien als auch für somatisch-gentherapeutische Applikationen vielversprechend zu sein (Deans and Moseley, 2003). Die Bedeutung von Immunbarrieren für den Einsatz von MSC ist im Rahmen von Transplantationen jedoch kritisch. Immunbarrieren beeinflussen u. a. den Einsatz autologer bzw. universeller Spenderlinien und inwieweit für den klinischen Einsatz potentielle toxische Immunsuppressoren notwendig sind. Grundlage für das Anwachsen von MSC im allogenen Wirt ist die immunsupprimierende Aktivität der MSC. In experimentellen *in vivo*-Modellen

konnte bereits gezeigt werden, dass MSC langfristig transplantiert werden können und *in vivo* ausdifferenzieren (Horwitz *et al.*, 2002). Durch die klinisch nutzbaren immunsuppressiven Effekte von MSC reduziert sich bei einer allogenen Transplantation die Wahrscheinlichkeit und die Schwere der Abstoßungsreaktion und zeigt, dass MSC zwischen HLA-inkompatiblen Individuen transplantierbar sind (Frassoni *et al.*, 2002). Für die Applikation von MSC ist jedoch eine detaillierte Charakterisierung der immunregulatorischen Aktivitäten und deren zugrunde liegenden Mechanismen kritisch. Die Abbildung 1.3 zeigt wichtige immunmodulatorische Eigenschaften von MSC.

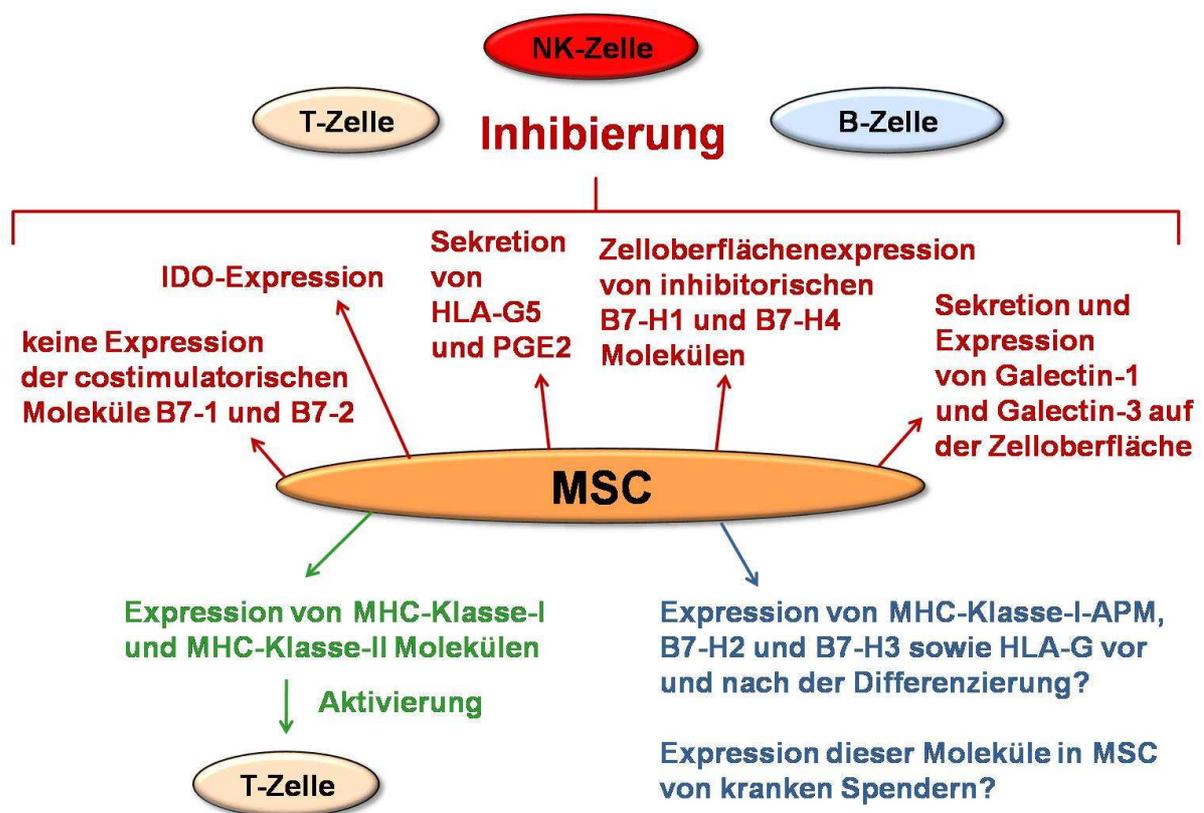


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des immunregulatorischen Potentials von mesenchymalen Stammzellen.

Dargestellt sind bekannte immunsuppressive (rot) sowie immunaktivierende (grün) Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (MSC). Die in der Literatur als kontrovers beschriebene bzw. bisher nicht untersuchte Expression immunmodulatorischer Moleküle ist dunkelblau hervorgehoben. NK-Zelle - Natürliche Killerzelle, IDO - Indolamin 2,3-Dioxygenase, PGE-2 - Prostaglandin E2, MHC-Klasse-I APM - MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsmaschinerie.

MSC bilden hohe Mengen des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), welches Tryptophan zu Kynurenin abbaut. Mit dem rapiden Abbau von Tryptophan wird die Tryptophan-abhängige Aktivierung von T-Zellen inhibiert. Zusätzlich induziert das

entstehende Abbauprodukt Kynurenin die Erzeugung regulatorischer T-Zellen, welche letztendlich für die Immunsuppression verantwortlich sind (Chen *et al.*, 2008; Di Lanni *et al.*, 2008; Meisel *et al.*, 2004; Prevosto *et al.*, 2007). Die Inhibierung der Immunantwort durch MSC geht weiterhin auf die Sekretion von Prostaglandin E2 (PGE2) zurück, welches die Bildung von Interleukin-2 und Interferon- γ durch T-Lymphozyten, sowie die Freisetzung von Interleukin-1 β und TNF α durch Makrophagen hemmt (Simmons *et al.*, 2004). Über die Freisetzung von Prostaglandinen durch MSC wird die Lymphozytenproliferation inhibiert (Rasmusson *et al.*, 2005). Weitere lösliche Faktoren, die in die MSC-vermittelte Immunsuppression involviert sind, sind z.B. der Hepatozyten Wachstumsfaktor TGF- β 1, Stickstoffmonoxid und IL-10 (Aggarwal und Pittenger, 2005; Beyth *et al.*, 2005; Djouad *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2003). Auch Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der MSC-vermittelten Immunsuppression. Die Prostaglandinproduktion der MSC lässt sich durch TNF- α um den Faktor 100 erhöhen (Aggarwal & Pittenger, 2005). Ein weiteres, in diesem Zusammenhang wichtiges Zytokin ist IFN- γ . Dieses induziert dieIDO- und Prostaglandin-Freisetzung durch MSC (Aggarwal und Pittenger, 2005). Die Expression von HLA-G5 Molekülen durch MSC inhibiert die zytotoxische Aktivität von ZTL und NK-Zellen (Nasef *et al.*, 2007; Rizzo *et al.*, 2008; Selmani *et al.*, 2009). Durch die Zelloberflächenexpression der coinhibitorischen Moleküle B7-H1 und B7-H4 auf MSC wird über Zell-Zell-Kontakt die Proliferation von T-Zellen supprimiert (Augello *et al.*, 2005; Krampera *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2010). Eine Inhibierung der T-Zellproliferation durch MSC wurde mehrfach publiziert (Tse *et al.*, 2003; Djouad *et al.*, 2003; Krampera *et al.*, 2003; Le Blanc *et al.*, 2003; Di Nicola *et al.*, 2002). MSC exprimieren keine costimulatorischen B7-1 und B7-2 Moleküle und sind somit in der Lage eine T-Zell Anergie zu induzieren (Glennie *et al.*, 2005; Majumdar *et al.*, 2003). Neueste Studien postulieren, dass die Expression von Galektinen (insbesondere Galektin-1 und -3) auf der Zelloberfläche von MSC sowie deren Sekretion zur Inhibierung der T-Zell-Proliferation führt (Gieseke *et al.*, 2010; Sioud *et al.*, 2010). B-Zellen werden ebenfalls durch MSC inhibiert (Djouad *et al.*, 2003; Corcione *et al.*, 2006). Es wurde nachgewiesen, dass MSC das Wachstum von IL-2 und IL-15 aktivierten NK-Zellen supprimieren können (Spaggiari *et al.*, 2006). MSC vermindern die TNF- α Produktion der dendritischen Zellen, wodurch die Generierung und Funktion von APZ inhibiert wird (Aggarwal und Pittenger, 2005). MSC supprimieren die Immunantwort *in vivo* (Le Blanc *et al.*, 2004).

Neben den erwähnten immunsuppressiven Eigenschaften fungieren MSC aufgrund ihrer starken MHC-Klasse-I und geringen MHC-Klasse-II Expression, welche durch IFN- γ hochreguliert werden kann, als antigenpräsentierende Zellen und aktivieren somit die T-Zell-Antwort (Stagg *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen,

das MSC nicht in allen *in vivo*-Studien eine Abstoßungsreaktion verhindern, was in Tierexperimenten gezeigt wurde. In einigen Studien konnte eine Inhibierung der T-Zellproliferation und Zytokin-Produktion von T-Zellen durch MSC nachgewiesen werden. Der Mechanismus dieser Inhibierung ist bis heute nicht vollständig geklärt (Sudres *et al.*, 2006; Mielcarek *et al.*, 2011). MSC zeichnen sich durch die Zelloberflächenexpression von vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM), intrazellulären Adhäsionsmolekülen 1 (ICAM-1), aktivierten Leukozyten Zelladhäsionsmolekülen (ALCAM), funktionellen Lymphozyten Antigenen-3 (LFA3) und Integrinen aus. Über diese Moleküle können MSC mit T-Zellen interagieren (Chamberlain *et al.*, 2007).

Analysen zur Expression, Regulation und Funktion weiterer wichtiger immunmodulatorischer Moleküle, wie z.B. B7-H2 und B7-H3, HLA-G sowie MHC-Klasse-I APM in undifferenzierten und differenzierten MSC führten teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen oder wurden bisher nicht durchgeführt. Alle Untersuchungen zum immunmodulatorischem Potential dieser Zellen wurden an immortalisierten MSC bzw. an primären MSC von gesunden Spendern durchgeführt. Bisher gibt es keine Untersuchungen an primären MSC von kranken Spendern.

1.2.2. Adipogene und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Als adipogene bzw. osteogene Differenzierung wird die Entwicklung von MSC in Fettzellen bzw. in Knochenzellen bezeichnet. Die adipogene Differenzierung von MSC erfolgt in einem Medium mit Glukoseüberschuß in Gegenwart von Insulin, Dexamethason, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin, Pantothensäure und D-Biotin (Pittenger *et al.*, 1999; Gimble *et al.*, 1992). Das Überangebot an Glukose ist essentiell für die Fettsynthese. Der Zusatz von Insulin führt zur Anregung der Glukose-Aufnahme durch Translokation des Glukose-Transporters GLUT4. Weiterhin erfolgt eine Aktivierung der Glykolyse und Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A als Fettsäure-Baustein und die Initiation der Fettspeicherung (Lehninger *et al.*, 1994). Dexamethason ist ein künstliches, dem Cortisol ähnliches Hormon, welches den „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (PPAP γ) induziert und die Transkription von Genen der Adipogenese aktiviert (Schoonjans & Auwerx, 2000). Durch 3-Isobutyl-1-Methylxanthin wird die cAMP- und cGMP-Phosphodiesterase gehemmt, was zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und letztendlich zu einer verringerten Proliferation und verstärkten Differenzierung der Zellen führt. Zusätzlich wird für die adipogene Differenzierung Pantothensäure (Vitamin B5) und D-Biotin (Vitamin B7 oder

Vitamin H) benötigt. Vitamin B5 ist wichtig für die Bildung von Coenzym A, welches seinerseits an der Synthese von Fetten beteiligt ist. Vitamin H ist die prosthetische Gruppe der Carboxy-Transferasen, durch deren Aktion unter anderem in der Fettsäurebiosynthese Kohlendioxid fixiert wird. Für die Induktion der osteogenen Differenzierung wird Ascorbat, β -Glycerophosphat und Dexamethason verwendet (Bellows *et al.*, 1986; Jaiswal *et al.*, 1997; Maniatopoulos *et al.*, 1988). Ascorbat stellt einen Co-Faktor dar, welcher an der Hydroxylierung von Prolin und Lysin und damit an der Kollagensynthese beteiligt ist. Außerdem aktiviert Ascorbat die Synthese von Proteinen der Knochenmatrix (Beresford *et al.*, 1993). Während β -Glycerophosphat als zusätzliche Phosphatquelle dient, inhibiert Dexamethason die Proliferation der MSC und ist am Mineralisierungsprozess beteiligt (Baylink 1983; Bellows *et al.*, 1990; Beresford *et al.*, 1992; Haynesworth *et al.*, 1992b).

1.3. Der Keimzelltumor

1.3.1. Generelle Eigenschaften von Keimzelltumoren

Die häufigste Tumorerkrankung junger Männer stellt der nichtseminomatöse Keimzelltumor (KZT) dar. KZT repräsentieren eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sich unter anderem durch Unterschiede in der Histopathologie auszeichnen. Die Zellen des KZT besitzen Charakteristika von embryonalen Karzinomzellen (EC-Zellen). EC-Zellen repräsentieren pluripotente Tumorstammzellen, die in unterschiedliche, somatische Derivate, wie z.B. Tumore in fötalen Gonaden (Teratome) oder extraembryonale Gewebe wie Chorionkarzinome und Dottersacktumore differenzieren können (Andrews, 1998; Pera *et al.*, 1989) (Abb. 1.4).

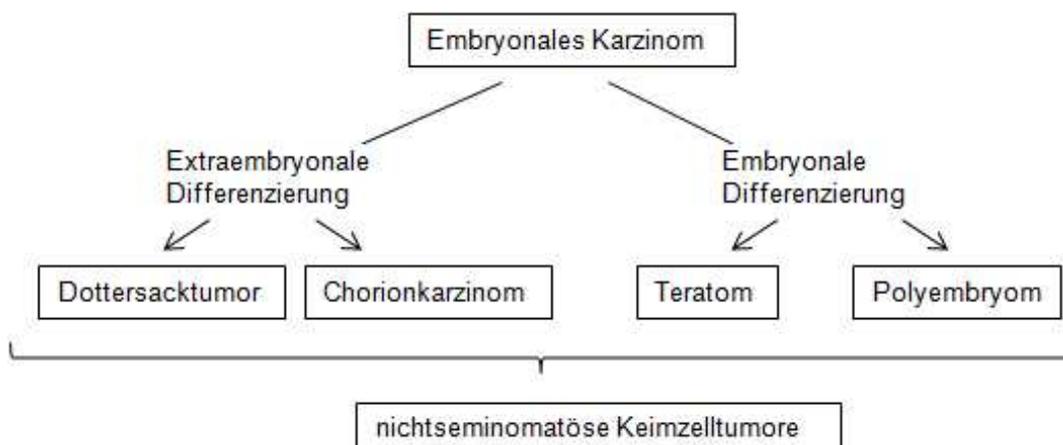


Abb. 1.4: Entwicklung verschiedener Keimzelltumortypen (verändert nach Müller, 2005).

Das kontrovers diskutierte Konzept der „Tumorstammzelle“ entstand mit der ersten Identifizierung potentieller Tumorstammzellen durch Bonnet & Dick 1997 bei Studien an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Die Tumorstammzell-Hypothese postuliert, dass nur eine kleine Subpopulation von Tumorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorinitiation besitzt und diese verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums ist. Erste Untersuchungen zeigten, dass Tumorstammzellen gegenüber differenzierten Tumorzellen eine hohe Kapazität zur Invasivität, Metastasierung und Angiogeneseinduktion besitzen (Balic *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2006; Patrawala *et al.*, 2006). Desweiteren überexprimieren sie antiapoptotische und „multidrug resistance“ Proteine. Somit können diese Zellen bisherige Tumorthérapien überstehen. Gerade deshalb stellen Tumorstammzellen ein Ziel für mögliche neue, effizientere Tumorthérapien dar. Analog zu Stammzellen scheinen Tumorstammzellen jedoch eine Nische für den Erhalt ihrer Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit zu benötigen (Rizo *et al.*, 2006). Wesentlich für die Funktion dieser Nische ist die Expression von stammzelltypischen Genen (Sneddon *et al.*, 2006, Boccaccio *et al.*, 2006). Gegenüber differenzierten somatischen Zellen und differenzierten Tumorzellen unterliegen Tumorstammzellen einer aberranten Immunregulation und können das Tumorwachstum propagieren (Atanackovic *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2006).

Die Zellen des KZT haben Eigenschaften von Tumorstammzellen und sind aufgrund ihrer geringen MHC-Klasse-I-Expression immunprivilegiert. Deshalb stellen KZT-Zellen potentielle Zielstrukturen für die Behandlung von Tumorpatienten dar. Vor diesem Hintergrund ist das Verständnis der Expression und Funktion von immunologischen Molekülen der KZT-Zellen essentiell. Bisher gibt es relativ wenige Untersuchungen zur Expression von immunregulatorischen Molekülen in humanen KZT-Zelllinien. Es konnte gezeigt werden, dass einige der undifferenzierten KZT-Zelllinien eine sehr geringe bzw. fehlende MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression aufweisen (Wilson *et al.*, 1994), was mit einer Herabregulation einiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM korrelierte (Seliger *et al.*, 1997). Die KZT-Zellen wurden nicht von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkannt, während der Gentransfer von MHC-Klasse-I Molekülen zur Erkennung dieser Zellen durch ZTL führte. Interessanterweise konnte die Expression von MHC-Klasse-I Zelloberflächenmolekülen in einigen KZT-Zelllinien durch Interferon- γ induziert werden. Es wurden bisher keine Studien zur Immunogenität von EC-Zellen gegenüber NK-Zellen veröffentlicht. Neben der geringen MHC-Klasse-I-Expression in KZT-Zellen bzw. EC-Zellen gibt es fast keine Informationen über die Expression und die Funktion weiterer immunrelevanter Moleküle, wie z.B. MHC-Klasse-I APM, B7-H1 - H4 und HLA-G in undifferenzierten EC-Zellen. Auch über die

Expression dieser Moleküle während der Differenzierung von EC-Zellen ist bisher nur wenig bekannt, was in der Abbildung 1.5 zusammenfassend dargestellt ist.

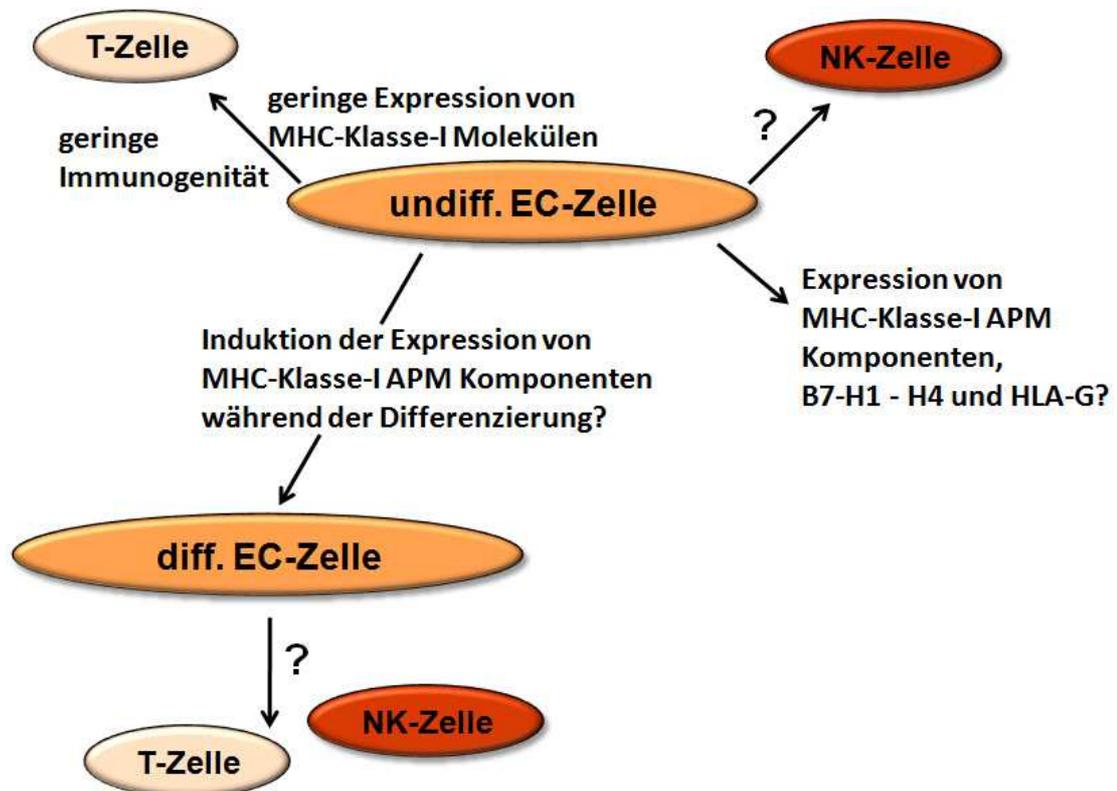


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des immunregulatorischen Potentials von Embryonalen Karzinomzellen.

Dargestellt ist das immunregulatorische Potential von Embryonalen Karzinomzellen (EC-Zellen). Undifferenzierte EC-Zellen (undiff. EC-Zelle) exprimieren geringe Mengen an MHC-Klasse-I Molekülen und werden nicht durch zytotoxische T-Zellen erkannt. Die Immunogenität von EC-Zellen gegenüber NK-Zellen wurde bisher nicht untersucht. Die Expression Komponenten der MHC-Klasse-I Antigenprozessierungsmaschinerie (MHC-Klasse-I APM), B7-H1 - H4 und HLA-G in EC-Zellen wurde kaum analysiert. Über die Expression der MHC-Klasse-I APM während der Differenzierung von EC-Zellen (diff. EC-Zelle) gibt es ebenfalls wenige Informationen. NK-Zelle - Natürliche Killerzelle.

1.3.2. Somatische Differenzierung von Keimzelltumor-Zelllinien

Die Differenzierung von KZT-Zelllinien kann mit Hilfe von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) erfolgen (Andrews, 1984). Dabei handelt es sich um ein natürliches Vitamin A-Derivat, das der Gruppe der Retinoide angehört (Roberts, 1984). Retinoide sind Oxidationsprodukte des Vitamin A und entstehen im menschlichen Körper aus dem aufgenommenen Provitamin A (β -Carotin). Durch die Enzyme Retinoiddehydrogenase und Retinaldehydrogenase wird ATRA aus Vitamin A oxidativ gebildet (Lotan, 1995). Im menschlichen Körper sind Retinoide

essentiell für die Zellproliferation, das Wachstum, die Differenzierung und die Embryogenese (Maden, 2000; Sporn 1976). Die Rezeptoren für Retinoide sind im Zellkern lokalisiert und gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Retinoide entfalten ihre hormonelle Wirkung direkt auf nukleärer Ebene und beeinflussen die Genexpression. Bisher sind mehr als 530 Gene als direkte oder indirekte Ziele der Retinsäure beschrieben wurden (Campbell, 1999; Balmer & Blomhoff, 2002). Durch ATRA wird die Zellproliferation supprimiert, der Zellzyklus-Arrests induziert und die Sensitivität von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika sowie gegenüber T-Zell- und NK-Zell-vermittelter Lyse erhöht. Daher erfolgt der Einsatz von ATRA im Rahmen von Tumorthapien (Haque *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2005; Mathew & Sharma, 2000; Pohl *et al.*, 1993; Tao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000; Westervelt *et al.*, 2003). Neben Untersuchungen zur Chemoprevention des KZT durch eine ATRA-Behandlung, stellt die Induktion der Differenzierung von KZT-Zellen ein wichtiges Modell zur Untersuchung von *in vitro* Veränderung der Genexpression dar.

1.4. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Während die Biologie von MSC und KZT-Zellen gut charakterisiert ist, gibt es zum immunregulatorischen Potential beider Zelltypen relativ wenige und zum Teil widersprüchliche Informationen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Expression immunmodulatorischer Moleküle in MSC von gesunden Spendern und von Patienten mit malignen Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks sowie in undifferenzierten und zum Teil in differenzierten MSC und KZT-Zellen. Dabei wurden insbesondere die Komponenten der MHC-Klasse-I APM, die costimulatorischen und coinhibitorischen Moleküle B7-H1 - H4 und das nicht-klassische HLA-G-Antigen untersucht. Neben Studien zu epigenetischen Veränderungen beinhaltete das Vorhaben auch Untersuchungen zur transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation dieser Komponenten. Zur Analyse der immunmodulatorischen Funktion einiger Moleküle sollten NK- und T-Zell-vermittelte Immunantworten in Korrelation mit der Expression der Komponenten bestimmt werden. Die Charakteristik der immunologischen Eigenschaften von MSC sind für deren Einsatz im Rahmen von Transplantationen und der Gewebegeneration unabdingbar. Die Untersuchung immunregulatorischer Moleküle in Zelllinien von KZT soll als Basis dienen, um der Tumorthapie mögliche Ansatzpunkte zu eröffnen und das immunologische Verständnis für diese Tumoren zu erweitern.

2. Material

2.1. Zelllinien und primäre Zellen

In der vorliegenden Studie wurden etablierte Zelllinien von KZT (Tab. 2.1) und MSC (Tab. 2.2) sowie primäre MSC des Knochenmarks von 13 Spendern (MSCP91 - D83) und Zellpellets von primären MSC von fünf Spendern (MSC 105 - 126) (Tab. 2.3) analysiert. Als Effektorzellen wurden Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie CD8⁺ T-Zellen aus peripherem Blut verschiedener Spender isoliert. Das periphere Blut wurde von der Blutspende Kröllwitz (Einrichtung für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Halle-Saale) bezogen. Die NK-Zelllinie NK-92 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) käuflich erworben (DSMZ-Nummer: ACC Nr. 488). In den folgenden Tabellen sind die verwendeten KZT-Zelllinien sowie MSC-Linien und primären MSC, deren Ursprung sowie die entsprechenden Referenzen bzw. DSMZ-Nummern aufgeführt. Im Fall der KZT-Zelllinien sind die histologischen Eigenschaften der ursprünglichen Patiententumore angegeben.

Tab. 2.1: KZT-Zelllinien, Herkunft, histologische Eigenschaften und Referenzen

Zelllinie	Ursprung/Lokalisation und Histologie des Patiententumors	Differenzierungsstatus	Referenzen
H12.1	Testes: EC + TE + CC + S	undifferenziert	Casper et al, 1987 Mueller et al, 2003
H12.1D	stabil differenzierte H12.1	differenziert	Mueller et al, 2003
H12.5	Testes: EC + T + CC + S	undifferenziert	Casper <i>et al.</i> , 1987
2102EP	Testes: TC + YST	undifferenziert	Wang <i>et al.</i> , 1980 Andrews <i>et al.</i> , 1980
1777NRpmet	Retroperitoneale Metastase: EC	differenziert	Bronson <i>et al.</i> , 1983 Bronson <i>et al.</i> , 1984
1411HP	Retroperitoneale Metastase: EC+ TE +YST	differenziert	Vogelzang <i>et al.</i> , 1985
JAR	Plazenta: CC	differenziert	DSMZ (ACC Nr. 462)
JEG-3	Plazenta: CC	differenziert	DSMZ (ACC Nr. 463)
Ntera-2	EC, TC	undifferenziert	DSMZ (ACC Nr. 527)

EC - Embryonales Karzinom, TE - Teratom, CC - Chorionkarzinom, S - Seminom, YST - Dottersacktumor, TC - Teratokarzinom, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Die Zelllinien H12.1, H12.1D, H12.5, 2102EP, 1777NRpmet und 1411HP wurden freundlicherweise von der Klinik für Innere Medizin IV der Martin-Luther Universität Halle (Leitung Prof. H.-J. Schmoll) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.2: MSC-Linien, Herkunft und Referenzen

Zelllinie	Herkunft	Referenzen
L87	Knochenmark	Thalmeier et al, 1994
V54-2	peripheres Blut	Conrad et al, 2002

Die MSC-Linien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD I. Teichert v. Lüttichau (Kinderklinik der Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.3: Primäre MSC aus Knochenmark, Eigenschaften des Knochenmarks und Art der Erkrankung

Bezeichnung der Spender von primären MSC	Erkrankung/Therapie des Knochenmarks	Art der Erkrankung
MSCP91	E	multiples Myelom
D2	E/T	multiples Myelom
D17	G	-
D24	E/T	akute myeloische Leukämie
D25	E/T	multiples Myelom
D26	T	Knochentuberkulose
D38	E/T	chronische lymphatische Leukämie
D39	G	-
D53	E/T	akute myeloische Leukämie
D55	T	Mantelzell-Lymphom
D66	E/T	multiples Myelom
D77	E/T	multiples Myelom
D83	E/T	akute myeloische Leukämie
MSC 105	G	-
MSC 106	G	-
MSC 113	G	-
MSC 125	G	-
MSC 126	G	-

MSC - mesenchymale Stammzellen, E - Erkrankung des Knochenmarks, T - Chemotherapie, G - gesundes Knochenmark.

Die 13 primären MSC (MSC91 - D83) wurden aus dem Knochenmark von gesunden Spendern bzw. von Spendern mit malignen Erkrankungen bzw. Infektion des Knochenmarks isoliert und freundlicherweise von der Klinik für Innere Medizin IV der Martin-Luther Universität Halle (Leitung Prof. H.-J. Schmoll) zur Verfügung gestellt. Desweiteren wurden Zellpellets von primären MSC, welche aus dem Knochenmark von fünf gesunden Spendern (MSC 105 – MSC 126) isoliert wurden, freundlicherweise von der Klinik für Immunologie der Karolinska Universität Stockholm zur Verfügung gestellt.

2.2. Geräte

Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH (Freiburg i. Br.)
Agarosegelelektrophorese- apparatur	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen); Mini-SUB [®] CELL GT, Bio-Rad Laboratorien GmbH (München)
Autoklav	Highclave HV-85, HMC Europe GmbH (Tüßling)
CO ₂ -Begasungsschrank	Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc. (Cornelius, USA)
Durchflusszytometer	Epics XL MCL, Beckman/Coulter (Krefeld)
Einfrierboxen (-20 °C/-80 °C)	GLW [®] GmbH (Hannover)
ELISA-Detektionsgerät	MRX TC II, Dynex Technologies GmbH (Berlin)
Fluoreszenzkamera	Luminescent image analyzer (LAS)-3000, Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf)
Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Leica DM IRB, Leica Microsystems GmbH (Wetzlar); SPOT RT Monochrome, Diagnostic instruments, Inc. (Sterling Heights)
Gefrierschrank (-20 °C)	Comfort, Liebherr International Deutschland GmbH (Biberach an der Riss)
Gefrierschrank (-80 °C)	U535 Innova, New Brunswick Scientific GmbH (Edison, USA)
Gelfotodokumentation	Kodak Image station 440 CF, Carestream Health Inc. (Rochester, USA)
Kryoboxen	Nalgene [™] , Nalge Europe Ltd. (Rochester, USA)
Kühlschrank	Profi Line, Liebherr International Deutschland GmbH (Biberach an der Riss)
Magnet für die Zellseperation	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magneten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnetrührer	RET basic C, KA [®] Werke GmbH & Co.KG (Staufen)
Mikroskop für die Zellkultur	Telaval 3, Carl Zeiss AG (Jena)
Multikanalpipette, 50 - 300 µl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Polyacrylamid-Gelelektro- phoreseapparaturen	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
PCR-Gerät	Labcycler, SensoQuest (Göttingen)
Photometer	BioPhotometer 6131, Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettus	Pipetboy acu, IBS Integra Bioscience GmbH (Fernwald)
Real-time Gerät	Rotor Gene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australia)
Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese	PowerPac 300, Bio-Rad Laboratorien GmbH (München); Hoefer Inc. (San Franzisko, USA)
Spannungsquelle für Polyacryl- amid-Gelelektrophorese	Power Pack P25, Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
Spannungsquelle für Blotapparatur	Power Pack Basic, Bio-Rad Laboratorien GmbH (München)

Sterilisator	Venticell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH (Gräfelfing)
Stickstofftank	Cryostorage system K Series, Taylor-Wharton Deutschland GmbH (Husum)
Tank-Blot-Apparatur	Trans Blot Cell, Bio-Rad Laboratorien GmbH (München)
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf AG (Hamburg)
Trockenschrank	WS 200, MLW Labortechnik (Ilmenau)
UV-Lampe	Mighty Bright, Hoefler Inc. (San Francisco, USA)
Vortexer	Zx ³ classic, UniEquip GmbH (Martinsried)
Waage	Analytical Plus, Ohaus [®] Corporation (Giessen)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Zählkammer	Neubauer, Labor Optik GmbH (Friedrichsdorf)
Zellkultursterilbank	Hera Safe, Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R, Heraeus (Berlin); Z 233 MK-2, Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen); Megafuge 3.0 R, Heraeus Sepatech GmbH (Osterode)

2.3. Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einmalsterilfilter, 0,22 µm	Millipore GmbH (Eschborn)
Einmalpipetten	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
FACS-Röhrchen ohne Deckel	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Glaspasteurpipetten	Assistant – Glaswaren-Fabrik K. Hecht GmbH (Sondheim/Rhön)
Glaswaren	Duran Group GmbH (Mainz)
Kanülen	Microlance 3, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Kryogefäße	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
MACS Separation Columns (MS, LS, LD Columns)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Nitrocellulosemembranen	Protran [®] Transfer Membran, Whatman Inc. (Clifton, USA)
Petrischalen 60/15 mm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg)
Skalpelle	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Spritzen	10 ml, B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
UV - Küvetten, mikro und halbmikro	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Whatman - Papier	3 mm Chr Blotting-Paper, Whatman Inc. (Clifton, USA)
Zellkulturgefäße	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Zellkulturflaschen/-platten	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)

2.4. Chemikalien

Acrylamid-Lösung (40 %)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Albumin Fraktion V	AppliChem GmbH (Darmstadt)
<i>all-trans</i> -Retinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ampicillin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Benzonase® Nuclease	Novagen (Darmstadt)
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
CFDA-SE	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
D-Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Desoxyribonukleosidtri- phosphatgemisch	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
96 %-iger (v/v) Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
70 %-iger (v/v) Ethanol (vergällt)	Biomel GmbH (Dessau)
100 %-ige (v/v) Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Qbiogene Inc. (Heidelberg)
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
FACS-Clean Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FACS-Flow Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FACS-Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FACS-Rinse Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FACS-Wash Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Ficoll-Paque™ PREMIUM	GE Healthcare (München)
Fötales Kälberserum	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Formaldehyd	AppliChem GmbH (Darmstadt)
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Glycin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glycerin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Humanes Serum	c. c. pro GmbH (Neustadt)
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
3-Isobutyl-1-Methylxanthine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milchpulver	Difco/ Voigt Global Distribution Inc. (Lawrence, USA)
Natriumazid	Merck KGaA (Darmstadt)

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Nonidet P40	Roche Holding Deutschland GmbH (Mannheim)
Orange G	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DL-Pantothensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Pferdeserum	c. c. pro GmbH (Neustadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Phorbol Myristat Azetat	Calbiochem/ Merck KGaA (Darmstadt)
Ponceau S	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Proleukin®S	Chiron GmbH (München)
Pyronin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Salzsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Schwefelsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Sucrose	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Temed	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tris (ultra pure)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tween-20	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Triton-X-100	Merck KGaA (Darmstadt)
Valproinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.5. Komplettsysteme

BCA Protein Assay-Kit	Pierce Ltd. (Rockford, USA)
CD8 MicroBeads (Magnetic cell sorting)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
DNase I (RNase-Free)	New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main)
ECL Western Blot Kit	Amersham, GE Healthcare (München)
EpiTect® Bisulfite Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Human IFN- γ ELSA Kit II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
IFN- γ Secretion Assay	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Invisorb® Spin Cell RNS Mini Kit	Invitek (Berlin)
Invisorb® TwinSpin Cell RNS Mini Kit	Invitek (Berlin)
Lipofectamine Reagent™ 2000	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNS Synthesis Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

SYBR green kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Taq DNS Polymerase Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)

2.6. Enzyme

Benzonase-Nuclease	Novagen/Merck KGaA (Darmstadt)
DNase I	New England Biolabs Inc. (Frankfurt a. Main)
Restriktionsendonukleasen konventionell	New England Biolabs Inc. (Frankfurt a. Main)
BstUI	

2.7. Molekulargewicht- und Längenstandards

100 Bp-Marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
1 kB-Marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

2.8. Allgemeine Stammlösungen, Puffer und Medien

2.8.1. Puffer für die Elektrophorese

Agarosegelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	200 mM Tris (ultra pure) 5,7 % (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0
10 x Ladepuffer	250 mg Xylencyanol 250 mg Orange G in 33 ml 150 mM Tris, pH 7,6 60 ml Glycerol ad 100 ml H ₂ O

Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer	1,5 M Tris (ultra pure) 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
Sammelgelpuffer	500 mM Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
10 x Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Glycerin

2.8.2. Puffer für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer 1 % FKS in PBS

2.8.3. Puffer für die Proteinbiochemie

Probenpuffer

2 x SDS-Probenpuffer 0,1 g/ml Sucrose
 10 % (w/v) SDS
 0,12 M Tris, pH 6,8
 1,2 % (w/v) Pyronin B

Western Blot

Blotting-Puffer 100 ml 10 x Laufpuffer
 200 ml Methanol
 ad 1 l Wasser

10 x Waschpuffer (TBS) 200 mM Tris
 1,4 M NaCl
 pH 7,6

1 x Waschpuffer (TBS-T) 100 ml 10 x Waschpuffer
 0,1 % (v/v) Tween-20
 ad 1 l Wasser

Ponceau S-Lösung 2 % (w/v) Ponceau S
 in 30 % (v/v) Trichloressigsäure

Blockierungslösung A 10 % (v/v) Pferdeserum
 5 % (w/v) Milchpulver
 in 1 x Waschpuffer

Blockierungslösung B 5 % BSA
 in 1 x Waschpuffer

Antikörperlösung A 2 % (w/v) Milchpulver in 1 x Waschpuffer

Antikörperlösung B 2 % (w/v) BSA in 1 x Waschpuffer

2.8.4. Eukaryotische Kulturen

DMEM (hoch Glukose; + Phenolrot, Kultivierung von Keimzelltumor- Zelllinien)	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
DMEM (niedrig und hoch Glukose; + Phenolrot, Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen)	Cell Concepts GmbH (Umkirch)
Dulbecco's PBS (- Ca, -Mg) EDTA-Trypsin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)

EMEM	Lonza GmbH, Wuppertal
Fetales Kälberserum (Kultivierung von Keimzelltumor-Zelllinien)	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen)	PAN Biotech GmbH (Nürnberg)
Humanes Serum	c. c. pro (Neustadt)
L-Glutamin	Biowhittaker Lonza GmbH (Wuppertal)
MEM Eagle Alpha Modification	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
MEM-NEAA	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Natriumpyruvat	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Pferdeserum	c. c. pro GmbH (Neustadt)
Streptavidin (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
RPMI 1640	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Optimem	GIBCO-Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Einfriermedium	90 % (v/v) Fötales Kälberserum, 10 % (v/v) DMSO

2.8.4.1. Medien zur Induktion der Differenzierung

Differenzierung von embryonalen Karzinomzelllinien

RPMI 1640 mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin

+ 1; 5; 10 bzw. 20 μ M *all-trans*-Retinsäure

Die *all-trans*-Retinsäure wurde in einem 10 %igem Ethanol-Wasser-Gemisch resuspendiert, anschließend 2 mM Stocklösungen aliquotiert und bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Adipogene Differenzierung (nach Pittenger et al., 1999; Gimble et al., 1992):

DMEM mit Glukoseüberschuss (4,5 g/l), 15 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin

+ 0,1 g/ml BSA (Sigma)

+ 0,17 μ M Panthotensäure

+ 3,3 μ M D-Biotin

+ 1 μ g/ml Insulin

+ 0,1 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin

+ 1 μ M Dexamethason

Osteogene Differenzierung (nach Bellows et al., 1986; Jaiswal *et al.*, 1997; Maniatopoulos et al., 1988):

DMEM mit 1g/l Glukose, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin

+ 50 µg/ml Ascorbat

+ 10 mM β-Glycerophosphat

+ 0,1 µM Dexamethason

2.9. siRNS

Die spezifischen, gegen B7-H3 gerichteten siRNS-Proben, die dazugehörigen siRNS Kontrollen (hoch- und niedrig-GC-dsRNS) sowie die mit Fluorescein markierte dsRNA zur Analyse der Transfektionseffizienz, wurden von der Firma Invitrogen bezogen (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Verwendete siRNS

siRNS-Bezeichnung	siRNS-Sequenz
siRNA B7-H3 (1)	5' UCACAGCUCUGUUUGAUCUUUCUCC 3'
siRNA B7-H3 (2)	5' AAAUCCCGGAUGCUCACGAAGCAGG 3'
siRNA B7-H3 (3)	5' AAACAAGCCCUGCUCGUUGGCCAU 3'
siRNS Kontrolle für B7-H3 (1)-niedrig GC	5' GGAGAAAGAUAACACAGAGCUGUGA 3'
siRNS Kontrolle für B7-H3 (2+3)-hoch GC	5' CCUGCUUCGUGAGCAUCCGGGAUUU 3'

2.10. Primer

Die Primer wurden entsprechend des Verwendungszwecks mit unterschiedlichen Eigenschaften generiert, wobei zwischen Detektionsprimern (Tab. 2.5.) und Primern für die Amplifizierung Bisulfit-behandelter DNS (Tab. 2.6.) unterschieden wurde. Die optimale Primersequenz wurde mit verschiedenen Computerprogrammen (SECentral, Methprimer) ermittelt, wobei ein GC-Gehalt von 40 % bis 60 % vorgegeben wurde.

Tab. 2.5. Detektionsprimer

Primerbezeichnung	Primersequenz	Tm [°C]	Fragmentgröße [Bp]
18S rRNS-FW 18S rRNS-REV	5' AGGGAATTCCCGAGTAAGTGCG 3' 5' GCCTCACTAAACCATCCAA 3'	60	104
β-Aktin-FW β-Aktin-REV	5' TCCTGTGGCATCCACGAAACT 3' 5' GAAGCATTTGCGGTGGACGAT 3'	58	239
β ₂ -MG-FW β ₂ -MG-REV	5' CTCGCGCTACTCTCTCTT 3' 5' AAGACCAGTCCTTGCTGA 3'	60	217
AP-FW AP-REV	5' TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA 3' 5' ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC 3'	60	454
B7-H1-FW B7-H1-REV	5' TGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAA 3' 5' ACCATAGCTGATCATGCAGCGGTA 3'	60	157
B7-H2-FW B7-H2-FW	5' CGTGACATCCATAAACGGGCTA 3' 5' CAGAAGCACGTTCTCTATGCA 3'	60	196
B7-H3-FW B7-H3-REV	5' TGTCTGTCTCATTGCACTGC 3' 5' CAGGCTATTTCTTGCCATCAT 3'	60	183
B7-H4-FW B7-H4-REV	5' GCAATTGCACTCATCATT 3' 5' CTGCTCCGACAGCTCATCTT 3'	60	216
GAPDH-FW GAPDH-REV	5' GGAATCATGACCACAGTCCAT 3' 5' AGGTCCACCACTGACACGTT 3'	60	218
HLA-G.257 (+) HLA-G.1225 (-)	5' GGAAGAGGAGACACGGAACA 3' 5' TGAGACAGAGACGGAGACAT 3'	60	430-1000 (pan-Primer)
HC-FW HC-REV	5' GCCTACGACGGCAAGGATTAC 3' 5' GGTGGCCTCATGGTCAGAGA 3'	60	252 (pan-Primer)
Oct-3/4-FW Oct-3/4-REV	5' ATCCTCGGACCTGGCTAAG 3' 5' ACCACACTCGGACCACATC 3'	60	741
Oct-4-FW Oct-4-REV	5' ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAACT 3' 5' CTGAATACCTTCCCAAATAGAACCC 3'	60	127
TAP1-FW TAP1-REV	5'GGAATCTCTGGCAAAGTCCA 3' 5' TGGGTGAACTGCATCTGGTA 3'	60	331
TAP2-FW TAP2-REV	5' CCAAGACGTCTCCTTTGCAT 3' 5' TTCATCCAGCAGCACCTGTC 3'	60	184
Tapasin-FW Tapasin-REV	5' TGGGTAAGGGACATCTGCTC 3' 5' ACCTGTCCTTGACAGGTATGG 3'	60	214

AP-Alkalische Phosphatase

Tab. 2.6. Primer für die Amplifizierung Bisulfit-behandelter DNS

Primerbezeichnung	Primersequenz	T _m [°C]	Fragmentgröße [Bp]
B7-H1-MU1 B7-H1-ML1	5' GAAAATTGGATTGATATGTTTTATTTTTG 3' 5' AACCCCAACAAATAATTAAGTCTACTACCC 3'	57	481
B7-H1-MU2 B7-H1-ML2	5' GGTAATTGGATTTGTTGTTTTGGGT 3' 5' TCCTCTCTCCATCCCAAAAAAAAAA 3'	60	231
HLA-G COBRA 1035-FW HLA-G COBRA 1491-REV	5' TTTTTATTAGGTGATAGGTTTTTAGAGAAG 3' 5' CTCTAACCCCTCCTACTCCACCCAC 3'	58	456
HLA-GnCOBRA 1134-FW HLA-GnCOBRA 1335-REV	5' GTTAAGGATGGTGGTTATGGTATTT 3' 5' AAATACCTCATAAAATAAAAACCTAAAAAC 3'	60	201

2.11. Antikörper, Färbelösungen und Puffer

Durchflusszytometrie

7-AAD Staining Solution	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Annexin V-FITC	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Annexin V Binding Buffer, 10x Concentrate	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
B7-H1-PE	eBioscience (Frankfurt)
B7-H2-PE	eBioscience (Frankfurt)
B7-H3-PE	R&D Systems (Wiesbaden)
B7-H3-unmarkiert	R&D Systems (Wiesbaden)
B7-H4-PE	eBioscience (Frankfurt)
CD3-PE	Beckmann Coulter (Krefeld)
CD3-PerCP	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
CD4-PE	Beckmann Coulter (Krefeld)
CD8-PE	Beckmann Coulter (Krefeld)
CD14-PE	Beckmann Coulter (Krefeld)
CD16-FITC	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
CD16-PE	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
CD45-PerCP	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
CD45-APC/H7	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
CD56-APC	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
HLA-G MEM-G/1	Abcam (Cambridge), United Kingdom
HLA-G MEM-G/9	Abcam (Cambridge), United Kingdom
HLA-ABC-PE	eBioscience (Frankfurt)
polyklonale anti-IgG-AK-Lösung, FITC/PE-markiert	Abcam plc (Cambridge, UK)
polyklonale anti-IgM/IgG-AK-Lösung, FITC-markiert	Dianova GmbH (Hamburg)
Isotypkontrollen IgG ₁ -unmarkiert	BD Pharmingen (Heidelberg)

IgG ₁ -FITC	Beckmann Coulter (Krefeld)
IgG ₁ -PE	Beckman Coulter (Krefeld)
IgG _{2a} -PE	Beckman Coulter (Krefeld)
IgM	Beckmann Coulter (Krefeld)

T-Zell-Aktivierung

CD3, Klon Okt3	eBioscience (Frankfurt)
----------------	-------------------------

Western Blot

Alkalische Phosphatase (TRA-2-54)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
β-Aktin-Antikörper, unmarkiert	Abcam plc (Cambridge, UK)
β-Aktin-Antikörper, HRP- konjugiert	Abcam plc (Cambridge, UK)
β ₂ -Mikroglobulin	Lampson <i>et al.</i> , 1983
Fettsäurebindeprotein 4 (ab13979)	Abcam plc (Cambridge, UK)
GAPDH	Cell Signaling-New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main)
HLA-G MEM-G/1	Exbio (Praha, Tschechische Republik)
MHC-Klasse-I schwere Kette (HC10)	Stam <i>et al.</i> , 1986; Perosa <i>et al.</i> , 2003
Oct-3/4 (C-10)	Santa Cruz Biotechnoloy (Heidelberg)
Polyklonaler Ziege anti-Maus Antikörper, HRP-konjugiert	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
Polyklonaler Schwein anti- Hase Antikörper, HRP- konjugiert	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
TAP1	Wang <i>et al.</i> , 2005
TAP2	Wang <i>et al.</i> , 2005
Tapasin	Temponi <i>et al.</i> , 1989

2.12. Datenverarbeitungsprogramme

Acrobat Reader	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
Aida Image Analyzer V.4.11	Raytest GmbH, Straubenhardt
CellQuestPro	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
DIVA	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Enhancer	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
Excel	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim)
ImageReader - LAS 3000	Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf)
MetaView	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
MethPrimer	frei verfügbar im „world wide web“
OligoAnalyzer 3.0	frei verfügbar im „world wide web“
Primer3oligo	frei verfügbar im „world wide web“
SeCentral	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
Word	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim)
XnView	frei verfügbar im „world wide web“

3. Methoden

3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.1.1. Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Die verwendeten humanen KZT-Zelllinien und MSC wurden als Monolayer unter Standardbedingungen kultiviert (37 °C, 5 Vol.-% CO₂). Alle zwei bis drei Tage wurden die Zelllinien passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 - 2 ml EDTA-Trypsin abgelöst. Durch Zugabe des zweifachen Volumens an Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Die abgelösten KZT- und MSC-Zelllinien wurden in Kulturmedium suspendiert und ein Teil (1/4 bis 1/2) in neue Zellkulturflaschen überführt. Für die Expansion primärer MSC wurden 200 Zellen/cm² ausgesät. Bei Bedarf einer großen Zellmenge wurden die Zellen in entsprechend größere Zellkulturflaschen gesetzt und kultiviert.

3.1.2. Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung von Suspensionszellen erfolgte unter den oben genannten Standardbedingungen. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert. 1/4 bis 1/2 der Zellsuspension wurde in neue Zellkulturflaschen überführt. Die verwendeten NK- und T-Zellen benötigen IL-2, um in sogenannte „lymphokine-activated killer cells“ (LAK) zu differenzieren (Whiteside, 2001). Nach dem Wechsel des Kulturmediums wurde diesem 250 - 6000 U/ml IL-2 hinzugefügt.

3.2. Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden adhärente Zellen durch Inkubation mit 1 - 2 ml EDTA-Trypsin abgelöst und im jeweiligen Medium resuspendiert. Nach der Zentrifugation (5 min 1400 rpm) wurden die Zellen in PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in Einfriermedium (FKS, 10 % DMSO). Die Zellsuspension wurde in 1 ml Kryoröhrchen aliquotiert, in einer, mit Isopropanol gefüllten, Einfrierbox bei -80 °C langsam tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -160 °C gelagert. Das Auftauen erfolgte bei Raumtemperatur. Die Zellsuspension wurde in frischem Kulturmedium 1:10 verdünnt, zentrifugiert (5 min, 1400 rpm), in PBS gewaschen und in 5 - 10 ml Medium resuspendiert und ausgesät.

3.3. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Vitalfärbung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl von den in Kultur-Medium resuspendierten Zellen abgenommen und mit Trypanblau (1:1) gemischt. Diese Suspension wurde zwischen Deckglas und Objektträger einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein, deren Plasmamembran nicht mehr intakt ist. Daher erscheinen lebende Zellen unter dem Mikroskop hell, während tote Zellen blau angefärbt sind. Es wurden lebende Zellen in vier Eckquadraten zu je 1 mm² ausgezählt. Der Mittelwert von vier Eckquadraten ergibt den Durchschnittswert für 1 mm². Bei einer Kammertiefe von 0,1 mm und einem Verdünnungsfaktor X konnte die Zellzahl wie folgt berechnet werden:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Fläche} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnungsfaktor X}}$$

3.4. Induktion der Differenzierung von Stammzellen

3.4.1. Adipogene und osteogene Differenzierung von MSC

Die Differenzierung der MSC erfolgte unter Verwendung der unter 2.8.4.1. beschriebenen Differenzierungsmedien. Zur Induktion der Differenzierungen wurden 200 MSC pro cm² in Zellkulturflaschen ausgesät und in DMEM (niedrig Glukose), versetzt mit 15 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin, bis zum Erreichen einer 90 - 100 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Normalmedium durch das jeweilige Differenzierungsmedium ersetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen bis die morphologischen Zeichen der Differenzierung lichtmikroskopisch sichtbar wurden. Die Inkubation der undifferenzierten Kontrollzellen erfolgte in Normalmedium ohne Zusatz differenzierungsinduzierender Substanzen.

3.4.2. Somatische Differenzierung der testikulären KZT-Zelllinie H12.1

Zur Induktion der Differenzierung der testikulären KZT-Zelllinie H12.1 wurden 2000 Zellen pro cm² in Zellkultur-Flaschen ausgesät. Dem Medium wurden verschiedene Mengen an *all-trans*-Retinsäure (ATRA) zugesetzt (Endkonzentration: 1; 5; 10 bzw. 20 µM). Die verwendeten Konzentration an ATRA entsprachen zum Einen pharmakologischen ATRA-Konzentrationen (1 - 10 µM) und Konzentrationen, welche bereits für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen sowie Ntera-Zellen verwendet wurden (10 - 100 µM, in der vorliegenden Arbeit 20 µM) (Andrews, 1984; Draper *et al.*, 2002; Segaert *et al.*, 1995). Als Kontrollen dienten die jeweiligen Mengen an Lösungsmittel (10 % ETOH in H₂O) bzw.

unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden für drei Tage unter Standardbedingungen (3.1.) kultiviert, geerntet und die Zellzahl bestimmt (3.3.). Anschließend wurden erneut 2000 dieser Zellen pro cm^2 in neue Zellkultur-Flaschen ausgesät und dem Medium die jeweiligen Mengen an ATRA bzw. 10 % ETOH in H_2O zugesetzt. Die dreitägigen Ernteschritte während des Differenzierungsprozesses sollten ein Überwachsen der unbehandelten und ETOH-behandelten Zellen verhindern, da diese im Vergleich zu den ATRA-behandelten Zellen ein stärkeres Wachstum aufwiesen. Nach jedem Ernteschritt wurde die Zellzahl bestimmt und grafisch als x-faches Wachstum dargestellt. Der Differenzierungsprozess galt als abgeschlossen sobald die ATRA-behandelten Zellen ein x-faches Wachstum ≤ 1 aufwiesen. Weiterhin wurden nach jedem Ernteschritt Zellpellets für eine RNS / DNS- (3.13.1.) und Proteinisolierung (3.14.1.) gesammelt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Eine sofortige Analyse der Proteinexpression sowie der Vitalität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (3.12.) ebenfalls nach jedem Ernteschritt durchgeführt. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen am Ende des Differenzierungsprozesses fotografisch festgehalten.

3.5. Behandlung von adhärennten Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Valproinsäure

Vor der Behandlung wurden 2000 Zellen pro cm^2 in Zellkultur-Flaschen ausgesät und als Monolayer über Nacht kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 0; 0,1; 0,5 und 1 mM Valproinsäure (VPA) und/oder 0; 0,5; 2,5; 5 und 10 μM 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) für ein bis fünf Tage behandelt. Das Medium wurde alle 24 h erneuert. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden nach ein bis fünf Tagen geerntet und die Zell-Pellets bis zur Analyse der DNS-Methylierung sowie Gen- und Proteinexpression bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bei der Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) handelt es sich um ein chemisches Analogon des Nukleosids Cytidin. Ist der Stoff in der Zelle vorhanden, wird er während der DNS-Replikation in diese eingebaut. DNS-Methyltransferasen katalysieren die Methylierung von Cytidinen. DAC hingegen kann nicht von diesen Enzymen methyliert werden. Deshalb führt eine DAC-Behandlung von Zellen zur Demethylierung. Findet eine Demethylierung an bestimmten Stellen der Promotorregion eines Gens statt, kann dies die Induktion der Transkription des Gens bewirken. In Tumoren sind oft Tumor-Suppressor-Gene methyliert, welche im Normalgewebe in demethylierter Form vorliegen. Die demethylierende Substanz DAC wird daher als Arzneistoff in der Chemotherapie von Tumoren verwendet (Christman *et al.*, 2002). Valproinsäure (VPA) hingegen hemmt die Histondeacetylasen. Diese Enzyme

entfernen Acetylgruppen von acetyliertem Lysin auf dem N-terminalen Histonende. Durch die Deacetylierung bekommt die Aminosäure Lysin wieder eine positive elektrische Ladung. Dies erhöht die Affinität des Histonendes für das negativ geladene Phosphat-Gerüst der DNS. In Gegenwart von VPA sind die Histonenden acetyliert. Dies führt zur Neutralisierung der positiv geladenen Histone. Die DNS ist dadurch weniger kompakt, was die Genaktivität erhöht (Brehm *et al.*, 1998).

3.6. Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNS

Die Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNS wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Dazu wurde das Lipofectamine Reagent™ 2000 (Invitrogen) verwendet. Das Prinzip der Lipofektion beruht auf dem Einbringen der Fremd-DNS bzw. -RNS mittels Lipidvesikeln, die mit der Zellmembran fusionieren (Felgner *et al.*, 1987; Hawley-Nelson *et al.*, 1993). Es wurden $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin in eine 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Am folgenden Tag wurden die adhärenen Zellen in PBS gewaschen und frisches Medium ohne Antibiotika zugegeben. Für die Transfektion wurden pro 6-Loch je 100 pmol spezifische siRNS, siRNS Kontrolle und mit Fluorescein-markierte dsRNS (zur Bestimmung der Transfektionseffizienz) sowie 5 µl Lipofectamine Reagent™ 2000 mit Optimem-Medium auf 250 µl aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden beide Lösungen 1:1 gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben und 4 - 6 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Danach wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Nach 72 h wurden die transfizierten Zellen mittels Trypsinierung geerntet und zur Analyse der Proteinexpression durchflusszytometrisch untersucht (3.12.). Für die spätere RNS-Isolierung und Untersuchung der Gen-Expression wurden Zellpellets bei -80 °C gelagert.

3.7. Aufarbeitung von Blutkonzentraten

Für die Isolierung peripherer Monozyten (PBMC) wurden Blutkonserven von gesunden Spendern (Blutspende Kröllwitz, Einrichtung für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Halle-Saale) mittels Leukozytenseparationsröhrchen und Ficoll™-Gradient aufgearbeitet (Noble & Cutts, 1967). Es wurden 15 ml Ficoll-Reagenz in die Röhrchen vorgelegt und zentrifugiert (1 min, 1.000 x g). Anschließend wurden 30 ml EDTA-Vollblut/PBS (1:1) zugegeben und für 20 min ohne Bremse bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. In diesem Schritt bildete sich ein Gradient aus. Das Serum wurde vorsichtig

abgenommen und die PBMC-Fraktion in ein neues Gefäß dekantiert. Die Lymphozyten einer Blutkonserve wurden vereinigt und mehrmals mit PBS gewaschen. Nach der anschließenden Zellzahl-Bestimmung (3.3.) wurden die Zellen sedimentiert, in Einfriermedium resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gelagert oder direkt die CD8⁺ T-Zellen bzw. NK-Zellen isoliert (3.8. bzw. 3.9.).

3.8. Isolierung CD8⁺ T-Lymphozyten aus PBMC mittels magnetischer CD8

MicroBeads

Die magnetische Zell-Sortierung (MACS) wurde nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Die PBMC wurden mit magnetischen CD8 MicroBeads inkubiert und anschließend auf eine Säule geladen, welche sich in einem magnetischen Feld befand. Die magnetisch markierten CD8⁺ Zellen verblieben auf der Säule währenddessen die unmarkierten CD8⁻ Zellen die Säule passieren konnten. Nach dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld konnten die CD8⁺ Zellen von der Säule eluiert werden. Die Zellen wurden anschließend hinsichtlich der CD8-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert (3.12.). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten CD8⁺ Zellen wiesen eine Reinheit von 95 - 98 % auf.

3.9. Isolierung von NK-Zellen aus PBMC

Für die Isolierung von NK-Zellen aus PBMC wurde der NK Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die NK-Zellen wurden nach dem Prinzip der Negativ-Selektion sortiert. Nicht-NK-Zellen wurden mit einem Biotin-konjugierten Cocktail gegen Linien-spezifische Antigene und einem MicroBead-Cocktail indirekt magnetisch markiert und im magnetischen Feld innerhalb einer Säule gehalten, während die nicht-markierten NK-Zellen von der Säule eluiert werden konnten. Nach Färbung der Zellen mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen (CD3 / CD4, CD3 / CD56, CD3 / CD16, CD56 / CD16, CD19 / CD14) wurde die Reinheit der NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (3.12.). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten NK-Zellen wiesen eine Reinheit von 95 - 98 % auf.

3.10. Aktivierung von NK-Zellen mit Interleukin-2 zur Generierung Lymphokin-aktivierter Killer

Ein großer Teil der natürlichen Killerzellen zeichnet sich durch die konstitutive Expression des IL-2-Rezeptors (IL-2R β) aus. Die Stimulation der Zellen mit IL-2 resultiert in einer Hochregulation ihrer zytolytischen Aktivität. Zur Generierung der Lymphokin-aktivierten Killer (LAK) wurden $1 - 1,5 \times 10^6$ NK-Zellen in 37 °C warmen RPMI-Medium mit 10 % humanem Serum und 6000 IU/ml IL-2 ausgesät und für 72 h inkubiert (nach Whiteside, 2001). Die erfolgreiche Generierung der LAK war mikroskopisch anhand der Bildung von Zellclustern zu sehen.

3.11. Chromfreisetzungsversuch

Die spezifische Lyse von Zielzellen durch Effektorzellen wurde mittels Chromfreisetzungsversuch nach Svedmyr & Jondal, 1975 nachgewiesen. Pro Loch einer 96-Lochplatte wurden je 1×10^4 Effektorzellen in 3-fachen Ansätzen verwendet. Pro 3-fach Ansatz wurde die spontane Lyse der Zielzellen ohne Effektoren sowie die Lyse der Zielzellen durch Effektoren in den Effektor:Target-Verhältnissen von maximal 40:1; 20:1 und 10:1 sowie 5:1; 2,5:1; 1,25:1 und mindestens 0,625:1 bis 0,3125:1 gemessen. Die Auswahl bestimmter Verhältnisse richtete sich nach der verfügbaren Zielzellzahl. Die maximale Lyse der Zielzellen wurde durch die Zugabe von Triton®-X 100 ebenfalls im 3-fachen Ansatz bestimmt. Zunächst wurde die Zellzahl der Zielzellen bestimmt, die Zellen zentrifugiert und 1×10^6 Zellen in 200 μ l Medium resuspendiert. Dem Ansatz wurden 100 μ l ^{51}Cr zugegeben. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen im Brutschrank. Die Zellen wurden in warmem Medium 2 x gewaschen und bei 2100 U/min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 /ml Zellen in Medium resuspendiert und je 50 μ l in ein Loch einer 96-Lochplatte pipettiert, was 10^4 Zielzellen/Loch entsprach. Parallel zu diesen Arbeitsschritten wurde die Zellzahl der Effektorzellen bestimmt und diese entsprechend der verschiedenen Effektor:Ziel-Kombinationen in Medium aufgenommen. Je 50 μ l der verschieden konzentrierten Effektor-Suspensionen wurden auf die entsprechenden Löcher verteilt. Als Negativkontrolle wurden jeweils 50 μ l Medium anstelle der Effektorzellsuspension zugegeben. Zur Bestimmung der maximalen Lyse wurden je 50 μ l einer 1 %igen Triton®-X-100-Lösung des Detergenz Triton®-X-100 in die vorgesehenen Löcher pipettiert. Nach erfolgter Messung der Radioaktivität wurde die spezifische Lyse wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{Chromfreisetzung im Versuchsloch} - \text{spontane Chromfreisetzung}}{\text{maximale Chromfreisetzung} - \text{spontane Chromfreisetzung}}$$

Die Chromfreisetzungsversuche wurden freundlicherweise von Frau Dagmar Quant (Institut für Medizinische Immunologie, Halle) durchgeführt.

3.12. Durchflusszytometrie (nach Janossy *et al.*, 2004; Shapiro, 2003)

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst in PBS/1 % FKS gewaschen und 100 µl der Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen) für 15-30 min im Dunkeln bei 4 °C mit einem direkt markierten bzw. unmarkierten Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml PBS/1 % FKS gewaschen. Bei der Verwendung eines unmarkierten Erstantikörpers schloss sich eine weitere 15 - 30-minütige Inkubation der Zellen mit einem Fluorochrom-markierten Zweitantikörper bei 4 °C im Dunkeln an. Nach dem erfolgten Waschschrift in 2 ml PBS/1 % FKS wurden die Zellen in 200 - 300 µl PBS/1 % FKS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung der Zellen wurde an einem 3-Farb-Durchflusszytometer (Epics XL MCL, Beckman/Coulter, Krefeld) durchgeführt. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden 5.000 bis 10.000 Zellen gezählt. Zur Abgrenzung einer bestimmten Zellpopulation in gemischten Zellkulturen wurden die Zellen mit einem Antikörper markiert, der sich gegen ein Zelltyp-spezifisches Oberflächenmolekül richtet. Die Messdaten wurden in digitaler Form gespeichert und im Anschluss an die Messung mit speziellen Programmen (CellQuestPro und DIVA, Becton Dickinson) am Computer ausgewertet. Die Zellen wurden bezüglich der Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls entweder zweidimensional als Punkte im Dot Plot oder im Histogramm Plot dargestellt. Im Gegensatz zum Dot Plot wird beim Histogramm Plot die Anzahl und Stärke der fluoreszierenden Zellen als Kurve abgebildet. Für einen relativen Vergleich der Proteinexpression verschiedener Zellen wurden die ermittelten Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) graphisch dargestellt.

3.12.1. Messung der Proliferation von T-Zellen mittels CFDA-SE-Markierung

Bei dieser Methode werden die T-Zellen mit dem Farbstoff Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidyl Ester (CFDA-SE) markiert. Die Substanz ist zunächst farblos und diffundiert passiv in Zellen ein. Nach der Abspaltung der Acetatgruppen durch zytosolische Esterasen wird es zu fluoreszierendem Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt. Es kommt zur Bildung stabiler Konjugate der Succinimidyl Ester mit zytosolischen Aminen in

der Zelle. Im Falle einer Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzelle verteilt, was die Bestimmung der Anzahl an Generationen während der Zellteilung auf Einzelzellebene erlaubt. Im Vergleich zur Ursprungszellgeneration nimmt die CFSE-Färbung der Tochterzellgenerationen pro Zellteilung ab (Parish, 1999). Die Analyse sich teilender Zellen erfolgt mittels Durchflusszytometrie (3.12.). Das Prinzip dieser Methode ist am Beispiel einer Proliferationsmessung von T-Zellen in der Abbildung 3.1 dargestellt.

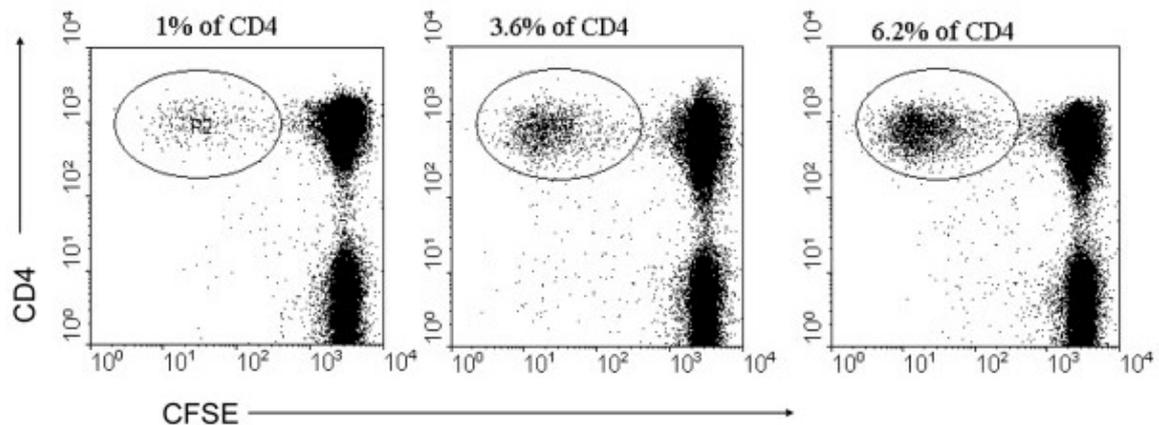


Abb. 3.1: T-Zell-Proliferation.

Gezeigt ist die Messung der Zellproliferation von peripheren Monozyten mittels Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)-Markierung. Der Dot Blot einer CFSE/CD4 Doppel-Markierung stellt die Zunahme der T-Zell Proliferation dar (verändert nach Warrington *et al.*, 2006).

Mit dieser Methode wurde die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen drei verschiedener Spender nach 5-tägiger Kokultur mit undifferenzierten und differenzierten Zellen der embryonalen Karzinomzelllinie H12.1 untersucht. Dazu wurden die H12.1 Zellen mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst (3.1.1.) und in X-Vivo Medium 1 x gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (3.3.) und 2×10^5 Zellen in eine 24-Loch-Platte in X-Vivo Medium mit 1 % humanen Serum ausgesät. Danach wurden die CD8⁺ T-Zellen der drei verschiedenen Spender rekultiviert (3.2.), 1 x in PBS/1 % FKS gewaschen und maximal 10^7 Zellen mit 5 μ M CFDA-SE für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 - 2 ml 100 % FKS zugegeben und die Proben fünf Sekunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml X-Vivo-Medium gewaschen und die Zellzahl bestimmt (3.3.). Danach wurden 2×10^5 CD8⁺ T-Zellen pro Spender in X-Vivo-Medium mit 1% FKS zu den bereits ausgesäten H12.1 Zellen gegeben. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen in Medium ohne weitere Zusätze. Die Positivkontrolle bestand aus T-Zellen, denen ein CD3-Antikörper (Klon OKT3) (1 μ g/ml) und Interleukin-2 (180 U/ml) zugesetzt wurde. Nach fünf Tagen wurden die nicht-adhärenenten T-Zellen aus der Zellkultur entnommen, 1 x in Medium und 1 x in PBS/1 % FKS gewaschen und mit den Antikörpern CD8 und CD25 für 10 min auf Eis in PBS/1 % FKS

inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (3.12.).

3.12.2. Messung der Interferon- γ Sekretion

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Cokultur von undifferenzierten und differenzierten embryonalen Karzinomzellen der Zelllinie H12.1 mit allogenen CD8⁺ T-Zellen zur IFN- γ Sekretion der Effektorzellen führt. Für die Cokultur wurden 1×10^5 undifferenzierte und differenzierte H12.1 Zellen sowie 1×10^5 T-Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät. Als Positivkontrolle wurden 2×10^5 T-Zellen pro Loch ausgesät und dem Medium (RPMI + 5 % humanes Serum + 1 % Penicillin/Streptomycin) 10 pg/ μ l Phorbol Myristat Acetat (PMA) sowie 10 pg/ μ l Ionomycin zugesetzt. Beide Substanzen stimulieren die Protein-Kinase C (PKC) und regen auf diese Weise die Zytokinproduktion, aber auch die Zellproliferation an (Mellor & Parker, 1998). Als Negativkontrollen wurden jeweils 2×10^5 T-Zellen bzw. 2×10^5 H12.1 Zellen im oben genannten Medium ohne Zusätze kultiviert. Alle Zellen wurden jeweils als Triplikate ausgesät. Nach 16 h wurde die 96-Loch-Patte bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend 110 μ l des Zellkulturüberstandes aus jedem Loch abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Überstände wurden für den IFN- γ ELISA (3.14.5.2.) verwendet. Die Bestimmung der IFN- γ -Sekretion erfolgte mittels IFN- γ Secretion Assay der Firma Miltenyi. Die T-Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren abgenommen. Restliche Zellen wurden durch Nachspülen mit kaltem Puffer (PBS, 1 % FKS, 2 mM EDTA) abgelöst und resuspendiert. Für die CD8-Durchflusszytometrie wurden 100 - 200 μ l der unstimulierten und stimulierten T-Zellen verwendet. Die restlichen Zellen wurden bei 1400 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 90 μ l kaltem Medium resuspendiert und 10 μ l IFN- γ catch reagent zugesetzt und gemixt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde 1 ml warmes Medium zugesetzt und die Proben für 45 min bei 37 °C rotierend inkubiert. Danach wurden die Proben kurz auf Eis inkubiert und in 2 ml kaltem Puffer bei 1400 rpm und 4 °C für 10 min gewaschen. Das Zellpellet wurde in 90 μ l kaltem Puffer resuspendiert, in Messröhrchen überführt und pro Probe 10 μ l FITC-markierter IFN- γ Detektionsantikörper und 5 μ l PE-markierter CD8 Antikörper zugesetzt. Anschließend wurden die Proben gemixt und für 10 min auf Eis inkubiert. Um tote Zellen bei der Durchflusszytometrie auszuschließen, wurde den Proben je 5 μ l der Substanz 7 Amino-Aktinomycin D (7AAD) zugesetzt. Die Untersuchung der IFN- γ Produktion durch CD8⁺ T-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei die CD8⁺ T-Zellen von den CD8⁻ H12.1 Zellen mittels CD8-Färbung abgegrenzt wurden.

3.12.3. Apoptose-Messung mittels Annexin V- und 7 Amino-Aktinomycin D-Färbung

Zur Untersuchung der NK-Zell-vermittelten Lyse von undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen wurde der Anteil lebender, apoptotischer und nekrotischer H12.1 Zellen nach der Inkubation dieser Zellen mit der NK-Zelllinie NK-92 im Effektor zu Target Verhältnis 1:10 nach 3 h durchflusszytometrisch analysiert. hierfür wurde das Zellgemisch (NK-92 und H12.1 Zellen) bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 100 - 500 µl Annexin V Binding Buffer resuspendiert und für 10 min bei 4 °C mit dem FITC konjugiertem Annexin V Antikörper und anschließend mit dem Farbstoff 7AAD inkubiert. Zur Abgrenzung der H12.1 Zellen (CD56⁻) von den NK-Zellen (CD56⁺) wurde das Zellgemisch zusätzlich mit einem APC-konjugiertem CD56 Antikörper gefärbt.

Die Annexin V/7AAD Doppelfärbung zur Bestimmung der Apoptose basiert auf folgendem Prinzip: Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose (dem "programmierten Zelltod") wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet sich an PS. Durch die Markierung von Zellen mit Annexin V-FITC erfolgt der Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V-FITC in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V-FITC apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden. Daher wird die Annexin V-FITC Markierung mit einer 7AAD-Färbung kombiniert. Der Farbstoff 7AAD dringt nur in Zellen ohne intakte Zellmembran, also in nekrotische bzw. tote Zellen ein. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und 7AAD-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und 7AAD-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und 7AAD-positiv. Annexin-negative und 7AAD-positive Zellen werden zu den vollkommen nekrotischen bzw. toten Zellen gezählt (Vermes *et al.*, 1995; Zelenin *et al.*, 1985)

3.13. Methoden der Molekularbiologie

3.13.1. Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von RNS aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem Komplettsystem Invisorb[®] Spin Cell RNS mini Kit nach den Herstellerangaben. Für die gleichzeitige Isolierung von RNS und DNS aus einem Zellpellet wurde das Komplettsystem Invisorb[®] TwinSpin Cell mini Kit verwendet. Die Integrität der RNS wurde gelelektrophoretisch überprüft. Die

Konzentration der isolierten Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (3.13.2.). Die Lagerung der RNS erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNS wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.13.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. In Mikroküvetten wurde die Konzentration der Nukleinsäuren in einem 1:69-Verhältniss in RNase-freiem Wasser gemessen. Die Konzentration von RNS bzw. doppelsträngiger (ds) DNS liegt bei einer Absorption (260 nm) von 1 bei $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ bzw. $50\text{ }\mu\text{g/ml}$. Unter Verwendung dieses Verhältnisses und des Verdünnungsfaktors kann die Konzentration der Nukleinsäuren nach folgender Gleichung berechnet werden (Sambrook *et al.*, 1989).

$$c = A_{260} \cdot VF \cdot K$$

[c - Konzentration der DNS-Lösung ($\mu\text{g/ml}$); A_{260} - Absorption bei 260 nm; VF – Verdünnungsfaktor; K - Konzentration RNS: $A_{260} = 1$ entspricht $40\text{ }\mu\text{g/ml}$; dsDNS: $A_{260} = 1$ entspricht $50\text{ }\mu\text{g/ml}$]

3.13.3. Hydrolyse der DNS mittels DNase I

Vor der cDNS-Synthese wurden DNS-Kontaminationen der RNS mittels Hydrolyse entfernt. Es wurde die DNase I der Firma New England BioLabs verwendet, wobei das vom Hersteller empfohlene Protokoll modifiziert wurde. In einem finalen Volumen von $30\text{ }\mu\text{l}$ wurden $2 - 3\text{ }\mu\text{g}$ RNS in 1x Reaktionspuffer mit 1 U DNase I für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde EDTA (Endkonzentration 5 mM) zugesetzt und die DNase I bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min hitzeinaktiviert. Der DNase I-Behandlung schloss sich eine photometrische Konzentrationsbestimmung (3.13.2.) und eine Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese (3.13.7) an. Zusätzlich wurde eine β -Aktin-PCR (3.13.5.) von den RNS-Proben durchgeführt, um eine DNS-Kontamination auszuschließen. Die RNS wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.13.4. Erststrang-cDNS-Synthese durch reverse Transkription

Die cDNS wurde von der DNase I-behandelten RNS mit Hilfe des RevertAid™ h minus First Strand cDNS Synthesis Kit synthetisiert. In einem finalen Volumen von $12\text{ }\mu\text{l}$ wurden $0,5\text{ }\mu\text{g}$ DNase I-verdaute RNS mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Random hexamer Primer versetzt, mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und für 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, was ein Binden der Primer an die MATrize ermöglichte. Im folgenden Schritt wurden Reaktionspuffer (einfache

Endkonzentration), 20 Units RiboLock™ Ribonuclease-Inhibitor, 40 Units RevertAid™ h minus M-MuLV-Reverse Transkriptase sowie 20 µmol dNTPs zugegeben und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Enzyme in einem abschließenden Schritt (10 min, 70 °C) hitzeinaktiviert. Die Qualität der synthetisierten cDNS wurde mittels β-Aktin-PCR (3.13.5.) überprüft. Die cDNS wurde bei 4 °C gelagert.

3.13.5. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzabschnitten mit einer Länge zwischen 0,1 und 40 kB aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki *et al.*, 1988). Es wurde die Taq-DNS-Polymerase eingesetzt, welche den Einbau von 2000 bis 6000 neuer Basen pro Minute in die DNS katalysiert (Wittwer *et al.*, 1991). Die Bedingungen der Reaktionen für die Taq-DNS-Polymerase sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt, wobei die PCR-Protokolle in Abhängigkeit von den eingesetzten Primern und dem zu amplifizierenden Transkript variieren.

Tab. 3.1: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Taq-DNS-Polymerase

Komponente	Volumen/25 µl-Reaktion [µl]	Endkonzentration
10x Taq-PCR-Puffer (-MgCl ₂)	2,5	1x
10 mM dNTPs	0,5	je 0,2 mM
50 mM MgCl ₂	0,75	1,5 mM
50 pM Primer FW	0,25	0,5 pM
50 pM Primer REV	0,25	0,5 pM
Ausgangs-cDNS	1	
Taq-DNS-Polymerase (5 U/µl)	0,25	1,25 Units
Nuklease-freies Wasser	add 25	

Tab. 3.2: Protokoll der PCR-Bedingungen für die Taq-DNS-Polymerase

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Zyklische Denaturierung	95 °C	30 sec	} 30-40
Annealing	58 °C/60 °C	30 sec	
Zyklische Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
	4 °C	∞	

3.13.6. „Echt-Zeit“-quantitative-PCR

Mit Hilfe der „Echt-Zeit“-PCR können Nukleinsäuren nach dem Prinzip der herkömmlichen PCR vervielfältigt werden. Zusätzlich ermöglicht die Methode eine Quantifizierung der gewonnenen DNS in „Echt-Zeit“ durch die Messung der Fluoreszenz am Ende der Elongation in jedem Zyklus. Die Anlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in die kleine Furche der doppelsträngigen DNS führt zum Fluoreszenzanstieg. Der freie Fluoreszenzfarbstoff hingegen besitzt eine sehr schwache Fluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des interkalierenden DNS-Farbstoffes SYBR Green I quantifiziert. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende der Reaktion wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Der Beginn der exponentiellen Phase ist durch den sogenannten „take-off“-Punkt gekennzeichnet. Dieser Punkt ist nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen erreicht, wenn die gemessene Fluoreszenz 20 % der maximalen Fluoreszenz beträgt. Das Ende der exponentiellen Phase ist erreicht, wenn die Fluoreszenz maximal ist (100 %). Eine korrekte Quantifizierung der gewonnenen DNS-Menge ist nur innerhalb dieser Phase möglich, da während der Zeit die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Template-Menge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass Template, Primer und Polymerase miteinander reagieren, suboptimal. In der dritten Phase der Amplifikation steigt die Menge der Produkte (DNS, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotid) derart an, dass es zur Hemmung durch diese kommt. Produktfragmente hybridisieren häufiger miteinander, Substrate werden langsam verbraucht und letztendlich kommt es zur Zerstörung der Polymerasen und Nucleotide durch Hitze. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Nach abgelaufener PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung denaturiert der Doppelstrang bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur. Dabei wird das SYBR Green freigesetzt und es kommt zur Abnahme der Fluoreszenz. Da die doppelsträngige DNS von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich (Pfaffl, 2004). Die Bedingungen der „Echt-Zeit“-PCR sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Bedingungen für die „Echt-Zeit“-PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Halten der Temperatur	50 °C	2 min	
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Zyklische Denaturierung	95 °C	15 sec	} 40
Annealing	60 °C	30 sec	
Schmelzschritte	60-99 °C		
	4 °C	∞	

Um einen relativen Mengenvergleich verschiedener Proben durchzuführen, wurden Referenzgene gemessen. Dabei handelt es sich um Gene, deren Expression nahezu gleichbleibend ist, z.B. β -Aktin, GAPDH und 18SrRNS. Die relativen Konzentrationen der jeweiligen PCR-Produkte wurden mittels interner PC-Software (Rotorgene 2000) ermittelt und anschließend auf die Expression eines konstanten Referenzgens bzw. auf den Mittelwert verschiedener Referenzgene bezogen und grafisch als relative mRNS-Expression dargestellt. Der Berechnung der relativen Konzentration der PCR-Produkte mittels interner PC-Software lag folgendes mathematisches Prinzip zugrunde:

$$\text{Comparative Konzentration (PCR-Produkt)} = E^{dC}$$

[E - PCR-Effizienz; dC - Zykluszahl am „take-off“-Punkt (Probe - Kontrolle)]

3.13.7. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für den Nachweis und die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren sowie für die Gelextraktion wurde die Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese angewendet. Es wurde für 45 min 5 V pro 1 cm Länge der Gelkammer angelegt. Für die Detektion wurde dem Gel Ethidiumbromid (Endkonzentration 4 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt, welches in Nukleinsäuren interkaliert. Der Ethidiumbromid-DNS-Komplex fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. Als Laufpuffer wurde 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 10-fach konzentriertem Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein 100 Bp- oder 1 kBp-Marker eingesetzt. Vor der Auftrennung von RNS wurden Gelkammer, -träger und -kamm für 30 min mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid behandelt, was RNase-Kontaminationen vermeiden sollte.

3.13.8. Aufreinigung von DNS-Fragmenten

Nach enzymatischen Reaktionen war es notwendig die DNS für weitere Schritte aufzureinigen und/oder die Nukleinsäuren aufzukonzentrieren. Für die Aufreinigung von DNS-Fragmenten wurde das QIAquick Gel Extraction Kit bzw. das QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den vorgegebenen Herstellerprotokollen für die Mikrozentrifuge verwendet. Die aufgereinigte DNS wurde gelelektrophoretisch und bildtechnisch dokumentiert (3.13.7.) und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (3.13.2.) bei -20 °C gelagert.

3.13.9. Untersuchung des Methylierungsstatus von DNS

Methylierungen der DNS sind häufig innerhalb sogenannter CpG Inseln zu finden (Christman *et al.*, 2002). Von den aufeinanderfolgenden Basen kann das Cytosin methyliert sein. Mit Hilfe des Programms „MethPrimer“ (<http://www.urogene.org/methprimer/>) wurde die Promotorregion des untersuchten Gens auf CpG-Inseln analysiert und Primer für die Amplifikation von Sequenzbereichen der Inseln generiert. Die DNS wurde aus den Zellen isoliert (3.13.1.). Anschließend erfolgte eine Bisulfit-Behandlung der DNS mit Hilfe des EpiTect[®] Bisulfite Kit der Firma QIAGEN. Die Inkubation der Ziel-DNS mit Natrium-Bisulfit bewirkt eine Konvertierung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil, wobei methylierte Cytosine nicht verändert werden. Daher hat eine Bisulfit-Behandlung verschiedene DNS-Sequenzen zur Folge, die spezifisch für methylierte bzw. nicht-methylierte DNS sind (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Sequenzen methylierter und nicht-methylierter DNS vor und nach Bisulfit-Behandlung.

	original Sequenz	nach der Bisulfit-Behandlung
nicht-methylierte DNS	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
methylierte DNS	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N

N - Adenin, Thymin oder Cytosin, C - Cytosin, G - Guanin

Ein wichtiger Schritt in der korrekten Analyse des Methylierungsmusters ist die komplette Konversion von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil. Dies wird durch die Inkubation der DNS in einer hohen Bisulfit-Salz-Konzentration bei hohen Temperaturen und geringem pH-Wert erreicht. Diese Bedingungen führen jedoch zu einer hohen DNS-Fragmentierung und DNS-Verlust während der Aufreinigung. Eine Aufreinigung ist jedoch notwendig, um Bisulfit-Salze und weitere Chemikalien, die für den Konvertierungs-Prozess benötigt werden, zu entfernen. Eine Verunreinigung der DNS mit diesen Substanzen würde eine Sequenzierung

erheblich stören. Mit Hilfe des DNS-protect buffer wird der Abbau der DNS während der Konvertierung verhindert. Die Bisulfit-Reaktion wurde entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Danach erfolgte die Konversion unter den in Tab. 3.5 dargestellten Bedingungen. Anschließend wurde die DNS in einer „nested“ PCR amplifiziert, wobei die vom Programm „MethPrimer“ generierten Primer zum Einsatz kamen. Bei der nested PCR handelt es sich um zwei PCR-Reaktionen. Die erste PCR erfolgte unter dem Einsatz von zwei „äußeren“ Primern. In der zweiten PCR-Reaktion wurden 5 µl der ersten PCR eingesetzt und mit dem Primerpaar amplifiziert, welches innerhalb des ersten PCR-Produktes bindet. Die gereinigten PCR-Produkte wurden entweder sequenziert und der Methylierungsstatus anhand der Sequenzen ausgewertet (Bisulfit-Sequenzierung) oder mit Hilfe der „combined bisulfite restriction analysis“ (COBRA) analysiert. Beim Verwenden der COBRA wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym BstUI inkubiert, welches in seiner Erkennungssequenz ein CpG trägt. Somit wurde die DNS nur dann gespalten, wenn das Cytosin des CpGs methyliert vorlag und damit nach der Bisulfit-Reaktion als Cytosin erhalten geblieben war. Die Spaltung der DNS wurde gelelektrophoretisch analysiert.

Tab. 3.5: Protokoll der PCR-Bedingungen für die Bisulfit-Reaktion

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	25 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	85 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	175 min
Finaler Temperaturhalteschritt	20 °C	10 min

3.13.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried) durchgeführt. Dafür wurden mindestens 30 ng gereinigte DNS pro 100 Bp PCR-Produkt in 20 µl 5 mM Tris hCl (pH 8-9) sowie 10 µl des dazugehörigen Primers mit einer Konzentration von 10 pmol/µl eingeschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Hilfe des Programms „Scientific and Educational Software“ [SEcentral, Cary (USA)] mit den in der NCBI-Datenbank eingetragenen Gensequenzen verglichen und ausgewertet.

3.14. Methoden der Proteinbiochemie

3.14.1. Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden nach Trypsinierung (3.1.1.) einmal mit PBS gewaschen (5 min, 400 x g), und als Zellpellet bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und in je 200 - 500 µl 1 x SDS-Probenpuffer + 5 Units Benzonase lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (30 min, 13.000 rpm, 4 °C). Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt (3.14.2.) und bei -20 °C gelagert.

3.14.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bicinchonininsäure (BCA)-Test (Pierce® BCA Protein Assay Kit) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. In alkalischer Lösung bilden Proteine mit Cu^{2+} -Ionen Komplexe (Biuret-Reaktion), wodurch die Ionen zu Cu^+ reduziert werden und daraufhin in der Lage sind, mit der Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex zu bilden. Die Intensität der Färbung ist somit von der Menge an enthaltenem Protein abhängig. Die Absorption bei 562 nm durch die Bildung des Chelatkomplexes aus zwei BCA-Molekülen und einem Cu^+ -Ion (Smith *et al.*, 1987; Wiechelmann *et al.*, 1988) wird photometrisch gemessen.

3.14.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinlösungen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach im elektrischen Feld in einem 10 - 12 %igen Trenngel mit 5 %igen Sammelgel (Lämmli, 1970) aufgetrennt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden mit 1 x SDS-Probenpuffer, sowie mit 0,1 M β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 0,01 M) versetzt und erhitzt (5 min, 95 °C). Zur Abschätzung der Proteingröße im Gel wurde ein Längenstandard mitgeführt. Für die Auftrennung im Sammelgel wurde eine Spannung von 70 - 80 V angelegt, die beim Eintreten der Proben in das Trenngel auf 100 - 120 V erhöht wurde.

3.14.4. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Tank-Blot-Verfahren bei 100 mA über Nacht auf eine Nitrozellulosemembran, die diese aufgrund hydrophober

Wechselwirkungen bindet, transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Proteintransfer auf die Membran wurde mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran mit Aqua dest. gespült und für 2 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Das überschüssige Ponceau S wurde mit Aqua dest. ausgewaschen bis die einzelnen Proteinspuren sichtbar wurden.

3.14.5. Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion

Die Immundetektion ist ein Epitop-spezifischer Nachweis, der sowohl im Western Blot als auch im „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) angewandt wird.

3.14.5.1. Immunoblot-Technik (Western Blot)

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (3.14.4.) wurde diese 3 x 5 min in 10 ml TBST-Puffer gewaschen und für 1 - 2 h mit Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurde die Nitrozellulosemembran für 2 - 4 h bei Raumtemperatur oder Ü.N. bei 4 °C in Primärantikörper-Lösung eingelegt. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die Membran zur Detektion des primären Antikörpers 1 - 3 h in Sekundärantikörper-Lösung eingelegt und abschließend dreimal in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“, HRP) konjugiert. Die Färbung wurde mittels ECL Western Blot-Substrate entsprechend des Herstellerprotokolls nachgewiesen und mit der Fluoreszenz-Kamera fotografiert.

3.14.5.2. „Enzyme-linked immunosorbent assay“

Der ELISA wurde verwendet, um die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch undifferenzierte und differenzierte Zellen der embryonalen Karzinomzelllinie H12.1 zu untersuchen. Aktivierte T-Zellen produzieren u. a. IFN- γ , welches in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und im ELISA detektiert werden kann. Zunächst wurden, wie unter 3.12.2. beschrieben, Cokulturen der Target- und Effektorzellen angefertigt. Nach 16 h wurden die 96-Loch-Platten zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, 4 °C) und 100 - 300 μ l der Kulturüberstände abgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation der Überstände und Überführung dieser in neue Reaktionsgefäße wurden restliche Zellen entfernt. Die Zellkulturüberstände wurden bei -80 °C gelagert. Zur Quantifizierung der in den Zellkulturüberständen vorhandenen IFN- γ -Menge wurde der OptEIATM human IFN- γ ELISA Kit II nach den Herstellerangaben der Firma Becton Dickinson verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse des immunregulatorischen Potentials von MSC

Zur Charakterisierung des immunregulatorischen Potentials von MSC wurde die Expression und zum Teil die funktionelle Bedeutung folgender immunmodulatorischer Moleküle in immortalisierten und primären MSC untersucht: (i) die Komponenten der MHC-Klasse-I APM, (ii) die Moleküle B7-H1 - H4 und (iii) das nicht-klassische MHC-Klasse-I Molekül HLA-G.

4.1.1. Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in MSC von kranken und gesunden Spendern

Zunächst wurde die mRNA- und Proteinexpression der schweren Kette (HC) und der leichten Kette (β_2 -Mikroglobulin) des MHC-Klasse-I Moleküls in MSC mittels „Echt-Zeit“-PCR und Western Blot untersucht. Dafür standen primäre MSC von zwei gesunden Spendern (D17 und D39, Tab. 2.3), elf primäre MSC von kranken Spendern (MSCP91 - D83, Tab. 2.3) sowie zwei immortalisierte MSC (L87 und V54-2, Tab. 2.2) zur Verfügung.

In allen 15 MSC wurde eine heterogene mRNA-Expression von HC und β_2 -Mikroglobulin detektiert (Abb. 4.1). Im Vergleich zu den primären MSC zeichneten sich die beiden immortalisierten MSC L87 und V54-2 durch eine gleichmäßig starke Proteinexpression der beiden Moleküle aus. Die MSC der beiden gesunden Spender D17 und D39 zeigten ebenfalls keine Unterschiede in der Proteinexpression von HC und β_2 -Mikroglobulin. Die Expression der beiden Proteine in den MSC der gesunden Spender D17 und D39 war jedoch schwächer als in den immortalisierten MSC L87 und V54-2. Im Gegensatz zu den immortalisierten MSC und den MSC der gesunden Spender wurde in den MSC der elf kranken Spender eine sehr heterogene Proteinexpression der beiden Moleküle detektiert.

Bezogen auf die mRNA- und Proteinexpression von HC und β_2 -Mikroglobulin in MSC gesunder Spender (D17 und D39), ergab sich in einigen Fällen eine nicht-koordinierte mRNA-/Proteinexpression. So wurde im Vergleich zu den MSC der gesunden Spender D17 und D39 in den MSC der kranken Spender D2 und D53 eine geringere mRNA-Expression, jedoch eine stärkere Proteinexpression von HC gemessen. Die MSC der kranken Spender D38 und D53 wiesen eine nicht-koordinierte mRNA- und Proteinexpression von β_2 -MG im Vergleich zu den MSC der gesunden Spender D17 und D39 auf. Es wurde eine koordinierte mRNA-Expression von HC und β_2 -Mikroglobulin gemessen, d.h. Zellen welche die HC stärker bzw. schwächer exprimierten, zeigten auch eine starke bzw. schwache mRNA-

Expression von β_2 -Mikroglobulin. Während L87 und V54-2 sowie die primären MSC D38, D53 und D77 eine relativ hohe HC- und β_2 -MG-Proteinexpression aufwiesen, konnte in D24, D25 und D55 nur eine relativ geringe Proteinexpression beider Moleküle detektiert werden. Weiterhin exprimierten manche Zellen relativ viel HC und wenig β_2 -MG auf Proteinebene, wie z.B. D2, D17 und D26. Generell war jedoch in allen mittel bis stark HC-exprimierenden Zellen eine starke Proteinexpression von β_2 -MG zu sehen.

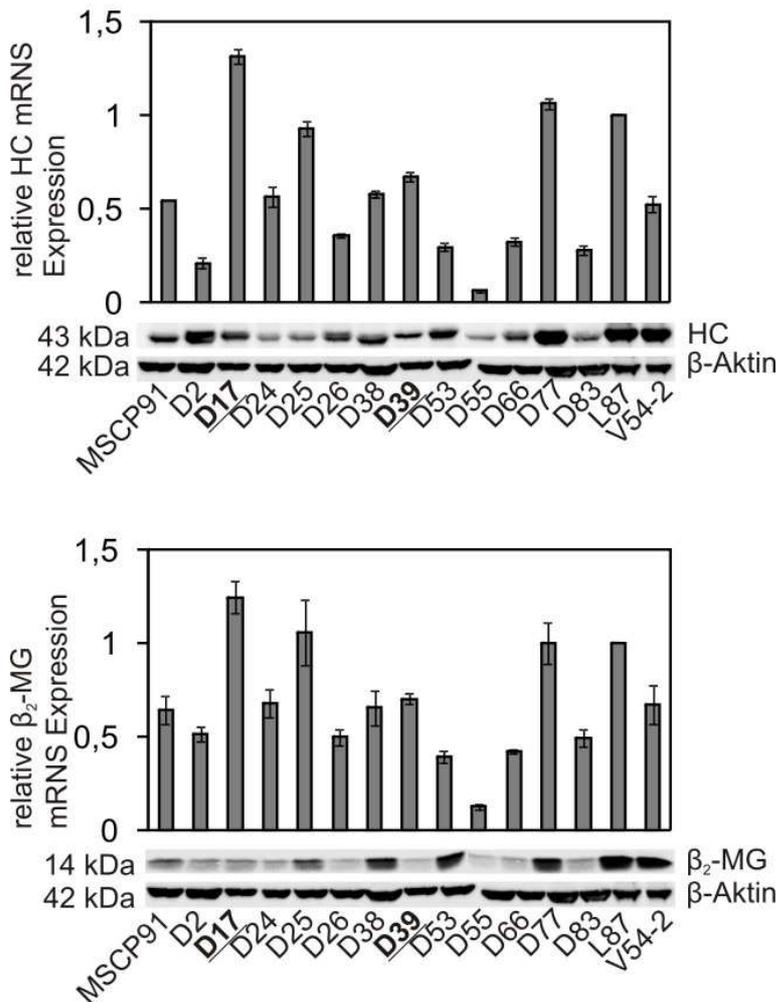


Abb. 4.1: Expression der schweren und leichten Kette des MHC-Klasse-I Moleküls in primären und immortalisierten MSC.

Grafisch dargestellt ist die relative mRNA-Expression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) (oben) und der leichten Kette des MHC-Klasse-I Moleküls β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG) (unten) der primären (MSC91 - D83) und der immortalisierten MSC L87 und V54-2. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Die korrespondierende Proteinexpression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) und β_2 -MG sowie des Standardproteins β -Aktin ist unter der jeweiligen „Echt-Zeit“-PCR Grafik im Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Experimenten gezeigt. MSC gesunder Spenders sind unterstrichen und fett gekennzeichnet.

Die Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberfläche von MSC wurde durchflusszytometrisch gemessen. Exemplarisch ist in Abbildung 4.2 die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression von MSC eines gesunden Spenders (D17), eines kranken Spenders (D38) sowie von immortalisierten MSC (L87) zu sehen. Bezogen auf die Isotypkontrollen (IK) wurden für die beiden gesunden MSC

folgende MFI für MHC-Klasse-I gemessen: D17 (MFI = $38 \pm 3,5$) und D39 (MFI = $27,8 \pm 2,8$). Die MFI-Werte (MHC-Klasse-I/IK) der MSC kranker Spender ergaben einen Mittelwert von 31 ± 4 , $n = 4$ und lagen somit im Bereich der MHC-Klasse-I-Expression der gesunden Spender. Die immortalisierten MSC wiesen eine MFI (MHC-Klasse-I/IK) von $23 \pm 1,2$ (L87) und $11,4 \pm 2,3$ (V54-2) auf. Die im Vergleich zu den primären MSC erhöhte β_2 -MG- und HC-Proteinexpression der immortalisierten MSC L87 und V54-2 führte somit nicht zu einer verstärkten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche.

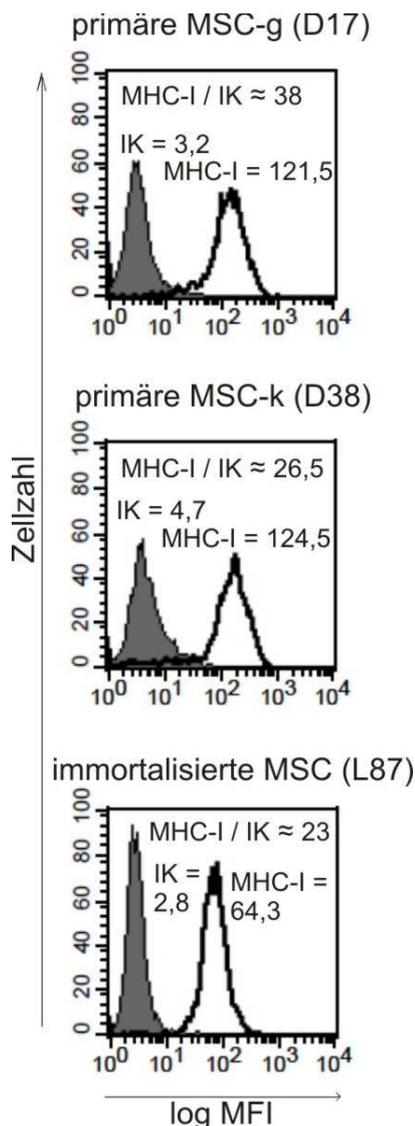


Abb. 4.2: Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberflächen von primären und immortalisierten MSC.

Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der unspezifischen Phycoerythrin (PE)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des spezifischen PE-konjugierten Antikörpers gegen MHC-Klasse-I (weiß) von primären MSC des gesunden Spenders (g) D17 (oben), des kranken Spenders (k) D38 (mitte) und der immortalisierten MSC L87 (unten). Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von MHC-I und IK sowie deren Quotient sind im Histogramm angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Messungen gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Die mRNA- und Proteinexpression der Komponenten der MHC-Klasse-I APM TAP1, TAP2 und Tapasin wurde in den MSC mittels „Echt-Zeit“-PCR und Western Blot analysiert. TAP1, TAP2 und Tapasin wurden von den primären MSC auf mRNA-Ebene schwach exprimiert, wohingegen in den immortalisierten MSC L87 und V54-2 eine starke mRNA-Expression dieser Moleküle detektiert wurde (Abb. 4.3). Auch auf Proteinebene wiesen die

immortalisierten MSC eine stärkere Proteinexpression von TAP1 und TAP2 im Vergleich zu den primären MSC auf. Im Vergleich zu den MSC der beiden gesunden Spender D17 und D39 wurde in den primären MSC der elf kranken Spender eine heterogene Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin detektiert. Während die Proteinexpression von TAP1 und TAP2 in einigen MSC kranker Spender (z.B. in MSCP91, D24, D25, D26, D55 und D66) mit der Proteinexpression dieser Moleküle in den MSC der gesunden Spender D17 und D39 vergleichbar war, so wurde in den MSC der kranken Spender D38, D53 und D77 eine vergleichsweise starke Proteinexpression von TAP1 und TAP2 detektiert. Die Proteinexpression von Tapasin verhielt sich ebenfalls heterogen. Die MSC-Linien L87 und V54-2 sowie die primären MSC der kranken Spender D2, D38, D77 und D83 wiesen eine relativ starke Tapasin-Proteinexpression auf. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die MSC der übrigen kranken und gesunden Spender durch eine marginale Proteinexpression dieses Moleküls aus.

In den meisten Fällen wurde eine koordinierte Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin detektiert. So wurde in den immortalisierten MSC L87 und V54-2 als auch in den primären MSC der kranken Spender D38, D53 und D77 eine relativ starke Proteinexpression dieser Moleküle gemessen, während beispielsweise die MSC der kranken Spender MSCP91, D24, D25 und D26 sowie die MSC der gesunden Spender D17 und D39 eine schwache Proteinexpression dieser Moleküle zeigten.

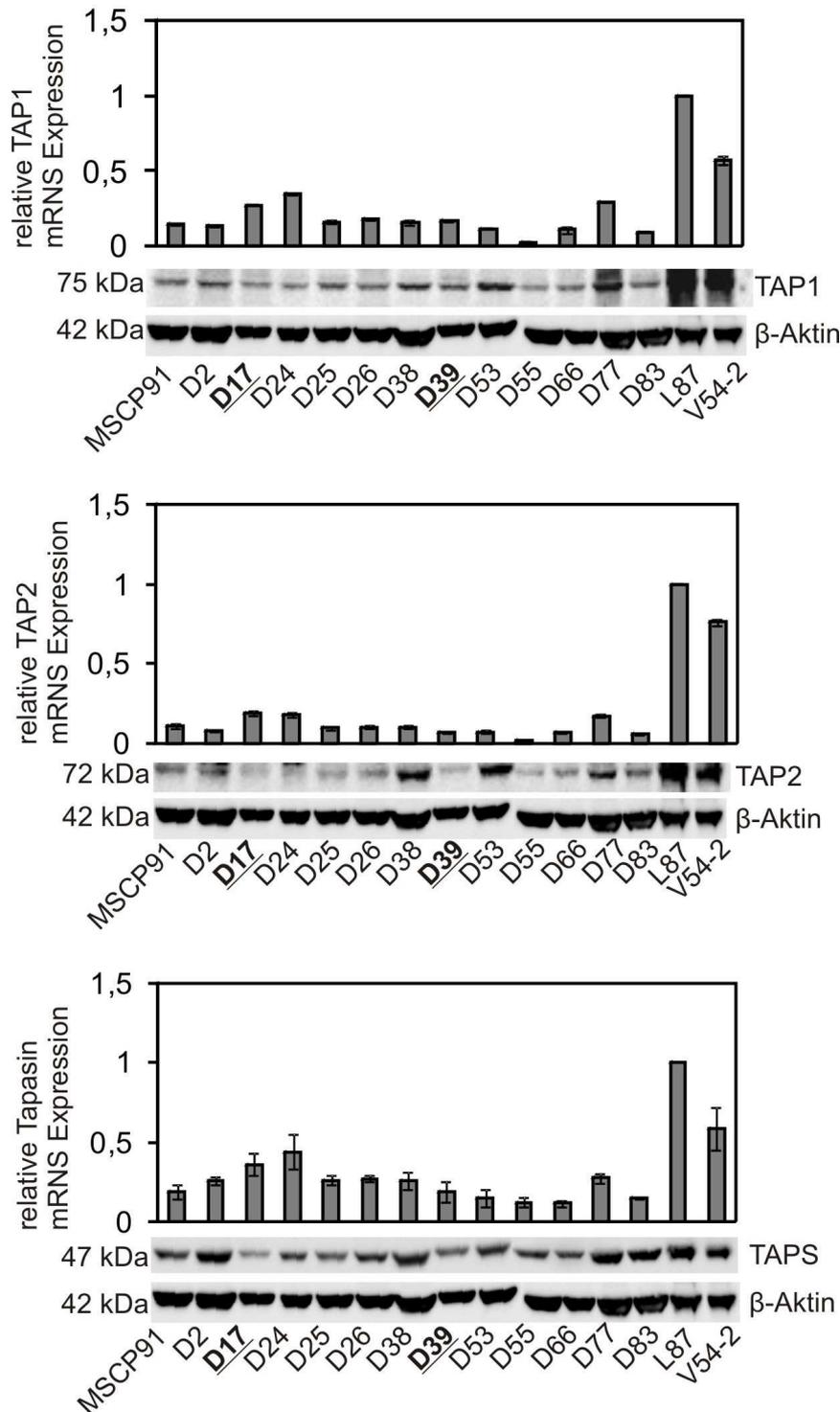


Abb. 4.3: Expression von TAP1, TAP2 und Tapasin in primären und immortalisierten MSC.

Grafisch dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TAP1 (oben), TAP2 (mitte) und Tapasin (unten) der primären (MSCP91 - D83) und der immortalisierten MSC L87 und V54-2 auf mRNA-Ebene. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Die korrespondierende Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin (TAPS) sowie des Standardproteins β -Aktin ist unter der jeweiligen „Echt-Zeit“-PCR Grafik im Western Blot dargestellt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Experimenten gezeigt. MSC gesunder Spender sind unterstrichen und fett gekennzeichnet.

Interessanterweise zeichneten sich die primären MSC der elf Spender mit malignen Erkrankungen bzw. einer Infektion des Knochenmarks durch eine sehr heterogene Proteinexpression der MHC-Klasse-I APM Komponenten aus. Hingegen war das Proteinexpressionslevel dieser Moleküle innerhalb der beiden immortalisierten MSC-Linien sowie in den primären MSC der zwei gesunden Spender annähernd gleich. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass sich primäre MSC kranker Spender generell durch eine heterogene Expression der MHC-Klasse-I APM Moleküle von primären MSC gesunder Spender unterscheiden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Expression der genannten Moleküle in fünf weiteren primären MSC gesunder Spender (MSC 105 - MSC 126, Tab. 2.3) untersucht. Um vergleichende Aussagen treffen zu können, wurden die immortalisierten MSC L87 und V54-2 als Kontrollen mitgeführt.

Im Gegensatz zu den MSC kranker Spender wurde in den primären MSC der gesunden Personen MSC 105 - MSC 126 sowohl für HC als auch für β_2 -MG eine relativ homogene mRNS- und Proteinexpression detektiert (Abb. 4.4). Die MSC 105 - 126 wiesen eine nahezu gleich starke Proteinexpression wie L87 und V54-2 auf. Da die MSC der Spender MSC 105 – MSC 126 als Zellpellets zur Verfügung standen, konnte die Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Oberfläche dieser Zellen nicht untersucht werden.

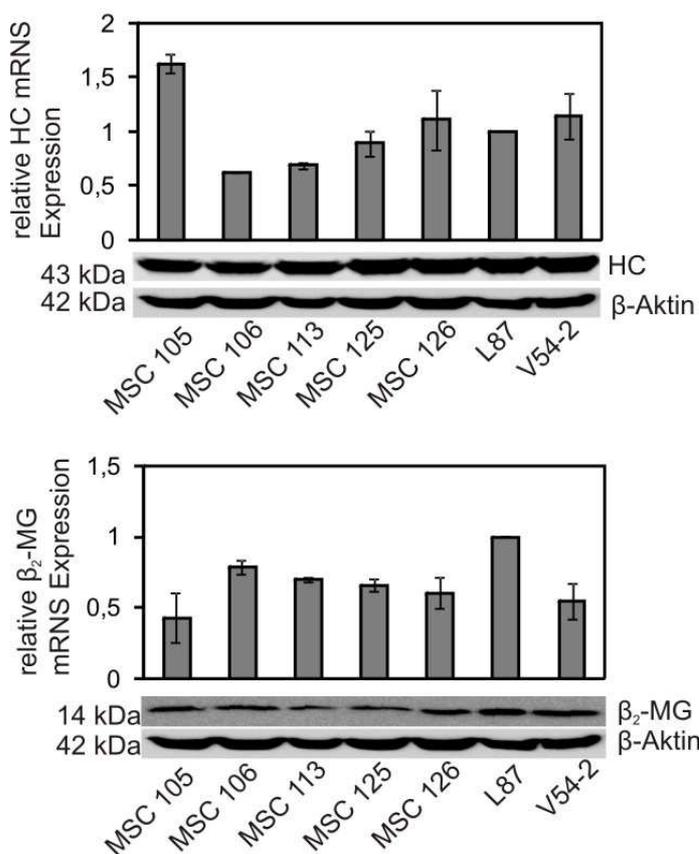


Abb. 4.4: Expression der schweren und leichten Kette des MHC-Klasse-I Moleküls in primären MSC gesunder Spender sowie in immortalisierten MSC. Grafisch dargestellt ist relative mRNS-Expression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) (oben) und der leichten Kette des MHC-Klasse-I Moleküls β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG) (unten) der primären MSC gesunder Spender (MSC 105 - 126) sowie der immortalisierten MSC (L87 und V54-2). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Die korrespondierende Proteinexpression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) und β_2 -MG sowie des Standardproteins β -Aktin ist unter der jeweiligen „Echt-Zeit“-PCR Grafik im Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Experimenten gezeigt.

Auch TAP1 wurde von den primären MSC der fünf gesunden Spender MSC 105 - MSC 126 im Vergleich zu den primären MSC der kranken Spender sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene relativ homogen exprimiert (Abb. 4.5). Das mRNA-Expressionsniveau von TAP2 der primären MSC gesunder Spender ähnelte dem mRNA-Expressionsniveau dieses Moleküls in primären MSC kranker Spender: die immortalisierten MSC L87 und V54-2 zeichneten sich durch eine relativ starke mRNA-Expression von den primären MSC der gesunden Spender MSC 105 - 106 ab. Auf Proteinebene wurde wiederum eine im Vergleich zu den primären MSC der kranken Spender relativ homogene TAP2 Expression detektiert. Tapasin wurde im Gegensatz zu den primären MSC der kranken Spender auf mRNA-Ebene relativ homogen exprimiert, d.h. für die primären MSC gesunder Spender und für die immortalisierten MSC L87 und V54-2 konnte ein ähnliches Expressionslevel gemessen werden. Während in den MSC kranker Spender eine heterogene Proteinexpression von Tapasin nachgewiesen wurde, so konnte in den MSC der gesunden Spender MSC 105 - MSC 126 nur eine, im Vergleich zu den immortalisierten MSC L87 und V54-2, marginale Proteinexpression dieses Moleküls detektiert werden.

Zusammenfassend konnte in MSC kranker Spender eine sehr heterogene Expression von MHC-Klasse-I APM Molekülen detektiert werden, während sich die MSC gesunder Spender durch eine relativ homogene Expression dieser Komponenten auszeichneten. Somit bestätigen die Expressionsstudien von MHC-Klasse-I APM Molekülen in primären MSC der gesunden Spender MSC 105 - MSC 126 die oben genannte Hypothese. Demnach scheinen sich MSC gesunder und kranker Spender sehr stark in ihrer Immunogenität zu unterscheiden.

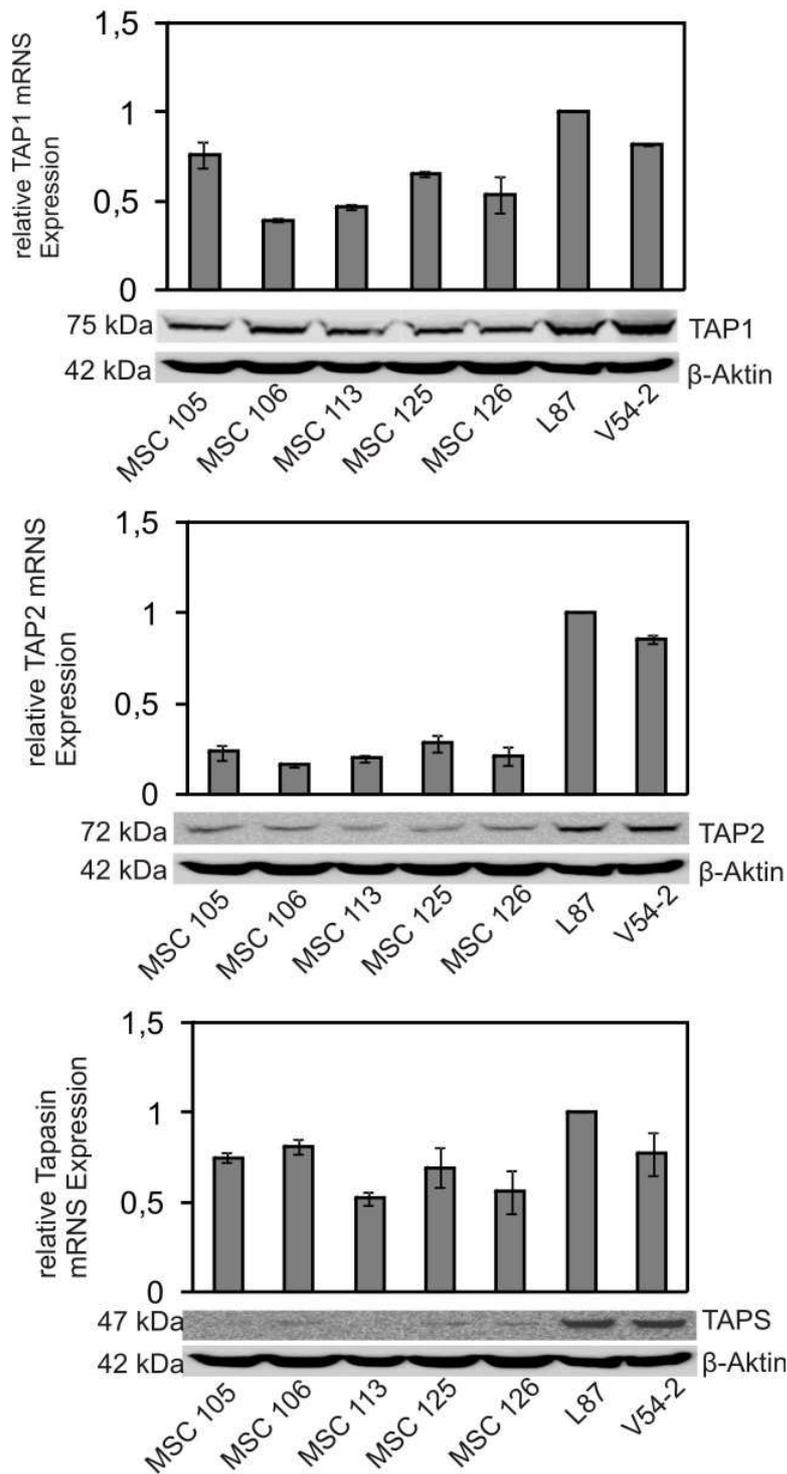


Abb. 4.5: Expression von TAP1, TAP2 und Tapasin in primären MSC gesunder Spender und in immortalisierten MSC.

Grafisch dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TAP1 (oben), TAP2 (mitte) und Tapasin (unten) der primären MSC gesunder Spender (MSC 105 - 126) und der immortalisierten MSC L87 und V54-2 auf mRNA-Ebene. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Die korrespondierende Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin (TAPS) sowie des Standardproteins β -Aktin ist unter der jeweiligen „Echt-Zeit“-PCR Grafik im Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Experimenten gezeigt.

4.1.2. Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in undifferenzierten und differenzierten MSC

Es sollte untersucht werden in wie weit sich die Proteinexpression der APM-Moleküle nach der Differenzierung von primären MSC verändert. Dafür wurden 13 primäre MSC (MSCP91 - D83, Tab. 2.3) in adipogene und osteogene Richtung differenziert (3.4.1.).

Bei den MSC D39, D77 und D83 wurde nach einer ein- bis zweiwöchigen Inkubation in adipogenem bzw. osteogenem Differenzierungsmedium ein Ablösen vom Flaschenboden beobachtet. Die primären MSC von zehn Spendern (MSCP91, D2, D17, D24, D25, D26, D38, D53, D55 und D66) konnten erfolgreich differenziert werden. Die osteogene Differenzierung dieser MSC konnte durch die Proteinexpression des Osteogenesemarkers alkalische Phosphatase (AP) im Western Blot gezeigt werden. Eine Differenzierung der MSC in Adipozyten wurde anhand der Proteinexpression des Adipogenesemarkers „adipocyte fatty acid binding protein“ (AFABP) nachgewiesen (Abb. 4.6). In den adipogen differenzierten Zellen wurde auch die Proteinexpression der AP detektiert.

Während die undifferenzierten MSC eine spindelförmige Zellmorphologie aufwiesen, konnte in osteogen differenzierten MSC eine Veränderung der Zellmorphologie und in adipogen differenzierten MSC die Bildung von Lipidtröpfchen beobachtet werden (Abb. 4.6.).

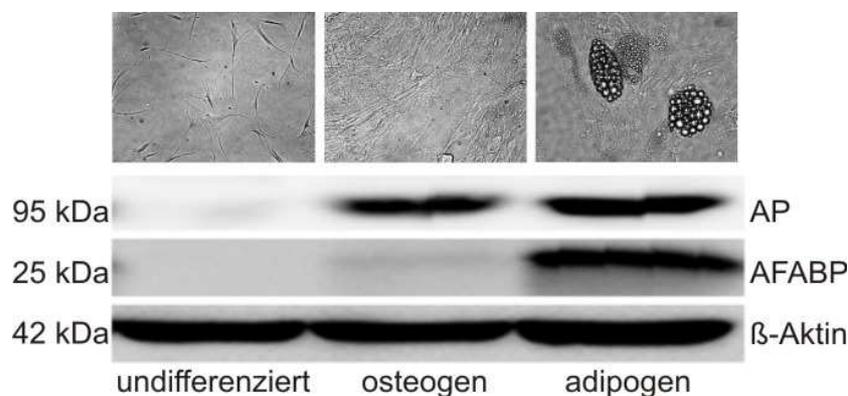


Abb. 4.6: Differenzierung von primären MSC.

Die primären MSC von zehn Spendern (MSCP91, D2, D17, D24, D25, D26, D38, D53, D55 und D66) wurden nach einer 3- bis 4-wöchigen Inkubation in osteogenem bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (2.8.4.1.) hinsichtlich ihrer Zellmorphologie und Proteinexpression von Differenzierungsmarkern lichtmikroskopisch und mittels Western Blot analysiert. Oben: Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von undifferenzierten (Vergrößerung: 100-fach), osteogen (Vergrößerung: 200-fach) und adipogen (Vergrößerung: 630-fach) differenzierten primären MSC. Unten: Proteinexpression des Osteogenese-Markers Alkalische Phosphatase (AP), des Adipogenese-Markers adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) sowie des Standardproteins β-Aktin in undifferenzierten, osteogen und adipogen differenzierten MSC. Es wurden 30 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von zehn unabhängigen Versuchen.

Die Proteinexpression wichtiger APM-Komponenten wurde in den primären MSC der oben genannten zehn Spender im undifferenzierten Zustand bzw. nach osteogener und adipogener Differenzierung mittels Western Blot analysiert.

Im Vergleich zu ihrem undifferenzierten Zustand wiesen die MSC mancher Spender eine erhöhte, konstante oder verringerte Expression der MHC-Klasse-I APM Komponenten nach osteogener und/oder adipogener Differenzierung auf. In der Abbildung 4.7 ist jeweils ein exemplarisches Beispiel einer erhöhten, konstanten und verringerten Expression des jeweiligen Moleküls dargestellt. Die Mehrheit der differenzierten MSC zeichnete sich durch eine erhöhte Expression der MHC-Klasse-I APM Komponenten im Vergleich zum undifferenzierten Status aus. Wie in der Abb. 4.7A dargestellt ist, wurde in sieben von zehn MSC (D17, D24, D26, D38, D53, D55 und D66) eine Hochregulation von HC nach der Differenzierung detektiert, wohingegen die MSC der Spender MSCP91 und D25 eine verringerte Expression nach der Differenzierung aufwiesen. Die MSC des Spenders D2 zeichneten sich sowohl vor als auch nach der Differenzierung durch eine homogene Expression von HC aus. Eine erhöhte Expression von β_2 -MG wurde in acht von zehn MSC (D2, D17, D24, D26, D38, D53, D55 und D66) nach der Differenzierung detektiert. Während sich die MSC des Spenders MSCP91 durch eine verringerte β_2 -MG-Expression nach der Differenzierung auszeichneten, wurde in den MSC des Spenders D2 eine konstante β_2 -MG-Expression im undifferenzierten und differenzierten Status detektiert (Abb. 4.7B). Die Expression von TAP1 erhöhte sich in fünf von zehn MSC (D17, D25, D53, D55 und D66) nach der Differenzierung. Eine Verringerung der TAP1-Expression nach der Differenzierung konnte in drei von zehn MSC (D2, D24 und D26) detektiert werden. In zwei von zehn MSC (MSCP91 und D38) wurde eine konstante TAP1-Expression beobachtet (Abb. 4.7C). Ähnlich wie TAP1 wurde auch TAP2 in fünf von zehn MSC (MSCP91, D17, D24, D53 und D55) nach der Differenzierung verstärkt, in zwei von zehn MSC (D2 und D66) verringert und in drei von zehn MSC (D25, D26 und D38) konstant exprimiert (Abb. 4.7D). Auch Tapasin wurde nach der Differenzierung in fünf von zehn MSC (MSCP91, D2, D17, D24 und D25) stärker exprimiert, während sich die MSC der Spender D26, D53, D55 und D66 durch eine verringerte Expression von Tapasin auszeichneten. In den MSC des Spenders D38 wurde nach der Differenzierung eine verringerte Tapasin-Expression detektiert (Abb. 4.7E).

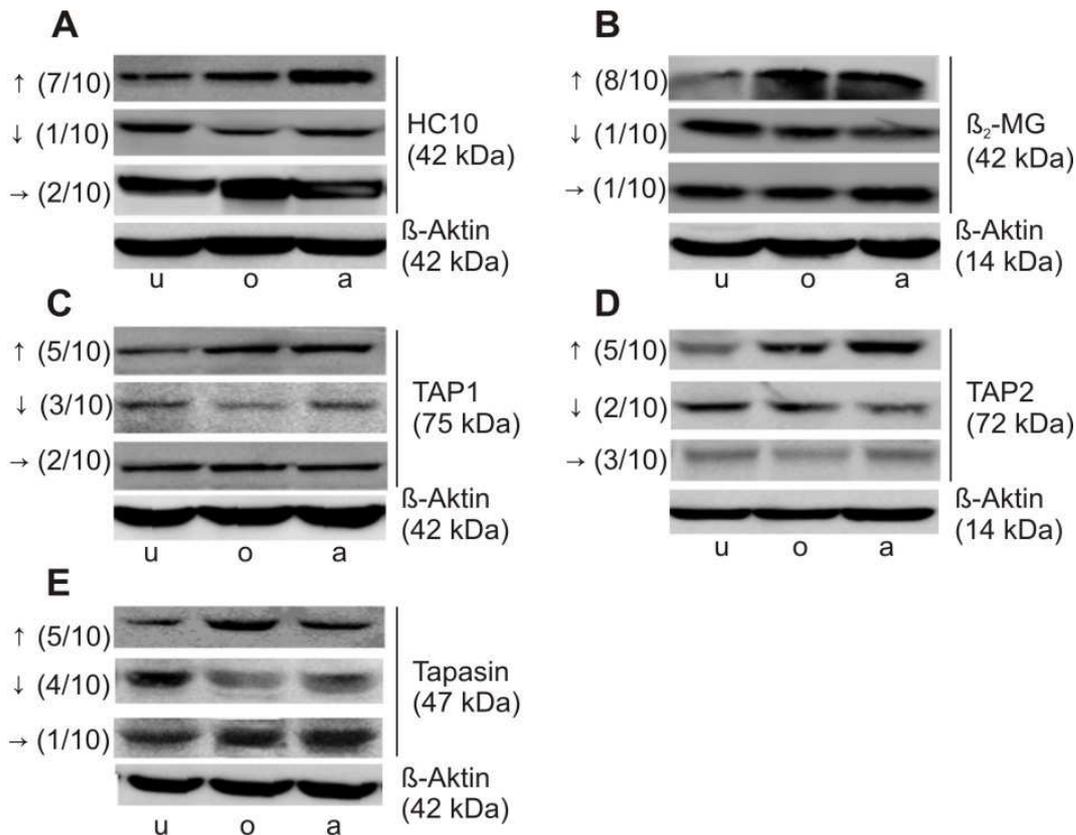


Abb.: 4.7: Repräsentative Proteinexpression wichtiger MHC-Klasse-I APM-Komponenten in undifferenzierten und differenzierten primären MSC.

Dargestellt ist die Proteinexpression der schweren Kette (HC) (A), der leichten Kette β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG) (B) des MHC-Klasse-I Moleküls sowie von TAP1 (C), TAP2 (D) und Tapasin (TAPS) (E) in undifferenzierten (u), osteogenen (o) und adipogenen (a) differenzierten primären MSC. Pro MHC-Klasse-I APM Molekül ist jeweils ein repräsentatives Beispiel einer erhöhten (\uparrow), konstanten (\rightarrow) bzw. verringerten (\downarrow) Expression nach der osteogenen und/oder adipogenen Differenzierung gezeigt. Neben den Pfeilen ist jeweils angegeben, in wie vielen MSC-Spendern (von insgesamt zehn) eine erhöhte, konstante bzw. verringerte Expression der jeweiligen Moleküle nach der Differenzierung detektiert wurde.

4.1.3. Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in MSC

Die Expression von B7-H1 - H4 in MSC wurde auf mRNA-Ebene mittels „Echt-Zeit“-PCR und auf der Zelloberfläche mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dafür standen primäre MSC von zwei gesunden Spendern (D17 und D39, Tab. 2.3), von elf kranken Spendern (MSCP91 - 83, Tab. 2.3) sowie von zwei immortalisierten MSC (L87 und V54-2, Tab. 2.2) zur Verfügung.

Auffällig war die im Vergleich zu den primären MSC hohe B7-H1-mRNA-Expression der immortalisierten MSC L87 und V54-2. Diese starke B7-H1-mRNA-Expression korrelierte mit der hohen Expression des Moleküls auf der Zelloberfläche der immortalisierten MSC, was in der Abbildung 4.8A exemplarisch für L87 gezeigt ist. Die niedrig B7-H1 mRNA-

exprimierenden primären MSC hingegen wiesen eine geringe B7-H1-Zelloberflächenexpression auf, was exemplarisch für die MSC des gesunden Spenders D17 und des kranken Spenders D38 in der Abbildung 4.8A dargestellt ist. Bezogen auf die Isotypkontrollen (IK) wurden für die beiden MSC gesunder Spender folgende mittlere B7-H1 Fluoreszenzintensitäten gemessen: D17 (MFI = $1,8 \pm 0,4$) und D39 (MFI = $1,4 \pm 0,2$). Die MFI-Werte (B7-H1/IK) der MSC kranker Spender ergaben einen Mittelwert von $2,0 \pm 0,5$ ($n = 10$), wobei die MSC des Spenders D83 mit einem MFI-Wert (B7-H3/IK) von $1,3 \pm 0,3$ die geringste und die MSC des Spenders MSCP91 mit einem MFI-Wert (B7-H3/IK) von $3,2 \pm 0,6$ die höchste B7-H1-Expression aufwiesen. Die B7-H1-Expression der MSC kranker Spender war somit gegenüber der B7-H1-Expression gesunder Spender leicht erhöht. Die immortalisierten MSC wiesen eine MFI der B7-H1/IK-Expression von $6,3 \pm 1,4$ (L87) und $7,8 \pm 2,2$ (V54-2) auf, was wie bereits erwähnt mit der erhöhten mRNA-Expression von B7-H1 im Vergleich zu den primären MSC korrelierte. Auch das costimulatorische Molekül B7-H2 wurde auf mRNA-Ebene von den immortalisierten MSC L87 und V54-2 relativ stark exprimiert, wohingegen die primären MSC eine weitaus geringere mRNA-Expression des Moleküls aufwiesen (Abb. 4.8B). Auf der Zelloberfläche von L87 und V54-2 wurde eine geringe B7-H2 Proteinexpression gemessen: MFI B7-H1/IK = $1,9 \pm 0,2$ (L87) bzw. $2,1 \pm 0,5$ (V54-2), was exemplarisch für L87 in der Abb. 4.8B dargestellt ist. In keiner primären MSC konnte B7-H2 auf der Zelloberfläche detektiert werden (MFI B7-H1/IK = 1), was am Beispiel von D17 und D38 in Abbildung 4.8B zu sehen ist.

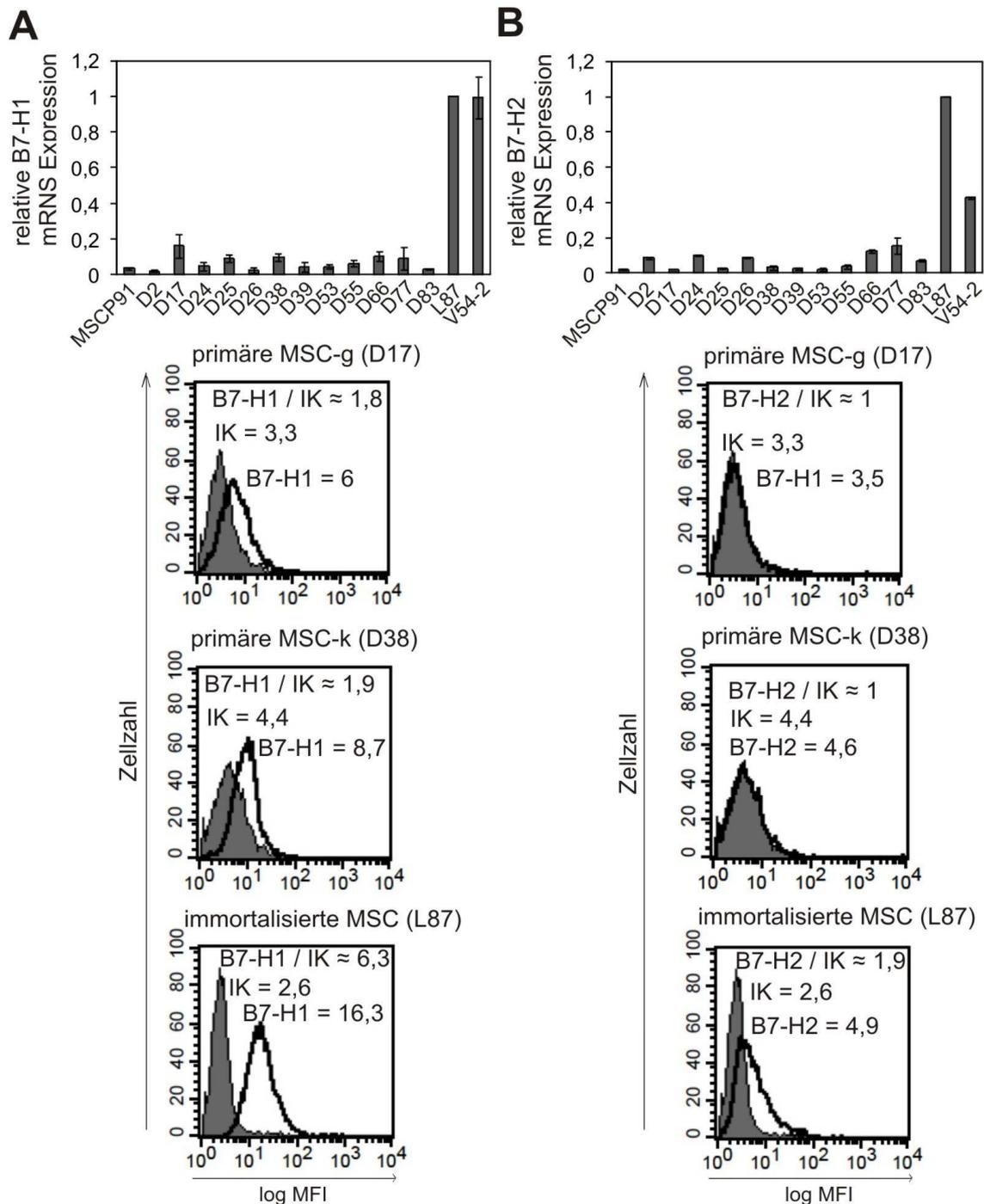


Abb. 4.8: Expression von B7-H1 und B7-H2 auf mRNA- und Proteinebene in primären und immortalisierten MSC.

Grafisch dargestellt ist die relative mRNA-Expression von B7-H1 (A) und B7-H2 (B) der primären (MSCP91 - D83) sowie der immortalisierten MSC L87 und V54-2. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNAs pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten unspezifischen Isotypkontrolle (IK) (grau) und des spezifischen PE-konjugierten Antikörpers gegen B7-H1 (A) bzw. B7-H2 (B) (weiß) von primären MSC des gesunden Spenders (g) D17 (oben), des kranken Spenders (k) D38 (mittig) und der immortalisierten MSC L87 (unten) dargestellt. Die Werte der mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von B7-H1 (A) bzw. B7-H2 (B), der IK sowie deren Quotient sind im Histogramm angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Messungen gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Im Vergleich zu den immortalisierten MSC L87 und V54-2 wurde die mRNA von B7-H3 in den primären MSC nahezu gleichermaßen stark exprimiert (Abb. 4.9). Die Expression von B7-H3 auf der Zelloberfläche verhielt sich sehr heterogen, so wurden für die primären MSC gesunder Spender folgende B7-H3/IK MFI-Werte gemessen: $6,3 \pm 1,7$ (D17) und $17 \pm 3,6$ (D39), was exemplarisch für D17 in der Abb. 4.9 dargestellt ist. Die MFI-Werte (B7-H3/IK) der MSC kranker Spender ergaben einen Mittelwert von $9,6 \pm 2,3$ ($n = 10$), wobei die MSC des Spenders D25 mit einem MFI-Wert (B7-H3/IK) von $1,4 \pm 0,2$ die geringste und die MSC des Spenders D38 mit einem MFI-Wert (B7-H3/IK) von $48 \pm 3,6$ die höchste B7-H3-Expression aufwiesen. Die Expression von B7-H3 auf der Zelloberfläche primärer MSC kranker Spender ist exemplarisch für D38 in der Abb. 4.9 gezeigt. Für die immortalisierten MSC wurden folgende MFI-Werte (B7-H3/IK) detektiert: $10,5 \pm 2,3$ (L87) und $13,3 \pm 3,1$ (V54-2), was exemplarisch für L87 in der Abb. 4.9 zu sehen ist.

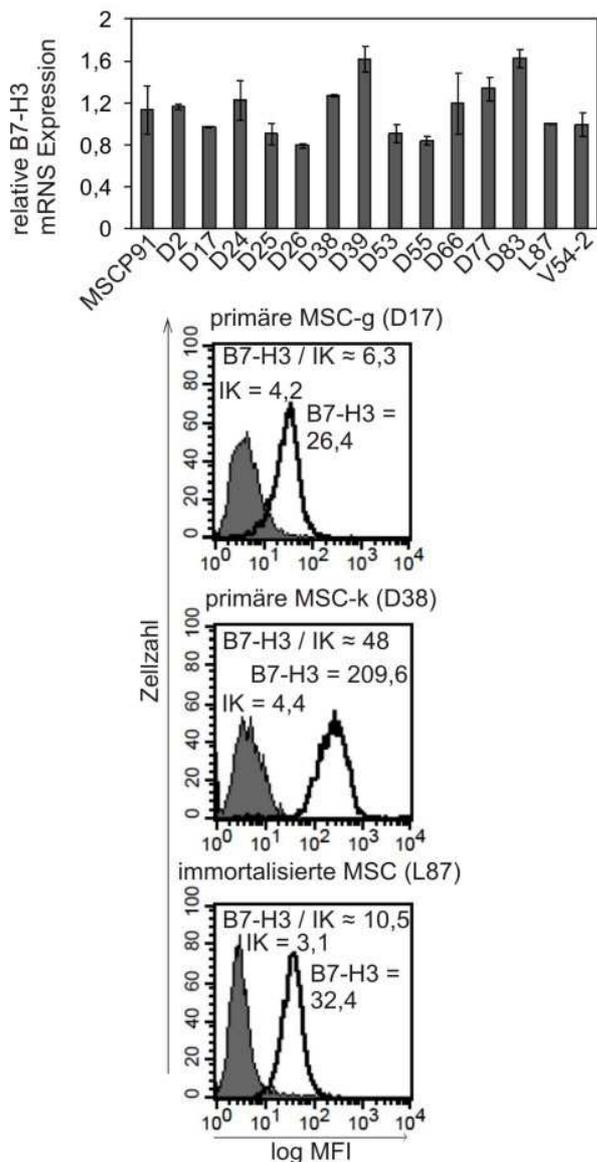


Abb. 4.9: Expression von B7-H3 auf mRNA- und Proteinebene in primären und immortalisierten MSC.

Grafisch dargestellt ist die relative mRNA-Expression von B7-H3 der primären (MSCP91 - D83) sowie der immortalisierten MSC L87 und V54-2. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten unspezifischen Isotypkontrolle (IK) (grau) und des spezifischen PE-konjugierten Antikörpers gegen B7-H3 (weiß) von primären MSC des gesunden Spenders (g) D17 (oben), des kranken Spenders (k) D38 (mitte) und der immortalisierten MSC L87 (unten) dargestellt. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von B7-H3, der IK sowie deren Quotient sind im Histogramm angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Messungen gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Die Transkription von B7-H4-mRNS konnte mittels RT-PCR in keiner MSC detektiert werden. Als Positivkontrolle diente die cDNS einer mit B7-H4 transfizierten Melanomzelllinie, in welcher die mRNS-Expression von B7-H4 nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

4.1.4. Analyse der immunmodulatorischen Funktion der B7-H3-Zelloberflächenexpression auf MSC

Innerhalb der Expressionsanalyse der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in MSC war besonders die starke Expression von B7-H3 auffällig. In wie weit die B7-H3-Zelloberflächenexpression auf MSC die Immunantwort von T- und NK-Zellen beeinflusst wurde bisher noch nicht untersucht.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Moleküls in MSC sollte die B7-H3-Expression durch siRNS-Behandlung in den primären MSC des gesunden Spenders D17, des kranken Spenders D38 und in den immortalisierten MSC L87 herab reguliert werden. Dafür wurden zunächst drei verschiedene spezifisch gegen B7-H3 gerichtete siRNS, im Folgenden mit (1), (2) und (3) bezeichnet (Tab. 2.4), an den immortalisierten MSC L87 getestet. Die L87-Zellen wurden wie unter 3.6. beschrieben mit den siRNS (1), (2) bzw. (3) und mit den siRNS Kontrollen (Tab. 2.4) transfiziert. Die Effizienz der Transfektionen wurde durchflusszytometrisch gemessen und lag zwischen 84 und 87 %. Die Expression von B7-H3 auf der Zelloberfläche unbehandelter und transfizierter L87-Zellen wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Der MFI-Mittelwert (B7-H3/IK) unbehandelter und mit der siRNS Kontrolle behandelter L87-Zellen lag bei $64,7 \pm 4,4$. Nach Transfektion der L87-Zellen mit den spezifischen siRNS ergaben sich folgende MFI-Werte (B7-H3/IK): 10,3 nach Transfektion mit siRNS (1); 8,1 nach Transfektion mit siRNS (2) und 10,5 nach Transfektion mit siRNS (3). Die B7-H3-Zelloberflächenexpression der L87-Zellen wurde mit der siRNS (2) am stärksten herab reguliert (von 100 auf 12,5 %). Die B7-H3-Expression der L87-Zellen wurde durch die Transfektion mit den siRNS Kontrollen nicht beeinflusst.

Die spezifisch gegen B7-H3 gerichtete siRNS (2), im Folgenden als B7-H3 siRNS bezeichnet, wurde zur Transfektion der primären MSC des gesunden Spenders D17, des kranken Spenders D38 und der immortalisierten MSC L87 verwendet. Nach der siRNS-Behandlung wurde die Expression von B7-H3 auf mRNA-Ebene mittels „Echt-Zeit“-PCR und auf Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. In den mit B7-H3 siRNS transfizierten MSC wurde die B7-H3-mRNS-Expression von 100 % auf 20-30 % herab reguliert. Die Zelloberflächenexpression von B7-H3 konnte nach der B7-H3 siRNS-Behandlung der MSC von 100 % auf 10-15 % gesenkt werden. Die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche der MSC wurde durch die Transfektionen nicht

beeinflusst. Diese Ergebnisse sind exemplarisch für die immortalisierten MSC L87 in der Abb. 4.10 dargestellt.

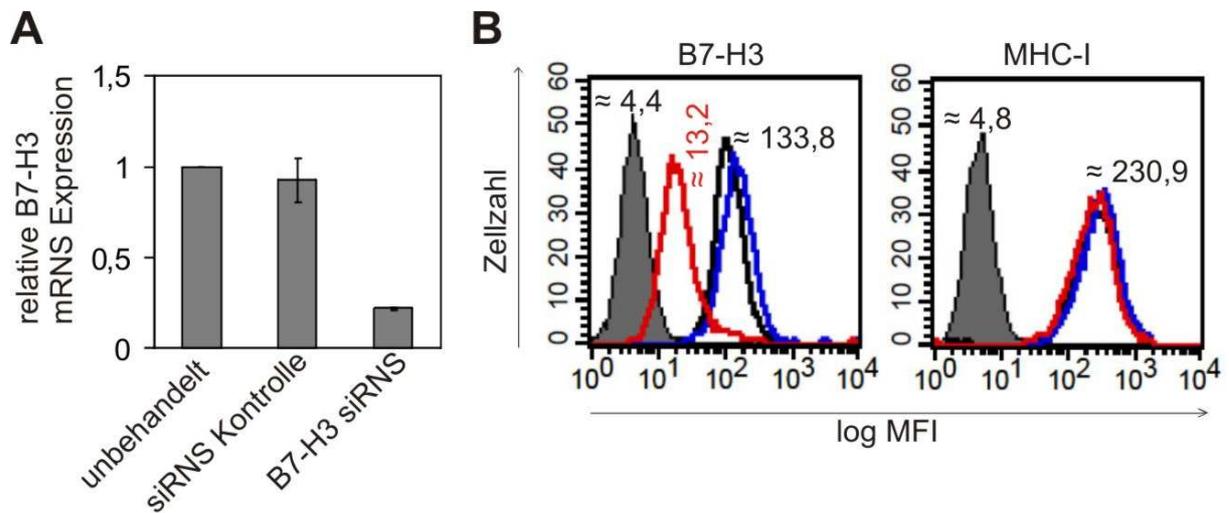


Abb. 4.10: Expression von B7-H3 und MHC-Klasse-I L87 nach siRNS-Behandlung.

A - Dargestellt ist die relative B7-H3-mRNA-Expression unbehandelter, mit der siRNS Kontrolle und mit B7-H3 spezifischer siRNS behandelter L87 Zellen. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment, exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. B - Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des PE-konjugierten B7-H3 bzw. HLA-ABC (MHC-I) Antikörpers (weiß) unbehandelter (schwarze Linie), mit der siRNS Kontrolle behandelter (blaue Linie) sowie mit der spezifischen B7-H3 siRNS behandelter (rote Linie) L87-Zellen. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK, B7-H3 und MHC-I sind im Histogramm angegeben. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

4.1.4.1. Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die Lyse von MSC durch zytotoxische T-Lymphozyten

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die ZTL-vermittelte Lyse von MSC wurde die B7-H3-Zelloberflächenexpression der primären MSC D38 und der immortalisierten MSC L87 mittels siRNS von 100 % auf 10 - 12 % verringert. Eine durch die Transfektion veränderte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche der MSC konnte durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden. Die MSC wurden mit $100 \mu\text{Cu } ^{51}\text{Cr}$ markiert und anschließend mit „melanoma-associated antigen recognized by T cells 1“ (MART1)-spezifischen positiven ZTL in verschiedenen Effektor:Target-Verhältnissen (40:1 bis 1,25:1) für 4 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der spezifischen Lyse der MSC mit Hilfe des Chromfreisetzungsversuchs (3.11.) Die zytotoxischen Eigenschaften der verwendeten MART1-spezifischen ZTL wurden durch Cokulturen mit MART1-gepulsten HLA-A2 positiven Tumorzellen (Positivkontrolle) und mit

Tyrosinase-gepulsten HLA-A2 positiven Tumorzellen (Negativkontrolle) überprüft. Es handelt sich hierbei um Tumorzellen, die mit den Antigenen MART1 bzw. Tyrosinase behandelt wurden. Diese Antigene werden den ZTL auf MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert (Dagmar Quant, persönliche Mitteilung). Die MART1- und Tyrosinase-gepulsten Tumorzellen sowie die MART1-spezifischen ZTL wurden freundlicherweise von Frau Dagmar Quant (Institut für Medizinische Immunologie, Halle) zur Verfügung gestellt. In der Abb. 4.11 sind die Ergebnisse des Chromfreisetzungsversuchs dargestellt.

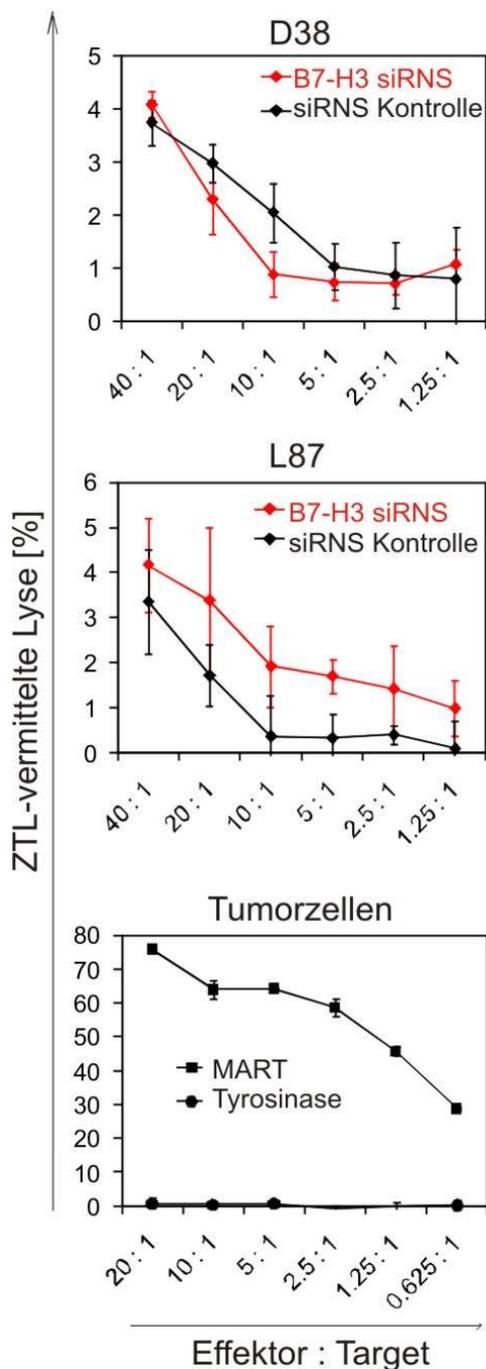


Abb. 4.11: ZTL-vermittelte Lyse von MSC.

Dargestellt ist die prozentuale ZTL-vermittelte Lyse von mit B7-H3 siRNS (rote Linie) und mit siRNS Kontrolle (schwarze Linie) behandelten primären MSC des Spenders D38 und immortalisierten MSC L87 sowie von MART1-gepulsten (MART) und Tyrosinase-gepulsten (Negativkontrolle) Tumorzellen zu unterschiedlichen Effektor:Target Verhältnissen (Effektor:Target). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei Messungen. Es ist jeweils ein exemplarisches Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Von den MART1-gepulsten Tumorzellen (Positivkontrolle) wurden maximal 80 % durch die ZTL lysiert. Die ZTL-vermittelte Lyse der Tyrosinase-gepulsten Tumorzellen (Negativkontrolle) lag unter 1 %. Im Vergleich zur Positivkontrolle wurden die MSC D38 und L87 nur marginal von den ZTL lysiert. Von den MSC, die mit der siRNS-Kontrolle bzw. mit der B7-H3 siRNS transfiziert wurden, wurden maximal 4 - 5 % durch die ZTL lysiert. Mit abnehmendem Effektor:Target Verhältnis verringerte sich die ZTL-vermittelte Lyse der MSC auf 0 - 1 %. Die Unterschiede der ZTL-vermittelten Lyse von D38 sowie L87 lagen nach Transfektion mit der siRNS Kontrolle bzw. mit B7-H3 siRNS jeweils unter 2 %. Die verringerte B7-H3-Zelloberflächenexpression hatte somit keinen Einfluss auf die ZTL-vermittelte Lyse der MSC.

4.1.4.2. Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die Lyse von MSC durch NK-Zellen

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H3 für die NK-Zell-vermittelte Lyse von MSC wurde zunächst die Lyse von sieben verschiedenen primären MSC und von immortalisierten MSC L87 durch NK-Zellen gemessen. Anschließend sollten einige MSC für die B7-H3 siRNS-Transfektion und weitere Zytotoxizitätsexperimente mit NK-Zellen ausgewählt werden. Als Effektoren kamen frisch isolierte, mit IL-2 aktivierte NK-Zellen (3.10.) von drei verschiedenen Spendern zum Einsatz. Die Reinheit der NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft. 95 - 98 % der isolierten NK-Zellen wiesen einen NK-Zell-typischen Phänotyp auf: CD3⁻ / CD4⁻, CD3⁻ / CD56⁺, CD3⁻ / CD16⁺, CD56⁺ / CD16⁺, CD19⁻ / CD14⁻).

Die mit 100 µCu ⁵¹Cr markierten primären MSC der gesunden Spender D17 und D39, der kranken Spender D38, D53, D66, D77 und D83 sowie die immortalisierten MSC L87 wurden mit frisch isolierten und aktivierten NK-Zellen von drei unabhängigen Spendern in verschiedenen Effektor:Target-Verhältnissen (20:1 bis 0,625:1) für 4 h kultiviert und die NK-Zell-spezifische Lyse mittels Chromfreisetzung gemessen (3.11.).

Alle MSC wurden von den NK-Zellen der verschiedenen Spender lysiert (Abb. nicht gezeigt). Die Werte der maximalen Lyse lagen bei einem Effektor:Target Verhältnis von 20:1 im Bereich von 40 - 95 %. Mit abnehmendem Effektor:Target Verhältnis (auf 0,625:1) verringerte sich die ZTL-vermittelte Lyse der MSC auf 5 - 30 %. Auffällig waren die im Vergleich zu den immortalisierten MSC L87 hohen spontanen Lyseraten der primären MSC (L87 < 10 %, primäre MSC 17 - 33 %). Aufgrund hoher spontaner Lyseraten (> 20 %) der primären MSC D53, D66, D77 und D83 wurden für weitere Zytotoxizitätsexperimente die

primären MSC des gesunden Spenders D17 und des kranken Spenders D38 (spontane Lyse < 20 %) sowie die immortalisierten MSC L87 ausgewählt.

Die B7-H3-Zelloberflächenexpression dieser Zellen wurde durch siRNS-Transfektion von 100 % auf 10 - 12 % herab reguliert. Eine durch die Transfektion veränderte Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf den MSC konnte durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden. Die MSC wurden mit $100 \mu\text{Cu } ^{51}\text{Cr}$ markiert und für 4 h mit frisch isolierten und aktivierten NK-Zellen von drei Spendern inkubiert. Anschließend wurde die NK-Zell-vermittelte Lyse der MSC mit Hilfe des Chromfreisetzungsversuchs gemessen (3.11.).

In der Abbildung 4.12A sind die prozentualen NK-Zell-vermittelten Lyseraten der primären MSC D17 und D38 sowie der immortalisierten MSC L87 durch frisch isolierte aktivierte NK-Zellen von drei Spendern dargestellt. Während die Werte der maximalen Lyse der primären MSC des gesunden Spenders D17 im Bereich von 40 - 60 % lagen, betrug die maximale Lyse der primären MSC des kranken Spenders D38 55 - 75 %. Von den immortalisierten MSC L87 wurden maximal 55 - 65 % lysiert. Wiederum konnte mit abnehmendem Effektor:Target Verhältnis (10:1 auf 0,625:1) eine Verringerung der ZTL-vermittelten Lyse der MSC auf 8 - 23 % (D17), auf 18 - 25 % (D38) und auf 15 - 30 % (L87) gemessen werden. Interessanterweise wurden die mit B7-H3 siRNS transfizierten MSC stärker durch die NK-Zellen lysiert als die MSC nach der siRNS Kontroll-Behandlung, was in der Abbildung 4.12B exemplarisch für das Effektor:Target Verhältnis 5:1 gezeigt ist. Im Vergleich zu den MSC, welche mit der siRNS Kontrolle transfiziert wurden, erhöhte sich die NK-Zell-vermittelte prozentuale Lyse nach der B7-H3 siRNS-Behandlung von D17 um 33 %, von D38 um 11 % und von L87 um 15 %.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation der B7-H3-Zelloberflächenexpression von 100 % auf 10 - 12 % zur Erhöhung der NK-Zell-vermittelten Lyse der MSC D17, D38 und L87 um 11 - 33 % führte.

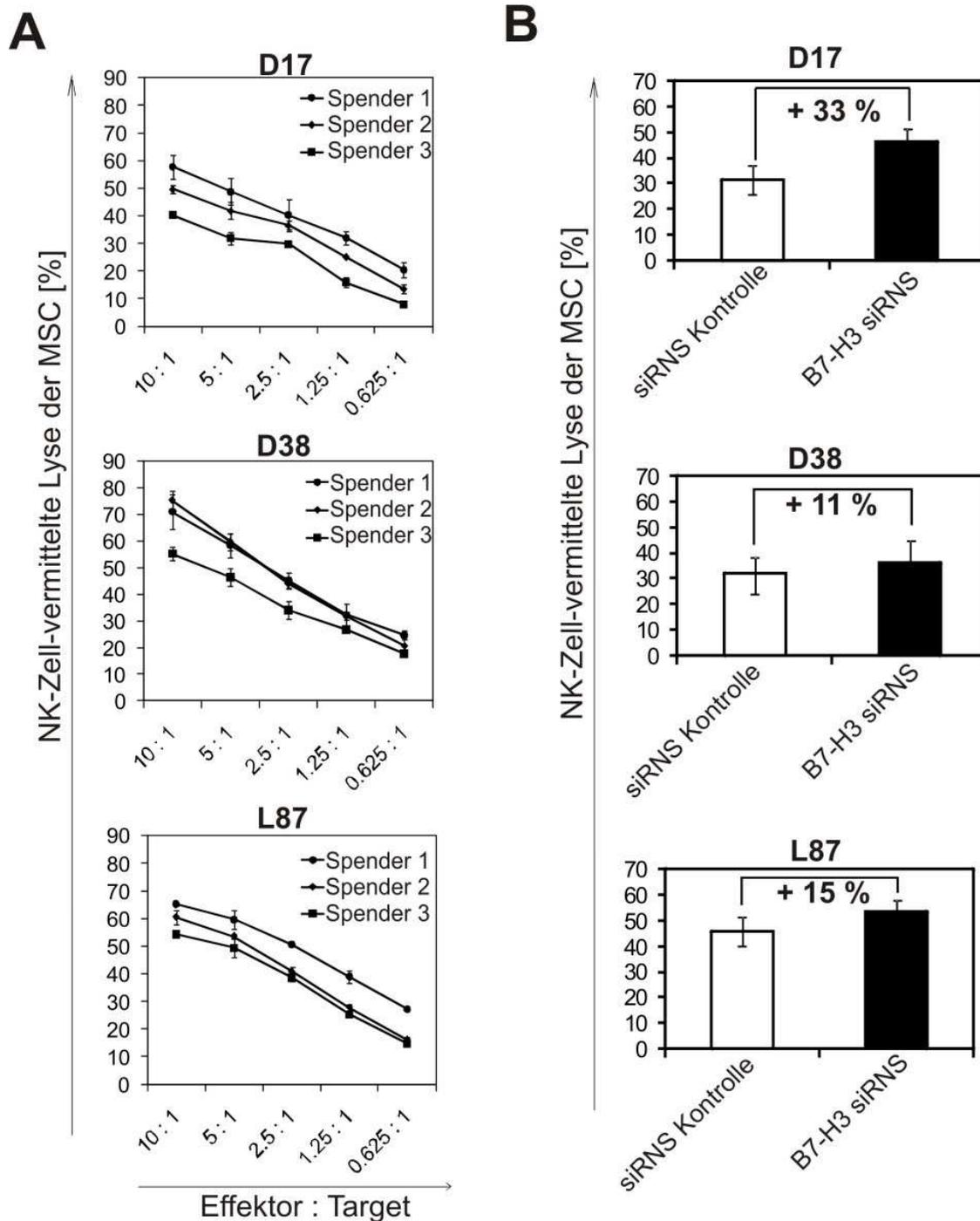


Abb. 4.12: NK-Zell-vermittelte Lyse von MSC.

A - Dargestellt ist die prozentuale NK-Zell-vermittelte Lyse von primären MSC des gesunden Spenders D17 und des kranken Spenders D38 sowie von immortalisierten MSC L87 zu unterschiedlichen Effektor:Target Verhältnissen (Effektor:Target). Als Effektoren wurden NK-Zellen verwendet, welche von drei unabhängigen Spendern, wie unter 3.9. und 3.10. beschrieben, isoliert und mit IL-2 aktiviert wurden. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei Messungen. B - Gezeigt ist die prozentuale NK-Zell-vermittelte Lyse von mit siRNS Kontrolle (weißer Balken) und mit B7-H3 siRNS (schwarzer Balken) behandelten primären MSC des gesunden Spenders D17 und des kranken Spenders D38 sowie immortalisierten MSC L87 im Effektor:Target Verhältnis von 5:1. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus den Messungen der Lyse von MSC unter Verwendung der NK-Zellen von drei unabhängigen Spendern.

4.1.5. Expression des immunsuppressiven nicht-klassischen MHC-Klasse-I Moleküls HLA-G in MSC

Die Immunantwort von T-Zellen und NK-Zellen wird durch u.a. durch das immunsuppressive Molekül HLA-G beeinflusst. Wie bereits unter 1.1. beschrieben, inhibiert HLA-G die zytotoxische Aktivität von T- und NK-Zellen und wird deshalb als „immunsuppressiv“ bezeichnet. Die Expression von HLA-G auf MSC könnte somit ein Grund für deren Immunsuppressivität darstellen.

Vor diesem Hintergrund sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit die mRNA- und Proteinexpression von HLA-G in MSC mittels RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht werden. Dafür standen die primären MSC von 13 Spendern (MSCP91 - D83, Tab. 2.3) und die immortalisierten MSC L87 und V54-2 (Tab. 2.2) zur Verfügung. Für die Amplifikation der fünf verschiedenen Isoformen des HLA-G Moleküls (HLA-G1 - G5) wurden pan-spezifische Primer verwendet.

Wie in Abb. 4.13A zu sehen ist, konnte die mRNA-Expression der HLA-G Isoform 1 bzw. 5 in D53 detektiert werden. Die mRNA-Expression weiterer Isoformen wurde nicht nachgewiesen. Trotz Erhöhung der PCR-Zykluszahl von 35 auf 45 konnte in den übrigen MSC keine HLA-G-mRNA Expression detektiert werden. Eine HLA-G-Proteinexpression von D53 konnte weder mittels Western Blot (Abb. 4.13B) noch mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Abb. 4.13C) detektiert werden. Als Positivkontrolle diente die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3, deren HLA-G-Proteinexpression sowohl im Western Blot als auch durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.13B, C).

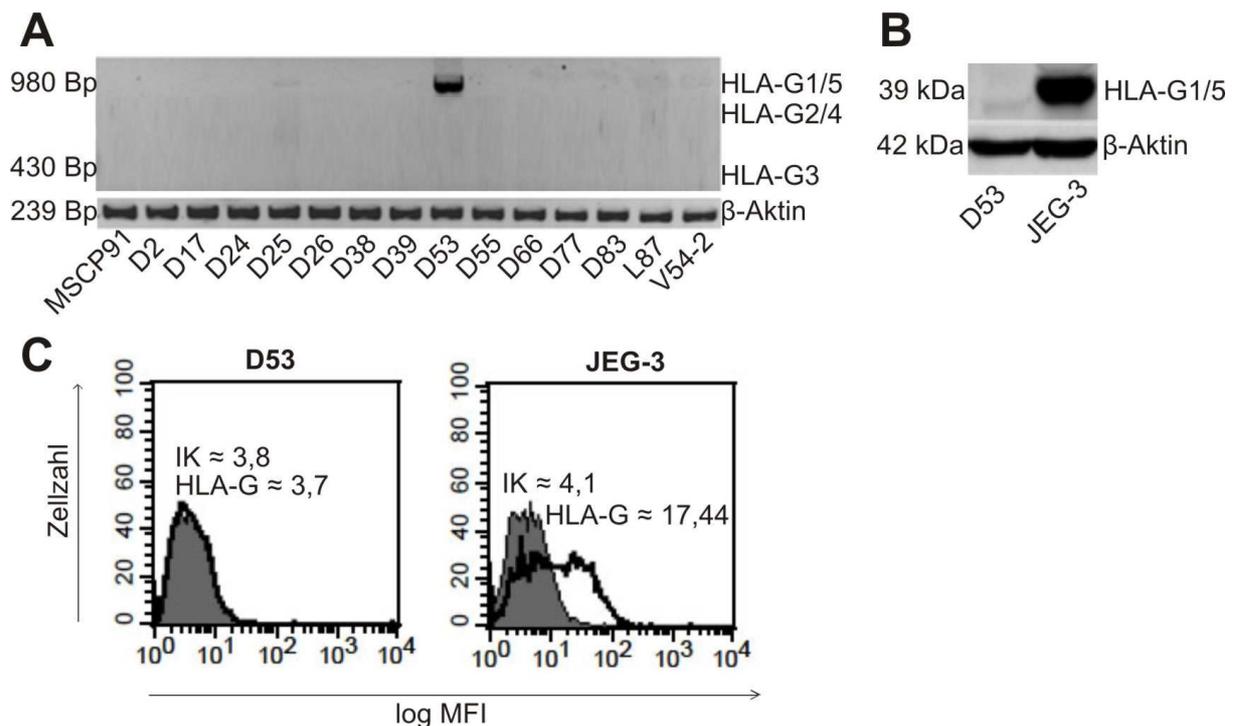


Abb. 4.13: Expression von HLA-G auf mRNA- und Proteinebene in MSC.

A - Dargestellt ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender HLA-G Amplikons der 15 primären MSC. Sichtbar sind die Amplikons HLA-G1 bzw. HLA-G5 mit einer Größe von \sim 1000 Bp (oben). Unterhalb ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. B - Dargestellt ist die Expression von HLA-G1/5 in D53 und JEG-3 auf Proteinebene im Western Blot unter Verwendung des HLA-G spezifischen Antikörpers MEM-G/1, welcher die denaturierte schwere Kette des HLA-G Moleküls erkennt. Die Expression des Standardproteins β -Aktin ist unter dem Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. C - Gezeigt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers gegen HLA-G (MEM-G/9) (weiß) von D53 und JEG-3. Der Antikörper MEM-G/9 erkennt die native Form von HLA-G auf der Zelloberfläche. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK und HLA-G sind im Histogramm angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Mit Ausnahme von D53 wurde in keiner der untersuchten MSC die Expression von HLA-G auf mRNA-Ebene detektiert. Eine geringe bzw. fehlende mRNA-Expression eines Moleküls kann in verschiedenen Regulationsmechanismen begründet sein. Neben der Acetylierung von Histonen gehört auch die Methylierung der DNS zu den epigenetischen Regulationsmechanismen. Durch eine DNS-Methylierung kann unter Umständen die Transkription von Genen abgeschaltet werden (Christman *et al.*, 2002).

Mit Hilfe des Programms „MethPrimer“ (<http://www.urogene.org/methprimer/>) wurde die DNS-Sequenz des HLA-G Gens auf Bereiche hin analysiert, die einen CpG-Anteil von über 50 % aufweisen (CpG-Insel). Innerhalb der ersten 1000 Bp der DNS-Sequenz des HLA-G Gens konnte eine CpG-Insel mit einer Größe von 824 Bp detektiert werden (Abb. 4.14).

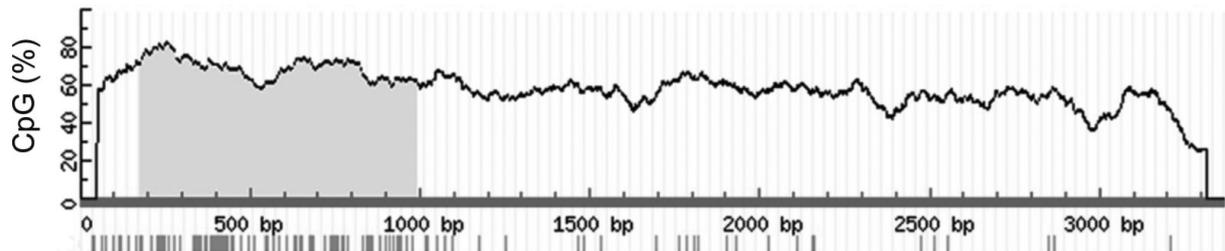


Abb. 4.14: Lokalisation der CpG Insel innerhalb der DNS-Sequenz des HLA-G Gens.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von CpGs über die 3363 Bp lange DNS-Sequenz des HLA-G Gens. Der DNS-Bereich mit einem CpG-Gehalt von über 50 % ist als CpG Insel grau hervorgehoben.

Der Methylierungsstatus der CpG-Insel des HLA-G Gens wurde mit Hilfe der COBRA-Technik analysiert (3.13.9.). Die DNS der immortalisierten MSC L87 und V54-2 (Tab. 2.2) sowie der primären MSC der 13 Spender MSCP91 - D83 (Tab. 2.3) wurde isoliert und mit Bisulfit behandelt, wobei jedes nicht-methylierte Cytosin in Uracil konvertiert wird und methylierte Cytosine erhalten bleiben. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNS mit den vom „MethPrimer“ Programm generierten Primern. Während dieser Reaktion wird jedes Uracil in Thymin konvertiert. Danach wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym BstUI inkubiert und gelelektrophoretisch analysiert. Falls eine CpGpCpG-Region (Erkennungssequenz von BstUI) innerhalb des amplifizierten DNS-Bereichs methyliert vorliegt, würden methylierte Cytosine erhalten bleiben und das PCR-Produkt wird durch BstUI gespalten. Eine nicht-methylierte CpGpCpG-Region läge nach der Bisulfit-Behandlung der DNS und anschließender PCR als TpGpTpG-Sequenz vor und würde nicht von BstUI gespalten werden.

Die PCR-Produkte der primären MSC aller 13 Spender wurden nicht von BstUI gespalten, was exemplarisch für die MSC eines Spenders in der Abb. 4.15A zu sehen ist. Die BstUI-Restriktion der PCR-Produkte der immortalisierten MSC L87 und V54-2 konnte nachgewiesen werden, was exemplarisch für L87 in der Abb. 4.15A gezeigt ist. Demzufolge konnte von der Methylierung einer CpGpCpG-Region des amplifizierten Bereichs der CpG-Insel des HLA-G Gens in den immortalisierten MSC L87 und V54-2 ausgegangen werden, währenddessen diese Region in den untersuchten primären MSC nicht-methyliert vorlag.

Um die Reversion der DNS-Methylierung innerhalb der CpG Insel des HLA-G Gens zu untersuchen, wurden die immortalisierten MSC L87 und V54-2 mit verschiedenen Konzentrationen an 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) behandelt (3.5) und die DNS dieser Zellen mittels HLA-G COBRA untersucht. Auch nach der DAC-Behandlung wurde das PCR-Produkt von BstUI gespalten (4.15A). Die Behandlung der Zellen mit DAC führte demnach nicht zur Demethylierung der CpGpCpG-Region(en). Im nächsten Schritt wurden die immortalisierten MSC L87 und V54-2 mit verschiedenen Konzentrationen an DAC in Kombination mit 1mM

Valproinsäure (VPA) behandelt (3.5.), um eine Demethylierung der DNS und veränderte Acetylierung von Histonen zu untersuchen. Nach Behandlung der immortalisierten MSC L87 und V54-2 mit 0,5 μ M DAC in Kombination mit 1 mM Valproinsäure, konnte nach drei und fünf Tagen bei beiden Zelllinien eine partielle jedoch keine vollständige Restriktion der PCR-Produkte detektiert werden, was exemplarisch für L87 in der Abb. 4.15B dargestellt ist.

Von den DAC/VPA-behandelten immortalisierten MSC wurde die HLA-G-mRNS-Expression mittels RT-PCR zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0 - 5) untersucht. Nach 3-tägiger DAC/VPA-Behandlung konnte die Expression der HLA-G-mRNS Isoformen HLA-G1 bzw. 5, HLA-G2 bzw. 4 und HLA-G3 in L87 und V54-2 detektiert werden. Die Expression dieser mRNS Isoformen verringerte sich nach 5-tägiger DAC/VPA-Behandlung. Dieser Effekt ist exemplarisch für L87 in der Abb. 4.15B zu sehen.

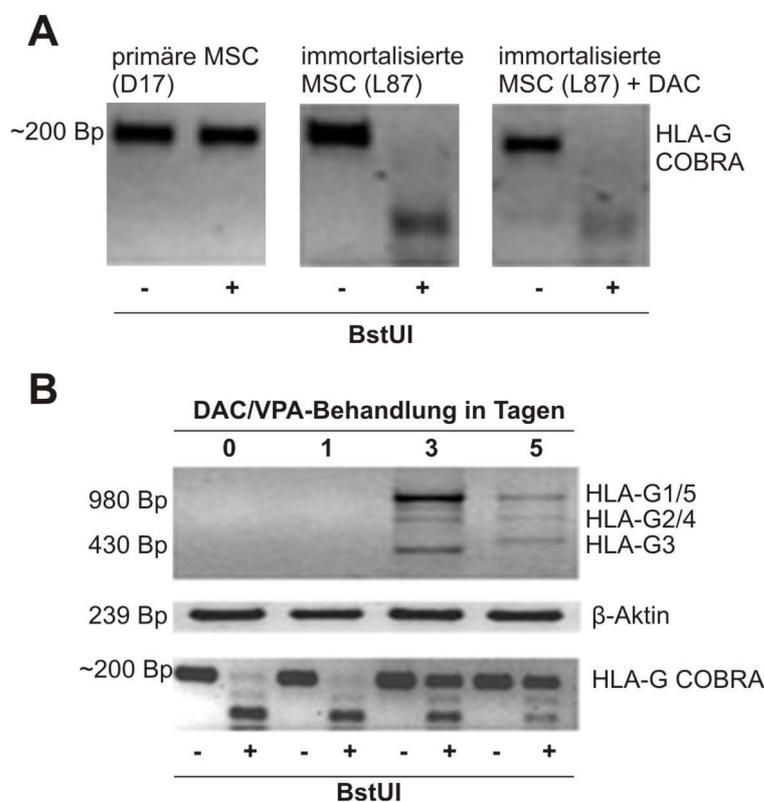


Abb. 4.15: Untersuchung der Methylierung und Acetylierung des HLA-G Gens in MSC auf DNS- und RNS-Ebene.

A - Dargestellt sind 1,5 %ige TAE-Agarosegele mit aufgetrennten BstUI-Restriktionsprodukten der HLA-G COBRA der primären MSC D17 (links), der immortalisierten MSC L87 (mitte) und der mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) behandelten immortalisierten MSC L87 (rechts). B - oben: Gezeigt ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender HLA-G Amplikons der unbehandelten und mit 0,5 μ M DAC und 1 mM Valproinsäure (VPA) für ein bis fünf Tage behandelten immortalisierten MSC L87. Sichtbar sind die Amplikons HLA-G1 bzw. HLA-G5 mit einer Größe von 980 Bp (oben), sowie HLA-G2 und HLA-G4 mit einer Größe von 500 bis 800 Bp und HLA-G3 mit einer Größe von 430 Bp. mittig: Dargestellt ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp. unten: Dargestellt ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel mit aufgetrennten BstUI-Restriktionsprodukten der HLA-G COBRA von unbehandelten und mit 0,5 μ M DAC und 1 mM Valproinsäure (VPA) für ein bis fünf Tage behandelten immortalisierten MSC L87. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

In den immortalisierten MSC L87 und V54-2 konnte nach ein- bis 5-tägiger DAC/VPA-Behandlung keine HLA-G-Zelloberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, was exemplarisch für L87 nach 5-tägiger DAC/VPA-Behandlung in Abb. 4.16A gezeigt ist. Auch im Western Blot wurde für L87 und V54-2 keine Induktion der HLA-G-Proteinexpression nach ein- bis 5-tägiger DAC/VPA-Behandlung detektiert, was exemplarisch für L87 nach 5-tägiger DAC/VPA-Behandlung in der Abb. 4.16B dargestellt ist. Als Positivkontrolle wurde die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 verwendet, deren HLA-G-Proteinexpression sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.16A und B).

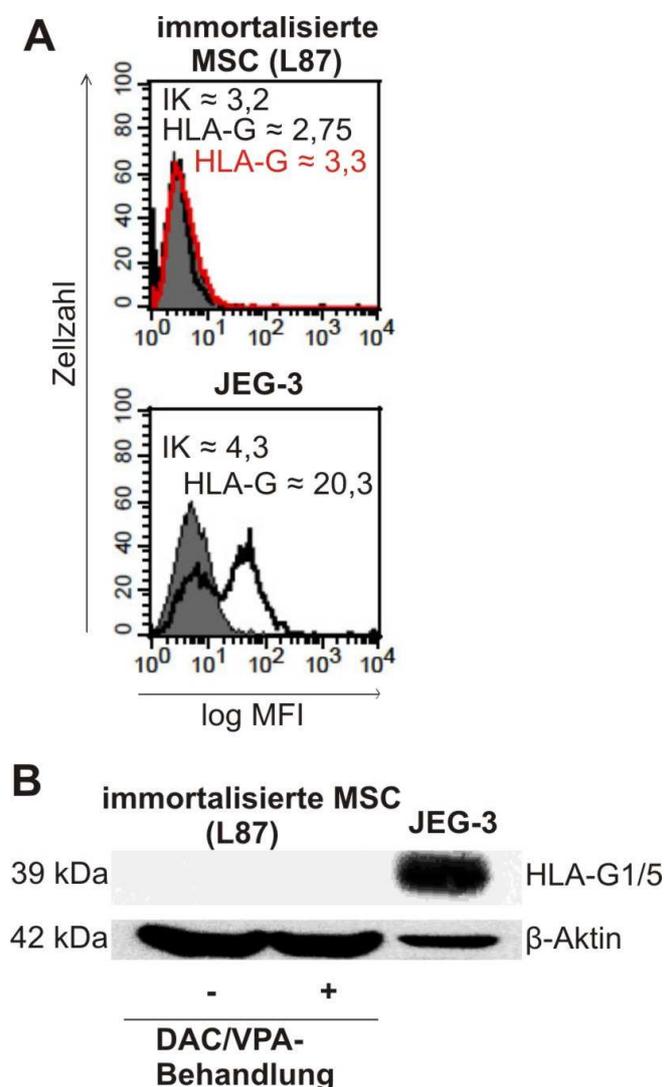


Abb. 4.16: Untersuchung der DAC/VPA-vermittelten Modulation der Methylierung und Acetylierung des HLA-G Gens in immortalisierten MSC auf Proteinebene.

A - Gezeigt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers gegen HLA-G (MEM-G/9) (weiß) von unbehandelten (schwarze Linie) und für fünf Tage mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) und 1 mM Valproinsäure (VPA) behandelten (rote Linie) immortalisierten MSC L87 sowie der unbehandelten Chorionkarzinomzelllinie JEG-3. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK und HLA-G sind im Histogramm angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI), B - Dargestellt ist die Expression von HLA-G1/5 von unbehandelten sowie für fünf Tage mit DAC/VPA behandelten immortalisierten MSC L87 und der unbehandelten Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 auf Proteinebene im Western Blot unter Verwendung des HLA-G spezifischen Antikörpers MEM-G/1. Die Expression des Standardproteins β -Aktin ist unter dem Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Demnach führte die DAC/VPA-Behandlung der immortalisierten MSC L87 und V54-2 zur Acetylierung von Histonen und zur Demethylierung der CpG-CpG-Regionen innerhalb der CpG-Insel des HLA-G Gens, wodurch die mRNA Transkription, jedoch nicht die Proteinexpression von HLA-G induziert wurde.

4.2. Analyse des immunregulatorischen Potentials von KZT-Zelllinien

Es sollte die Expression der drei Hauptgruppen immunmodulatorischer Moleküle (MHC-Klasse-I APM, costimulatorische Moleküle B7-H1 - H4 und immunsuppressives Molekül HLA-G) in neun KZT-Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus (Tab. 2.1) untersucht werden. Von Interesse war weiterhin, in wie weit die Expression dieser Moleküle mit dem Differenzierungsstatus der KZT-Zelllinien korreliert. Im Mittelpunkt stand die differenzierungsabhängige Expression und funktionelle Bedeutung der MHC-I-Klasse-APM Komponenten in der undifferenzierten KZT-Zelllinie H12.1 nach Differenzierung mit *all-trans*-Retinsäure.

4.2.1. Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-4 in KZT-Zelllinien

Zu Beginn sollte der Differenzierungsstatus der neun KZT-Zelllinien überprüft werden. Hierfür wurde die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-4 untersucht. Oct-4 gehört zur Gruppe der Oktamer-bindenden POU-Transkriptionsfaktoren und ist in die Regulation der zellulären Pluripotenz involviert (Pesce *et al.*, 1998; Pesce & Scholer, 2001; Hay *et al.*, 2004; Rajpert-De Meyts *et al.*, 2004). Da die Expression des Moleküls im Zuge der somatischen Differenzierung ausgeschaltet wird, stellt Oct-4 einen Marker für den undifferenzierten Zustand dar (Schoorlemmer *et al.*, 1995).

Die Expression von Oct-4 wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Im Vergleich zu den differenzierten KZT-Zelllinien JEG-3, JAR, H12.1D, 1411HP und 1777NRpmet wurde Oct-4 von den undifferenzierten Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.5 und H12.1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene stark exprimiert (Abb. 4.17).

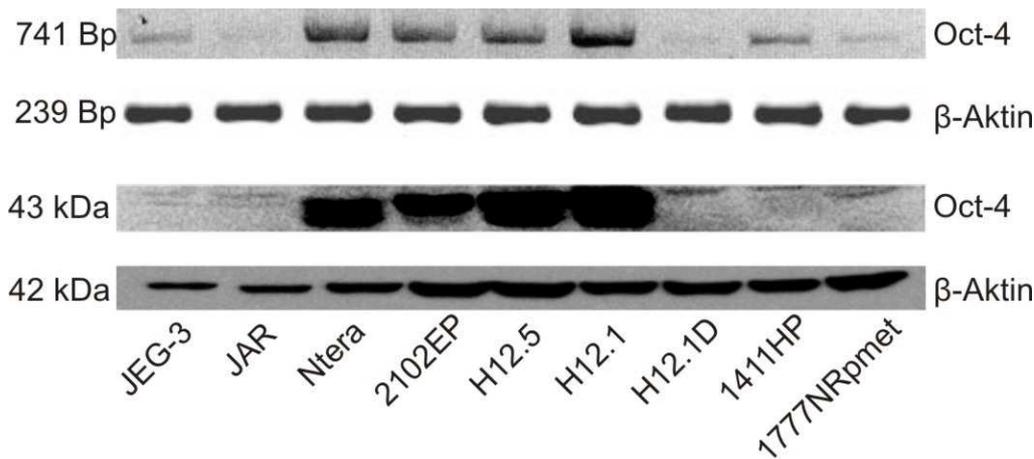


Abb. 4.17: Expression von Oct-4 auf mRNA- und Proteinebene in KZT-Zelllinien.

Im oberen Bereich ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender Oct-4 Amplikons mit einer Größe von 741 Bp sowie ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. Darunter ist die Proteinexpression von Oct-4 sowie des Standardproteins β -Aktin im Western Blot dargestellt. Die Detektion von Oct-4 erfolgte unter der Verwendung des Antikörpers Oct-3/4 (C-10), welcher spezifisch gegen die Isoform 1 von Oct-4 gerichtet ist. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen RT-PCR bzw. Western Blot Experimenten.

4.2.2. Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I APM in KZT-Zelllinien

Die mRNA- und Proteinexpression von β_2 -MG, HC, TAP1, TAP2, Tapasin sowie die Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberfläche von KZT-Zelllinien wurde mittels RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht.

Die KZT-Zelllinien zeigten eine heterogene mRNA-Expression von HC sowie eine heterogene Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberfläche (Abb. 4.18). Während die JAR-Zelllinie HC schwach auf mRNA-Ebene exprimierte, konnte in den übrigen KZT-Zelllinien eine starke HC-mRNA-Expression detektiert werden. Bezogen auf die Isotypkontrollen lagen die MFI-Werte der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression der differenzierten KZT-Zelllinien JEG-3 und 1411HP sowie der undifferenzierten KZT-Zelllinie H12.5 im Bereich von 62,0 - 107,8. Für die undifferenzierten KZT-Zelllinien Ntera, 2102EP und H12.1 sowie für die differenzierten KZT-Zelllinien H12.1D und 1777NRpmet wurden MFI-Werte (MHC-I/IK) von 8,1 - 27,1 gemessen. Auf den JAR-Zellen konnte keine MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression detektiert werden, was mit der schwachen HC-mRNA-Expression dieser Zelllinie korrelierte. Es ist zu betonen, dass im Fall des Zellsystems H12.1 (undifferenziert) und H12.1D (differenziert) eine Zunahme der MHC-Klasse-I-mRNA- und Zelloberflächenexpression gemessen wurde: MFI (MHC-I/IK) = 11,5 (H12.1) bzw. H12.1D (27,1).

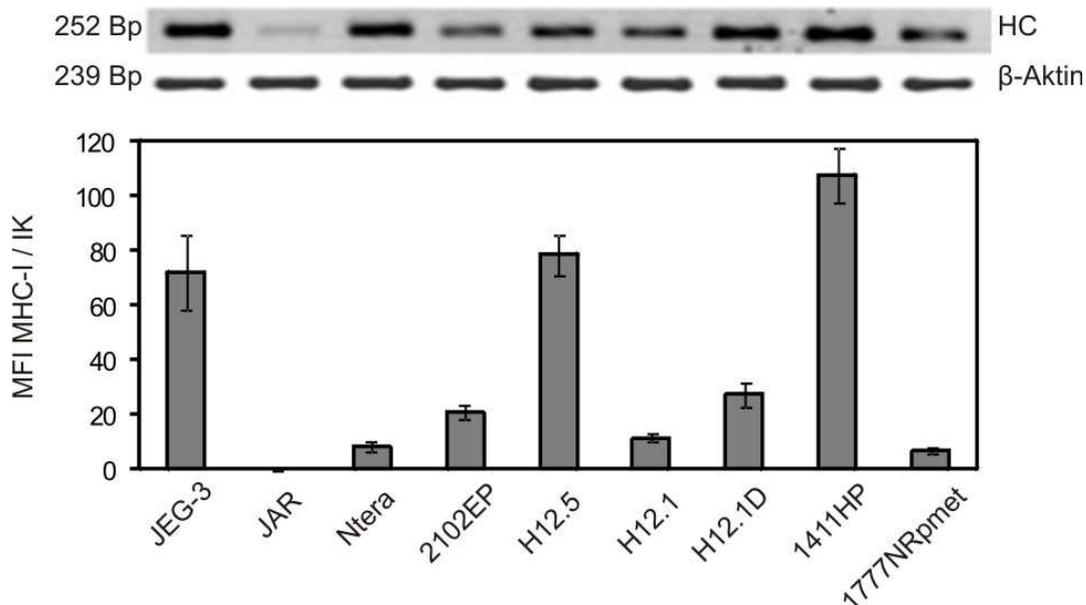


Abb. 4.18: Expression von HC auf mRNA-Ebene und Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen in KZT-Zelllinien.

Im oberen Bereich ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender Amplikons der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) mit einer Größe von 252 Bp sowie ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. Es ist jeweils ein exemplarisches Beispiel von drei unabhängigen RT-PCR-Experimenten dargestellt. Darunter sind die Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des MHC-Klasse-I Moleküls (MHC-I) und der Isotypkontrolle (IK) der KZT-Zelllinien grafisch dargestellt. Zur durchflusszytometrischen Messung der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression kam der spezifisch gegen MHC-Klasse-I gerichtete Phycoerythrin (PE)-konjugierte Antikörper HC zum Einsatz. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen.

Die APM-Komponenten β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin wurden in den KZT-Zelllinien ebenfalls heterogen exprimiert (Abb. 4.19). Im Vergleich zu den undifferenzierten KZT-Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.1 und der differenzierten KZT-Zelllinie 1777NRpmet konnte in den differenzierten KZT-Zelllinien JEG-3, JAR, H12.1D und 1411HP eine hohe Proteinexpression aller vier APM-Komponenten detektiert werden. Auf mRNA-Ebene konnte dieses Proteinexpressionsniveau in den meisten Fällen bestätigt werden. Auffällig war die gegenüber der undifferenzierten EC-Zelllinie H12.1 deutlich erhöhte Proteinexpression von β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin in der differenzierten EC-Zelllinie H12.1D. Auf mRNA-Ebene konnten in diesem Fall keine starken Expressionsunterschiede detektiert werden.

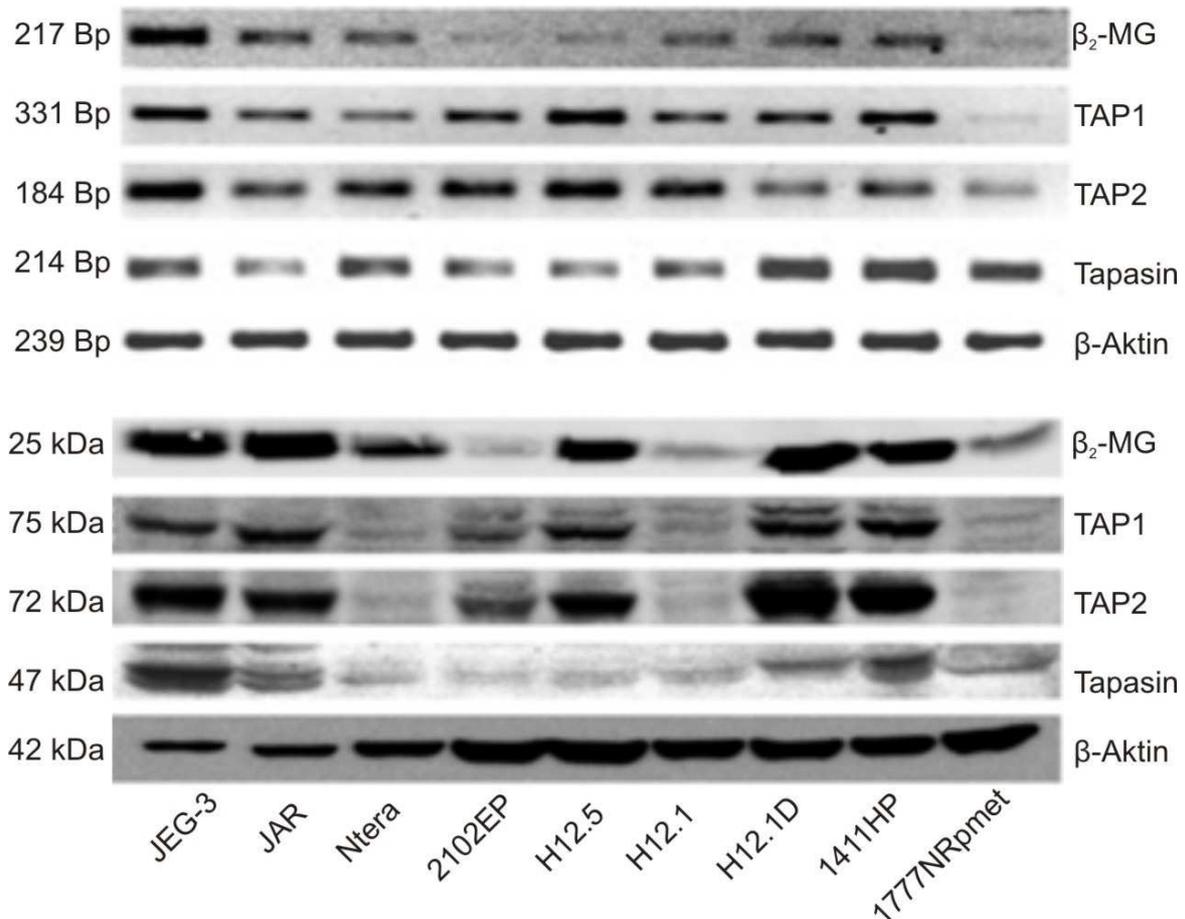


Abb. 4.19: Expression von β_2 -Mikroglobulin, TAP1, TAP2 und Tapasin auf mRNA- und Proteinebene in KZT-Zelllinien.

Im oberen Bereich sind 1,5%ige TAE-Agarosegele korrespondierender Amplikons von β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG), TAP1, TAP2 und Tapasin mit einer Größe von 217 Bp, 331 Bp, 184 Bp und 214 Bp sowie ein 1,5%iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. Im unteren Bereich ist die Proteinexpression des jeweiligen MHC-Klasse-I APM Moleküls und des Standardproteins β -Aktin im Western Blot dargestellt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der APM-Proteine kamen die unter 2.11. aufgelisteten Antikörper zum Einsatz. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens zwei unabhängigen RT-PCR bzw. Western Blot Experimenten gezeigt.

4.2.3. Somatische Differenzierung und Expressionsanalyse wichtiger

Komponenten der MHC-Klasse-I APM der testikulären KZT-Zelllinie H12.1

Für die Untersuchung der Expression und funktionellen Bedeutung der MHC-Klasse-I APM-Komponenten während der Differenzierung von KZT-Zellen wurde die undifferenzierte testikuläre KZT-Zelllinie H12.1 als Modellsystem herangezogen. Die Zelllinie wurde mit verschiedenen Konzentrationen (1; 5; 10 und 20 μ M) der differenzierungsinduzierenden Substanz *all-trans*-Retinsäure (ATRA) behandelt (3.4.2) und die Expression der APM-Komponenten im Laufe der Differenzierung analysiert. Für alle ATRA-Konzentrationen

wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Im Folgenden sind die Untersuchungen und Expressionsanalysen exemplarisch für die Differenzierung von H12.1 mit 10 μM ATRA gezeigt.

Während der 12-tägigen ATRA-Behandlung von H12.1 wurden die Zellen nach jedem Ernteschritt (alle drei Tage) gezählt. Zu Beginn der ATRA-Behandlung und nach jedem Ernteschritt erfolgte die Aussaat von 2000 Zellen pro cm^2 . Die während der Behandlung ermittelten Zellzahlen wurden auf diese „Ausgangszellzahl“ bezogen und als x-faches Wachstum grafisch dargestellt (Abb. 4.20). Während sich die Zellzahl ATRA-behandelter sowie unbehauelter und mit dem Lösungsmittel ETOH-behandelter H12.1 Zellen während des Differenzierungsprozesses im Durchschnitt vervierfachte, wurde für die ATRA-behandelten Zellen ab dem neunten Tag ein 1,5-faches Wachstum ermittelt. Ab dem zwölften Tag konnte kein weiteres Wachstum der ATRA-behandelten Zellen bestimmt werden und die Differenzierung galt als abgeschlossen. Somit wurde ab dem neunten Tag ein antiproliferierender Effekt von ATRA auf die H12.1 Zellen beobachtet.

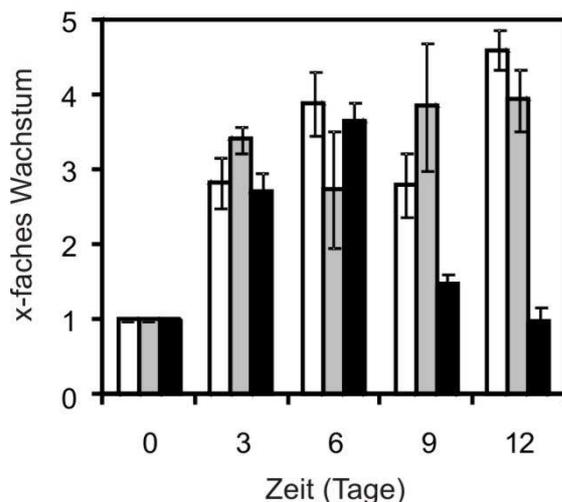


Abb. 4.20: x-faches Wachstum der Zelllinie H12.1 während des Differenzierungsprozesses.

Die 12-tägige Behandlung der H12.1 Zellen mit 10 μM ATRA erfolgte wie unter 3.4.2. beschrieben. Die Zellzahl wurde zum Zeitpunkt „null Tage“ sowie nach jedem 3-tägigem Ernteschritt bestimmt und auf die „Ausgangszellzahl“ von 2000 Zellen pro cm^2 bezogen. Grafisch dargestellt ist das x-fache Wachstum unbehauelter (weiße Balken), ETOH behandelte (graue Balken) und ATRA behandelte (schwarze Balken) H12.1 Zellen während des Differenzierungsprozesses. Die Zellzahlen wurden jeweils dreimal unabhängig bestimmt, woraus sich die entsprechenden Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben.

Während der Behandlung von H12.1 mit ATRA bzw. der korrespondierenden Lösungsmittelmenge ETOH, wurden die zytotoxischen Effekte dieser Substanzen untersucht. Nach jedem 3-tägigem Ernteschritt von H12.1 erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff 7AAD und eine anschließende durchflusszytometrische

Analyse. Da der Farbstoff nur in lebende Zellen eindringt, steht der Prozentsatz 7AAD-positiver Zellen für den Anteil der toten Zellen. Als Positivkontrolle wurden H12.1 Zellen für 24 h mit 1 mM des Chemotherapeutikums Cisplatin behandelt. Zu Beginn der ATRA-Behandlung (Tag 0) betrug der Anteil toter Zellen 1,5 - 2 %. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnten nach drei, sechs, neun und zwölf Tagen keine erhöhten zytotoxischen Effekte nach ATRA- bzw. ETOH-Behandlung gemessen werden. Der Anteil toter Zellen lag sowohl nach ATRA- bzw. ETOH-Behandlung als auch bei unbehandelten Zellen zwischen 3 - 6 % (Tag 3), 3 - 8 % (Tag 6), 4 - 9 % (Tag 9) und 12 - 18 % (Tag 12). Nach der Behandlung der H12.1 Zellen mit Cisplatin wurden 42 - 47 % 7AAD-positive Zellen detektiert. In der Abbildung 4.21 ist der Anteil lebender und toter Zellen nach der jeweiligen 12-tägigen Behandlung von H12.1 sowie nach der Behandlung von H12.1 Zellen mit 1 mM Cisplatin dargestellt.

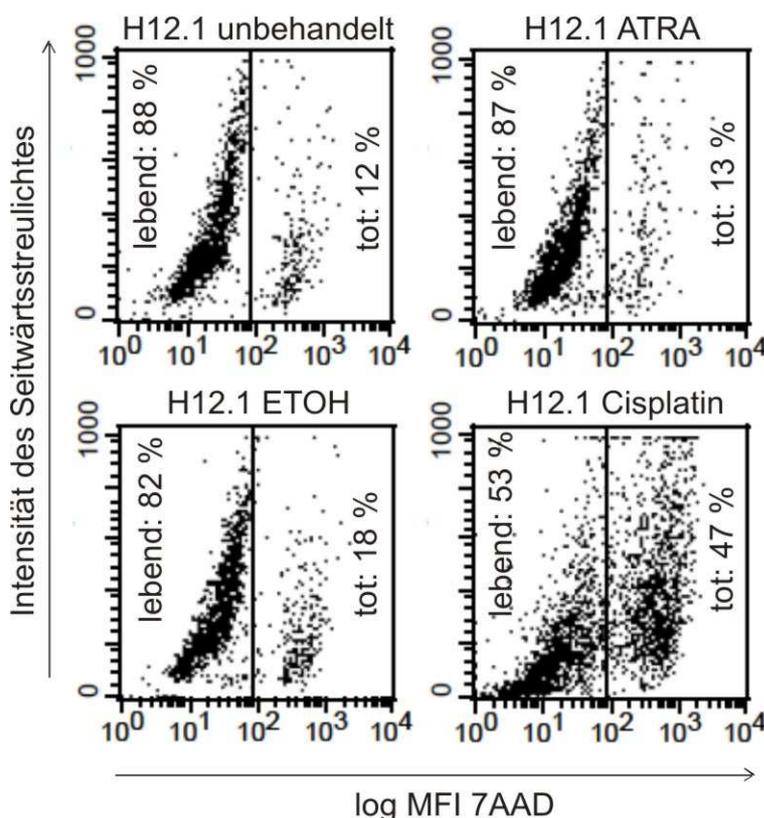


Abb. 4.21: Anteil lebender und toter H12.1 Zellen nach Abschluss der Differenzierung.

Die 12-tägige Behandlung der H12.1 Zellen mit 10 μ M ATRA erfolgte wie unter 3.4.2. beschrieben. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit dem Farbstoff 7-Amino-Aktinomycin D (7AAD) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Der Prozentsatz lebender (7AAD negativ) und toter Zellen (7AAD positiv) von unbehandelten, mit ETOH bzw. ATRA und Cisplatin (Positivkontrolle) behandelten Zellen ist im jeweiligem Dot Blot angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) von 7AAD.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden nach Abschluss des Differenzierungsprozesses lichtmikroskopisch festgehalten (Abb. 4.22). Im Vergleich zu den unbehandelten und ETOH-behandelten Kontrollzellen wiesen die ATRA-behandelten Zellen einen geringeren Konfluenzgrad auf (Kontrollzellen 80 - 90 % Konfluenz, ATRA behandelte Zellen 20 - 30 % Konfluenz). Weiterhin zeichneten sich die Kontrollzellen durch ein geringeres Zytoplasma:Kern Verhältnis als die ATRA-behandelten Zellen aus. Zudem konnte nach der Differenzierung eine Zunahme der Zellgröße beobachtet werden.

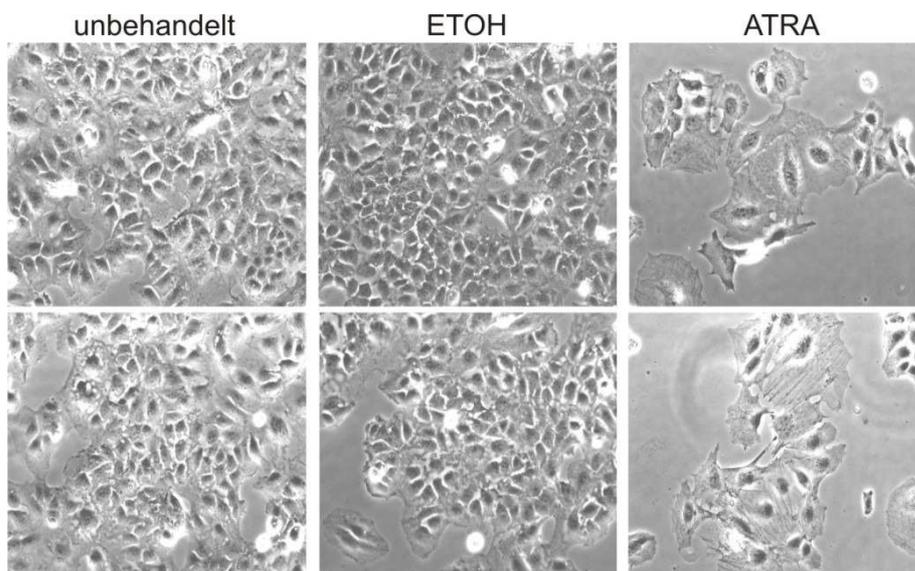


Abb. 4.22: Morphologie unbehandelter bzw. ETOH-behandelter H12.1 Kontrollzellen und ATRA-behandelter H12.1 Zellen nach Abschluss der Differenzierung.

Gezeigt sind jeweils zwei exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter (links), mit ETOH-behandelter (mitte) und mit ATRA-behandelter (rechts) H12.1 Zellen nach dem Abschluss der Differenzierung (nach zwölf Tagen). Vergrößerung: 100-fach.

Zur Untersuchung der erfolgreichen Differenzierung von H12.1 wurde die Expression der beiden Marker Oct-4 und Alkalische Phosphatase (AP) auf mRNA-Ebene mittels „Echt-Zeit“-PCR und auf Proteinebene im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde die differenzierte Zelllinie H12.1D verwendet. Es ist bekannt, dass beide Marker in undifferenzierten embryonalen Karzinomzellen exprimiert werden. Die Expression der Moleküle wird im Laufe der Differenzierung herab reguliert (Damjanov *et al.*, 1993; Schoorlemmer *et al.*, 1995).

Während Oct-4 auf mRNA- und Proteinebene von den Kontrollzellen relativ gleichmäßig exprimiert wurde, nahm die Expression des Markers in ATRA-behandelten Zellen im Laufe des Differenzierungsprozesses ab. Im Vergleich zu den für zwölf Tage mit ATRA differenzierten H12.1 Zellen konnte für die Zelllinie H12.1D eine geringe mRNA-Expression aber keine Proteinexpression von Oct-4 detektiert werden (Abb. 4.23).

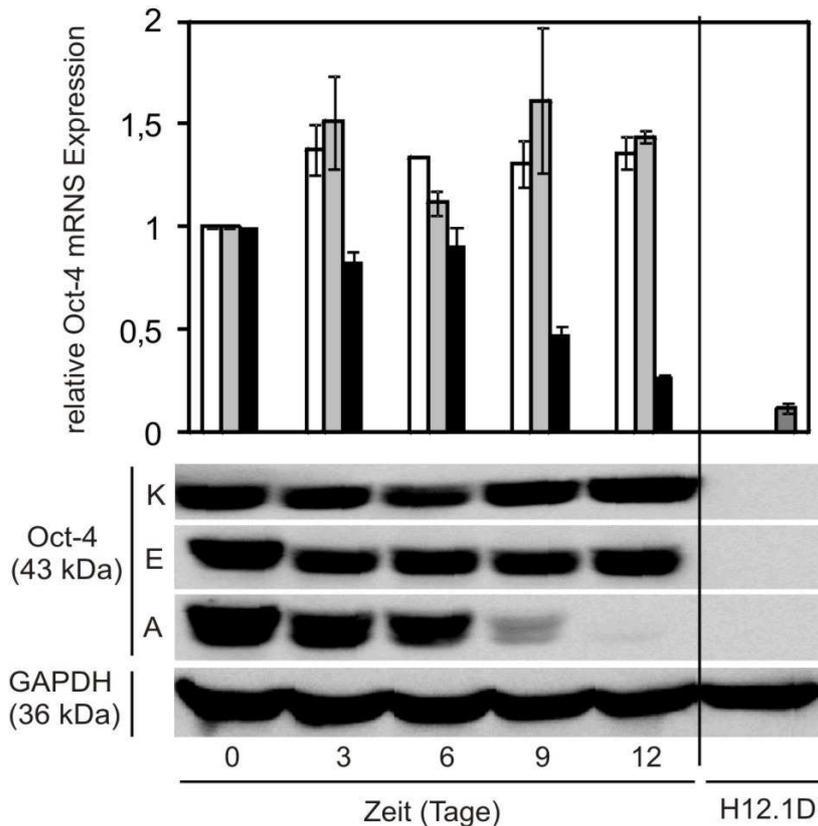


Abb. 4.23: Expression von Oct-4 während der Behandlung der H12.1 Zellen mit ATRA bzw. ETOH.

Grafisch dargestellt ist die Oct-4-mRNS-Expression unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression von Oct-4 und des Standardproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von Oct-4 erfolgte unter der Verwendung des Antikörpers Oct-3/4 (C-10), welcher spezifisch gegen die Isoform 1 von Oct-4 gerichtet ist. Es wurden 30 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Auch der Marker AP wurde in den Kontrollzellen relativ gleichmäßig auf mRNA- und Proteinebene exprimiert, wohingegen die Expression des Moleküls in den ATRA-behandelten Zellen stark abnahm. Im Vergleich zu den undifferenzierten H12.1 Zellen zeichnete sich die differenzierte Kontrollzelllinie H12.1D durch eine geringere Expression von AP auf mRNA-Ebene aus. Eine Proteinexpression von AP wurde in den H12.1D-Zellen nicht detektiert (Abb. 4.24). Somit konnte unter dem Einsatz verschiedener ATRA-Konzentrationen (1, 5, 10 und 20 µM) nach zwölf Tagen eine Differenzierung der H12.1 Zellen erreicht werden, welche durch die nahezu vollständige Herabregulation der Expression von Oct-4 und AP gekennzeichnet war.

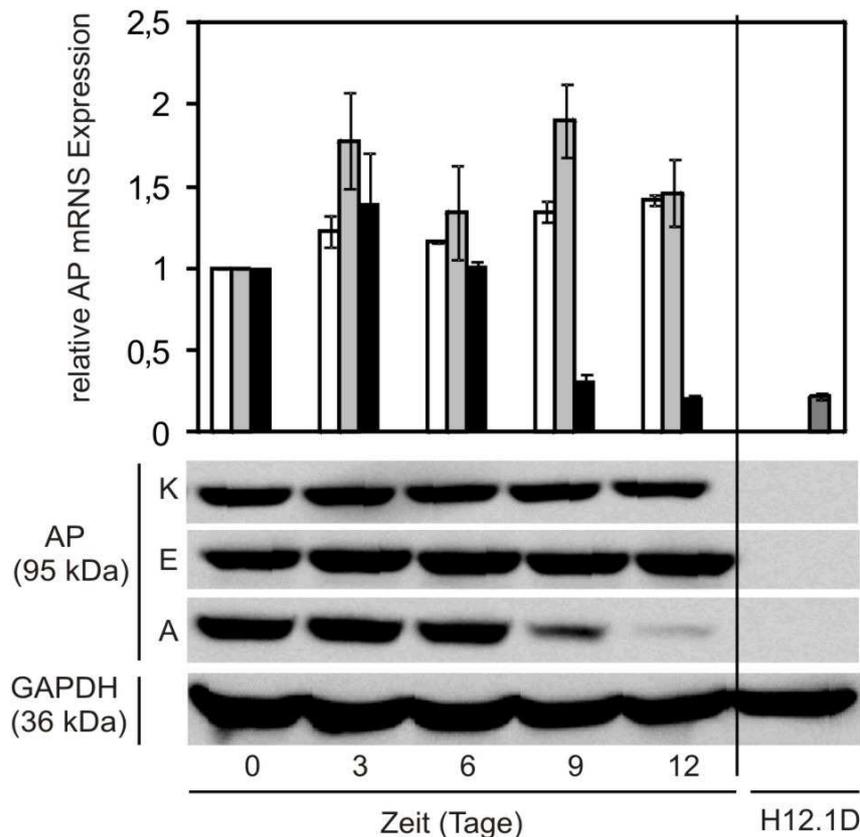


Abb. 4.24: Expression der Alkalischen Phosphatase während der Behandlung der H12.1 Zellen mit ATRA bzw. ETOH.

Grafisch dargestellt ist die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase (AP) unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression der AP und des Standardproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion der AP erfolgte unter der Verwendung des Antikörpers Alkalische Phosphatase (TRA-2-54). Es wurden 30 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Im Laufe des Differenzierungsprozesses von H12.1, d.h. zum Zeitpunkt „null Tage“ sowie nach jedem Ernteschritt (nach drei, sechs, neun und zwölf Tagen) wurde die mRNA- und Proteinexpression der MHC-Klasse-I APM Komponenten mittels „Echt-Zeit“-PCR, Durchflusszytometrie und Western Blot analysiert.

Die mRNA- und Proteinexpression von HC und die Zelloberflächenexpression des MHC-Klasse-I Moleküls während der Differenzierung von H12.1 sind in Abb. 4.25 dargestellt.

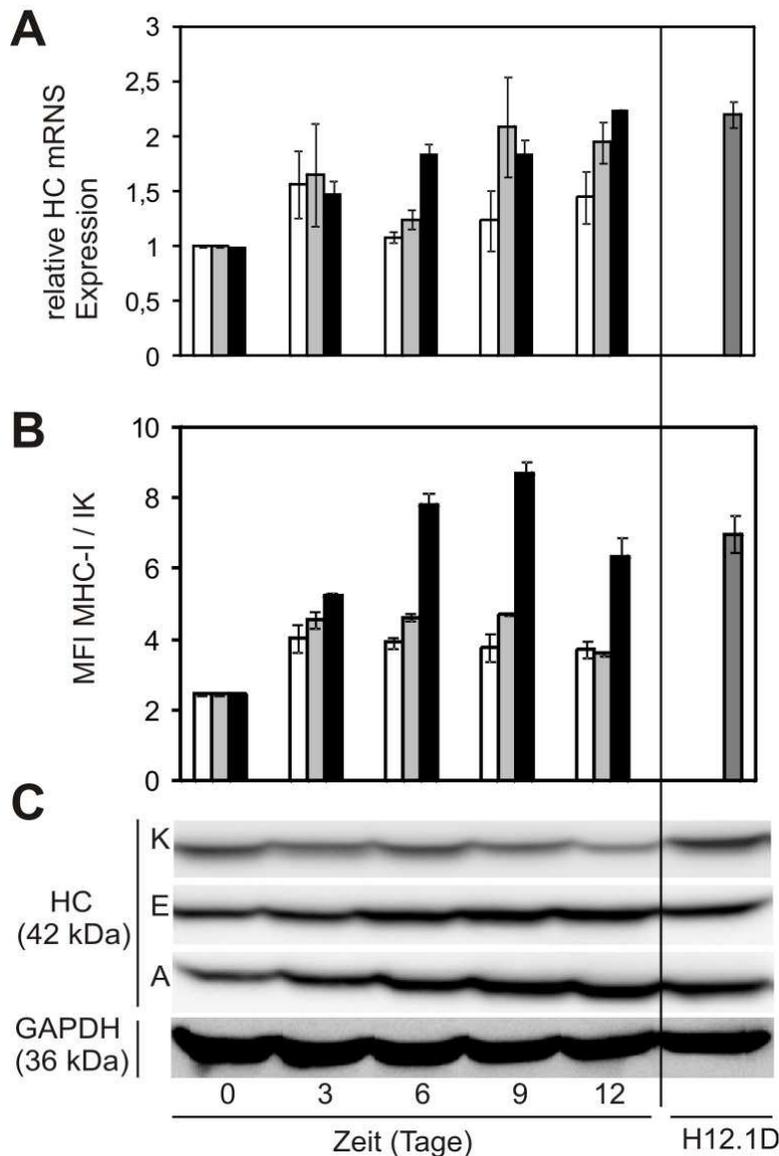


Abb. 4.25: Expression von MHC-Klasse-I während der Differenzierung von H12.1 mit ATRA.

A - Grafisch dargestellt ist die mRNA-Expression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. B - Dargestellt sind die Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des MHC-Klasse-I Moleküls (MHC-I) und der Isotypkontrolle (IK) unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Zur durchflusszytometrischen Messung der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression kam der spezifisch gegen MHC-Klasse-I gerichtete Phycoerythrin (PE)-konjugierte Antikörper HC zum Einsatz. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen. C - Gezeigt ist die korrespondierende Proteinexpression der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls (HC) sowie des Standardproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Western Blot (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von HC erfolgte unter der Verwendung des Antikörpers HC10. Es wurden 30 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Während in den unbehandelten H12.1 Zellen auf mRNA-Ebene eine relativ homogene HC-Expression gemessen wurde, so konnte in den mit ETOH- und mit ATRA behandelten H12.1 Zellen eine Zunahme der mRNA-Expression dieses Moleküls detektiert werden, welche nach 12-tägiger Behandlung mit der HC-mRNA-Expression der differenzierten Zelllinie H12.1D vergleichbar war. Im Laufe der Behandlung der H12.1 Zellen mit ATRA konnte eine Erhöhung der Proteinexpression von HC und eine Zunahme der Expression des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberfläche detektiert werden. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten eine relativ gleichmäßige und die mit ETOH behandelten H12.1 Zellen eine leicht erhöhte MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression. Der größte Unterschied in der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression von unbehandelten bzw. mit ETOH behandelten H12.1 Zellen und mit ATRA behandelten H12.1 Zellen war nach neun Tagen erkennbar. Während die MFI-Werte (MHC-Klasse-I/IK) der unbehandelten und mit ETOH behandelten H12.1 Zellen im Bereich von 3,7 bis 4,7 lagen; so wurde für die mit ATRA behandelten H12.1 Zellen ein MFI-Wert (MHC-Klasse-I/IK) von 8,7 gemessen (Abb. 4.25).

Desweiteren wurde die Expression der leichten Kette des MHC-Klasse-I Moleküls β_2 -Mikroglobulin während der Differenzierung von H12.1 untersucht. Auf mRNA-Ebene konnte in den ATRA-behandelten Zellen eine bis zu 5-fache Erhöhung der β_2 -MG-Expression nach neun und zwölf Tagen gemessen werden. In den unbehandelten Kontrollzellen wurde eine 1,5- bis 2-fache Erhöhung der mRNA-Expression dieses Moleküls nach neun und zwölf Tagen detektiert. Die mit ETOH-behandelten Zellen wiesen eine 2,2- bis 2,7-fach erhöhte mRNA-Expression nach drei bis zwölf Tagen auf. Die β_2 -MG-mRNA-Expression der differenzierten Zelllinie H12.1D war mit der mRNA-Expression dieses Moleküls in unbehandelten H12.1 Zellen vergleichbar. Die Proteinexpression von β_2 -MG erhöhte sich im Laufe der Differenzierung der H12.1 Zellen, wobei nach neun Tagen bereits eine stärkere Expression als in den H12.1D Zellen detektiert wurde. Die unbehandelten und mit ETOH behandelten Kontrollzellen zeichneten sich durch eine schwache β_2 -MG-Proteinexpression aus (Abb. 4.26).

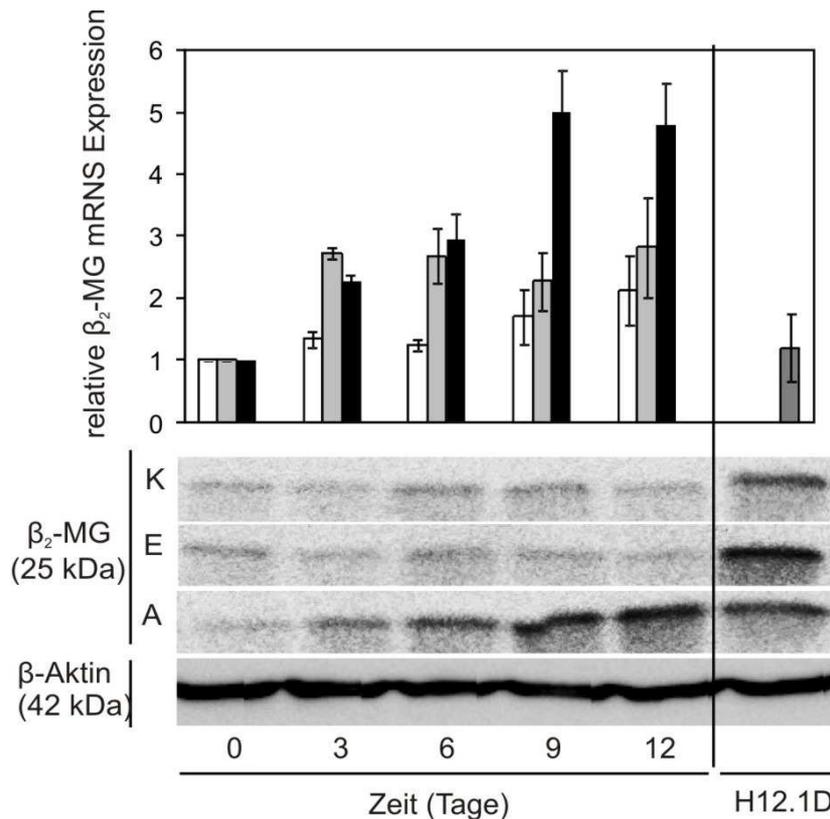


Abb. 4.26: Expression von β_2 -Mikroglobulin während der Differenzierung von H12.1 mit ATRA. Grafisch dargestellt ist die β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG)-mRNS-Expression unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression von β_2 -MG und des Standardproteins β -Aktin im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von β_2 -MG erfolgte unter der Verwendung des unter 2.11. angegebenen spezifischen β_2 -MG Antikörpers. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Neben der Untersuchung der Expression von HC, β_2 -MG und des MHC-Klasse-I Moleküls auf der Zelloberfläche während der Differenzierung von H12.1, wurde die Expression von TAP1 und TAP2, analysiert. Es konnte eine, im Vergleich zu den H12.1 Kontrollzellen und der differenzierten Zelllinie H12.1D, deutliche Erhöhung der TAP1-mRNS-Expression in Laufe der ATRA-Behandlung von H12.1 detektiert werden. Nach 9- und 12-tägiger ATRA Behandlung wurde eine 10- bis 12-fache Erhöhung der mRNA-Expression dieses Moleküls gemessen. Die Proteinexpression dieses Moleküls erhöhte sich ebenfalls während der ATRA-Behandlung und war nach 9- bis 12-tägiger Behandlung mit der TAP1-Expression von H12.1D vergleichbar. In den Kontrollzellen wurde das Protein gleichbleibend schwach exprimiert (Abb. 4.27).

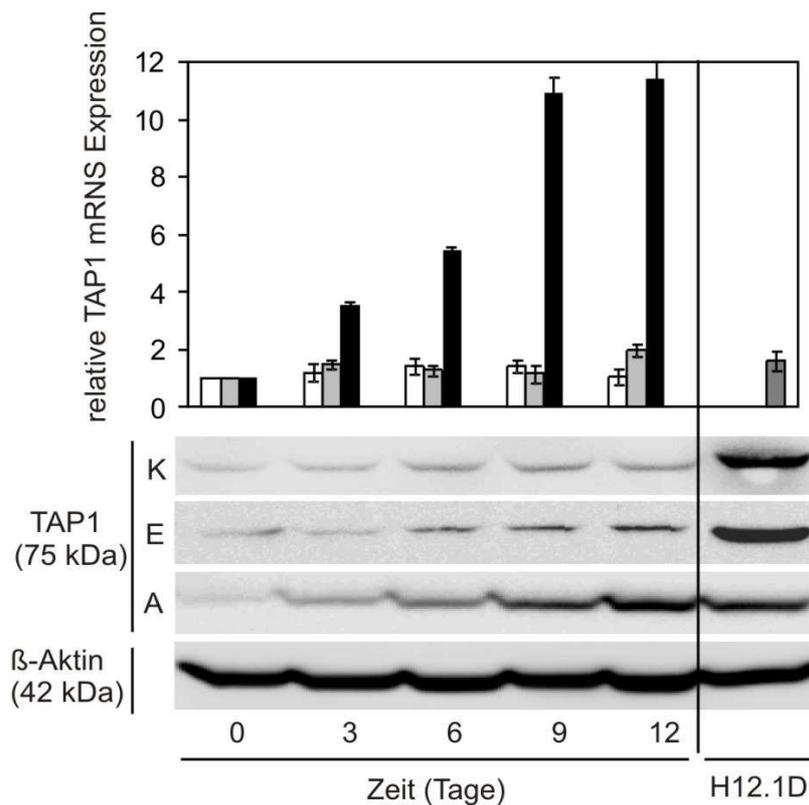


Abb. 4.27: Expression von TAP1 während der Differenzierung von H12.1 mit ATRA.

Grafisch dargestellt ist die TAP1 mRNA-Expression unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression von TAP1 und des Standardproteins β -Aktin im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von TAP1 erfolgte unter der Verwendung des unter 2.11. angegebenen spezifischen TAP1-Antikörpers. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Für TAP2 konnte eine bis zu 3-fach erhöhte mRNA-Expression in den ATRA-behandelten Zellen nach neun bis zwölf Tagen beobachtet werden. In den mit ETOH behandelten Zellen wurde eine bis zu 2-fach erhöhte mRNA-Expression dieses Moleküls nach zwölf Tagen gemessen. Die unbehandelten Zellen zeichneten sich durch eine gleichbleibende schwache TAP2-mRNA-Expression aus. Die Proteinexpression von TAP2 stieg während der Differenzierung von H12.1 deutlich auf das TAP2 Proteinexpressionsniveau der differenzierten Zelllinie H12.1D an, während in den Kontrollzellen eine gleichbleibend schwache Proteinexpression detektiert wurde (Abb. 4.28).

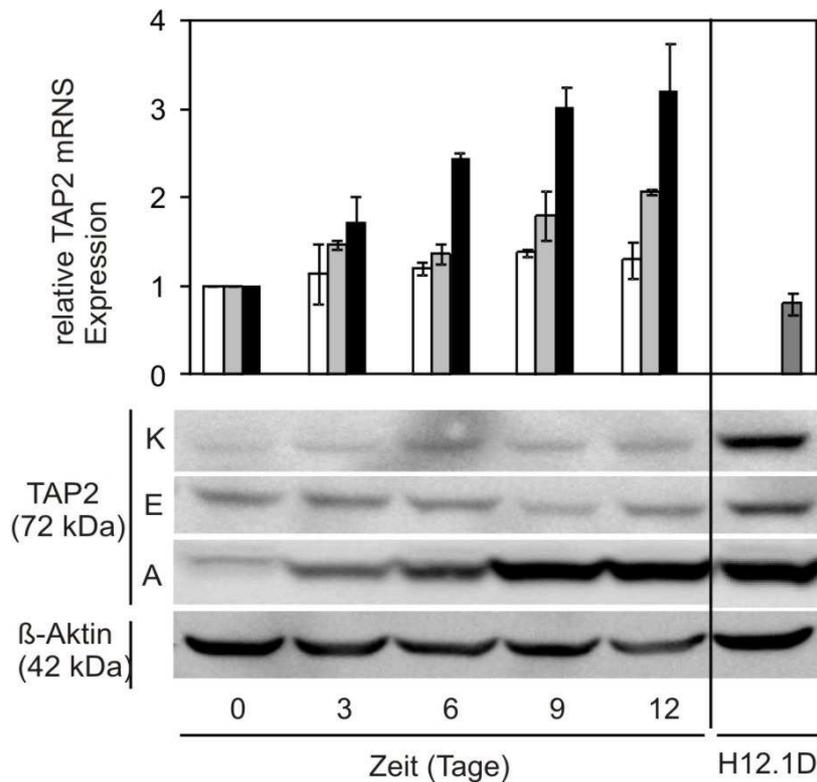


Abb. 4.28: Expression von TAP2 während der Differenzierung von H12.1 mit ATRA.

Grafisch dargestellt ist die TAP2-mRNS-Expression unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression von TAP2 und des Standardproteins β -Aktin im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von TAP2 erfolgte unter der Verwendung des unter 2.11. angegebenen spezifischen TAP2-Antikörpers. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

Desweiteren wurde die Expression des Chaperons Tapasin während der Differenzierung untersucht. Wie in Abb. 4.29 zu sehen ist, konnte in ATRA behandelten Zellen eine bis zu 6,5-fache Erhöhung der Tapasin-Expression auf mRNS-Ebene nach neun Tagen detektiert werden, während die Kontrollzellen eine gleichbleibend schwache mRNS-Expression zeigten. Im Vergleich zu den H12.1 Kontrollzellen, wies die H12.1D Zelllinie eine 4,5-fache Tapasin-mRNS-Expression auf. Auf Proteinebene konnte eine deutliche Erhöhung der Tapasin-Expression in den mit ATRA behandelten H12.1 Zellen detektiert werden, welche nach neun und zwölf Tagen mit der Expression des Moleküls in H12.1D Zellen vergleichbar war. Unbehandelte und mit ETOH behandelte H12.1 Zellen hingegen zeichneten sich durch eine schwache Tapasin-Proteinexpression aus.

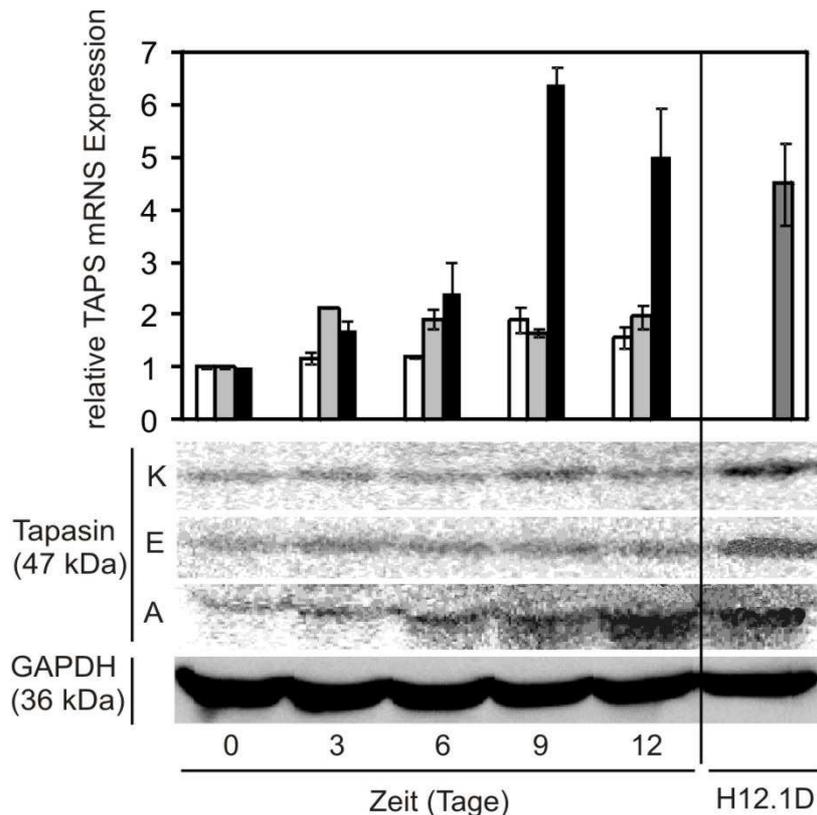


Abb. 4.29: Expression von Tapasin während der Differenzierung von H12.1 mit ATRA.

Grafisch dargestellt ist die Tapasin mRNA-Expression unbehandelter (weiße Balken), ETOH-behandelter (graue Balken) und ATRA-behandelter (schwarze Balken) H12.1 Zellen zu den Zeitpunkten null, drei, sechs, neun und zwölf Tage sowie der differenzierten Kontrollzelllinie H12.1D (dunkelgrauer Balken). Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei analysierten cDNS pro „Echt-Zeit“-PCR Experiment. Exemplarisch ist hier ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen „Echt-Zeit“-PCR-Experimenten gezeigt. Darunter ist die korrespondierende Proteinexpression von Tapasin (TAPS) und des Standardproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Western Blot gezeigt (K = unbehandelte Kontrollzellen, E = ETOH-behandelte Zellen, A = ATRA behandelte Zellen). Die Detektion von TAPS erfolgte unter der Verwendung des unter 2.11. angegebenen spezifischen TAPS-Antikörpers. Es wurden 30 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Western Blot Experimenten.

4.2.4. Bedeutung der differenzierungs-vermittelten Erhöhung der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf H12.1 Zellen für die Immunantwort

Nach 9-tägiger Differenzierung der embryonalen Karzinomzelllinie H12.1 konnte eine Zunahme der Proteinexpression von HC, β_2 -MG, TAP1, TAP2 und TAPS sowie eine Verdopplung der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression detektiert werden. Die MFI-Werte (MHC-I/IK) der H12.1 Kontrollzellen lagen im Bereich von 3,7 bis 4,7 und der MFI-Wert (MHC-I/IK) der mit ATRA differenzierten H12.1 Zellen lag bei $8,7 \pm 0,23$ (Abb. 4.30).

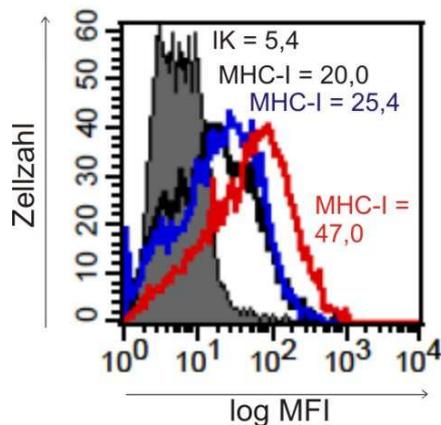


Abb. 4.30: Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche von undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen.

Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des PE-konjugierten spezifischen Antikörpers gegen MHC-Klasse-I (MHC-I) (weiß) unbehandelter (schwarze Linie), mit ETOH behandelter (blaue Linie) sowie mit ATRA behandelter (rote Linie) H12.1 Zellen nach neun Tagen. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK und von MHC-Klasse-I sind im Histogramm angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Zunahme der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen eine Bedeutung für die Aktivierung allogener CD8⁺ T-Lymphozyten sowie der NK-Zell-vermittelten Lyse hat.

4.2.4.1. Bedeutung der erhöhten Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen für die Aktivierung allogener CD8⁺ T-Zellen

Wie bereits unter 1.1. beschrieben, führt die Bindung von antigenspezifischen Rezeptoren sowie des CD8-Corezeptors der T-Zellen an Peptid-MHC-Komplexe der antigenpräsentierenden Zelle und ein costimulierendes Signal zur T-Zell-Aktivierung. Es wurde vermutet, dass die erhöhte Proteinexpression der MHC-Klasse-I APM Komponenten sowie die Verdopplung der MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression der differenzierten H12.1 Zellen zu einer verbesserten Antigenprozessierung sowie Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche führt, was sich auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auswirken könnte. Neben der Ausschüttung von Perforinen und Granzymen zeichnen sich aktivierte CD8⁺ T-Zellen durch die Produktion von IFN- γ aus. Desweiteren kommt es nach der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zur verstärkten Proliferation dieser Lymphozyten.

Deshalb wurde untersucht, in wie weit die erhöhte Expression von MHC-Klasse-I APM Komponenten der differenzierten H12.1 Zellen zur Induktion bzw. Erhöhung der Aktivität von allogenen CD8⁺ T-Zellen führt. Die Isolierung von CD8⁺ T-Zellen erfolgte mittels magnetischer Zell-Sortierung (MACS). Anschließend wurde die Reinheit der isolierten T-Zellen mittels CD8-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Unter den isolierten Zellen konnten 95-98 % CD8⁺ T-Zellen detektiert werden.

Zunächst wurde die IFN- γ -Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach 16 h Cokultivierung mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen unter Verwendung des IFN- γ -Assays (3.12.2.) gemessen. Es wurden Cokulturen allogener CD8⁺ T-Lymphozyten (Reinheit 95 - 98 %) von drei Spendern und unbehandelten sowie für neun Tage mit ETOH behandelten und mit 10 μ M ATRA differenzierten H12.1 Zellen hergestellt. Zur Vermeidung von zytotoxischen Nebeneffekten durch ATRA bzw. ETOH wurden die mit ETOH- und ATRA behandelten H12.1 Zellen vor der Cokultivierung mit den CD8⁺ T-Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Als Positivkontrolle wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit 10 pg/ μ l PMA sowie 10 pg/ μ l Ionomycin aktiviert. Die Kultivierung von CD8⁺ T-Zellen in Medium ohne weitere Zusätze diente als Negativkontrolle (unstimulierte CD8⁺ T-Zellen). In der Abbildung 4.31 sind die Ergebnisse exemplarisch für einen T-Zell-Spender dargestellt.

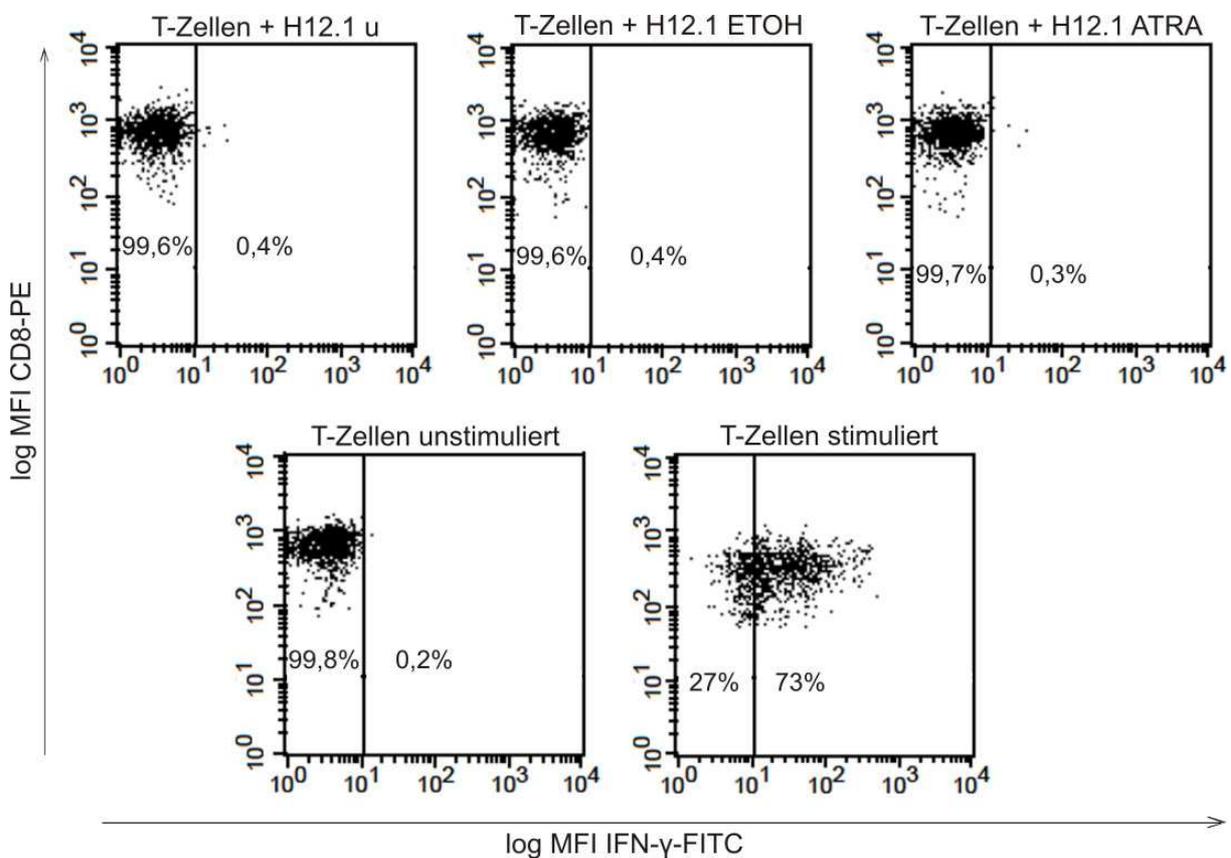


Abb. 4.31: Prozentualer Anteil IFN- γ -produzierender allogener CD8⁺ T-Zellen nach Cokultivierung mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen.

In den jeweiligen Dot Blots ist der prozentuale Anteil IFN- γ negativer (links) sowie IFN- γ positiver (rechts) CD8⁺ T-Zellen nach 16 h Cokultivierung mit undifferenzierten H12.1 Zellen (neun Tage unbehandelt bzw. mit ETOH behandelt) sowie mit differenzierten H12.1 Zellen (neun Tage mit 10 μ M ATRA behandelt) gezeigt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte CD8⁺ T-Zellen (16 h Kultivierung in Medium ohne weitere Zusätze) und als Positivkontrolle für 16 h mit 10 pg/ μ l Phorbol Myristat Acetat (PMA) sowie mit 10 pg/ μ l Ionomycin stimulierte CD8⁺ T-Zellen verwendet. Es ist exemplarisch ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten (drei unabhängige T-Zell-Spender) gezeigt. y-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) der CD8-Zelloberflächenexpression [CD8-Phycoerythrin (PE)], x-Achse: log MFI von IFN- γ -Fluoresceinisothiocyanat (FITC).

Sowohl nach Kultivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten von drei verschiedenen Spendern mit undifferenzierten H12.1 Kontrollzellen als auch nach der Inkubation mit differenzierten H12.1 Zellen wurde keine IFN- γ -Produktion der CD8⁺ T-Zellen detektiert ($0,4 \pm 0,1$ % IFN- γ positive CD8⁺ T-Zellen). Während in den unstimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten (Negativkontrolle) ebenfalls keine IFN- γ -Produktion gemessen wurde ($0,3 \pm 0,1$ % IFN- γ positive CD8⁺ T-Zellen), konnte in den mit 10 pg/ μ l PMA sowie in den mit 10 pg/ μ l Ionomycin stimulierten CD8⁺ T-Zellen (Positivkontrolle) eine deutliche Produktion des Zytokins detektiert werden (71 ± 5 % IFN- γ positive CD8⁺ T-Zellen).

Nach der oben beschriebenen 16-stündigen Cokultivierung von CD8⁺ T-Zellen mit undifferenzierten und mit differenzierten H12.1 Zellen sowie nach der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen mittels PMA und Ionomycin (Positivkontrolle) wurde das durch die CD8⁺ T-Zellen sekretierte IFN- γ im Zellkulturüberstand mit Hilfe des IFN- γ -ELISA (3.14.5.2.) gemessen. Während in den Zellkulturüberständen der jeweiligen Cokulturen bzw. der Negativkontrolle (CD8⁺ T-Zellen im Medium ohne Zusätze) kein IFN- γ detektiert werden konnte, wurde im Zellkulturüberstand der Positivkontrolle $14,2 \pm 0,1$ pg/ml IFN- γ gemessen (Abb. 4.32).

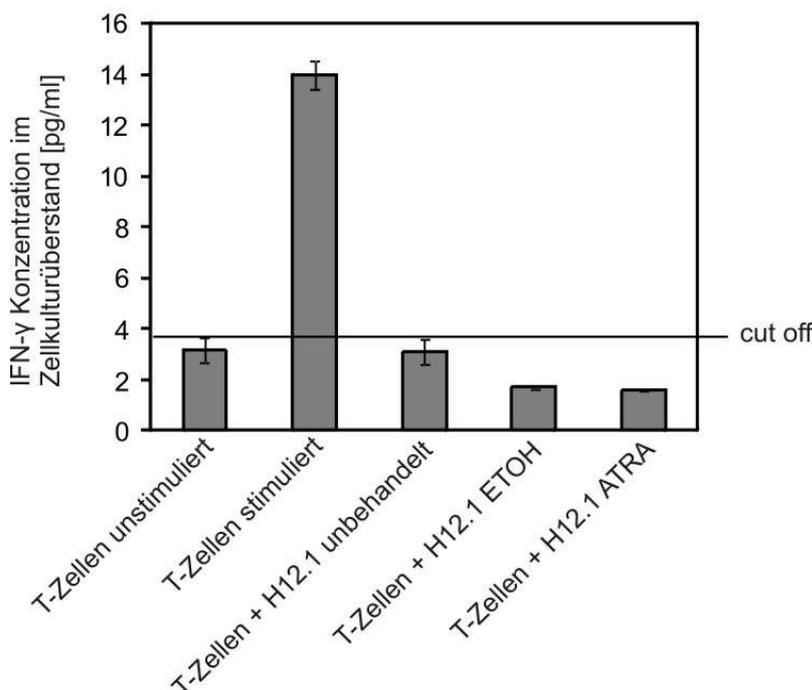


Abb. 4.32: IFN- γ im Zellkulturüberstand allogener CD8⁺ T-Zellen nach Cokultivierung mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen.

Grafisch dargestellt ist die Menge an IFN- γ im Zellkulturüberstand nach 16 h Kultivierung der CD8⁺ T-Zellen von drei unabhängigen Spendern mit undifferenzierten H12.1 Zellen (neun Tage unbehandelt bzw. mit ETOH behandelt) sowie mit differenzierten H12.1 Zellen (neun Tage mit 10 μ M ATRA behandelt). Als Negativkontrolle wurden unstimulierte CD8⁺ T-Zellen (16 h Kultivierung in Medium ohne weitere Zusätze) und als Positivkontrolle für 16 h mit 10 pg/ μ l Phorbol Myristat Acetat (PMA) sowie mit 10 pg/ μ l Ionomycin stimulierte CD8⁺ T-Zellen verwendet. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten (drei unabhängige T-Zell-Spender).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen drei verschiedener allogener Spender durch eine 5-tägige Cokultivierung mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen induziert wird. Die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe der unter 3.12.1. beschriebenen CFDA-SE-Markierung gemessen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass im Gegensatz zu nicht proliferierenden CFSE-gefärbten Zellen, proliferierende CFSE-gefärbte Zellen den Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen verteilen, was durchflusszytometrisch anhand der Bildung von CFSE-gefärbten Zellgenerationen detektiert werden kann, die eine verringerte CFSE-Färbung als die Ursprungszellen aufweisen.

Zunächst wurden die CD8⁺ T-Zellen mit dem Farbstoff CFSE gefärbt und anschließend für fünf Tage mit undifferenzierten (neun Tage unbehandelt bzw. mit ETOH behandelt) und differenzierten (neun Tage mit 10 µM ATRA behandelt) H12.1 Zellen kultiviert. Als Positivkontrolle wurden die CD8⁺ T-Zellen für fünf Tage mit 1 µg/ml eines CD3-Antikörpers (Klon OKT3) sowie 180 U/ml Interleukin-2 stimuliert. Die Negativkontrolle bestand aus CD8⁺ T-Zellen, die für fünf Tage in Medium ohne weitere Zusätze kultiviert wurden.

In der Abb. 4.33 ist der prozentuale Anteil proliferierender sowie nicht proliferierender CD8⁺ T-Zellen nach der 5-tägigen Cokultur mit unbehandelten bzw. mit ETOH behandelten und mit ATRA differenzierten H12.1 Zellen sowie der unstimulierten und stimulierten (IL-2 + CD3) CD8⁺ T-Zellen exemplarisch für einen T-Zell-Spender gezeigt. Nach der 5-tägigen Cokultivierung von CD8⁺ T-Zellen drei verschiedener allogener Spender mit undifferenzierten H12.1 Zellen proliferierten 10 ± 3 % der CD8⁺ T-Zellen. Die Cokultur von CD8⁺ T-Zellen mit differenzierten H12.1 Zellen führte zu einem Anteil von 22 ± 2 % proliferierender CD8⁺ T-Zellen. Von den mit IL-2 und CD3 stimulierten CD8⁺ T-Zellen proliferierten 96 ± 2 % (Positivkontrolle), was durchflusszytometrisch an der Bildung von CFSE-gefärbten Zellgenerationen nachgewiesen werden konnte. Der Prozentsatz proliferierender Zellen der unstimulierten Negativkontrolle betrug $0,5 \pm 0,2$ %. Somit konnte nach der Inkubation der CD8⁺ T-Zellen mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen für keinen T-Zell-Spender eine deutliche Proliferation anhand der Bildung von Tochterzellgenerationen detektiert werden.

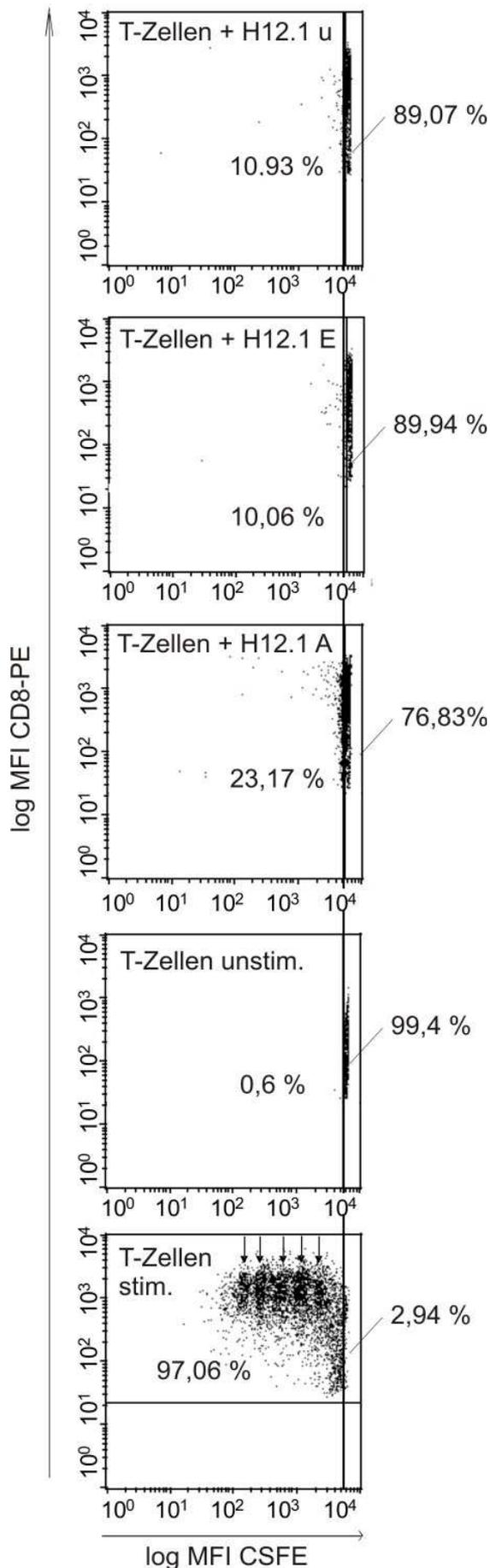


Abb. 4.33: Proliferation allogener CD8⁺ T-Zellen nach Cokultur mit undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen.

In den jeweiligen Dot Blots ist der prozentuale Anteil proliferierender (links) und nicht-prolierender (rechts) CD8⁺ T-Zellen eines allogenen Spenders nach 5-tägiger Kultivierung mit undifferenzierten H12.1 Zellen (neun Tage unbehandelt (u) bzw. mit ETOH (E) behandelt) sowie mit differenzierten H12.1 Zellen (neun Tage mit 10 μ M ATRA (A) behandelt) dargestellt. Als Positivkontrolle wurden für fünf Tage mit 1 μ g/ml eines CD3-Antikörpers (Klon OKT3) sowie 180 U/ml Interleukin-2 stimulierte (stim.) CD8⁺ T-Zellen und als Negativkontrolle unstimulierte (unstim.) CD8⁺ T-Zellen nach 5-tägiger Kultivierung in Medium ohne weitere Zusätze verwendet. Die Tochterzellgenerationen der stimulierten CD8⁺ T-Zellen sind mit Pfeilen markiert. Es ist ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. y-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) der CD8 Zelloberflächenexpression [CD8- Phycoerythrin (PE)], x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) von Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CSFE).

4.2.4.2. Bedeutung der erhöhten Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen für die NK-Zell-vermittelten Lyse

Wie unter 1.1.1. beschrieben, führt die Bindung von inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen an MHC-Klasse-I Moleküle der antigenpräsentierenden Zelle zur Suppression der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. Demnach sollte eine erhöhte Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen die antigenpräsentierende Zelle vor der Lyse durch NK-Zellen schützen. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit sich die erhöhte MHC-Klasse-I Zelloberflächenexpression differenzierter H12.1 Zellen auf die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen auswirkt. Neben der Interaktion von inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen mit MHC-Klasse-I Molekülen kann die zytotoxische Aktivität dieser Zellen durch die Bindung ihrer aktivierenden Rezeptoren mit den Liganden MICA, MICB sowie ULBP1-3 erhöht werden (Pezzutto *et al.*, 1998). Falls die Differenzierung der H12.1 Zellen zu einer veränderten Expression dieser Liganden führt, hätte dies womöglich einen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Daher wurde zunächst die Oberflächenexpression dieser Liganden in unbehandelten H12.1 Zellen und nach einer 9-tägigen Differenzierung von H12.1 Zellen mit 10 μ M ATRA bzw. Behandlung mit ETOH untersucht.

Wie in Abb. 4.34 zu sehen ist, konnte sowohl auf den undifferenzierten (neun Tage unbehandelt bzw. mit ETOH behandelt) als auch auf den mit ATRA-differenzierten H12.1 Zellen keine Expression von MICA und ULBP1 - 3 detektiert werden. MICB wurde von den undifferenzierten Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert. Nach der Differenzierung konnte eine Abnahme der MICB-Oberflächenexpression um $34,7 \pm 0,1$ % gemessen werden (MFI MICB/IK undifferenzierte Zellen = $2,6 \pm 0,3$; differenzierte Zellen = $1,7 \pm 0,2$). Mit Ausnahme von MICB konnte somit der Einfluss der NK-Zell-Liganden MICA und ULBP1 - ULBP3 auf die NK-Zell vermittelte Lyse von undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen ausgeschlossen werden. Die verringerte Zelloberflächenexpression von MICB und/oder die erhöhte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche von differenzierten H12.1 Zellen könnten möglicherweise zur verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den H12.1 Zellen führen.

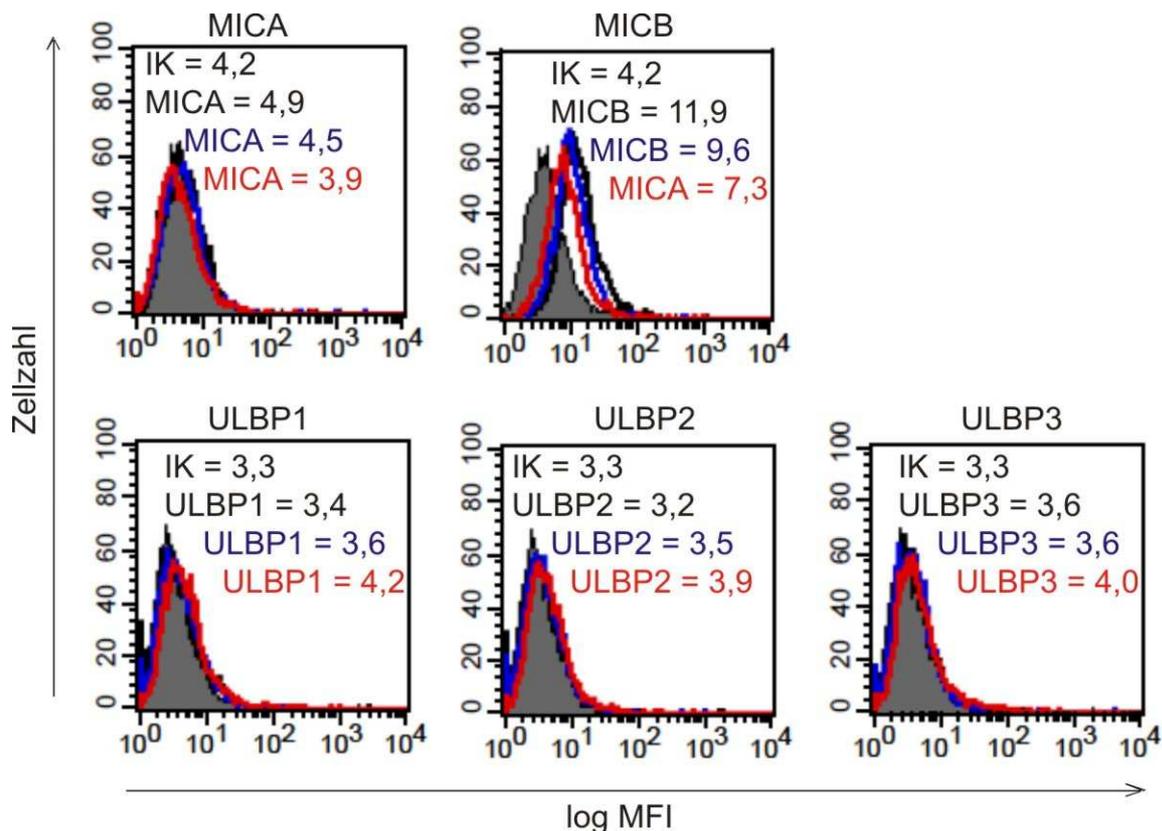


Abb. 4.34: Expression von MICA und MICB sowie ULBP1 - 3 auf der Zelloberfläche undifferenzierter und differenzierter H12.1 Zellen.

Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des PE-konjugierten spezifischen Antikörpers gegen MICA, MICB und ULBP1 - 3 unbehandelter (schwarze Linie), mit ETOH behandelter (blaue Linie) sowie mit ATRA behandelter (rote Linie) H12.1 Zellen nach neun Tagen. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK und von MICA und MICB bzw. ULBP1 - 3 sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

Zur Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber H12.1 wurden Cokulturen der allogenen NK-Zelllinie NK-92 mit unbehandelten, für neun Tage mit ETOH behandelten und mit 10 μ M ATRA differenzierten H12.1 Zellen im Effektor:Target Verhältnis 10:1 angefertigt. Als Kontrolle wurden H12.1 Zellen ohne Zusatz der NK-92 Zellen inkubiert. Nach 3 h wurde der Anteil lebender, apoptotischer und nekrotischer H12.1 Zellen mittels Annexin/7AAD-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Prinzip dieser Methode wurde unter 3.12.3. beschrieben. Zur Abgrenzung der H12.1 Zellen (CD56⁻) von den NK-Zellen (CD56⁺) wurde das Zellgemisch zusätzlich mit einem Allophycocyanin (APC)-konjugiertem CD56-Antikörper gefärbt.

In der Abb. 4.35 ist die zytotoxische Wirkung von NK-92 auf H12.1 zu sehen, wobei exemplarisch ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Messungen gezeigt ist. Nach 3-stündiger Kultivierung undifferenzierter H12.1 Zellen ohne NK-92 Zellen wurde ein

Anteil von 77 ± 5 % lebender Zellen (Annexin und 7AAD negativ), 12 ± 3 % apoptotischer Zellen (Annexin positiv, 7AAD negativ) und 9 ± 4 % nekrotischer Zellen (Annexin und 7AAD positiv) gemessen. Von den differenzierten H12.1 Zellen konnten 84 ± 3 % lebende, 7 ± 4 % apoptotische und 6 ± 2 % nekrotische Zellen detektiert werden. Nach 3-stündiger Kultivierung von undifferenzierten H12.1 Zellen mit den NK-92 Zellen wurde ein Anteil von 20 ± 4 % lebender, 60 ± 5 % apoptotischer und 18 ± 3 % nekrotischer H12.1 Zellen detektiert. Von den differenzierten H12.1 Zellen konnten nach der 3-stündigen Kultivierung mit NK-92 Zellen 21 ± 3 % lebende, 59 ± 4 % apoptotische und 17 ± 4 % nekrotische H12.1 Zellen gemessen werden.

Somit wurden keine Unterschiede in der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität der NK-92 Zellen gegenüber undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen gemessen. Die oben genannte Hypothese einer Verringerung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber differenzierten H12.1 Zellen aufgrund der erhöhten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen sowie der verringerten MICB-Zelloberflächenexpression auf differenzierten H12.1 Zellen konnte somit nicht bestätigt werden.

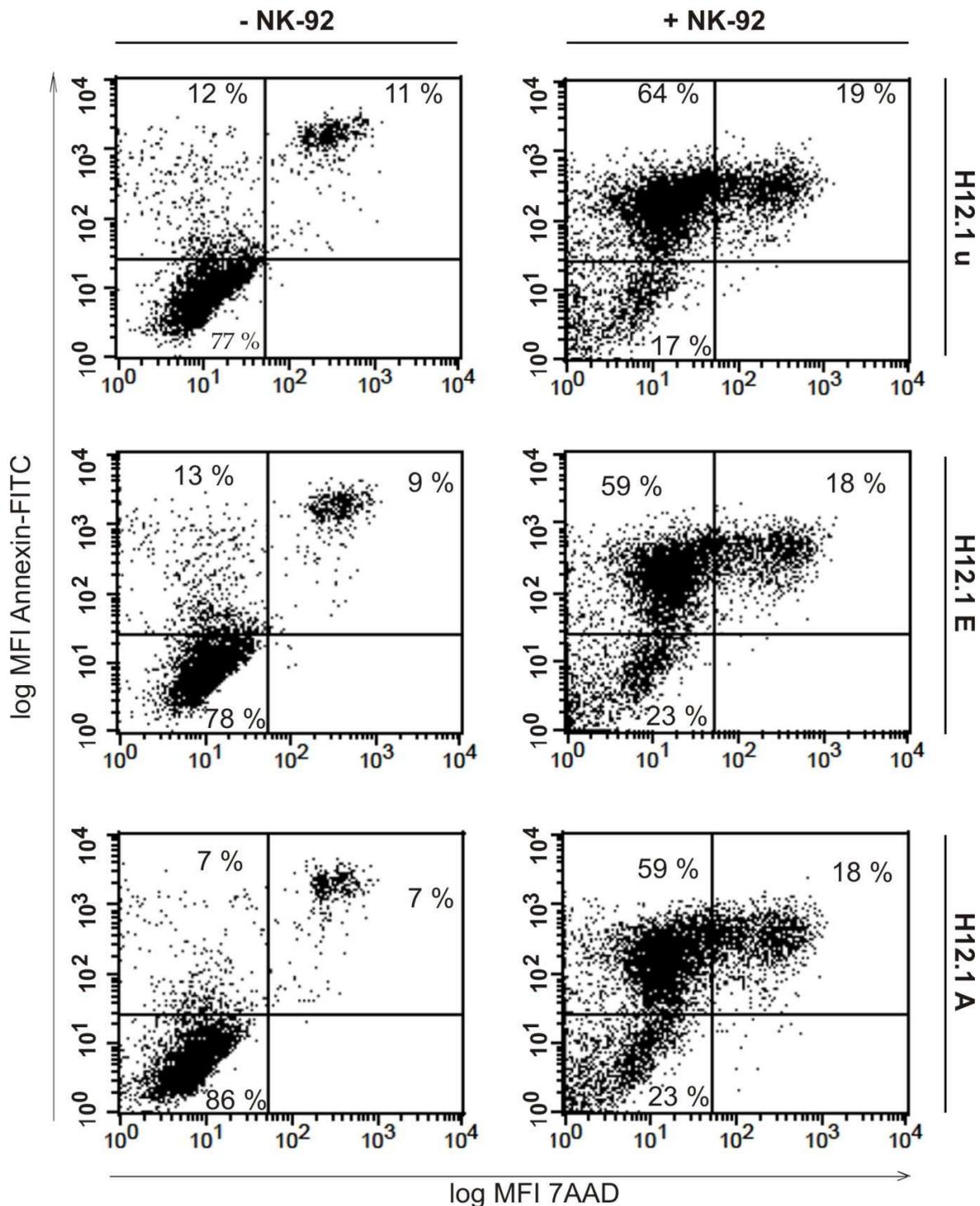


Abb. 4.35: Apoptose undifferenzierter und differenzierter H12.1 Zellen nach Cokultur mit NK-92. Für neun Tage unbehandelte (u), mit ETOH behandelte (E) sowie mit ATRA differenzierte (A) H12.1 Zellen wurden ohne NK-92 Zellen (- NK-92) und mit NK-92 Zellen (+ NK-92) im Effektor:Target Verhältnis von 10:1 kultiviert. Nach 3 h wurde die Apoptose der H12.1 Zellen mittels Annexin/7-Amino-Aktinomycin D (7AAD)-Färbung durchflusszytometrisch untersucht (3.12.3.). In den jeweiligen Dot Blots ist der prozentuale Anteil lebender H12.1 Zellen (Annexin und 7AAD negativ: linker unterer Einzelquadrant), apoptotischer H12.1 Zellen (Annexin positiv und 7AAD negativ: linker oberer Einzelquadrant) und nekrotischer H12.1 Zellen (Annexin und 7AAD positiv: rechter oberer Einzelquadrant) zu sehen. Es ist ein exemplarisches Beispiel von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. y-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) von Annexin-Fluorescein-isothiocyanat (Annexin-FITC).

4.2.5. Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in KZT-Zelllinien

Die Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1, B7-H2, B7-H3 und B7-H4 wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie in neun KZT-Zelllinien (Tab. 2.1) untersucht.

In der Abb. 4.36 ist die Expression der Moleküle in den neun KZT-Zelllinien dargestellt. Während in sechs von neun KZT-Zelllinien (JEG-3, Ntera, H12.5, H12.1, H12.1D und 1777NRpmet) eine Expression von B7-H1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, konnte in den Zelllinien JAR, 2102EP und 1411HP keine mRNA-Expression dieses Moleküls detektiert werden. Auf Proteinebene wurde nur in den Zelllinien JEG-3 und H12.1D die Zelloberflächenexpression von B7-H1 detektiert (MFI B7-H1/IK = $3,3 \pm 0,2$ (JEG-3) und $3,2 \pm 0,3$ (H12.1D))(Abb. 4.36A). Die Expression von B7-H2 mRNA konnte in allen neun KZT-Zelllinien nachgewiesen werden. Während die Zelllinie JAR eine hohe Proteinexpression von B7-H2 zeigte (MFI B7-H2/IK = $7,5 \pm 1,3$), lagen die MFI-Werte (B7-H2/IK) der Zelllinien JEG-3, H12.5 und H12.1 im Bereich von 2,4 bis 5. Auf der Zelloberfläche der Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.1D und 1411HP wurde eine geringe Expression des Moleküls detektiert (MFI B7-H2/IK von 1,1 bis 2,3) (Abb. 4.36B). Ebenso wurde B7-H3 auf mRNA-Ebene von allen analysierten KZT-Zelllinien exprimiert. Die MFI-Werte der B7-H3-Zelloberflächenexpression (B7-H3/IK) der KZT-Zelllinien lagen im Bereich von 2,4 bis 9; wobei die Zelllinie JEG-3 die geringste (MFI B7-H3/IK = $3 \pm 0,6$) und JAR die stärkste (MFI B7-H3/IK = $7,8 \pm 1,2$) Expression aufwies (Abb. 4.36C). Die mRNA-Expression von B7-H4 konnte in vier von neun KZT-Zelllinien (JEG-3, JAR, H12.5 und H12.1) detektiert werden. In keiner der untersuchten Zelllinien wurde eine B7-H4-Zelloberflächenexpression nachgewiesen (Abb. 4.36D). Als Positivkontrolle diente eine mit B7-H4 transfizierte Melanomzelllinie, deren B7-H4-Expression detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

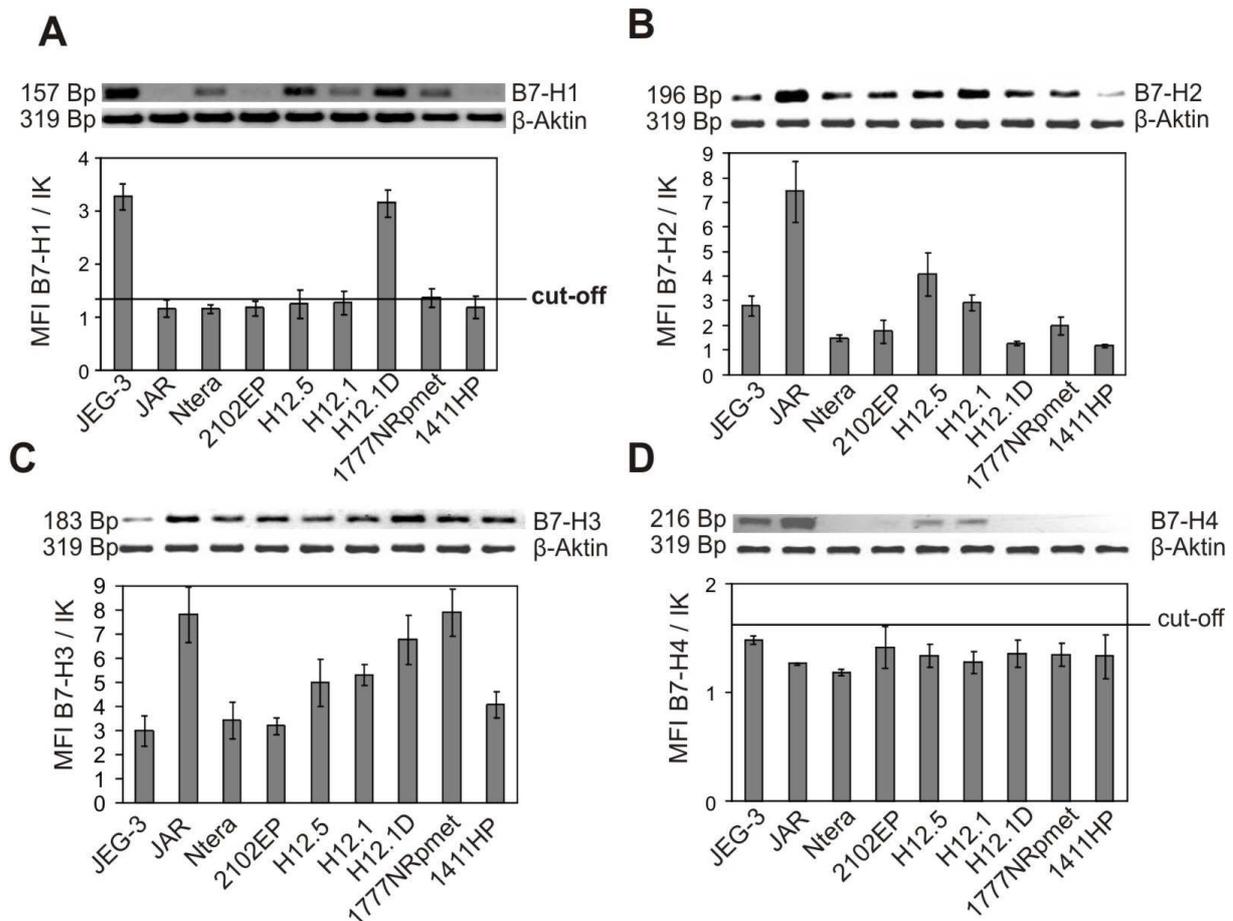


Abb. 4.36: Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in KZT-Zelllinien.

Dargestellt ist die Expression von B7-H1 (A), B7-H2 (B), B7-H3 (C) und B7-H4 (D) in neun KZT-Zelllinien. Im oberen Bereich ist jeweils ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender Amplikons von B7-H1 bzw. B7-H2, B7-H3 und B7-H4 mit einer Größe von 157 Bp bzw. 196 Bp, 183 Bp und 216 Bp sowie ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. Es ist jeweils ein exemplarisches Beispiel von drei unabhängigen RT-PCR-Experimenten abgebildet. Darunter sind die Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von B7-H1, H2, H3 bzw. -H4 und Isotypkontrolle (IK) der KZT-Zelllinien grafisch dargestellt. Zur durchflusszytometrischen Messung der B7-H1 - H4-Zelloberflächenexpression kamen die unter 2.11. genannten spezifisch gegen B7-H1 - H4 gerichteten Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörper zum Einsatz. Die Fehlerbalken (Standardabweichung vom Mittelwert) ergeben sich aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen. Der Bereich unterhalb der cut-off-Linie entspricht der MFI der unspezifischen Isotypkontrolle (MFI = 1) bzw. einer unspezifischen Bindung des B7-H1 - H4 Antikörpers (MFI > 1).

In den KZT-Zelllinien JAR, 2102EP und 1411HP konnte keine B7-H1-mRNS-Expression detektiert werden. Ebenso wurde keine mRNS-Expression von B7-H4 in den Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.1D, 1777NRpmet und 1411HP gemessen. Die fehlende bzw. geringe mRNS-Expression der Moleküle in einigen Zelllinien kann in unterschiedlichen epigenetischen Regulationsmechanismen begründet sein. Ein wichtiger Regulationsmechanismus ist die Methylierung der DNS. Mit Hilfe des Programms „MethPrimer“ (<http://www.urogene.org/methprimer/>) wurde die DNS-Sequenz des B7-H1- und des B7-H4-

Gens auf Bereiche hin analysiert, die einen CpG-Anteil von über 50 % aufweisen (CpG-Insel). Während für B7-H4 keine CpG Insel detektiert werden konnte, wurde 184 Bp stromaufwärts des B7-H1 Gens eine CpG Insel nachgewiesen, die 97 Bp der B7-H1 Gen-Sequenz beinhaltet (Gesamtlänge 281 Bp) (Abb. 4.37A). Mittels COBRA (3.13.9.) wurde innerhalb dieser CpG-Insel ein DNS-Bereich amplifiziert, welcher 18 CpGs beinhaltet. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und der Methylierungsstatus der B7-H1 CpG Insel in den neun KZT-Zelllinien analysiert. In Abb. 4.37B sind die 18 CpGs der CpG Insel von B7-H1 als Kästchen dargestellt. Weiße Kästchen repräsentieren nicht-methylierte CpGs, graue Kästchen stellen methylierte CpGs dar. Während für die Zelllinien JEG-3, Ntera, H12.5 und 1411HP keine Methylierungen detektiert wurden, konnten in den Zelllinien 2102EP, H12.1 sowie 1777NRpmet eine von 18 und in H12.1D fünf von 18 methylierte CpGs nachgewiesen werden. In der Zelllinie JAR waren alle 18 CpGs methyliert.

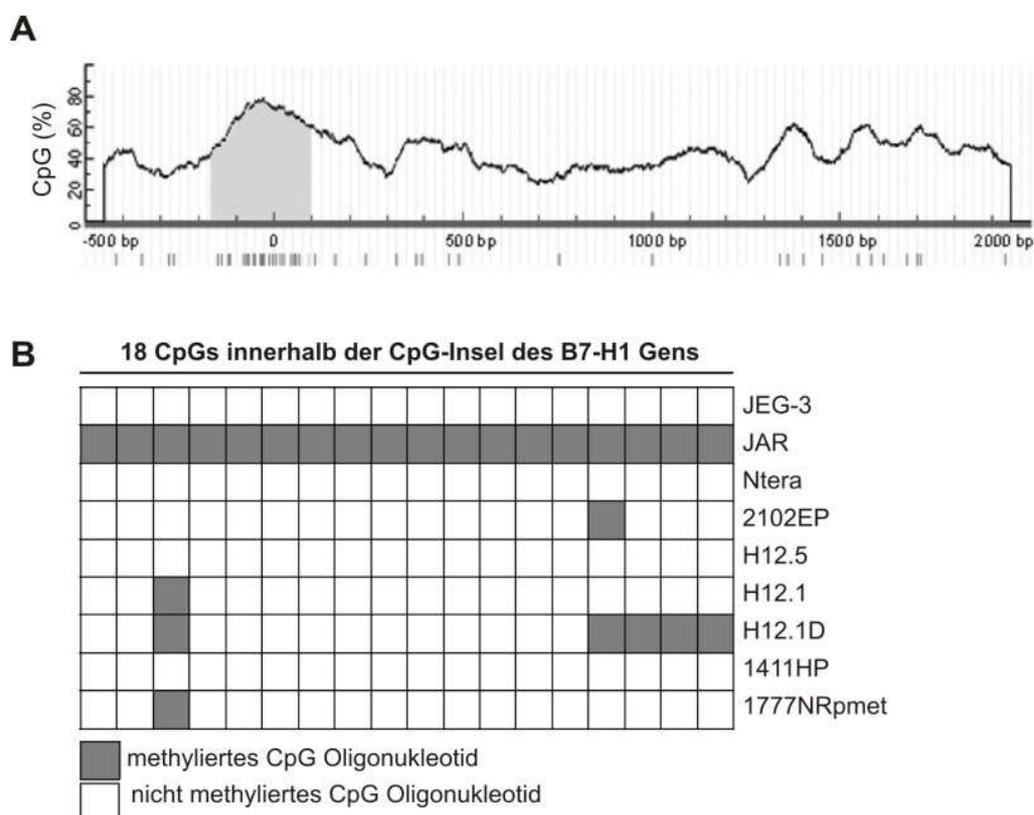


Abb. 4.37: Lokalisation und Methylierungsstatus der CpG Insel von B7-H1.

A - Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der CpGs innerhalb der DNS-Sequenz 500 Bp stromaufwärts und innerhalb der ersten 2000 Bp des B7-H1-Gens. Der DNS-Bereich mit einem CpG-Anteil von über 50 % ist als CpG Insel grau hervorgehoben. Die CpG Insel umfasst die ersten 97 Bp des B7-H1 Gens sowie einen 184 Bp großen DNS-Bereich stromaufwärts des B7-H1 Gens. B - Gezeigt ist der Methylierungsstatus der 18 CpGs innerhalb der CpG Insel von B7-H1 in neun KZT-Zelllinien. Weiße Kästchen repräsentieren nicht-methylierte CpGs, graue Kästchen stellen methylierte CpGs dar. Die Untersuchung des Methylierungsstatus der 18 CpGs der B7-H1 CpG Insel wurde zweimal mittels Bisulfitsequenzierung analysiert und führte zum gleichen Ergebnis.

Zur weiteren Analyse einer möglichen Regulation der B7-H1-mRNS-Expression durch DNS-Methylierung wurde die Zelllinie JAR für vier Tage mit 0; 0,5; 2,5; 5 und 10 μM DAC behandelt (3.5.) und anschließend der Methylierungsstatus der CpGs mittels Bisulfidsequenzierung (3.13.9.) untersucht. Wie in Abb. 4.38A dargestellt ist, führte die Behandlung der Zellen mit 0; 5 und 10 μM DAC zu keiner Demethylierung, während nach der Behandlung von JAR mit 0,5 μM DAC 17 von 18 CpGs demethyliert wurden. Unter dem Einsatz von 2,5 μM DAC erfolgte eine Demethylierung von 15 der 18 CpGs. Somit führte eine 4-tägige Behandlung der Zelllinie JAR mit 0,5 μM DAC zur fast vollständigen Demethylierung der CpGs innerhalb der CpG-Insel des B7-H1 Gens.

Anschließend erfolgte eine 5-tägige Behandlung der JAR Zellen mit 0,5 μM DAC sowie die Erstellung einer Zeitkinetik. Nach eintägiger DAC Behandlung wurde eines der 18 CpG-Oligonukleotide demethyliert. Eine 2- und 3-tägige DAC Behandlung führte zur Demethylierung von 16 der 18 CpGs und nach vier und fünf Tagen lagen alle 18 CpGs demethyliert vor. Parallel dazu wurde die Expression von B7-H1 auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Bereits nach einer eintägigen Behandlung der Zelllinie JAR mit 0,5 μM DAC konnte die Expression von B7-H1 auf mRNA-Ebene induziert werden. Über den Verlauf der Behandlung bis zum fünften Tag erfolgte ein Anstieg der B7-H1-mRNS-Expression. Die Induktion der B7-H1-Proteinexpression auf der Zelloberfläche war nach zwei Tagen detektierbar und erreichte nach vier bis fünf Tagen ihr Maximum (Abb. 4.38B).

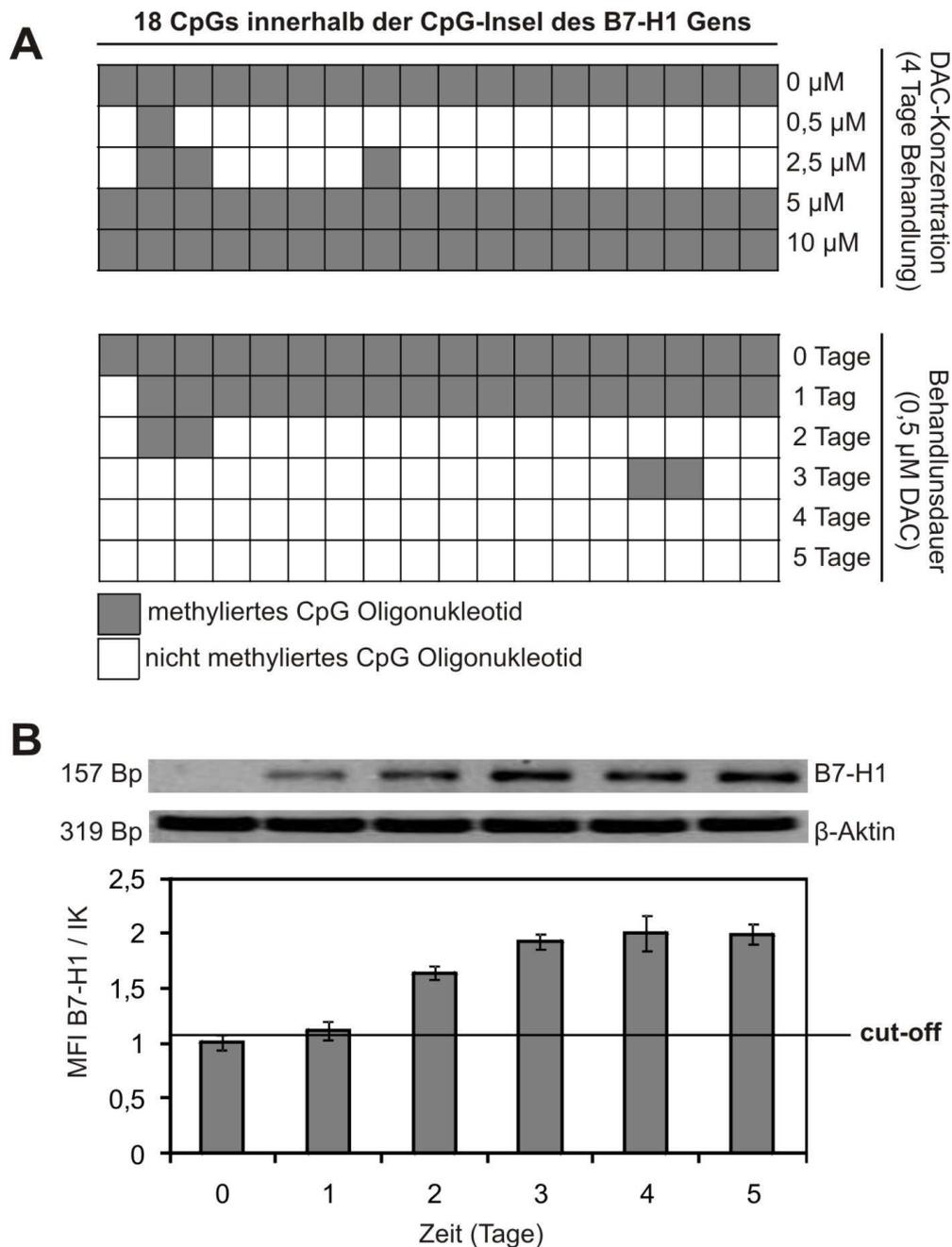


Abb. 4.38: Methylierungsstatus der CpG-Insel des B7-H1 Gens und Expression von B7-H1 nach Behandlung von JAR Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

A - Gezeigt ist der Methylierungsstatus der 18 CpGs innerhalb der CpG-Insel von B7-H1 in JAR Zellen nach 4-tägiger Behandlung mit 0 bis 10 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) (oben) sowie nach Behandlung mit 0,5 µM DAC für 0 bis 5 Tage. Die Untersuchung des Methylierungsstatus der 18 CpGs der B7-H1 CpG Insel wurde zweimal mittels Bisulfitsequenzierung analysiert und führte zum gleichen Ergebnis. B - Im oberen Bereich ist ein 1,5%iges TAE-Agarosegel korrespondierender Amplikons von B7-H1 mit einer Größe von 157 Bp sowie ein 1,5%iges TAE-Agarosegel korrespondierender β-Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp nach Behandlung der JAR Zellen mit 0,5 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin für null bis fünf Tage gezeigt. Darunter sind die Quotienten mittleren Fluoreszenzen (MFI) von B7-H1 und der Isotypkontrolle (IK) nach Behandlung der JAR-Zellen mit 0,5 µM DAC für null bis fünf Tage grafisch dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen. Der Bereich unterhalb der cut-off-Linie entspricht der MFI der unspezifischen Isotypkontrolle (MFI = 1) bzw. einer unspezifischen Bindung des B7-H1 Antikörpers (MFI > 1).

Wie oben beschrieben konnte nach 4- bis 5-tägiger Behandlung der Zelllinie JAR mit 0,5 μM DAC die maximale Induktion der Proteinexpression von B7-H1 auf der Zelloberfläche erreicht werden. Der MFI-Wert (B7-H1/IK) von unbehandelten JAR-Zellen lag bei $1,04 \pm 0,2$ und stieg nach der 4- bis 5-tägigen Behandlung auf $2,2 \pm 0,3$. Diese B7-H1-Proteinexpression der JAR-Zellen war mit der Proteinexpression des Moleküls auf der B7-H1-positiven Zelllinie JEG-3 vergleichbar (MFI B7-H1/IK = $2,7 \pm 0,4$) (Abb. 4.39).

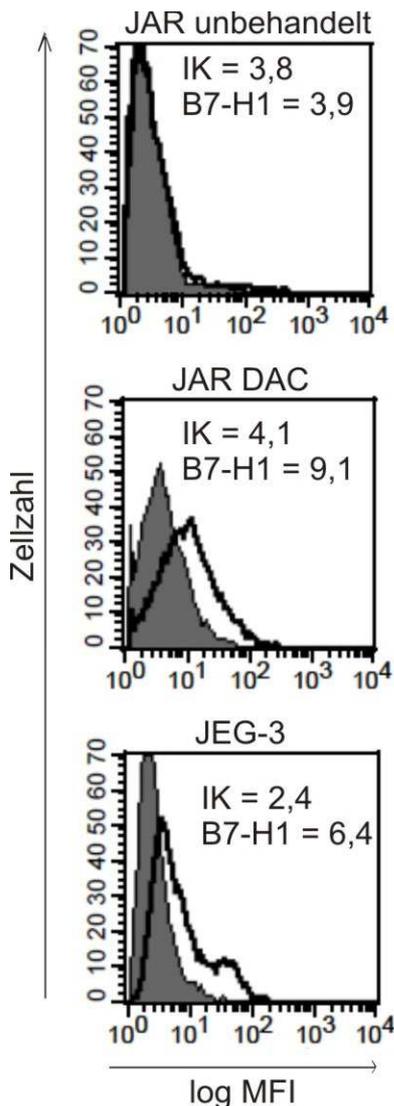


Abb. 4.39: Proteinexpression von B7-H1 auf der Zelloberfläche unbehandelter und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelter JAR- sowie JEG-3-Zellen.

Gezeigt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme der Phycoerythrin (PE)-konjugierten Isotypkontrolle (IK) (grau) und des PE-konjugierten B7-H1 (MEM-G/9) (weiß) von unbehandelten, und für fünf Tage mit 0,5 μM 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) behandelten JAR-Zellen sowie der unbehandelten Chorionkarzinomzelllinie JEG-3. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von IK und B7-H1 sind in den jeweiligen Histogrammen angegeben. Es ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. x-Achse: logarithmische mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI).

4.2.6. Expression des nicht-klassischen MHC-Klasse-I Moleküls HLA-G in KZT-Zelllinien

Mittels RT-PCR und Western Blot wurde die mRNA- und Proteinexpression des immunsuppressiven Moleküls HLA-G in neun KZT-Zelllinien (Tab. 2.1) untersucht. Wie in Abb. 4.40A zu sehen ist, konnte in den undifferenzierten EC-Zelllinien 2102EP, H12.5 und H12.1 sowie in der differenzierten Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 die mRNA-Expression der HLA-G Isoformen HLA-G1/5, HLA-G2/4 und HLA-G3 detektiert werden. Die undifferenzierte EC-Zelllinie Ntera exprimiert HLA-G1/5 auf mRNA-Ebene. Für die differenzierten EC-Zelllinien H12.1D, 1411HP und 1777NRpmet sowie für die differenzierte Chorionkarzinom-Zelllinie JAR konnte keine HLA-G-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Auf Proteinebene wurde nur in der Zelllinie JEG-3 die Expression von HLA-G1/5 detektiert.

Mit Ausnahme von JEG-3 konnte in keiner differenzierten KZT-Zelllinie die Expression von HLA-G auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Da zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchungen zur HLA-G Expression der vorliegenden Arbeit für die Zelllinien JAR und JEG-3 bereits die Methylierung der DNS als Ursache der fehlenden HLA-G-mRNA-Expression beschrieben wurde (Moreau *et al.*, 2003; Mouillot, G. *et al.*, 2005), stellte sich die Frage inwiefern die HLA-G-mRNA-Expression der differenzierten KZT-Zelllinien H12.1D, 1411HP und 1777NRpmet durch diesen Mechanismus reguliert wird. Wie bereits unter 4.1.5. beschrieben, konnte mit Hilfe des Programms www.methprimer.de eine 824 Bp lange CpG-reiche Region (CpG-Insel) innerhalb der DNS Sequenz des HLA-G Gens detektiert werden. Die Analyse des Methylierungsstatus dieser CpG-Insel erfolgte mit Hilfe der COBRA-Technik (3.13.9.). Für die Restriktion des amplifizierten Produktes der Bisulfit-DNS wurde das Enzym BstUI (Erkennungssequenz: CpGpCpG) verwendet. Wie in Abb. 4.40B zu sehen ist, konnte für die Zelllinien JAR und H12.1D eine vollständige und für die Zelllinien JEG-3, Ntera, H12.1 und 1411HP eine partielle Methylierung einer CpGpCpG-Region nachgewiesen werden. Die Zelllinien 2102EP, H12.5 und 1777NRpmet wiesen keine Methylierung einer CpGpCpG-Region auf. Somit korrelierte der Methylierungsstatus des HLA-G Promoters mit Ausnahme von 1777NRpmet mit dem Transkriptionslevel der untersuchten KZT-Zelllinien.

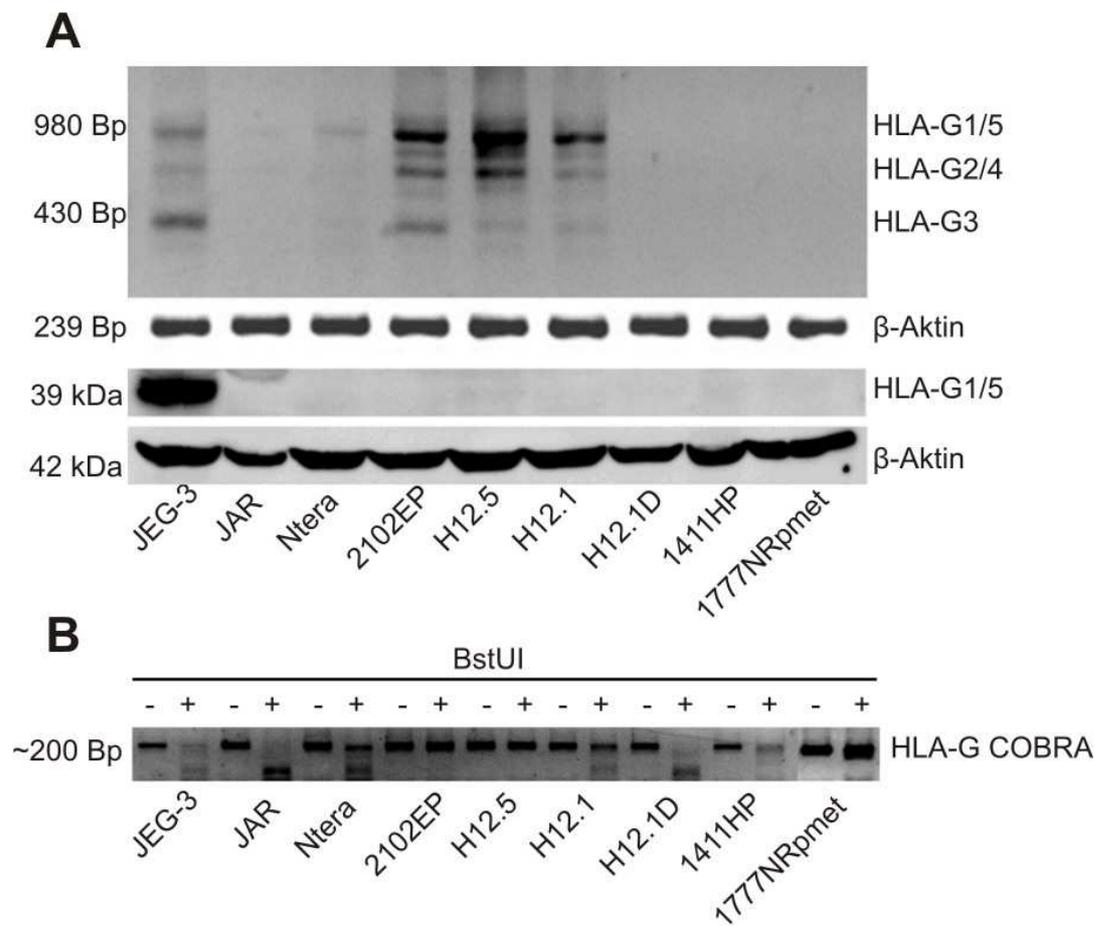


Abb. 4.40: Expression und Methylierung von HLA-G in KZT-Zelllinien.

A - Im oberen Bereich ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender HLA-G Amplikons der KZT-Zelllinien dargestellt. Sichtbar sind die Amplikons HLA-G1 bzw. HLA-G5 mit einer Größe von ~1000 Bp, HLA-G3 mit einer Größe von 430 Bp und HLA-G2/4 (zwischen 430 Bp und 980 Bp). Unterhalb ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin Amplikons mit einer Größe von 239 Bp gezeigt. Im unteren Bereich ist die Expression von HLA-G1/5 der KZT-Zelllinien auf Proteinebene im Western Blot dargestellt. Es wurde der HLA-G spezifische Antikörper MEM-G/1 verwendet, welcher die denaturierte schwere Kette des HLA-G Moleküls erkennt. Die Expression des Standardproteins β -Aktin ist unter dem Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression des Standardproteins β -Aktin ist unter dem Western Blot gezeigt. Es wurden 30 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es ist jeweils ein exemplarisches Beispiel von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. B - Dargestellt ist ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel mit aufgetrennten BstUI-Restriktionsprodukten der HLA-G COBRA der KZT-Zelllinien. Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Untersuchung der Methylierung von HLA-G in KZT-Zelllinien wurde die Zelllinie H12.1D, welche eine vollständige Methylierung einer CpGpCpG-Region innerhalb der CpG-Insel von HLA-G zeigte, mit verschiedenen Konzentrationen an DAC und VPA sowie mit Kombinationen dieser Substanzen für ein bis fünf Tage behandelt (3.5.), was jedoch weder zur Demethylierung der CpGpCpG-Region noch zur Induktion der HLA-G-mRNS-Expression führte.

5. Diskussion

5.1. Das immunregulatorische Potential von MSC

Die immunmodulatorischen Eigenschaften von MSC werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Dennoch stehen MSC im Mittelpunkt der regenerativen Medizin und werden bereits seit einigen Jahren im Rahmen von Transplantationen, zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen und Autoimmunkrankheiten sowie zur Geweberegeneration eingesetzt (Ball *et al.*, 2008; Horwitz *et al.*, 1999; Joo *et al.*, 2010; Koc *et al.*, 1998; Kurtzberg *et al.*, 2009; Lazarus *et al.*, 1995; Le Blanc *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Ringden *et al.*, 2006; Uccelli *et al.*, 2006; Zappia *et al.*, 2005). Auf der einen Seite besitzen MSC die einzigartige Fähigkeit die Funktion vieler Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und antigenpräsentierende Zellen, zu supprimieren, was bereits unter 1.2.1. beschrieben wurde. Andererseits belegen auch einige Studien, dass MSC die Immunantwort in Abhängigkeit des Stimulus inhibieren und/oder aktivieren können und als antigenpräsentierende Zellen gegenüber CD4+ und CD8+ T-Zellen agieren (Chan *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2008; Krampera *et al.*, 2006; Klyushnenkova *et al.*, 2005; Rasmusson *et al.*, 2005). Dazu zählt z.B. die IFN- γ -vermittelte Hochregulation von MHC-Klasse-I und -II Molekülen während einer Abstoßungsreaktion und die damit verbundene Induktion der Präsentation antigener Peptide durch MSC (Shlomchik WD, 2007; Stagg *et al.*, 2006; Welniak *et al.*, 2007). Die Lyse von MSC durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten wurde 2008 durch Morandi *et al.*, beobachtet. Weiterhin konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass MSC nach allogener Transplantation Abstoßungsreaktionen auslösen (Mielcarek *et al.*, 2011; Nauta *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2006; Poncelet *et al.*, 2007). Desweiteren wurde nach der Transplantation von Knochenmark in Mäuse eine Abstoßungsreaktion trotz gleichzeitiger Administration von MSC beobachtet (Sudres *et al.*, 2006). Derartige Erkenntnisse zeigen, dass die immunologischen Eigenschaften von MSC noch nicht eindeutig aufgeklärt sind und MSC trotz allem für die oben genannten medizinischen Zwecke eingesetzt werden.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das immunmodulatorische Potential von MSC hinsichtlich der Expression und Funktion der immunregulatorischen Moleküle der MHC-Klasse-I-APM, der B7-H1 - H4 Moleküle und des nicht klassischen MHC-Klasse-I Moleküls HLA-G charakterisiert werden.

5.1.1. Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in MSC gesunder und kranker Spender

Die Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in primären MSC gesunder Spender ist relativ gut charakterisiert (Götherström *et al.*, 2003; Le Blanc *et al.*, 2003; Morandi *et al.*, 2008; Niemeyer *et al.*, 2004/2007). Über die Expression dieser Moleküle in primären MSC kranker Spender gibt es bisher keine Informationen. Vor dem Hintergrund das bereits autologe und allogene MSC-Transplantationen genutzt werden um eine Reihe von Krankheiten zu behandeln (Bang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Garcia-Olmo *et al.*, 2005; Katritsis *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2004; Reinders *et al.*, 2010; Ringden *et al.*, 2007;), ist eine detaillierte Charakterisierung der Expression von Molekülen der MHC-Klasse-I-APM auch in primären MSC kranker Spender unabdingbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dieser Moleküle in primären MSC von sieben gesunden Spendern, von elf Spendern mit malignen Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks sowie von zwei immortalisierten MSC untersucht.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Le Blanc *et al.*, 2003; Morandi *et al.*, 2008) konnte auch innerhalb der vorliegenden Arbeit die Expression der MHC-Klasse-I-APM Komponenten HC, β_2 -MG, TAP1, TAP2 und TAPS für alle sieben MSC gesunder Spender sowie für zwei immortalisierte MSC nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu betonen, dass sich die MSC der gesunden Spender MSC105 - 126 (Tab. 2.3.) durch eine sehr schwache Proteinexpression von Tapasin auszeichneten. Auch für die elf MSC der kranken Spender konnte die Expression der oben genannten Moleküle detektiert werden. Die detektierte Expression von MHC-Klasse-I-APM Komponenten in den untersuchten MSC stellt deren immunsuppressiven Phänotyp deutlich in Frage.

Interessanterweise wurde für die MSC der gesunden Spender ein relativ homogenes Expressionslevel der genannten Moleküle nachgewiesen. Im Vergleich zu den MSC von gesunden Spendern zeichneten sich die MSC der Spender mit malignen Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks durch ein heterogenes Expressionslevel von Komponenten MHC-Klasse-I-APM aus. Es kann somit vermutet werden, dass maligne Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks das Expressionsprofil von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM und damit möglicherweise auch die Immunogenität der aus dem Knochenmark isolierten MSC verändern. Eine veränderte Expression, Prozessierung und/oder Präsentation von MHC-Klasse-I Molekülen in Cytomegalie-Virus (CMV)-infizierten Zellen und in maligne entarteten Zellen wurde bereits beschrieben (Lilley & Ploegh, 2005; Restifo *et al.*, 1993; Rotem-Yeduhar *et al.*, 1994; Seliger *et al.*, 1996 und 1997). Es sollten daher MSC weiterer Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und Therapien des Knochenmarks sowie MSC

gesunder Spender hinsichtlich der Expression und Funktion von MHC-Klasse-I APM Molekülen untersucht werden. Vor der Verwendung von MSC im Rahmen allogener Transplantationen müssten maligne Erkrankungen und Infektionen des Knochenmarks der MSC Spender ausgeschlossen werden. Ebenso ist der Einsatz von MSC kranker Spender für autologe Transplantationen kritisch. Eine veränderte Immunogenität der MSC könnte die Schwere der Abstoßungsreaktion erhöhen bzw. vermindern.

5.1.2. Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in undifferenzierten und differenzierten MSC

Das Ziel von MSC-basierten Zelltherapien ist unter anderem die Differenzierung von MSC in einen spezifischen Zelltyp, welcher für die Regenerierung von verletztem oder zerstörtem Gewebe bzw. Zellen benötigt wird (Marlies *et al.*, 2010). Vor diesem Hintergrund ist eine detaillierte Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von undifferenzierten versus differenzierten MSC wichtig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war eine mögliche Veränderung des Proteinexpressionslevels von MHC-Klasse-I-APM Komponenten nach osteogener und adipogener Differenzierung der MSC von Interesse. Es ist zu betonen, dass in dieser Arbeit nach adipogener Differenzierung auch osteogen differenzierte Zellen generiert wurden und somit die Expressionsstudien der adipogen differenzierten MSC nicht 100 %ig von den osteogen differenzierten MSC abgegrenzt werden konnten. Eine derartige Mischung von Zelltypen nach der Differenzierung von MSC wurde bereits beschrieben und ist auf deren Heterogenität zurückzuführen (Hicok *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 1996).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde nach osteogener und/oder adipogener Differenzierung von primären MSC in den meisten Fällen eine im Vergleich zum undifferenzierten Status der MSC erhöhte Proteinexpression von MHC-Klasse-I APM Molekülen detektiert. Eine Hochregulation der MHC-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche wurde bisher für MSC nach ihrer Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten beschrieben (Le Blanc *et al.*, 2003). Inwieweit die Differenzierung von MSC auch funktionell deren immunregulatorisches Potential verändert, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht analysiert. Aufgrund der in dieser Dissertation generierten Daten kann eine Veränderung der Immunogenität von MSC nach deren Differenzierung nicht ausgeschlossen werden. Vor dem Hintergrund, dass der Einsatz von MSC zur Geweberegeneration eine *in vitro* bzw. *in vivo* Differenzierung dieser Zellen voraussetzt, sind weitere funktionelle Untersuchungen zur Immunogenität von undifferenzierten versus

differenzierten MSC unabdingbar. Eine Veränderung der Immunogenität wurde bisher für chondrogen, jedoch nicht für osteogen oder adipogen differenzierte MSC aus Ratten beschrieben. Die Cokultur von chondrogen differenzierten MSC mit humanen dendritischen Zellen führte im Vergleich zur Cokultur mit undifferenzierten MSC zu einer 4- bis 8-fach erhöhten Proliferation der Lymphozyten. Dieser Effekt war jedoch von der Expression der MHC-Klasse-I-APM unabhängig und wurde vielmehr auf die Hochregulation der costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 zurückgeführt, welche neben der Präsentation antigener Peptidfragmente über MHC-Klasse-Moleküle das zweite Signal zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen aussenden (Chen *et al.*, 2007). Die Expression von B7-1 und B7-2 in MSC nach deren Differenzierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es ist möglich, dass sich die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC nach der Differenzierung nicht verändern, wie es auch bereits im Rahmen der Proliferationssuppression aktivierter PBMC für MSC aus dem Knochenmark und aus Fettgewebe vor und nach ihrer osteogenen bzw. adipogenen und chondrogenen Differenzierung beschrieben wurde (Le Blanc, 2003; Götherström *et al.*, 2003; Niemeyer *et al.*, 2004/2007).

5.1.3. Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in MSC - Die funktionelle Bedeutung von B7-H3

Innerhalb der letzten Jahre erweiterte sich die Anzahl der B7-Familienmitglieder von den costimulatorischen Liganden B7-1 und B7-2 auf die Moleküle B7-H1, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4 und B7-H6 (Brandt *et al.*, 2009; Flies *et al.*, 2007; Greenwald *et al.*, 2005). Die fehlende Zelloberflächenexpression von B7-1 und B7-2 auf MSC ist unter anderem für die immunsuppressiven Effekte der MSC verantwortlich (Aggarwal *et al.*, 2005; Di Nicola *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu B7-1 und B7-2 gibt es relativ wenig Daten zur Expression und Funktion der B7-H1 - H4 Moleküle in MSC (Flies *et al.*, 2007; Greenwald *et al.*, 2005). Bisher wurde die Expression und coinhibitorische Funktion von B7-H1 und B7-H4 in MSC beschrieben (Augello *et al.*, 2005; Ni *et al.*, 2009; Rameshwar, 2008; Sheng *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2009).

In Korrelation mit den Literaturdaten konnte in der vorliegenden Arbeit die Expression von B7-H1 in MSC auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Xue *et al.*, welche 2009 sowohl eine starke B7-H4 mRNA- als auch Proteinexpression in MSC nachweisen konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit keine mRNA-Expression von B7-H4 in allen 15 untersuchten MSC detektiert. Die mRNA-Expression dieses Moleküls konnte in einer mit B7-H4 transfizierten Melanomzelllinie (Positivkontrolle) gezeigt werden. Neben B7-

H1 und B7-H4 erfolgten innerhalb der vorliegenden Arbeit erstmalig Expressionsstudien von B7-H2 und B7-H3 in MSC. B7-H2 wurde lediglich auf mRNA-Ebene in den primären MSC nachgewiesen. Das Molekül wurde nur von den immortalisierten MSC L87 und V54-2 auf mRNA-Ebene und auf der Zelloberfläche exprimiert. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit erstmalig die mRNA- und Proteinexpression von B7-H3 nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich eine Vielzahl möglicher transkriptioneller, post-transkriptioneller und post-translationeller Regulationsmechanismen, welche die Expression der B7-H1 - H4 Moleküle steuern könnten, die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurden. Während die bereits beschriebene Expression des coinhibitorischen B7-H1 Moleküls mit der immunsuppressiven Wirkung der MSC korreliert, passt die fehlende Expression des inhibitorischen B7-H4 Moleküls nicht in diesen Kontext. Jedoch erscheint die fehlende Expression des coaktivierenden Moleküls B7-H2 in den primären MSC für deren immunsuppressive Rolle sinnvoll.

Von den B7-H1 - H4 Molekülen wurde B7-H3 am stärksten auf der Zelloberfläche aller untersuchten MSC exprimiert, wodurch im Rahmen dieser Arbeit besonderes Interesse an dessen immunregulatorischer Funktion in MSC geweckt wurde. Interessanterweise wurde sowohl humanes als auch murines B7-H3 bisher als coaktivierendes aber auch als coinhibitorisches Molekül beschrieben (Boenisch *et al.*, 2008; Castriconi *et al.*, 2004; Hofmeyer *et al.*, 2008; Leitner *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Zur immunregulatorischen Funktion von B7-H3 in MSC gibt es bisher keine Informationen.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde das immunmodulatorische Potential der B7-H3-Expression auf MSC bezüglich der Aktivierung der Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen untersucht. Über die Wechselwirkungen von MSC und T-Zellen sowie NK-Zellen gibt es bereits eine Vielzahl an Informationen. Es wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, in denen MSC die Proliferation von T-Zellen supprimieren und deren Immunantwort inhibieren (Di Nicola *et al.*, 2002; Djouad *et al.*, 2003; Krampera *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003; Rasmusson *et al.*, 2003; Potian *et al.*, 2003). MSC können jedoch auch von T-Zellen lysiert werden (Morandi *et al.*, 2008). Über die Wechselwirkung von MSC und NK-Zellen gibt es ebenfalls viele Informationen. Es wurde beschrieben, dass MSC durch allogene NK-Zellen nicht lysiert werden (Rasmusson *et al.*, 2003; Suzdatlseva *et al.*, 2008). Desweiteren wurde die Lyse von MSC durch aktivierte, jedoch nicht durch frisch isolierte nicht-aktivierte NK-Zellen nachgewiesen (Sotiropoulou *et al.*, 2006). Die Lyse von MSC durch aktivierte allogene und autologe NK-Zellen sowie eine Inhibierung der Proliferation und Zytotoxizität von NK-Zellen durch MSC wurde von Spaggiari *et al.*, 2006 beobachtet. Innerhalb dieser Studie

wurde die NK-Zell vermittelte Lyse der MSC auf die Interaktion von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren Nkp30, NKG2D und DNAM-1 mit verschiedenen Liganden der MSC (u.a. Nectin-2, ULBPs und MICA) zurückgeführt. Desweiteren wurde gezeigt, dass die NK-Zell-vermittelte Lyse der MSC nicht durch die Interaktion von inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren (KIRs) mit MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche der MSC verringert wird.

Um den Einfluss der B7-H3-Expression von MSC auf deren Lyse durch zytotoxische CD8+ T-Zellen sowie NK-Zellen zu untersuchen, wurde die Zelloberflächenexpression von B7-H3 in der MSC-Linie L87 und in primären MSC der zwei Spender D17 und D38 mittels siRNS-Behandlung auf 10 - 15 % gesenkt.

Die Untersuchung der ZTL-vermittelten Lyse von L87 und D38 wurde in Chromfreisetzungsversuchen untersucht. Die MSC L87 und D38 wurden nach der Behandlung mit einer siRNS Kontrolle nicht durch die T-Zellen lysiert, was die bereits beschriebene immunsuppressive Wirkung von MSC gegenüber T-Zellen bestätigt. Auch nach der Behandlung mit spezifischer siRNS gegen B7-H3 konnte keine Induktion der Lyse gemessen werden. Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungen. Zum Einen könnte die Reduktion der B7-H3-Zelloberflächenexpression auf den MSC von 100 % auf 10 - 15 % nicht ausreichend gewesen sein, um Veränderungen in der Immunantwort von T-Zellen detektieren. Möglicherweise ist schon die Expression geringer Mengen an B7-H3 ausreichend um einen bestimmten immunregulatorischen Effekt der T-Zell-Antwort zu erzielen. Auf der anderen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, dass B7-H3 die Immunantwort der verwendeten T-Zellen nicht moduliert. Eventuell ist die B7-H3-Expression auf MSC gegenüber anderen Immunzellen, wie z.B. CD4+ T-Zellen von Bedeutung. Die B7-H3-vermittelte Inhibierung der Proliferation sowie Reduktion der Zytokin-Produktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen wurde bereits für andere Zellsysteme beschrieben (Leitner *et al.*, 2009). Möglicherweise kommt der B7-H3-Expression auf MSC auch eine andere, von der T-Zell-Immunologie unabhängige Rolle zu, wie z.B. die bereits beschriebene Beteiligung von B7-H3 an der osteogenen Differenzierung und Knochenmineralisierung (Suh *et al.*, 2004).

Desweiteren konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit die bereits beschriebene Lyse von MSC durch aktivierte frisch isolierte NK-Zellen bestätigt werden. Die Herabregulation der B7-H3-Expression von primären MSC der Spender D17 und D38 sowie der immortalisierten MSC L87 führte zur Erhöhung der NK-Zell-vermittelten Lyse der MSC um 11 - 33 %. Somit kann vermutet werden, dass die starke Expression von B7-H3 auf MSC die NK-Zell-vermittelte Lyse der MSC inhibiert und damit einen wichtigen Teil der immunsuppressiven Wirkung von MSC einnimmt. Interessanterweise wurde bereits eine protektive Rolle der B7-H3-Expression auf Neuroblastomzellen gegenüber der NK-Zell-vermittelten Lyse beschrieben (Castriconi *et al.*, 2004).

B7-H3 als immunsuppressives Molekül von MSC - da dieser Effekt bisher nur in primären MSC von zwei Spendern und in immortalisierten MSC der Zelllinie L87 beobachtet wurde, ist es unabdingbar weitere MSC zu untersuchen. Eine Desweiteren sollte die NK-Zell-vermittelte Lyse von MSC nach einer Überexpression von B7-H3 in diesen Stammzellen untersucht werden. Eine durch B7-H3 Überexpression verringerte NK-Zell-vermittelte Lyse der MSC würde die immunsuppressive Rolle dieses Moleküls bestätigen. Vor dem Hintergrund der möglichen inhibitorischen Wirkung der MSC-spezifischen B7-H3-Expression auf NK-Zellen, könnten B7-H3-überexprimierende MSC im Rahmen von Transplantationen eingesetzt werden, was möglicherweise zur Verringerung von Abstoßungsreaktionen führt.

5.1.4. DNS-Methylierung und Histon-Acetylierung als mögliche Mechanismen in der Regulation der HLA-G-Expression in MSC

HLA-G inhibiert die zytotoxische Aktivität von NK- und T-Zellen (Adrian-Cabestre *et al.*, 1999; Gati *et al.*, 2001; Moretta *et al.*, 1997; Pende *et al.*, 1997) und könnte damit zum immunsuppressiven Potential der MSC beitragen. Vor diesem Hintergrund wurde die HLA-G-Expression von MSC innerhalb vieler Arbeitsgruppen untersucht. Diese Studien führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. In fetalen MSC der Leber wurde die mRNA- und Proteinexpression von HLA-G beschrieben, während adulte MSC des Knochenmarks HLA-G lediglich auf mRNA-Ebene aber nicht auf Proteinebene exprimierten (Götherström *et al.*, 2005). Die mRNA Expression von HLA-G in fetalen MSC des Knochenmarks konnte durch Chen *et al.*, 2006 gezeigt werden. Auf der anderen Seite konnten Nasef *et al.*, im Jahr 2007 die Expression von HLA-G auf mRNA- und Proteinebene auch in adulten MSC des Knochenmarks detektieren. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass HLA-G in die MSC-vermittelte Inhibierung der Lymphozytenproliferation involviert ist. Die Expression von HLA-G in MSC des Nabelschnurblutes wurde erstmalig von La Rocca *et al.*, 2008 nachgewiesen. Der Nachweis der Sekretion der Isoform HLA-G5 durch adulte MSC des Knochenmarks erfolgte von Selmani *et al.*, 2008. Die HLA-G5 Sekretion führte zur Suppression der Funktion von T-Zellen und NK-Zellen. Weiterhin konnten Morandi *et al.*, 2008 die Oberflächenexpression sowie Sekretion von HLA-G von adulten MSC des Knochenmarks zeigen. Im gleichen Jahr jedoch wurden von Rizzo *et al.*, keine löslichen HLA-G Isoformen im Zellkulturüberstand von adulten MSC des Knochenmarks detektiert. Auch mittels Immunzytochemie wurden keine HLA-G positiven MSC nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten Selmani *et al.*, 2009 sowohl HLA-G mRNA als auch eine intra- und extrazelluläre HLA-G Proteinexpression in adulten MSC des Knochenmarks nachweisen. Auf

der anderen Seite konnte in adulten MSC des Knochenmarks und des Fettgewebes sowohl intra- als auch extrazellulär keine HLA-G Proteinexpression detektiert werden. Die Expression des Moleküls wurde durch Progesteron induziert (Ivanova-Todorova *et al.*, 2009). Letztendlich führten zahlreiche Untersuchungen zur HLA-G-Expression in MSC zu verschiedenen Ergebnissen. Bisher gibt es wenige Informationen zur Regulation der HLA-G-Expression in MSC. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression und Regulation von HLA-G in MSC untersucht. Dafür standen primäre MSC des adulten Knochenmarks von zwei gesunden Spendern, elf Spendern mit malignen Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks und zwei immortalisierte MSC zur Verfügung.

In den MSC eines kranken Spenders konnte die Expression von HLA-G auf mRNA- jedoch nicht auf Proteinebene gezeigt werden. Die MSC der zehn weiteren kranken Spender und der zwei gesunden Spender sowie der zwei immortalisierten MSC zeigten keine mRNA-Expression dieses Moleküls. Die fehlende Proteinexpression von HLA-G in adulten MSC wurde, wie bereits oben erwähnt, auch von Götherstörn *et al.*, 2005 und Ivanova-Todorova *et al.*, 2009 beobachtet. Eine derart geringe Frequenz der HLA-G mRNA-Expression adulter MSC ist bisher noch nicht beschrieben worden. Für die immortalisierten MSC L87 und V54-2 konnte innerhalb dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die HLA-G mRNA-Expression durch Methylierung und Acetylierung reguliert wird, da nach Behandlung dieser Zellen mit DAC und VPA die HLA-G mRNA-Expression induziert sowie DNS-Bereiche der HLA-G Promoter-Region demethyliert wurden, währenddessen die alleinige DAC-Behandlung keine Effekte zeigte. Die Regulation der HLA-G-Expression durch derartige epigenetische Mechanismen wurde bisher für die KZT-Zelllinien JEG-3, JAR und Ntera sowie für Lungen-, Dickdarm- und Nierentumore beschrieben (Dunker *et al.*, 2008; Holling *et al.*, 2009; Menendez *et al.*, 2008; Mouillot, G. *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2003; Polakova *et al.*, 2009; Rouas-Freiss *et al.*, 2003; Suárez-Alvarez *et al.*, 2010). Mit Ausnahme von embryonalen Stammzellen konnte in normalem nicht-malignem Gewebe bzw. Zellen bisher keine bzw. eine gering frequentierte HLA-G-Methylierung detektiert werden (Dunker *et al.*, 2008; Menendez *et al.*, 2008; Suárez-Alvarez *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde durch DAC und VPA Behandlung von L87 und V54-2 die HLA-G mRNA Expression, jedoch nicht die HLA-G Proteinexpression induziert. Ebenso konnte in den primären MSC eines kranken Spenders die Expression von HLA-G auf mRNA-, aber nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden, während in 14 von 15 untersuchten primären MSC keine HLA-G mRNA detektiert wurde. Somit scheinen weitere transkriptionelle, post-transkriptionelle und translationelle Regulationsmechanismen in die Kontrolle der HLA-G-Expression von MSC involviert zu sein. Derartige Kontrollmechanismen der HLA-G-Expression wurden bereits postuliert. Dazu

zählen zum Einen die mRNA-Instabilität durch einen 14 Bp Insertions- bzw. Deletions-Polymorphismus (Chen *et al.*, 2008; Hviid *et al.*, 2003 und 2004; Rousseau *et al.*, 2003) und zum Anderen mikro-RNSs (Tan *et al.*, 2007; Veit und Chies, 2009). 2010 konnte von Zhu *et al.*, gezeigt werden, dass die Expression von HLA-G durch die mikro-RNS miR152 reduziert wird, wodurch sich die NK-Zell vermittelte Lyse von JEG-3 Zellen erhöhte. Desweiteren kann die HLA-G Transkription durch die Bindung von Transkriptionfaktoren, wie z.B. „cAMP responsive element binding protein 1“ (CREB1), „interferon regulatory factor“ (IRF) 1, „heat shock transcription factor“ (HSF) 1, „RAS response element binding protein 1“ (RREB-1) sowie „progesterone response element“ reguliert werden. In diesem Zusammenhang wird die Expression von HLA-G durch Umwelteinflüsse wie Stress, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, Hormone (z.B. Progesteron) sowie Zytokine (z.B. Interferone, TNF- α und TGF- β) kontrolliert (Flajollet *et al.*, 2009; Gobin *et al.*, 2002; He *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2000; Lefebvre *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 1997; Yie *et al.*, 2006). Als weitere Regulationsmöglichkeit der HLA-G-Expression wurde die Nitrierung des HLA-G Proteins beschrieben (Diaz-Lagares *et al.*, 2009).

Aufgrund der fehlenden HLA-G-Proteinexpression der innerhalb der vorliegenden Arbeit untersuchten MSC, kann keine Aussage über die funktionelle Bedeutung von HLA-G in MSC getroffen werden. Interessanterweise konnte jedoch erstmalig für immortalisierte MSC gezeigt werden, dass epigenetische Mechanismen an der Regulation der HLA-G-Expression beteiligt sind.

5.2. Das immunregulatorische Potential von KZT-Zelllinien

KZT-Zelllinien besitzen Charakteristika von Tumorstammzellen (Andrews, 1998; Pera *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu differenzierten somatischen Zellen und differenzierten Tumorzellen unterliegen Tumorstammzellen unter anderem einer aberranten Immunregulation und können das Tumorstadium propagieren (Atanackovic *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2006). Tumorstammzellen stellen deshalb ein Ziel für mögliche neue, effizientere Tumorthapien dar. Vor diesem Hintergrund sind Untersuchungen zur Expression, Regulation und Funktion immunmodulatorischer Moleküle in diesen Zellen essentiell. Zum immunregulatorischen Potential von KZT-Zelllinien gibt es wenige Informationen, weshalb die Untersuchung des immunogenen Charakters von Modellzelllinien des KZT innerhalb der vorliegenden Arbeit von Interesse war.

5.2.1. Die Bedeutung des Differenzierungsstatus von KZT-Zelllinien für die Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I-APM

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Expression der wesentlichen Komponenten der MHC-Klasse-I-APM (HC, β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin) sowie die Zelloberflächenexpression des MHC-Klasse-I Moleküls in KZT-Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus analysiert. Als Differenzierungsmarker diente der embryonale Transkriptionsfaktor Oct-3/4, dessen Expression in undifferenzierten, nicht aber in differenzierten KZT-Zellen nachgewiesen wurde (Schoorlemmer *et al.*, 1995).

Die Untersuchung der mRNA-Expression von HC und der Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche von KZT-Zelllinien ergab keinen Hinweis auf eine differenzierungsabhängige Expression mit Ausnahme der EC-Zelllinien H12.1 (undifferenziert) und H12.1D (differenziert). Im Vergleich zu H12.1D wurden in H12.1 geringere Mengen an HC-mRNA sowie MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche nachgewiesen. In den übrigen KZT-Zelllinien wurde sowohl die mRNA von HC als auch das MHC-Klasse-I-Molekül auf der Zelloberfläche heterogen und in den meisten KZT-Zellen diskordiniert exprimiert, was auf transkriptionelle, post-transkriptionelle oder post-translationelle Regulationsmechanismen hindeutet. Beispielsweise wurde in der Zelllinie JAR eine sehr schwache HC-mRNA Expression nachgewiesen, was auf den bereits für diese Zelllinie beschriebenen epigenetischen Regulationsmechanismus der DNS-Methylierung des MHC-Klasse-I Promoters zurückzuführen ist (Boucraut *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite zeigten die Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.1 und 1777NRpmet eine relativ starke HC-mRNA Expression, jedoch eine im Vergleich zu den übrigen Zelllinien schwache Proteinexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche (MFI ≤ 20). Dieses Phänomen könnte in post-transkriptionellen und post-translationellen Regulationsmechanismen begründet sein. Dazu zählen u.a. RNA-Editing, RNA-Interferenz und Proteinmodifikationen (z.B. Ubiquitinierung). Derartige Regulationsmechanismen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert. Die Zelllinien JEG-3, H12.5, H12.1D und 1411HP zeichneten sich durch eine koordiniert starke HC-mRNA sowie MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression aus (MFI ≥ 20).

Die Expressionsuntersuchungen von β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin ergaben ebenfalls Hinweise auf verschiedene Regulationsmöglichkeiten der Expression. Generell wurde eine heterogene und diskordinierte mRNA- und Proteinexpression der Moleküle nachgewiesen. Beispielsweise wurde in der Zelllinie 1777NRpmet eine im Vergleich zu den übrigen KZT-Zelllinien schwache mRNA- und Proteinexpression von β_2 -MG, TAP1 und TAP2 detektiert, was auf eine epigenetische Regulation, wie z.B. DNS-Methylierung, Histondeacetylierung

oder Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren schließen lässt. Eine epigenetische Regulation der Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM wurde bereits für humane embryonale Stammzellen und für induzierte Stammzellen beschrieben (Suárez-Alvarez *et al.*, 2010). Derartige Regulationsmechanismen der Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in KZT-Zelllinien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genauer untersucht.

Auffällig war weiterhin die relativ starke mRNA-Expression jedoch geringe Proteinexpression von Tapasin in den Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.5 und H12.1, was wiederum auf die oben genannten Regulationsmechanismen, wie z.B. Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung hinweisen könnte. Eine Differenzierungsabhängigkeit der Expression der APM-Komponenten war jedoch nur für H12.1 und H12.1D zu sehen, wobei die Unterschiede besonders auf Proteinebene deutlich wurden. Während die Komponenten in der undifferenzierten Zelllinie H12.1 sehr schwach exprimiert wurden, zeigte die differenzierte Zelllinie H12.1D eine starke Expression der Moleküle.

Die Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM wurde bisher nur in wenigen humanen und murinen EC-Zellen untersucht. In den Studien wurden geringe bzw. nicht detektierbare MHC-Klasse-I-Oberflächenexpressionen beschrieben (Croce *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1981). Beispielsweise weist die humane EC-Zelllinie 577LM eine geringe, aber durch IFN- γ induzierbare Expression von MHC-Klasse-I und TAP1 auf (Seliger *et al.*, 1997). Die geringe MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression der humanen EC-Linie Ntera wurde mit der fehlenden TAP1-mRNA Expression dieser Zelllinie in Verbindung gebracht. Nach IFN- γ Behandlung konnte die mRNA- und Proteinexpression dieser Moleküle wieder induziert werden, was für eine transkriptionelle Modulation spricht (Wilson *et al.*, 1994). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in den Ntera-Zellen eine schwache Expression von TAP1 auf mRNA- und Proteinebene detektiert, was die geringe MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression begründen könnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Mehrheit der untersuchten KZT-Zelllinien durch eine geringe MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression auszeichnet. Dieses Phänomen beschränkt sich nicht nur auf KZT-Zelllinien, sondern tritt auch bei anderen Tumoren, wie z.B. dem Lungenzellkarzinom und dem Nierenzellkarzinom sowie bei Virus-infizierten Zellen auf (Garrido *et al.*, 2010; Lilley & Ploegh, 2005; Restifo *et al.*, 1993; Rotem-Yeduhar *et al.*, 1994). Humane und murine Tumorzellen zeichnen sich durch effiziente Mechanismen aus, die eine MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression und somit das Erkennen durch zytotoxische T-Zellen verhindern. Dazu zählen strukturelle Alterationen oder Fehlregulationen der Transkription und Translation der MHC-Klasse-I-APM Komponenten, die zu einer verringerten Expression und Funktionalität dieser Moleküle führen (Restifo *et al.*, 1993; Rotem-Yeduhar *et al.*, 1994;

Seliger *et al.*, 1996 und 1997). Die Gruppe um Suárez-Alvarez brachte 2010 die geringe Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen mit der reduzierten bzw. fehlenden Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in Verbindung. Auch innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde für die untersuchten KZT-Zelllinien eine geringe Expression einiger Komponenten der MHC-Klasse-I-APM nachgewiesen, was die verminderte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche begründen könnte. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in den untersuchten KZT-Zelllinien, welche sich durch eine geringe MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auszeichnen (Ntera, 2102EP, H12.1 und 1777NRpmet), auch eine schwache Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin (in Ntera), β_2 -MG und Tapsin (in 2102EP), sowie β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin (in H12.1 und 1777NRpmet) detektiert wurde. Eine Ausnahme bildet hier die Zelllinie JAR, deren fehlende MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wie oben beschrieben, auf einer Methylierung der MHC-Klasse-I-Promoter-DNS beruht. Auf der anderen Seite wurde in den KZT-Zelllinien JEG-3, H12.5, H12.1D und 1411HP eine stärkere MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression detektiert, was in der höheren Proteinexpression mehrerer Komponenten der MHC-Klasse-I-APM begründet sein könnte. Eine starke Expression von MHC-Klasse-I wurde bereits für die JEG-3 Zellen nachgewiesen (Kawata *et al.*, 1984; Rinke de Wit *et al.*, 1989).

Während die heterogene Expression der MHC-Klasse-I Komponenten der APM in humanen EC-Zellen in den verschiedenen oben genannten Mechanismen begründet zu sein scheint, gibt es für murine EC-Zellen hinsichtlich der Regulationsmechanismen mehr Informationen. Die fehlende bzw. geringe HC-mRNS-Expression der undifferenzierten murinen EC-Linie F9 wurde zum Einen mit einer erhöhten Sensitivität der MHC-Klasse-I-Gene gegenüber DNase I im Vergleich zu differenzierten F9-Zellen (Croce *et al.*, 1981) und zum Anderen mit dem Binden von nur in undifferenzierten F9-Zellen vorhandenen Transkriptionsfaktoren an negativ regulatorische Elemente des MHC-Klasse-I-Gens begründet (Flanagan *et al.*, 1991). Damit scheint die Expression der Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in EC-Zellen durch einen weiteren wichtigen Mechanismus - der Differenzierung - reguliert zu werden, worauf im Folgenden weiter eingegangen wird.

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Expression wichtiger Komponenten der MHC-Klasse-I-APM in humanen KZT-Zelllinien korrelierten mit bereits publizierten Expressionsdaten anderer Zellsysteme. Besonders interessant erschien hierbei die mögliche differenzierungsabhängige Regulation der Expression von MHC-Klasse-I-Komponenten der APM in den Zelllinien H12.1 und H12.1D.

5.2.2. Die Rolle der ATRA-vermittelten Differenzierung für die Immunogenität der testikulären KZT-Zelllinie H12.1

Differenzierungsinduzierende Substanzen, wie Derivate von Vitamin-D und Vitamin-A, haben eine große Bedeutung in der Tumorthherapie (Haque *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2005; Reichrath, 2001). Durch die Behandlung mit ATRA konnte bei einer Vielzahl verschiedener Tumore die Proliferation gehemmt, die Apoptose induziert oder die Sensitivität gegenüber zytotoxischen T-Zellen erhöht werden (Easwaran *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 1994; Kelloff *et al.*, 1999; Nicke *et al.*, 1999; Raffo *et al.*, 2000; Satake *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2003; Vertuani *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Auf Grund ähnlich ablaufender Differenzierungsvorgänge in nichtseminomatösen KZT-Zellen und in der normalen Embryogenese sind diese Tumorzellen nicht nur unter tumorbiologischen, sondern auch unter stammzellbiologischen und entwicklungsbiologischen Aspekten von Interesse. Mit den von nichtseminomatösen KZT abgeleiteten EC-Zelllinien stehen Zellsysteme für Studien von molekularen Ereignissen einer frühen Embryogenese sowie für Untersuchungen zur Immunologie des KZT zur Verfügung (Andrews, 1998; Roach *et al.*, 1993).

Um zu untersuchen in wieweit die Differenzierung testikulärer KZT-Zellen deren Immunogenität verändert, wurde die undifferenzierte EC-Zelllinie H12.1 als Modellsystem herangezogen und für zwölf Tage mit pharmakologischen ATRA-Konzentrationen (1 - 10 μM) und ATRA-Konzentrationen, welche bereits für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen sowie Ntera-Zellen eingesetzt wurden (10 - 100 μM , in der vorliegenden Arbeit 20 μM) (Andrews, 1984; Draper *et al.*, 2002; Segaert *et al.*, 1995) behandelt. Alle verwendeten ATRA-Konzentrationen führten nach neun bis zwölf Tagen zur Differenzierung der H12.1 Zellen, welche durch die bereits beschriebene Herabregulation der Differenzierungsmarker Oct-4 und Alkalische Phosphatase gekennzeichnet war (Damjanov *et al.*, 1993; Schoorlemmer *et al.*, 1995). Der antiproliferative Effekt von ATRA war nach einer 9-tägigen Behandlung der H12.1 Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen der differenzierungsinduzierenden Substanz erkennbar. Für die murine EC-Zelllinie F9 wurde eine Inhibition der Proliferation durch 10 μM ATRA bereits nach 24 h beschrieben (Atencia *et al.*, 1994), während dieser Effekt bei humanen Brustkrebszellen schon nach einer 24-stündigen Behandlung mit 1 μM ATRA zu sehen war (Seewaldt *et al.*, 1995). Demnach scheint die antiproliferative Wirkung von ATRA nicht nur konzentrations- und zeitabhängig sondern auch zelltypspezifisch zu sein. Nach 12-tägiger Behandlung der H12.1 Zellen mit 1 - 10 μM ATRA wurde in unbehandelten, mit ETOH behandelten und mit ATRA behandelten H12.1 Zellen kein Unterschied im Prozentsatz toter Zellen detektiert, wodurch eine

zytotoxische Wirkung von ATRA ausgeschlossen werden konnte. Zur Induktion der Apoptose kann hier keine Aussage getroffen werden, da innerhalb der vorliegenden Arbeit der Prozentsatz toter Zellen mittels 7AAD-Färbung gemessen wurde. Durch eine Doppelfärbung der Zellen mit 7AAD und Annexin V könnte die Induktion der Apoptose durch ATRA untersucht werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass während der Differenzierung der H12.1 Zellen mittels ATRA apoptotische Zellen entstehen, was neben murinen EC-Zellen (Atencia *et al.*, 1994) auch für metastasierende Melanomzellen (Zhang *et al.*, 2003) und Brustkrebszellen (Seewaldt *et al.*, 1995) gezeigt wurde. Phänotypisch unterschieden sich die differenzierten Zellen durch den geringeren Konfluenzgrad und das größere Zytoplasma-Kern-Verhältnis deutlich von den undifferenzierten Zellen. Derartige morphologische Veränderungen nach ATRA-induzierter Differenzierung wurden ebenfalls bei der murinen EC-Linie F9 (Atencia *et al.*, 1994) beschrieben. Im Laufe der Differenzierung humaner Brustkrebszellen hingegen wurden phänotypische Eigenschaften der Apoptose, wie nukleäre Kondensation, zytoplasmatische Vakuolisierung, Verlust der Adhärenz und Schrumpfen der Zellen beobachtet (Seewaldt *et al.*, 1995). Derartige apoptotische Veränderungen wurden während der Differenzierung der H12.1 Zellen nicht festgestellt, was wiederum darauf schließen lässt, dass gewisse ATRA-vermittelte anti-Tumor-Effekte zelltypspezifisch zu sein scheinen.

Wie bereits erwähnt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Veränderung der Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-APM während der Differenzierung von H12.1 Zellen untersucht. Im Vergleich zu unbehandelten H12.1 Zellen wurde sowohl in differenzierenden ATRA behandelten H12.1 Zellen als auch in ETOH behandelten H12.1 Zellen eine geringe Erhöhung der HC und β_2 -MG mRNA-Expression nachgewiesen. Möglicherweise wurde dieser Effekt stressbedingt durch ETOH hervorgerufen. Das Phänomen einer ETOH-induzierten Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I Molekülen wurde bereits für verschiedene humane und murine Zellen beschrieben (Parent *et al.*, 1987; Ruhland *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1989). Innerhalb der vorliegenden Arbeit war dieser Effekt nur auf mRNA-Ebene nachweisbar. Eine Zunahme der Proteinexpression von HC- und β_2 -MG sowie eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche wurde nur in differenzierenden und nicht in ETOH behandelten bzw. in unbehandelten Zellen beobachtet, was auf eine differenzierungsabhängige Regulation der Proteinexpression dieser Moleküle schließen lässt.

MHC-Klasse-I Moleküle werden auf der Zelloberfläche als heterotrimere Komplexe exprimiert, die sich aus der schweren Kette HC, einem integralen Membranprotein, der leichten Kette β_2 -MG und einem Peptid zusammensetzen (Bjorkman und Parham, 1990; Cresswell *et al.*, 1974; Townsend und Bodmer, 1989). Zudem ist die Assoziation von HC mit

β_2 -MG Voraussetzung für die Stabilität des MHC-Klasse-I Moleküls (Krangel *et al.*, 1979). Neben der Expression und Assoziation von HC und β_2 -MG ist weiterhin das Beladen des MHC-Klasse-I Moleküls mit Peptidfragmenten essentiell, da nicht beladene MHC-Klasse-I Moleküle instabil sind (Townsend *et al.*, 1989; Ljunggren *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1992) und somit nicht auf die Zelloberfläche gelangen. Die erhöhte MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression differenzierter H12.1 Zellen könnte demnach aus der verstärkten HC- und β_2 -MG-Proteinexpression während der Differenzierung der H12.1 Zellen resultieren, was jedoch nicht ausschließt, dass weitere Faktoren der MHC-I-Klasse APM in diesen Prozess involviert sind. Dafür spricht, dass sich die differenzierenden H12.1 Zellen durch eine starke Erhöhung der mRNA und Proteinexpression von TAP1, TAP2 und Tapasin auszeichnen. Der Transporter TAP, bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 ist für den ATP-abhängigen Transport antigener Peptidfragmente aus dem Zytosol in das ER verantwortlich (Elliott *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1995; Kaer *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1992). Es ist beschrieben, dass eine verminderte TAP1-Proteinexpression eine geringe Proteinexpression von TAP2 mit sich zieht (Seliger *et al.*, 2001). TAP1 scheint für die Stabilität von TAP2 und damit für die Funktionalität des TAP-Transporters essentiell zu sein (Seliger *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 2000). Im Vergleich zu TAP1 wurde während des Differenzierungsprozesses von H12.1 eine wesentlich geringere Hochregulation der TAP2 mRNA-Expression beobachtet. Desweiteren war die stark zunehmende Proteinexpression von TAP1 und TAP2 auffällig. Somit würde sich die vermutete stabilisierende Wirkung von TAP1 auf TAP2 im Rahmen einer post-translationalen Regulation bestätigen, währenddessen die Expression von TAP1 auf transkriptioneller Ebene reguliert zu sein scheint.

Neben dem Transporter TAP kommt besonders dem Chaperon Tapasin eine Schlüsselrolle innerhalb des Peptidbeladungskomplexes zu (Garbi *et al.*, 2000; Rizvi und Raghavan, 2010; Williams *et al.*, 2002). Auf der einen Seite bildet Tapasin mit einer weiteren Komponente der APM, der Thiol-Oxidoreduktase Endoplasmatisches Retikulum Protein 57 (ERp57) ein Heterodimer, welches die Rekrutierung und Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen beeinflussen kann (Rizvi *et al.*, 2011; Stepensky *et al.*, 2007). In Abwesenheit von Tapasin katalysiert ERp57 die Reduktion der α_2 -Disulfidbrücke der MHC-Klasse-I-Peptidbindungstasche, wodurch die Beladung von MHC-Klasse-I Molekülen mit Peptiden verhindert wird (Kienast *et al.*, 2007). Desweiteren ist Tapasin an der Selektion von geeigneten Peptiden für das MHC-Klasse-I Molekül beteiligt (Koch *et al.*, 2004). Weiterhin ist für das Chaperon Tapasin ebenfalls eine stabilisierende Rolle des TAP-Transporters beschrieben worden (Garbi *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 1998; Raghuraman *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002). Tapasin hat eine große Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung (Belicha-

Villanueva *et al.*, 2008). Innerhalb dieser Studie wurde gezeigt, dass eine Zunahme der TAP-Expression die MHC-Klasse-I-Expression nicht verstärkt, während die Überexpression von Tapasin bei geringer TAP-Aktivität zu einer starken Erhöhung der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression führt. Die erhöhte Proteinmenge von Tapasin in differenzierenden H12.1 Zellen könnte somit TAP1 und TAP2 im Rahmen einer post-translationalen Regulation stabilisieren, was einen weiteren Grund für deren erhöhte Proteinexpression während der Differenzierung der H12.1 Zellen darstellen würde.

Die beschriebenen Eigenschaften der MHC-Klasse-I-APM-Komponenten und ihre erhöhte Expression in differenzierenden H12.1 Zellen machen somit die Zunahme der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression in diesem Zellsystem verständlich, was hier noch einmal kurz zusammengefasst werden soll:

- (i) Durch ATRA-Behandlung steigen die Proteinmengen an HC, β_2 -MG, TAP1, TAP2 und Tapasin in differenzierenden H12.1 Zellen, was möglicherweise zu erhöhten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf diesen Zellen führt.
- (ii) Durch eine ATRA-vermittelte transkriptionelle Regulation erhöht sich besonders stark die mRNA-Expression von TAP1 in differenzierenden H12.1 Zellen, was möglicherweise auch die Zunahme der TAP1-Proteinexpression erklären könnte. Vermehrt vorhandene TAP1 Proteine stabilisieren TAP2, was eventuell die erhöhte TAP2 Proteinexpression begründet.
- (iii) Durch die Zunahme der Proteinexpression von Tapasin in differenzierenden H12.1 Zellen wird der MHC-Klasse-I Peptidbeladungskomplex stabilisiert und die Beladung von MHC-Klasse-I Molekülen mit Peptidfragmenten begünstigt, was letztendlich zur vermehrten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche führen könnte.

Die Modulation der Expression von MHC-Klasse-I-APM durch Retinoide wurde bereits für humane Neuroblastomzellen (Vertuani *et al.*, 2003), die humane EC-Zelllinie Ntera-2 (Nagata *et al.*, 1992; Segars *et al.*, 1993; Wójcik & Wilk, 1999), die murine EC-Zelllinie F9 (Croce *et al.*, 1991; Miyazaki *et al.*, 1986) und humane Zellen des Gebärmutterhalstumors (Santin *et al.*, 1998) beschrieben. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Modell-Zelllinie H12.1 erstmalig eine ATRA-vermittelte Hochregulation von MHC-Klasse-I-Komponenten der APM in testikulären KZT-Zellen nachgewiesen werden.

Inwieweit der durch ATRA-Differenzierung induzierten Hochregulation der MHC-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche differenzierter H12.1 Zellen eine immunologische Bedeutung zukommt, wurde im Rahmen von allogenen ZTL-Assays untersucht.

Nach Cokultivierung von undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen mit allogenen CD8⁺ T-Zellen verschiedener Spender konnten keine Unterschiede in der Aktivierung der IFN- γ Produktion und Proliferation der CD8⁺ T-Zellen gemessen werden. Möglicherweise war die Verdopplung der Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche nicht ausreichend für eine Induktion der T-Zell-Aktivierung. Dafür spricht, dass sich nach ATRA-vermittelter 6-facher Hochregulation der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression in Neuroblastomzellen die spezifischen Lyse der Zielzellen durch allogene und autologe CD8⁺ T-Zellen von 12 - 15 % nur auf 24 - 35 % erhöhte (Vertuani *et al.*, 2003). Zur weiteren Untersuchung der immunologischen Bedeutung der erhöhten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der zelloberfläche differenzierter H12.1 Zellen für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wäre es sinnvoll in weiteren Studien CD8⁺ zytotoxische T-Zellen des gleichen HLA-Phänotyps wie H12.1 zu verwenden. Dafür müssten peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen von passenden Spendern generiert werden. Desweiteren könnten die bereits innerhalb der Arbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Immunologie vorhandenen HLA-A02-, MART-restringierten CD8⁺ T-Zellen verwendet werden. Derartige Untersuchungen setzen die erfolgreiche Transfektion von H12.1 Zellen mit HLA-A02 sowie eine erhöhte Zelloberflächenexpression dieses Moleküls nach der Differenzierung voraus.

Weiterhin erfolgten Untersuchungen zum immunregulatorischen Potential differenzierter H12.1 Zellen gegenüber der NK-Zelllinie NK-92. Es wurde vermutet, dass die erhöhte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche differenzierter H12.1 Zellen zur verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber der H12.1 Zellen führt. In der Literatur wurde eine durch ATRA-vermittelte Erhöhung der Expression von NK-Zell-aktivierenden Molekülen MICA, MICB und ULBP1 - 3 in Leberkrebszellen (Jinushi *et al.*, 2003) und Leukämie-B-Zellen (Poggi *et al.*, 2004; Rohner *et al.*, 2007) beschrieben. Vor diesem Hintergrund wurde die Zelloberflächenexpression dieser Komponenten auf undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen untersucht. Es konnte keine Veränderung der Zelloberflächenexpression von MICA und ULBP1 - 3 nach Differenzierung detektiert werden. Für MICB wurde eine um ca. 35 % verringerte Expression auf der Zelloberfläche von differenzierten H12.1 Zellen beobachtet. Möglicherweise ist die Regulation dieser Komponenten durch ATRA zelltypspezifisch. Nachdem H12.1 Zellen mit NK-92 Zellen kultiviert wurden, konnten keine Unterschiede in der NK-92-vermittelten Induktion der Apoptose in undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen detektiert werden. Einerseits

kann somit spekuliert werden, dass die Verdopplung der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen und/oder die Verringerung der MICB Expression um ca. 35 % auf differenzierten H12.1 Zellen für eine Suppression der Zytotoxizität von NK-92 Zellen gegenüber den H12.1 Zellen nicht ausreichend war. Auf der anderen Seite wurde für Neuroblastomzellen, bei denen die ATRA-Behandlung zur 6-fachen Hochregulation der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression führte, ebenfalls keine Veränderung der Lyse durch die NK-Zelllinie Nishi, jedoch eine verstärkte Lyse durch frisch isolierte NK-Zellen beschrieben (Vertuani *et al.*, 2003). Vor diesem Hintergrund kann vermutet werden, dass die Inhibition von NK-Zellen aufgrund einer erhöhten MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression generell nur unter Verwendung frischer NK-Zellen detektierbar ist.

Somit konnte nach der Differenzierung von H12.1 keine Veränderung der Immunogenität dieser Zellen gegenüber allogenen CD8⁺ T-Zellen und der NK-Zelllinie NK-92 nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde im Rahmen der ATRA-induzierten Differenzierung von H12.1 neben der Verdopplung der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression die Expression weiterer immunmodulatorischer Komponenten, wie z.B. des immunsuppressiven Moleküls HLA-G oder der coaktivierenden bzw. coinhibitorischen Moleküle der B7-Familie verändert, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Eine veränderte Expression dieser Komponenten würde sich möglicherweise auf die Immunogenität der H12.1 Zellen gegenüber CD8⁺ T-Zellen und der NK-Zelllinie NK-92 auswirken und den putativen immunogenen bzw. immunsuppressiven Effekt der erhöhten MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression der differenzierten H12.1 Zellen gegenüber NK-92-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen überdecken.

Ob die Verdopplung der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression auf differenzierten H12.1 Zellen tatsächlich relevant für die Modulation der Immunantwort ist, konnte letztendlich innerhalb dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise würden Zytotoxizitäts- sowie Zytokinfreisetzungssassays mit T-Zellen des gleichen HLA-Phänotyps wie H12.1 und mit frisch isolierten NK-Zellen aufschlussreich sein, was eine Reihe von Vorarbeiten voraussetzt. Zum Einen müssten aufgrund des HLA-A11, 26-Phänotyps der H12.1 Zellen peptidspezifische ZTL von passenden Spendern generiert werden. Auf der anderen Seite könnten auch die bereits innerhalb unserer Arbeitsgruppe vorhandenen HLA-A02, MART-spezifischen ZTL verwendet werden. Dafür müssten die H12.1 Zellen zunächst erfolgreich mit HLA-A02 transfiziert werden und das Molekül nach Differenzierung auch verstärkt auf der Zelloberfläche exprimieren.

5.2.3. Die Expression der costimulatorischen Moleküle B7-H1 - H4 in KZT-Zelllinien - Bedeutung des Differenzierungsstatus der Zelllinien und der DNS-Methylierung des B7-H1 Gens

Wie bereits unter 5.1.3. erwähnt, dehnte sich die Anzahl der B7-Familienmitglieder innerhalb der letzten Jahre von B7-1 und B7-2 auf die Moleküle B7-H1, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4 und B7-H6 aus. Die Identifizierung der neuen Mitglieder der B7-H-Familie führte zu Untersuchungen ihrer Expression und Funktion in Tumoren verschiedenen Ursprungs (Brandt *et al.*, 2009; Flies *et al.*, 2007; Greenwald *et al.*, 2005).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Expression und Regulation dieser Moleküle in KZT-Zelllinien analysiert. Für B7-H2 und B7-H3 wurde eine relativ homogene, vom Differenzierungsstatus der KZT-Zelllinien unabhängige koordinierte mRNA- und Proteinexpression beobachtet. Die coinhibitorischen Moleküle B7-H1 und B7-H4 wurden auf mRNA-Ebene jedoch sehr heterogen exprimiert. Auf Proteinebene konnte lediglich für JEG-3 und H12.1D eine B7-H1-Zelloberflächenexpression detektiert werden, wohingegen B7-H4 von keiner KZT-Zelllinie auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Die B7-H4-Zelloberflächenexpression einer mit B7-H4-transfizierten Melanom-Zelllinie konnte jedoch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten auf epigenetische, post-transkriptionelle bzw. post-translationelle Regulationsmechanismen beider Moleküle hinweisen. Eine Abhängigkeit der B7-H1- und B7-H4-Expression vom Differenzierungsstatus der KZT-Zelllinien wurde mit Ausnahme von H12.1 (undifferenziert, keine B7-H1-Zelloberflächenexpression) und H12.1D (differenziert, detektierbare B7-H1-Zelloberflächenexpression) nicht beobachtet. Die Zelloberflächenexpression von B7-H1 und B7-H4 konnte für eine Vielzahl von Tumoren, wie z.B. für Brust-, Eierstock-, Lungen- und Nierentumore nachgewiesen werden (Salceda *et al.*, 2005; Tringler *et al.*, 2005; Ghebeh *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004; Krambeck *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass viele etablierte Tumorzelllinien diese Moleküle nicht konstitutiv auf der Proteinebene exprimieren, wohingegen die mRNA von B7-H1 und B7-H4 exprimiert wird (Choi *et al.*, 2003; Salceda *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2002), was für eine posttranskriptionelle Regulation dieser Moleküle spricht (Flies und Chen, 2007). Weiterhin wurde postuliert, dass die Expression von B7-H1 und B7-H4 gewebespezifisch ist und durch Transkriptionsfaktoren oder gelöste Faktoren des Tumor-Mikromilieus reguliert zu sein scheint (Flies und Chen, 2007). Die Expression von B7-H1 kann durch IFN- γ induziert werden. Innerhalb der 350 Bp stromaufwärts vom Translationsstart des B7-H1-Gens wurden zwei putative Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren IRF1- α bzw. IRF- β identifiziert (Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). Desweiteren wurde gezeigt, dass die Expression von

B7-H1 durch die mikro RNS-513 inhibiert werden kann (Gong *et al.*, 2009/2010). Weitere molekulare Mechanismen der B7-H-Expression wurden bisher noch nicht detailliert untersucht.

In der vorliegenden Arbeit erschien besonders der hochfrequentierte Verlust der B7-H1- sowie der B7-H4-Transkription auffällig. Die defiziente B7-H1-Transkription KZT-Zelllinien könnte auf epigenetisches „silencing“ zurückzuführen sein, da das Methylierungsmuster innerhalb der CpG-Insel des B7-H1 Promoters in den meisten Fällen mit dem B7-H1 Transkriptionslevel der KZT korrelierte. Eine Ausnahme bildeten hier u.a. die H12.1D Zellen. In diesen Zellen wurden innerhalb der CpG Insel des B7-H1 Gens neben 13 unmethylierten fünf methylierte CpGs detektiert, währenddessen in den übrigen Zelllinien außer in JAR keine Methylierungen oder die Methylierung eines CpG-Oligonukleotids nachgewiesen wurde. Dennoch konnte in den H12.1D Zellen eine im Vergleich zu den übrigen KZT-Zelllinien starke mRNA- und Proteinexpression von B7-H1 detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass nur die Methylierung ganz bestimmter CpGs innerhalb der CpG Insel des B7-H1 Gens zum epigenetischen „silencing“ der B7-H1-Transkription führt. Möglicherweise wird die Transkription von B7-H1 auch erst durch über die Methylierung einer gewissen Anzahl von CpGs inhibiert. Für diese Hypothese spricht die innerhalb der vorliegenden Arbeit detektierte Methylierung von 18 CpGs innerhalb der CpG Insel des B7-H1 Gens und die nicht nachweisbare Transkription dieses Moleküls in der Zelllinie JAR. Die DAC-vermittelte Zeit- und Dosis-abhängige Demethylierung der 18 methylierten CpGs innerhalb der CpG Insel des B7-H1 Gens wurde von einer ansteigenden B7-H1 Transkription in der Zelllinie JAR begleitet. Das methylierungsabhängige „silencing“ von B7-H1 wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschrieben und deutet auf einen neuen Mechanismus in der Regulation des Moleküls hin. Vor dem Hintergrund, dass die Expression von B7-H1 einen immunsuppressiven Mechanismus zahlreicher Tumorzellen darstellt (Dong *et al.*, 2002 und 2003; Subudhi *et al.*, 2005), sollten demethylierende Substanzen, welche heutzutage in der Tumorthherapie verwendet werden, kritisch evaluiert werden (Amiot *et al.*, 2010). Da bisher nur sehr wenig Informationen darüber existieren, inwieweit die Induktion der Expression von coinhibitorischen bzw. coaktivierenden Molekülen durch Demethylierung zur Aktivierung bzw. Suppression der T-Zell-Antwort führt (Thomas *et al.*, 2005), wären weitere funktionelle Untersuchungen zur demethylierungs-vermittelten Hochregulation der B7-H1-Expression der Zelllinie JAR im Rahmen von Zytotoxizitätsassays mit T-Zellen sinnvoll. Diese Zelllinie ist jedoch aufgrund der beschriebenen Methylierung des MHC-Klasse-I Promoters (Boucraut *et al.*, 1993) für derartige Untersuchungen ungeeignet, da eine Induktion der B7-H1-Expression durch die Behandlung der Zellen mit DAC möglicherweise eine Hochregulation der MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression mit sich

ziehen würde. Eine Veränderung der T-Zellantwort gegenüber DAC-behandelten JAR-Zellen könnte somit nicht mit Bestimmtheit auf B7-H1 zurückgeführt werden.

In den KZT-Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.5, H12.1, 1777NRpmet und 1411HP wurde keine Methylierung von CpGs bzw. die Methylierung von nur einem von 18 CpG-Oligonukleotiden innerhalb der CpG Insel des B7-H1 Gens nachgewiesen. Dennoch konnte in diesen Zelllinien keine mRNA- und/oder keine Proteinexpression von B7-H1 detektiert werden. Diese defiziente Expression von B7-H1 in einigen KZT-Zelllinien könnte auf RNA-Interferenzen zurückgeführt werden, was 2010 für Kryospridien und 2009 für Epithelzellen der Galle gezeigt wurde (Gong *et al.*, 2009/2010). In diesen Studien wurde die Expression von B7-H1 durch die mikro RNA-513 inhibiert. Demnach wäre es sinnvoll die Expression der mikro RNA-513 in den genannten KZT-Zelllinien zu untersuchen.

5.2.4. Die Expression von HLA-G in KZT-Zelllinien – Bedeutung des Differenzierungsstatus der Zelllinien und der DNA-Methylierung des HLA-G Gens

Wie bereits unter 1.1. beschrieben, handelt es sich bei HLA-G um ein nicht-klassisches MHC-Klasse-I Molekül, welches die zytotoxische Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen inhibiert. Aufgrund dieser Wirkung wird die Expression von HLA-G als „immun-escape“-Mechanismus vieler Tumorzellen beschrieben (Adrian-Cabestre *et al.*, 1999; Amiot *et al.*, 2011; Gati *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1995/1998/2003; Lesport *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Moretta *et al.*, 1997; Pende *et al.*, 1997; Seliger *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010).

Zur Expression von HLA-G in Tumoren gibt es zahlreiche Informationen. Die Expression HLA-G auf mRNA- und/oder Proteinebene wurden in vielen Tumorzelllinien und Tumoren verschiedener Entitäten, wie z.B. dem Adenokarzinom der Prostata, Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre, B- und T-Zell-Lymphomen, Melanom, Glioblastom, Leukämien, Uterus-, Brust-, Eierstock-, Lungen-, Blasen-, Magen- und Nierentumoren beschrieben (Amiot *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2003; Dunker *et al.*, 2008; El-Chennawi *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2001; Ishigami *et al.*, 2006; Kleinberg *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2002; Menier *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 1998, 1999 und 2000; Real *et al.*, 1999a; Rebmann *et al.*, 2007; Urosević *et al.*, 2002; Wiendl *et al.*, 2002; Yie *et al.*, 2007). Innerhalb dieser Studien wurden jedoch Unterschiede in den Frequenzen HLA-G positiver und HLA-G negativer Tumorzelllinien bzw. Tumore detektiert. So exprimierten ca. 70 % der Melanome HLA-G mRNA und in 30 % der untersuchten Melanome wurde HLA-G auf Proteinebene detektiert (Chang *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2004). In Magentumoren wurde die Proteinexpression von HLA-G in 52 von

115 Fällen (Ishigami *et al.*, 2006) nachgewiesen. In einer weiteren Studie konnte in 113 von 160 Magentumoren die Proteinexpression dieses Moleküls detektiert werden (Yie *et al.*, 2007). Die Expression von HLA-G auf mRNA-Ebene wurde innerhalb beider Arbeiten nicht untersucht (Ishigami *et al.*, 2006; Yie *et al.*, 2007).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HLA-G in neun KZT-Zelllinien untersucht. Die mRNA-Expression von HLA-G scheint in den KZT-Zelllinien mit Ausnahme der differenzierten JEG-3 Zellen differenzierungsabhängig reguliert sein. Die Expression von HLA-G auf mRNA-Ebene wurde in den vier undifferenzierten Zelllinien Ntera, 2102EP, H12.5 und H12.1, jedoch nicht in den vier differenzierten Zelllinien JAR, H12.1D, 1777NRpmet und 1411HP detektiert. Auf Proteinebene konnte nur für JEG-3 die Expression von HLA-G nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf post-transkriptionelle und post-translationelle Regulationen der Expression dieses Moleküls in den undifferenzierten Zellen hin. Die fehlende mRNA-Expression in den differenzierten KZT-Zelllinien scheint in epigenetischen und post-transkriptionellen Regulationsmechanismen, wie z.B. Methylierung der DNS und mikro-RNS, begründet zu sein. In der Literatur sind bereits einige Fälle - darunter auch die KZT-Zelllinien JEG-3, JAR und Ntera - beschrieben, bei denen der Verlust bzw. die schwache HLA-G-Transkription mit einer epigenetischen Expressionskontrolle in Zusammenhang gebracht wird. Viele Tumore zeichnen sich durch den Verlust der Kontrolle in der DNS-Methylierung des HLA-G Promoters aus, was für die HLA-G Transkription ursächlich zu sein scheint (Dunker *et al.*, 2008; Holling *et al.*, 2009; Menendez *et al.*, 2008; Mouillot, G. *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2003; Polakova *et al.*, 2009; Rouas-Freiss *et al.*, 2003; Suárez-Alvarez *et al.*, 2010). Die innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführten HLA-G Methylierungsstudien korrelierten in allen Fällen, mit Ausnahme von 1777NRpmet, mit dem HLA-G Transkriptionslevel der untersuchten KZT-Zelllinien. Der Nachweis einer Reversion der DNS-Methylierung des HLA-G Promoters in H12.1D Zellen war jedoch auch unter Verwendung verschiedener Kombinationen und Konzentrationen der demethylierenden Agenzien DAC sowie des Histondeacetylase-Inhibitors Valproinsäure nicht erfolgreich. Weiterhin war im Fall der Zelllinie 1777NRpmet keine Korrelation des Methylierungsstatus mit der HLA-G Transkription zu sehen. Diese Ergebnisse deuten auf weitere epigenetische/transkriptionelle bzw. post-transkriptionelle Regulationsmechanismen der HLA-G Transkription hin, wie z.B. Acetylierung von Histonen sowie mikro-RNS. Derartige Mechanismen zur Regulation der HLA-G Transkription wurden bereits unter 5.1.4. beschrieben. Im Vergleich zur HLA-G negativen Zelllinie JAR wurde in den HLA-G positiven JEG-3 Zellen eine erhöhte Histon Acetylierung des HLA-G-Promoter-Chromatins beschrieben (Holling *et al.*, 2009). Eine Regulation der Expression von HLA-G in KZT-Zelllinien durch mikro-RNS ist ebenfalls sehr wahrscheinlich. Dafür spricht, dass in den KZT-

Zelllinien JAR, Ntera, 2102EP, H12.5, H12.1, H12.1D, 1411HP und 1777NRpmet, welche HLA-G teilweise auf mRNA-Ebene aber nicht auf Proteinebene exprimieren, eine im Vergleich zur HLA-G positiven KZT-Zelllinie JEG-3 erhöhte Transkription der putativen HLA-G-spezifischen mikro-RNS-148A, -148B und -152 detektiert werden konnte (Simon Jasinski, Institut für Medizinische Immunologie, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals eine differenzierungsabhängige Transkription von HLA-G gezeigt, welche möglicherweise auf transkriptionellen und/oder post-transkriptionellen Regulationsmechanismen beruht, die sich abhängig vom Differenzierungsstatus der KZT-Zelllinien auswirken. Da jedoch keine der untersuchten Zellen, außer JEG-3, HLA-G auf der Zelloberfläche exprimierte, kann zur funktionellen Bedeutung des Moleküls in KZT-Zelllinien keine Aussage getroffen werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung des immunregulatorischen Potentials von mesenchymalen Stammzellen und Keimzelltumor-Zelllinien.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten konnte in allen analysierten MSC die mRNA- und Proteinexpression der MHC-Klasse-I APM Moleküle nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stellen den so oft als „immunsuppressiv“ beschriebenen Phänotyp der MSC deutlich in Frage. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig MSC von Spendern mit malignen Erkrankungen bzw. Infektionen des Knochenmarks hinsichtlich der Expression von Molekülen der MHC-Klasse-I APM untersucht. Im Gegensatz zu MSC von gesunden Patienten wurde für die MSC kranker Personen eine heterogene Expression der MHC-Klasse-I APM Komponenten detektiert und eine mögliche Veränderung der Immunogenität von MSC kranker Spender diskutiert. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung der MSC von kranken Patienten im Rahmen allogener und autologer Transplantationen kritisch. Im Vergleich zu undifferenzierten primären MSC wurde nach deren osteogener und/oder adipogener Differenzierung in den meisten Fällen eine verstärkte Expression der MHC-Klasse-I APM Moleküle detektiert. Der Einsatz von MSC zur Geweberegeneration setzt eine Differenzierung dieser Stammzellen voraus. Eine Veränderung der Immunogenität von undifferenzierten versus differenzierten MSC gegenüber Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse nicht ausgeschlossen. Es sollten deshalb MSC von weiteren Spendern differenziert und hinsichtlich der Expression sowie immunologischer Funktion der MHC-Klasse-I APM untersucht werden.

Innerhalb der Expressionsstudien der costimulatorischen bzw. inhibitorischen Moleküle B7-H1 - H4 konnte die Expression des inhibitorischen B7-H4 Moleküls sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in MSC nicht detektiert werden. Neben den bereits erwähnten Mechanismen der MSC-vermittelten Immunsuppression spricht lediglich die innerhalb der vorliegenden Arbeit detektierte Expression des inhibitorischen B7-H1 Moleküls sowie die fehlende Expression des costimulatorischen B7-H2 Moleküls für den immunsuppressiven Phänotyp dieser Zellen. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Expression des, hinsichtlich seiner immunologischen Funktion, kontrovers diskutierten B7-H3 Moleküls in MSC nachgewiesen. Die Expression des Moleküls wurde in drei MSC mittels siRNA von 100 % auf 10 - 12 % gesenkt. Dies führte zu einer Erhöhung der Lyse dieser MSC durch frisch isolierte, aktivierte NK-Zellen um bis zu 35 %. Diese Ergebnisse könnten womöglich für eine protektive Rolle von B7-H3 in der NK-Zell-vermittelten Lyse der MSC sprechen. Um eine genauere Aussage zu treffen, müssten MSC von mindestens zehn weiteren Spendern

untersucht werden. Für derartige Analysen werden hohe MSC-Zellzahlen benötigt. Die Zellen müssten zudem eine Reihe von Kriterien erfüllen: schnelles Wachstum (Zellzahlverdopplung nach zwei bis drei Tagen) über mehrere Passagen (fünf bis sieben), gute Transfektionseffizienzen (60 - 70 %) mit guter Zellausbeute (geringe Mortalität nach der Transfektion) sowie geringe spontane Lyseraten in Chromfreisetzungsexperimenten (< 20 %). Innerhalb dieser Arbeit wurde die Erfahrung gemacht, dass unter 13 MSC-Spendern maximal sechs MSC die oben genannten Wachstumsbedingungen erfüllen. Daher sollten für weitere Experimente zunächst MSC von 30 Spendern hinsichtlich des Zellwachstums getestet werden. Die ausgewählten MSC müssten danach expandiert und die Transfektionseffizienz sowie die effiziente Herabregulation der B7-H3 Expression mit siRNS bestimmt werden. Erst dann könnten diese Zellen für die Analyse der NK-Zell-vermittelten Lyse eingesetzt werden und die mögliche immunsuppressive Rolle der B7-H3 Expression auf MSC bestätigen. Da bei einer Herabregulation der B7-H3-Expression durch siRNS gewisse Nebeneffekte, wie z.B. die Veränderung der Expression weiterer Moleküle nicht ausgeschlossen werden kann, könnten B7-H3-blockierende Antikörper verwendet werden. Abgesehen von den bereits publizierten immunsuppressiven Mechanismen der MSC, sprechen wie bereits erwähnt einige der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gegen den immunsuppressiven Phänotyp der MSC. Dazu zählt auch die Expression des immunsuppressiven Moleküls HLA-G, welche innerhalb der vorliegenden Arbeit lediglich in MSC eines Spenders auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Die Expression dieses Moleküls wird in der Literatur sehr kontrovers beschrieben, was möglicherweise auf unterschiedliche Zellkulturbedingungen zurückgeführt werden kann. Es wurde bereits beschrieben, dass die Kultivierung HLA-G positiver Zellen über mehrere Passagen zur Methylierung des HLA-G Gens führt und damit die Expression des Moleküls verringert bzw. verhindert wird. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine methylierungs- und acetylierungsabhängige mRNA-Expression von HLA-G in den immortalisierten MSC L87 und V54-2 gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Untersuchungen zum immunmodulatorischen Potential von MSC erweitert und neue Ansatzpunkte für weitere Analysen geschaffen werden. Vor dem Hintergrund des Einsatzes von MSC im Rahmen von Transplantationen und in der Gewebegeneration gilt es zu betonen, dass sowohl mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen als auch mit den in der Literatur beschriebenen Daten die immunologische Charakterisierung der MSC keineswegs abgeschlossen ist. Besonders wichtig scheint in diesem Zusammenhang die Erweiterung der Untersuchungen auf mehr MSC sowie die einheitliche Kultivierung dieser Zellen, um zum Einen die Aussagekraft der generierten Daten zu erhöhen und kontroversen Ergebnissen vorzubeugen.

Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit das immunregulatorische Potential von undifferenzierten und differenzierten Keimzelltumor-Zelllinien analysiert. Der unterschiedliche Differenzierungsstatus dieser Zellen konnte durch die Proteinexpression des Stammzellmarkers Oct-4 in undifferenzierten, jedoch nicht in differenzierten Zellen bestätigt werden. Generell wurden die MHC-Klasse-I APM Komponenten in den untersuchten Zellen sehr heterogen und mit Ausnahme des Zellsystems H12.1 (undifferenziert) und H12.1D (differenziert) unabhängig vom Differenzierungsstatus exprimiert. Die undifferenzierte Zelllinie H12.1 wurde als Modellsystem verwendet, um deren immunregulatorischen Phänotyp während des Differenzierungsprozesses zu charakterisieren. Zunächst konnte die Differenzierung der H12.1 Zellen, sowohl mit pharmakologisch eingesetzten ATRA Konzentrationen als auch mit Konzentrationen, welche für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen verwendet werden, etabliert werden. Während des Differenzierungsprozesses wurde eine Hochregulation der MHC-Klasse-I APM Komponenten gemessen, was die Verdopplung der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen auf differenzierten H12.1 Zellen erklären könnte. Gegenüber allogenen CD8⁺ T-Zellen sowie der NK-Zelllinie NK-92 konnten jedoch keine Veränderungen in der Immunogenität von undifferenzierten und differenzierten H12.1 Zellen detektiert werden. Es wäre sinnvoll in weiteren funktionellen Studien CD8⁺ T-Zellen des gleichen HLA-Phänotyps wie H12.1, sowie frisch isolierte NK-Zellen als Effektorzellen zu verwenden.

Neben der Analyse der Expression der MHC-Klasse-I APM Komponenten in KZT-Zelllinien wurde die Expression der B7-H1 - H4 Moleküle untersucht. Es wurde eine heterogene, vom Differenzierungsstatus unabhängige Expression dieser Komponenten gemessen, was in epigenetischen, post-transkriptionellen bzw. post-translationellen Regulationsmechanismen begründet sein könnte. Interessanterweise konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal eine methylierungsabhängige Expression des B7-H1 Moleküls in der Chorionkarzinom-Zelllinie JAR gezeigt werden. Zur die Klärung inwieweit die DNS-Methylierung einen generellen Regulationsmechanismus der B7-H1-Expression in Chorionkarzinom-Zellen darstellt, müssten weitere Zelllinien dieser Tumorentität analysiert werden.

Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine weitgehend differenzierungsabhängige HLA-G-mRNS-Expression in KZT-Zelllinien gezeigt werden. Mit Ausnahme der differenzierten KZT-Zelllinie JEG-3, konnte in keiner der differenzierten KZT-Zelllinien HLA-G auf mRNS-Ebene detektiert werden, während in allen undifferenzierten KZT-Zelllinien HLA-G auf mRNS-Ebene nachgewiesen wurde. Es ist jedoch zu betonen, dass dieser Effekt auf mRNS-Ebene beobachtet wurde. In keiner der analysierten KZT-Zelllinien außer JEG-3 konnte HLA-G auf Proteinebene detektiert werden.

Vor dem Hintergrund, dass über das immunregulatorische Potential von KZT-Zelllinien wenig bekannt ist, erweitern die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse das Verständnis für die immunmodulatorischen Eigenschaften von KZT-Zelllinien und bieten eine gute Basis für die beschriebenen weiterführenden Untersuchungen.

- Adrian-Cabestre F, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le Danff C, Dausset J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Paul P. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J. Reprod. Immunol.* 1999; 43: 183-193.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood.* 2005; 105: 1815-1822.
- Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(3): 417-431.
- Amiot L, Onno M, Drenou B, Le Marchand B, Lamy T, Semana G, Fauchet R. Distribution of HLA-G alternative mRNAs including soluble forms in normal lymphocytes and in lymphoid cell-derived leukemia. *Eur. J. Immunogenet.* 1996; 23: 311-320.
- Andrews PW. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* 1998; 106: 158-167.
- Appleman LJ und Boussiotis VA. T cell anergy und costimulation. *Immunol. Rev.* 2003; 192: 161-180.
- Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatic S, Schnieders F, Bartels K, Schilling G, Faltz C, Wolschke C, Dierlamm J, Ritter G, Eiermann T, Hossfeld DK, Zander AR, Jungbluth AA, Old LJ, Bokemeyer C, Kröger N. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2007; 109(3): 1103-1112.
- Atencia R, Garcia-Sanz M, Unda F, Arechaga J. Apoptosis during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 663-667.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1482-1490.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death I pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1482-1490.
- Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(19): 5615-5621.
- Ballester R, Rosen OM. Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH₃ cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 15194-15199.
- Ball L, Bredius R, Lankester A, Schweizer J, van den Heuvel-Eibrink M, Escher H, et al. Third party mesenchymal stromal cell infusions fail to induce tissue repair despite successful control of severe grade IV acute graft-versus-host disease in a child with juvenile myelo-monocytic leukemia. *Leukemia.* 2008; 22: 1256-1257.
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002; 43(11): 1773-1808.
- Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005; 57: 874-882.
- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2006; 66(16): 7843-7848.
- Baylink DJ. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med.* 1983; 309: 306-308.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986; 38: 143-154.
- Belicha-Villanueva A, McEvoy S, Cycon K, Ferrone S, Gollnick SO, Bangia N. Differential contribution of TAP und tapasin to HLA class I antigen expression. *Immunology.* 2008; 124(1): 112-120.

- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol.* 1990; 140: 132-138.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci.* 1992; 102 (Pt 2): 341-351.
- Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells *in vitro*: a model of bone formation? *Am J Med Genet.* 1993; 45: 163-178.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005; 105: 2214-2219.
- Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004; 22(4): 625-634.
- Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59: 253-288.
- Boccaccio C und Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(8):637-645.
- Boenisch O, Sayegh MH, Najafian N. Negative T-cell costimulatory pathways: their role in regulating alloimmune responses. *Current Opinion in Organ Transplant.* 2008; 13: 373-378.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3(7): 730-737.
- Boucraut J, Guillaudeux T, Alizadeh M, Boretto J, Chimini G, Malecaze F, Semana G, Fauchet R, Pontarotti P, Le Bouteiller P. HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. *Immunogenetics.* 1993; 38(2): 117-30.
- Bouvier M. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol. Immunol.* 2003; 39: 697-706.
- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, Moretta A, West R, Xu W, Vivier E, Levin SD. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med.* 2009; 206: 1495-1503.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature.* 1998; 391(6667): 597-601.
- Bukur J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I, Sutter G, Huber C, Seliger B. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 4107-4111.
- Campbell A. 1999: Receptor mechanisms mediating differentiation and proliferation effects on retinoids on neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters* 279. 2000, 113-116.
- Caplan, Al. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994; 21: 429-435.
- Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology.* 1999; Elsevier Ltd., Oxford.
- Carosella ED, Moreau P, Le Maout J, Le Discorde M, Daussert J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.* 2003; 81: 199.
- Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 634-643.
- Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, Negri F, Conte R, Corrias MV, Moretta L, Moretta A, Bottino C. Identification of 4lg-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from NK cell-mediated lysis. *PNAS.* 2004; 101(34): 12640-12645.

- Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics und biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 2000; 60(6): 1475-1482.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2739-2749.
- Chang CC, Murphy SP, Ferrone S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol.* 2003; 64(11): 1057-1063.
- Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a marrow window at low levels of interferon- γ . *Blood.* 2006; 107: 4817-4824.
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat Immunol.* 2001; 2: 269-274.
- Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan TW. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow-mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol.* 2006; 18: 552-556.
- Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR: The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol.* 2008; 181(8): 5396-5404.
- Chen XL, Chen P, Jia ZQ, Liu YN, Ma KT, Zhang YZ, Zhou CY. HLA expression in human fetal bone marrow mesenchymal stem cells. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2006; 38(6): 597-602.
- Chen X, McClurg A, Zhou GQ, McCaigue M, Armstrong MA, Li G. Chondrogenic differentiation alters the immunosuppressive property of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, and the effect is partially due to the upregulated expression of B7 molecules. *Stem Cells.* 2007; 25(2): 364-70. Epub 2006 Oct 26.
- Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens.* 2008; 72: 335-341.
- Choi IH, Zhu G, Sica GL, Strome SE, Chevillie JC, Lau JS, Zhu Y, Flies DB, Tamada K, Chen L. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. *J Immunol.* 2003; 171(9): 4650-4654.
- Christman J K. 5-Azacytidine und 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies und their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002; 21(35): 5483-95. Review.
- Chung Y, Nurieva R, Esashi E, Wang YH, Zhou D, Gapin L, Dong C. A critical role of costimulation during intrarhythmic development of invariant NK T cells. *J. Immunol.* 180, 2276-2283.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing und multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(14): 7841-7845.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006; 107: 367-372.
- Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells.* 2007; 25(3): 707-711.
- Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity.* 2000; 13: 95-105.
- Cresswell P, Springer T, Strominger JL, Turner MJ, Grey HM, Kubo RT. Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens und beta2-microglobulin und its turnover on the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974; 71(5): 2123-2127.
- Croce C, Linnenbach A, Huebner K, Parnes JR, Margulies DH, Appella E, Seldmann JG. Control of expression of histocompatibility antigens (H-2) und β 2-microglobulin in F9 teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5754-5758.

- Croce CM, Linnenbach A, Huebner K, Parnes JR, Margulies DH, Appella E, Seidman JG. Control of expression of histocompatibility antigens (H-2) und β 2-microglobulin in F9 teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981; 78: 5754-5758.
- Damjanov I, Horvat B, Gibas Z. Retinoic acid –induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest*. 1993; 68: 220-232.
- Deans RF; Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology und potential clinical unses. *Exp. Hematol*. 2003; 28: 875-884.
- Dennis JE, Caplan AI. Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connect Tissue Res*. 1996; 35(1-4): 93-99.
- Diaz-Lagares A, Alegre E, LeMaout J, Carosella ED, Gonzalez A. Nitric oxide produces HLA-G nitration and induces metalloprotease-dependent shedding creating a tolerogenic milieu. *Immunology*. 2009; 126: 436-445.
- Di Iannia M, Del Papaa B, De Ioannia M, Morettia L, Bonifacioa E, Cecchinia D, Sportolettia P, Falzettia F, Tabiliob A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*. 2008; 36(3): 309-318.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99: 3838-3843.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation und senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate und differentiate. *Br J Haematol*. 1999; 107: 275-281.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003; 102: 3837-3844.
- Dong H und Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med*. 2003; 81: 281-287.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med*. 2002; 8: 793-800.
- Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Undrews PW. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat*. 2002; 200: 249-258.
- Dunker K, Schlaf G, Bukur J, Altermann WW, Handke D, Seliger B. Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens*. 2008; 72:137-148.
- Easwaran V, Pishvaian M, Byers SW. Cross-regulation of b-catenin-LEF/TCF und retinoic acid signaling pathways. *Curr Biol* 1999; 9:1415–1418.
- El-Chennawi FA, Auf FA, El-Diasty AM, El-Daim MA, El-Sherbiny SM, Ali A, El-Baz M, El-Hameed MA, Paul P, Ibrahim EC, Carosella E, Ghoneim MA. Expression of HLA-G in cancer bladder. *Egypt J Immunol*. 2005; 12(1): 57-64.
- Elliott T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*. 1995; 181(4): 1481-1491.
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, JUNG G und Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991; 351: 290-296.
- Flajollet S, Poras I, Carosella ED, Moreau P. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. *J Immunol*. 2009; 183: 6948-6959.
- Flanagan JR, Murata M, Burke PA, Shirayoshi Y, Appella E, Sharp PA, Ozato K. Negative regulation of the major histocompatibility complex class I promoter in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 3145-3149.
- Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother*. 2007; 30: 251-260.

- Frasconi F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), coinfused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-vs-host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: S2 (abstract).
- Freedman AS, Freeman GL, Horowitz JC, Daley J, Nadler LM. B7, a B cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 1987; 139: 3260-3267.
- Freeman GL, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whiteman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 1989; 143: 2714-2722.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR und Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1027.
- Friedenstein A J, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplant.* 1968; 6: 230-247.
- Garbi N, Tan P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG, Momburg F, Hämmerling GJ. Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 234-238.
- Garbi N, Tiwari N, Momburg F, Hämmerling GJ. A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 264-273.
- Garcia-Olmo D, Garcia-Arzan M, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arzan M, Pascual M. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005; 48: 1416-1423.
- Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010; 127(2): 249-256.
- Gati A, Guerra N, Giron-Michel J, Azzarone B, Angevin E, Moretta A, Chouaib S, Caignard A. Tumor cells regulate the lytic activity of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by modulating the inhibitory natural killer receptor function. *Cancer Res.* 2001; 61: 3240-3244.
- Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006; 8(3): 190-198.
- Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood.* 2010; 116 (19): 3770-3779.
- Gimble JM, Youkhana K, Hua X. Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem.* 1992; 50: 73-82.
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G; Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 6586-6590.
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, Nadler LM. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 6575-6579.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest and anergy of activated T cells. *Blood.* 2005; 105: 2821-2827.
- Gobin SJ, Biesta P, de Steenwinkel JE, Datema G, van den Elsen PJ. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem.* 2002; 277: 39525-39531.
- Gong AY, Zhou R, Hu G, Liu J, Sosnowska D, Drescher KM, Dong H, Chen XM. *Cryptosporidium parvum* induces B7-H1 expression in cholangiocytes by down-regulating microRNA-513. *J Infect Dis.* 2010; 201(1): 160-169.
- Gong AY, Zhou R, Hu G, Li X, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF, Soukup GA, Dong H, Chen XM. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *J Immunol.* 2009; 182(3): 1325-1333.

- Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunological properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190(1): 239-245.
- Götherström C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver und adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica.* 2005; 90: 1017.
- Green DR. Apoptosis. Death deceiver. *Nature.* 1998; 396(6712): 629-630.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 3: 515-548.
- Hammond SA, Johnson RP, Kalams SA, Walker BD, Takiguchi M, Safrit JT, Koup RA, Siliciano RF. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway und a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8+ CTL. *J Immunol.* 1995; 154(11): 6140-56.
- Hashiguchi M, Kobori H, Ritprajak P, Kamimura Y, Kozono H, Azuma M: Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 10495-10500.
- Haque A, Das A, Hajiaghamseni LM, Younger A, Banik NL, Ray SK. Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 56: 615–625.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992b; 13: 81-88.
- He L, Zhang G, He Y, Zhu H, Zhang H, Feng Z. Blockade of B7-H1 with sPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25: 3309-3313.
- Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways und multiple effector molecules. *Immunity.* 1994; 1(5): 343-346. Review.
- He X, Dong DD, Yie SM, Yang H, Cao M, Ye SR, Li K, Liu J, Chen J. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on allocytotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17:1459-1469.
- Hicok KC, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC, Riggs BL. Development und characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(2): 205-217.
- Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3. *PNAS.* 2008; 105(30): 10277-10278.
- Holling TM, Bergevoet MW, Wierda RJ, van Eggermond MC, van den Elsen PJ. Genetic and epigenetic control of the major histocompatibility complex class Ib gene HLA-G in trophoblast cell lines. *Ann NY Acad Sci.* 2009; 1173: 538-544.
- Hong WK, Itri LM. Retinoids und human cancer. In Sporn, Roberts MB, Goodman AB und DS (eds.). *The Retinoids: Biology, Chemistry und Medicine*, 2nd edn. Raven Press, New York 1994; 597-658.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft und stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 8932-8937.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability und therapeutic effects of bone marrow-derived medenchmal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med.* 1999; 5: 309.
- Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile und HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 2003; 55: 63–79.
- Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G und IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype und polymorphisms. *Immunogenetics.* 2004; 56: 135-141.
- Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, Carosella ED, Avril MF, Paul P. Analysis of HLA antigen expression in benign und malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression

- correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer*. 2004; 108(2): 243-250.
- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61: 6838-6845.
- Ibrahim EC, Morange M, Dausset J, Carosella ED, Paul P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones*. 2000; 5: 207-218.
- Idoyaga J, Moreno J, Bonifaz L. Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol. Immunother*. 2007; 56: 1237-1250.
- Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Dahlke MH. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplant*. 2006; 81(11): 1589-1595.
- Ishigami S, Natsugoe S, Miyazono F, Nakajo A, Tokuda K, Matsumoto M, Okumura H, Douchi T, Hokita S, Aikou T. HLA-G expression in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2006; 26(3B): 2467-2472.
- Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Timeva T, Yunakova M, Bukarev D, Shterev A, Tivchev P, Kyurkchiev S. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. *Am. J. Rep. Immunol*. 2009; 62: 25-33.
- Janossy G. Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A*. 2004; 58: 87-97.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997; 64(2): 295-312.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. Expression und role of MICA und MICB in human hepatocellular carcinomas und their regulation by retinoic acid. *Int. J. Cancer*. 2003; 104: 354-361.
- Joo SY, Cho KA, Jung YJ, Kim HS, Park SY, Choi YB, Hong KM, Woo SY, Seoh JY, Cho SJ, Ryu KH. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. *Cytotherapy*. 2010; 12: 361-370.
- Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas und perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 1994; 265(5171): 528-530.
- Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Voriadis EM, Papamichail M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005; 65: 321-329.
- Kawata M, Sizer K, Sekiya S, Parnes JR, Herzenberg LA. Limitation of differential expression of HLA-A, B, C antigens on choriocarcinoma cell lines by messenger RNA for HLA heavy chain but not β 2-microglobulin. *Cancer Res*. 1984; 44: 4011-4016.
- Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research und drug development. *Adv. Cancer Res*. 1999; 278: 199-334.
- Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell*. 2010; 140(1): 111-122.
- Kienast A, Preuss M, Winkler M, Dick TP. Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 und tapasin. *Nat. Immunol*. 2007; 8(8): 864-872.
- Kleinberg L, Flørenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, Nesland JM, Shih IeM, Davidson B. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2006; 449(1): 31-39.
- Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, und suppression. *J. Biomed. Sci*. 2005; 12(1): 47-57.

- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW. Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous culture-expanded human mesenchymal stem cells (hmesenchymal stem cells) und PBPCs in breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *Blood*. 1998; 92: 274a.
- Koch J, Guntrum R, Heintke S, Kyritsis C, Tampé R. Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.* 2004; 279(11): 10142-10147.
- Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Park ES, Kuntz SM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(27): 10391-10396.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Undreini A, Santarasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 386-398.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve und memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003; 101: 3722-3729.
- Krangel MS, Orr HT, Strominger JL. Assembly und maturation of HLA-A und HLA-B antigens in vivo. *Cell*. 1979; 18(4): 979-991.
- Kuiper HM, De Jong R, Brouwer M, Lammers K, Wijdenes J, Van Lier RAW. Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunol*. 1994; 83: 38-44.
- Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease II. Digestion of thymus nucleic acid (desoxyribonucleic acid) The kinetics of the reaction. *J Gen Physiol*. 1950; 33: 363-377.
- Kurtzberg J, Prasad V, Grimley MS, Horn B, Carpenter PA, Jacobsen D, Prockop S. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Therapy (Prochymal) as a Rescue Agent for Severe Treatment Resistant GVHD in Pediatric Patients. *Transplant*. 2010; 16(2): 169.
- La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasa L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation und characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential und detection of new markers. *Histochem. Cell Biol*. 2008; 131(2): 267-282.
- Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP. Striking paucity of HLA-A, B, C und beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J Immunol*. 1983; 30: 2471-2478.
- Lankat-Buttgereit B und Tampe R. The transporter associated with antigen processing: function und implications in human diseases. *Physiol Rev*. 2002; 82: 187-204.
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion und subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16: 557.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363(9419): 1439-1441.
- Le Blanc K, Tammik L, Zetterberg E, Rosendahl K, Ringdén O. HLA-expression und immunologic properties of undifferentiated und differentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003; 31(10): 890-896.
- Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal und adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003; 6: 485-489.
- Lee N, Geraghty DE. HLA-F surface expression on B cell und monocyte cell lines is partially independent from tapasin und completely independent from TAP. *J. Immunol*. 2003; 171: 5264-5271.
- Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J. Immunol*. 1998; 160: 4951-4960.
- Lee N, Malacko AR, Ishitani A, Chen MC, Bajorath J, Marquardt H, Geraghty DE. The membrane-bound und soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995; 3: 591-600.

- Lee SJ, Jang BC, Lee SW, Yang YI, Suh SI, Park YM, Oh, Shin JG, Yao S, Chen L, Choi IH. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression und IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* 2006; 580: 755-762.
- Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poes S, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFNregulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem.* 2001; 276: 6133-6139.
- Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. Soluble tapasin restores MHC class I expression und function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity.* 1998; 8(2): 221-231.
- Lehninger AL. *Prinzipien der Biochemie*, 2 edn (Heidelberg, Spektrum akademischer Verlag). 1994; 751-754, 861, 862, 867.
- Leitner J, Klauser C, Pickl WF, Stöckl J, Majdic O, Bardet AF, Kreil DP, Dong C, Yamazaki T, Zlabinger G, Pfistershammer K, Steinberger P. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 und TREML2 interaction. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 1-11.
- Lesport E, Baudhuin J, Sousa S, Lemaoult J, Zamborlini A, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Favier B. Inhibition of human V γ 9V δ 2 T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2011 [Epub ahead of print].
- Lilley BN, Ploegh HL. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev.* 2005; 207: 126-144.
- Lin A, Zhang X, Zhou WJ, Ruan YY, Xu DP, Wang Q, Yan WH. HLA-G expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010 [Epub ahead of print].
- Li J, Zhu H, Liu Y, Li Q, Lu S, Feng M, Xu Y, Huang L, Ma C, An Y, Zhao RC, Wang R, Qin C. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebra lischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macacafascicularis. *Brain Res.* 2010; 1334: 65-72.
- Ling V, Wu PW, Spaulding V, Kieleczawa J, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M. Duplication of primate und rodent B7-H3 immunoglobulin V- und C-like domains: divergent history of functional redundancy und exon lost. *Genomics.* 2003; 82(3):365-77.
- Linsley PS, Clarke EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 5031-5035.
- Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK. Coexpression und functional cooperation of CTLA-4 und CD28 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1595-1604.
- Li R, Cao XH, Liu C, Wu XL, Ling YW, Zhang Y, Feng R, Liu QF. Clinical implications of HLA-G protein expression in acute leukemia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010; 30(11): 2446-2448.
- Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 5892-5894.
- Liu X, Bai XF, Wen J, Gao JX, Liu J, Lu P, Wang Y, Zheng P, Liu Y. B7H costimulates clonal expansion und cognate destruction of tumor cells by CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1339-1348.
- Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlén C, Neeffjes JJ, Höglund P, Heemels MT, Bastin J, Schumacher TN, Townsend A, Kärre K, et al. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature.* 1990; 346(6283): 476-480.
- Lotan R, 1995: *Cellular Biology of the Retinoids*. In: Degos L., Parkinson DR, eds: *Retinoids in oncology*. Springer Verlag. 1995; 27-42.
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin und Fas lytic pathways. *Nature.* 1994; 370(6491): 650-652.
- Luo L, Chapoval AI, Flies DB, Zhu G, Hirano F, Wang S, Lau JS, Dong H, Tamada K, Flies AS, Liu Y, Chen L. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J. Immunol.* 2004; 173: 5445-5450.
- Luo XM und Ross AC. Physiological and receptor-selective retinoids modulate interferon gamma signaling by increasing the expression, nuclear localization, and functional activity of interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem.* 2005; 280: 36228–36236.

- Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 587-622.
- Maden M. The role of retinoic acid in embryonic und post-embryonic development. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(1): 65-73.
- Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988; 254: 317-330.
- Marlies E.J. Reinders, Willem E. Fibbe, Ton J. Rabelink. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 17-24.
- Mathew JS, Sharma RP. Effect of all-trans-retinoic acid on cytokine production in a murine macrophage cell line. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22: 693-706.
- Mazanet MM und Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells und suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol.* 2002; 169: 3581.
- McCluskey J, Elliott T. Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo Is Dependent on Tapasin. *Immunity.* 2002; 16 (4): 5009-520.
- McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev Genet.* 2002; 737-747.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004; 103: 4619-4621.
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 1998; 332: 281-292. Review.
- Menendez L, Walker LD, Matyunina LV, Totten KA, Benigno BB, McDonald JF. Epigenetic changes within the promoter region of the HLA-G gene in ovarian tumors. *Mol Cancer.* 2008; 7: 43.
- Menier C, Prevot S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Human leukocyte antigen-G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. *Hum Immunol.* 2009; 70(12): 1006-1009.
- Mielcarek M, Storb R, Georges GE, Golubev L, Nikitine A, Hwang B, Nash RA, Torok-Storb B. Mesenchymal Stromal Cells Fail to Prevent Acute Graft-versus-Host Disease and Graft Rejection after Dog Leukocyte Antigen-Haploidentical Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(2): 214-225.
- Miyazaki JI, Appella E, Ozato K. Negative regulation of the major histocompatibility class I gene in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 9537-9541.
- Moonis M, Ahmad I, Bachhawat BK. Macrophages in host defence - an overview. *Indian J Biochem Biophys.* 1992; 29(2): 115-122. Review.
- Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 1191-1196.
- Moreau P, Paul P, Gourand L, Prost S, Dausset J, Carosella E, Kirszenbaum M. HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells: differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. *Hum Immunol.* 1997; 52: 41-46.
- Moretta A, Parolini S, Castriconi R, Bottino C, Vitale M, Sivori S, Millo R. Function und specificity of human natural killer cell receptors. *Eur. J. Immunogenet.* 1997; 24: 455-468.
- Morundi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, Ferrone S, Barnaba V, Pistoia V. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells.* 2008; 26(5): 1275-1287.
- Nagata T, Segars JH, Levi BZ, Ozato K. Retinoic acid-dependent transactivation of major histocompatibility complex class I promoters by the nuclear hormone receptor H-2RIIBP in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.* 1992; 89: 937-941.

- Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplant.* 2007; 84(2): 231-237.
- Nauta, AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host und stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006; 108(6): 2114-2120.
- Ni X, Jia YQ, Meng WT, Zhong L, Zeng Y. Expression of B7-H1 Molecule on Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells und Its Effects on T lymphocyte Proliferation. *Art. Chin.* 2009; 17(4): 990-993.
- Nicke B, Kaiser A, Wiedenmann B. Retinoic acid receptor alpha mediates growth inhibition by retinoic acids in human colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:572-577.
- Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Eckstein V, Südkamp NP, Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells und adipose tissue-derived stem cells before und after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng.* 2007; 13(1): 111-121.
- Niemeyer P, Seckinger A, Simank HG, Kasten P, Südkamp N, Krause U. Allogene Transplantationsmöglichkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen. Eine In-vitro-Studie zur Knochenregeneration. *Orthopädie.* 2004; 33: 1346-1353.
- Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J.* 1967; 8(5): 110-111.
- Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity und IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol.* 2002; 169: 3676-3685.
- Parent LJ, Ehrlich R, Matis L, Singer DS. Ethanol: an enhancer of major histocompatibility complex antigen expression. *FASEB J.* 1987; 1: 469-473.
- Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration und proliferation studies. *Immunol. und Cell Biol.* 1999, 77(6): 499-508.
- Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT. Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone.* 1999; 24(6):549-554.
- Parker KC, Dibrinom M, Hull L, Coligan JE. The β 2-microglobulin dissociation rate is an accurate measure of the stability of MHC class I heterotrimers und depends on which peptide is bound. *J. Immunol.* 1992; 149: 1896-1904.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic und metastatic progenitor cells. *Oncogene.* 2006; 25(12): 1696-1708.
- Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA und expression of soluble HLA-G5, -G6, und -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum. Immunol.* 2000; 61: 1138-1149.
- Paul P, Cabestre FA, Le Gal FA, Khalil-Daher I, Le Danff C, Schmid M, Mercier S, Avril MF, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED. Heterogeneity of HLA-G gene transcription und protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res.* 1999; 59: 1954-1960.
- Paul, P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J und Carosella ED. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA und expression of soluble HLA-G5, -G6, und -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 200a; 61:1138-1149.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, Avril MF, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 4510-4515.
- Pende D, Sivori S, Accame L, Pareti L, Falco M, Geraghty D, Le Bouteiller P, Moretta L, Moretta A. HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory und as activating receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1875-1880.

- Pera MF, Cooper S, Mills J, Parrington JM. Isolation und characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*. 1989; 42: 10-23.
- Perosa F, Luccarelli G, Prete M, Faviono E, Ferrone S, Dammacco F. Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. *J Immunol*. 2003; 171: 1918-1926.
- Petroff MG, Kharatyan E, Torry DS, Holets L. The immunomodulatory proteins B7-DC, B7-H2, und B7-H3 are differentially expressed across gestation in the human placenta. *Am. J. Pathol*. 2005; 167: 465-473.
- Petroff MG und Perchellet A. B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. *Am. J. of Reprod. Immunology*. 2010, 63: 506-519.
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. Taschenatlas der Immunologie. Georg Thieme Verlag KG. 2007.
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum. 2004.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
- Poggi A, Venturino C, Catellani S, Clavio M, Miglino M, Gobbi M, Steinle A, Ghia P, Stella S, Caligaris-Cappio F, Zocchi MR. V δ 1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells und up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res*. 2004; 64: 9172-9179.
- Pohl J, LaFace D, Sands JF. Transcription of retinoic acid receptor genes in transgenic mice increases CD8 T-cell subset. *Mol Biol Rep*. 1993; 17: 135-142.
- Polakova K, Bandzuchova E, Sabty FA, Mistrik M, Demitrovicova L, Russ G. Activation of HLA-G expression by 5-aza-2-deoxycytidine in malignant hematopoietic cells isolated from leukemia patients. *Neoplasma*. 2009; 56: 514-520.
- Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplant*. 2007; 83(6):783-790.
- Potian J, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens und recall antigens. *J. Immunol*. 2003; 171: 3426-3434.
- Prasad DVR, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, Dong C. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol*. 2004; 173: 2500-2506.
- Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*. 2003; 18: 863-873.
- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007; 92(7): 881-888.
- Raffo P, Emionite L, Colucci L, Bemondo F, Moro MG, Bollag W, Toma S. Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition und apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2000; 20: 1535-1543.
- Raghuraman G, Lapinski PE, Raghavan M. Tapasin interacts with the membrane-spanning domains of both TAP subunits und enhances the structural stability of TAP1 x TAP2 complexes. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 41786-41794.
- Rameshwar P. IFN γ und B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2008; 18(8): 805-806.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens und alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res*. 2005; 305: 33-41.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplant*. 2003; 76: 1208-1213.
- Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol*. 2007; 17(6): 422-429.
- Refaeli Y und Abbas AK. Role of cytokines in autoimmunity. *Eur.Cytokine Netw*. 1998; 9: 81-82.

- Reichrath, J. Will analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) open a new era in cancer therapy? *Onkolog.* 2001; 24: 128-133.
- Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, Popp FC, Steinmann JF, Slowik P, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant.* 2009; 41: 2607-2611.
- Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule J, Rosenberg SA, Mennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp Med* 1993; 177: 265-72.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006; 81(10): 1390-1397.
- Ringden O, Uzunel M, Sundberg B, Lönnies L, Nava S, Gustafsson J, Henningsohn L, Le Blanc K. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia.* 2007; 21: 2271-2276.
- Rinke de Wit TF, Vloemans S, Van den Elsen PJ, Haworth A, Stern PL. Differential expression of the HLA class I multigene family by human embryonal carcinoma und chorioncarcinoma cell lines. *J. Immunol.* 1990; 144: 1080-1087.
- Rizo A, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Hum Mol Genet.* 2006; 2: R210-R219.
- Rizvi SM, Del Cid N, Lybarger L, Raghavan M. Distinct functions for the glycans of tapasin and heavy chains in the assembly of MHC class I molecules. *J Immunol.* 2011; 186(4): 2309-2320.
- Rizvi SM, Raghavan M. Mechanisms of function of tapasin, a critical major histocompatibility complex class I assembly factor. *Traffic.* 2010; 11(3): 332-347.
- Rizzo R, Campioni D, Stignani M, Melchiorri L, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Moretti S, Cuneo A, Lanza F, Baricordi OR. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2008; 10(4): 364-375.
- Roach S, Cooper S, Bennett W, Pera MF. Cultured cell lines from human teratomas: windows into tumour growth and differentiation und early human development. *Eur Urol* 1993; 23: 82-87.
- Roberts AB, Sporn MB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds: *The retinoids*, Academic Press 2, Orlando, FL. 1984; 210-86.
- Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression und enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leukemia Res.* 2007; 10: 1393-1402.
- Rotem-Yeduhar R, Winograd S, Sela S, Coligan JE, Ehrlich R. Downregulation of peptide transporter genes in cell lines transformed with highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* 1994; 180: 477-88.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin. Cancer Biol.* 2003; 13: 325-336.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum. Immunol.* 2003; 64(11): 1005-1010.
- Ruhlund B, Walker L, Wollitzer AO, Peterson CM. Ethanol influences class I und class II MHC antigen expression on human fetal islet-like cell clusters. *Clinic. und Exp. Res.* 1991; 15(4).
- Sack U, Tárnok A, Rothe G. *Zelluläre Diagnostik*. Karger Verl., 2006.
- Salceda S, Tang T, Kmet M, Munteanu A, Ghosh M, Macina R, Liu W, Pilkington G, Papkoff J. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. *Exp Cell Res.* 2005; 306(1):128-141.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239 (4839): 487-491.

- Sambrook J, Fritsch EE und Maniatis T. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York 1989.
- Santin AD, Hermonat P, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Hiserodt JC, Tian E, Carter CA, Pecorelli S, Parham GP. Effects of retinoic acid combined with interferon-gamma on the expression of major-histocompatibility-complex molecules und intercellular adhesion molecule-1 in human cervical cancer. *Int. J. Cancer*. 1998; 75: 254-258.
- Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007; 109(1): 228-234. Epub 2006 Sep 19.
- Schmoll HJ. Maligne Keimzelltumoren des Mannes. In: Kompendium Internistische Onkologie Teil 2, Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. 1999; 3. Auflage: 1659-1732.
- Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet*. 2000; 355: 1008-1010.
- Schoorlemmer J, Jonk L, Sanbing S, van Puijenbroek A, Feijen A, Kruijer W. Regulation of Oct-4 gene expression during differentiation of EC cells. *Mol Biol Rep*. 1995; 21(3): 129-40.
- Seewaldt VL, Johnson BS, Parker MB, Collins SJ, Swisshelm K. Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest und apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ*. 1995; 6: 1077-1088.
- Segaert S, Garmyn M, Bouillon R, Degreef H. Subpharmacological concentrations of retinoic acid attenuate the antiproliferative effect of calcitriol on cultured human keratinocytes. *J. Eur. Acad. of Derm. und Venereol*. 1995; 5: 91-91(1).
- Segars JH, Nagata T, Bours V, Medin JA, Franzoso G, Blanco JCG, Drew PD, Becker KG, An J, Tang T, Stephany DA, Neel B, Siebenlist U, Ozato K. Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I genes in Ntera-2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF- κ B (p50-p65) und retinoic acid receptor β -retinoid X receptor β heterodimers. *Mol. und Cell. Biol*. 1993; 6157-6169.
- Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G und MIC expression in tumors und their role in antitumor immunity. *Trends Immunol*. 2003a; 24: 82-87.
- Seliger B, Dunn T, Schwenzler A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP und MHC class I expression und their upregulation by IFN- γ . *Scund. J. Immunol*. 1997; 46: 625-632.
- Seliger B, Höhne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampé R, Huber C. Reduced membrane major histocompatibility complex class I density und stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP und LMP expression. *Clin Cancer Res*. 1996; 2 (8): 1427-1433.
- Seliger B, Höhne A, Knuth A, Bernhard H, Meyer T, Tampe R, Momburg F, Huber C. Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal und malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation und progression. *Cancer Res*. 1996; 56 (8): 1756-1760.
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off – tumors on. *Immunol Today* 1997; 18: 292-9.
- Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampé R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res*. 2001; 61: 8647-8650.
- Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, Obert L, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplant*. 2009; 87: 62-66.
- Semani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-H5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress Tlymphocyte und natural killer function und to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008; 26(1): 212-222.
- Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V. The role of cadherin, b-catenin, und AP-1 in Retinoic acid-regulated carcinoma cell differentiation und proliferation. *J Biol Chem* 2002; 277: 30887–30891.
- Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, 4th ed. New York, Wiley-Liss, 2003.
- Sharpe, AH und Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:116.

- Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, Shen B, Yin S, Liu W, Cui L, Li N. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* 2008; 18(8): 846-857.
- Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 340-352.
- Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 2003; 18: 849-861.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 387-437.
- Singer DS, Parent LJ, Kolber A. Ethanol: An enhancer of transplantation antigen expression. *Clinic. und Exp. Res.* 1989; 13(4).
- Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scan J Immunol.* 2010; 71: 267-274.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1): 76-85.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(40): 14842-1447.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 74-85.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006; 107: 1484-1490.
- Sporn MB. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogues (Retinoids). *Fed Proc.* 1976; 35: 1332-38.
- Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhemopoietic antigen-presenting cell. *Blood.* 2006; 107: 2570-2577.
- Stam NJ, Spits H, Ploegh HL. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol.* 1986; 137: 2299-2306.
- Stepensky D, Bangia N, Cresswell P. Aggregate formation by ERp57-deficient MHC class I peptide-loading complexes. *Traffic.* 2007; 8(11): 1530-1542.
- Suárez-Alvarez B, Rodríguez RM, Calvanese V, Blanco-Gelaz MA, Suhr ST, Ortega F, Otero J, Cibelli JB, Moore H, Fraga MF, López-Larrea C. Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2010; 5 (4): e10192.
- Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX. The balance of immune responses: costimulation versus coinhibition. *J Mol Med.* 2005; 83: 193-202.
- Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP, Klatzmann D, Cohen JL. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol.* 2006; 176: 7761-7767.
- Suh WK, Gajewska BU, Okada H, Gronski MA, Bertram EM, Dawicki W, Duncan GS, Bukczynski J, Plyte S, Elia A, Wakeham A, Itie A, Chung S, Da Costa J, Arya S, Horan T, Campbell P, Gaida K, Ohashi PS, Watts TH, Yoshinaga SK, Bray MR, Jordana M, Mak TW. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol.* 2003; 4(9): 899-906.
- Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T, Gajewska BU, Deenick E, Dawicki W, Okada H, Wakeham A, Itie A, Watts TH, Ohashi PS, Jordana M, Yoshida H, Mak TW. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 6403-6411.

- Suh WK, Wang SX, Jheon AH, Moreno L, Yoshinaga SK, Ganss B, Sodek J, Grynepas MD, Mak TW. The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation und bone mineralization. *PNAS*. 2004; 101(35): 12969-12973.
- Sun Y, Vale M, Leung E, Kanwar JR, Gupta R, Krissansen GW. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Therapy*. 2003; 10: 1728-1734.
- Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 und B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 53: 143-151.
- Suzdaltseva YG, Burunova VV, Vakhrushev IV, Cheglakov IB, Yarygin KN. In vitro comparison of immunological properties of cultured human mesenchymal cells from various sources. *Bull Exp Biol Med*. 2008; 145(2): 228-231.
- Svedmyr E, Jondal M. Cytotoxic effector cells specific for B Cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(4): 1622-1626.
- Tan P, Kropshofer H, Mundelboim O, Bulbuc N, Hämmerling GJ, Momburg F. Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol*. 2002; 168(4): 1950-1960.
- Tan Z, Rundall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae JD, Ober C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G und risk of asthma. *Am. J. Hum. Genet*. 2007; 81(4): 829-834.
- Tao Y, Yang Y, Wang W. Effect of all-trans-retinoic acid on the differentiation, maturation and functions of dendritic cells derived from cord blood monocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47: 444-450.
- Temponi M, Kageshita T, Perosa F, Ono R, Okada H, Ferrone S. Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification. *Hybridoma*. 1989; 8: 85-95.
- Thomas RM, Gao L, Wells AD. Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J. Immunol*. 2005; 174: 4639-4646.
- Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells und is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2007; 13: 1757-1761.
- Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in primary und metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005; 104: 2084-2091.
- Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Krejci KG, Lobo JR, Sengupta S, Chen L, Zincke H, Blute ML, Strome SE, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness und potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(49): 17174-17179.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure und some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(9): 4350-4354.
- Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol*. 1989; 7: 601-624.
- Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy und light chains induced by viral peptides. *Nature*. 1989; 340(6233): 443-448.
- Townsend A, Ohlén C, Foster L, Bastin J, Ljunggren HG, Kärre K. A mutant cell in which association of class I heavy und light chains is induced by viral peptides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989; 54(1): 299-308.
- Tran CN, Thacker SG, Louie DM, Oliver J, White PT, Endres JL, Urquhart AG, Chung KC, Fox DA. Interactions of T cells with fibroblast-like synoviocytes: Role of the B7 family costimulatory ligund B7-H3. *J. Immunol*. 2008; 180: 2989-2998.
- Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, Torkko KC, Singh M, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-h4 is highly expressed in ductal und lobular breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(5): 1842-1848.

- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stem cells: implications in transplantation. *Transpl.* 2003; 75: 389-397.
- Tuschl T. RNA interference und small interfering RNAs. *Chembiochem.* 2001; 2(4): 239-45.
- Uccelli A, Zappia E, Benvenuto F, Frassoni F, Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression und neuroprotection. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2006; 6(1): 17-22.
- Undrews PW, Bronson DL, Wiles MV, Goodfellow P. The expression of MHC antigens by human teratocarcinoma derived cell lines. *Tissue Antigens* 1981; 17: 493-500.
- Undrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental Biol.* 1984; 103: 285-293.
- Undrews PW. Teratocarcinomas und human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* 1998; 106: 158-167.
- Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein upregulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell Tcell lymphomas und indolent B-cell lymphomas. *Blood.* 2002; 99: 609-617.
- Vanecko S und Laskowski M. Studies of the specificity of Deoxyribonuclease I.III. Hydrolysis of chains carrying a monoesterified phosphate on carbon 5'. *J of Biol Chem.* 1961; 236: 3312-3316.
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploeght HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, und CD4-8 + T cells. *Cell.* 1992; 71: 1205-1214.
- Van Parijs L und Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 355-361.
- Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response – microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl. Immunol.* 2009; 20(4): 229-231.
- Verfaillie CM, Pera MF und Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2002-1; 369-91.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184 (1): 39-51.
- Vos JC, Reits EA, Wojcik-Jacobs E, Neeffjes J. Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr Biol.* 2000; 10(1): 1-7.
- Wang KC, Cheng AL, Chuang SE, Hsu HC, Su IJ. Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions. *Exp Hematol.* 2000; 28: 1441–1450.
- Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med.* 2003; 197: 1083-1091.
- Wang X, Campoli M, Cho HS, Ogino T, Bundoh N, Shen J, Hur SY, Kageshita T, Ferrone S. A method to generate antigen-specific mAb capable of staining formalin-fixed, paraffin-embed-ded tissue sections. *J Immunol. Methods.* 2005; 299: 139-151.
- Warrington KJ, Nair U, Carbone LD, Kang AH, Postlethwaite AE. Characterisation of the immune response to type I collagen in scleroderma. *Arthritis Research und Therapy.* 2006; 8: 136.
- Wei ML, Cresswell P. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature.* 1992; 356(6368): 443-446.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 139-170.
- Westervelt P, Pollock JL, Oldfather KM, Walter MJ, Ma MK, Williams A, DiPersio JF, Ley TJ. Adaptive immunity cooperates with liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) to facilitate long-term molecular remissions in mice with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 9468–9473.

- Whiteside TL. Isolation of Human NK Cells and Generation of LAK Activity. *Current Protocols in Immunology*. 2001; Unit 7.7.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*. 1988; 175(1): 231-237.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss EH, Melms A, Weller M. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol*. 2002; 168: 4772-4780.
- Williams AP, Peh CA, Purcell AW, McCluskey J, Elliott T. Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo Is Dependent on Tapasin. *Immunity*. 2002; 16 (4): 509-520.
- Wilson L, Spies T, Van den Elsen PJ. Cellular immune recognition of HLA-A*0201 following gene transfer into a human embryonal carcinoma cell line. *Human Immunol*. 1994; 41: 74-78.
- Wittwer CT, Fillmore GC und Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *BioTechniques* 10. 1991; 76-83.
- Wójcik C, Wilk S. Changes in proteasome expression and activity during differentiation of neuronal precursor Ntera-2 clone D1 cells. *Neurochem. Int*. 1999; 34: 131-136.
- Xu J, Huang B, Xiong P, Feng W, Xu Y, Fang M, Zheng F, Gong F. Soluble mouse B7-H3 down-regulates dendritic cell stimulatory capacity to allogenic T cell proliferation and production of IL-2 und IFN- γ . *Cell. Mol. Immunol*. 2006; 3(3): 235-240.
- Xue Q, Luan X, Gu Y, Wu H, Zhang G, Yu G, Zhu H, Wang M, Dong W, Geng YJ, Zhang X. The negative co-signaling molecule B7-H4 is expressed by human BMSC and mediates its T cell modulatory activity. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(1).
- Yan WH. HLA-G expression in hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol*. 2010; 3(1):67-80.
- Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod*. 2006; 21: 2538-2544.
- Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128(6): 1002-1009.
- Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14(10): 2721-2729.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY und Rock KL. Proteolysis und class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev*. 1999; 172: 49-66.
- Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, Scardino PT, Sharma P, Allison JP. B7-H3 und B7x are highly expressed in human prostate cancer und associated with disease spread und poor outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(49): 19458-19463.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis including T-cell anergy. *Blood*. 2005; 106(5): 1755-1761.
- Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, Zhuze AL, Gnutchev NV. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry*, 1984; 5: 348-354.
- Zhang G, Hou J, Shi J, Yu G, Lu B, Zhang X. Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells und activated T cells und is detectable in normal human serum. *Immunol*. 2008; 123: 538-546.
- Zhang H, Satyamoorthy K, Herlyn M, Rosdahl I. All-trans retinoic acid (ATRA) differentially induces apoptosis in matched primary und metastatic melanoma cells – a speculation on damage effect of ATRA via mitochondrial dysfunction und cell cycle redistribution. *Carcinogenesis* 2003; 24: 185-191.

Zhu B, Guleria L, Khosroshahi A, Chitnis T, Imitola J, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ. Differential role of programmed death-ligand 1 und programmed death-ligand 2 in regulating the susceptibility und chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2006; 176: 3480-3489.

Zhu CB, Wang CX, Zhang X, Zhang J, Li W. Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. *Int J Cancer.* 2011; 128(3): 617-622.

Zhu XM, Han T, Wang XH, Li YH, Yang HG, Luo YN, Yin GW, Yao YQ. Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202(6): 592.e1-7.

Zinkernagel RM and Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974; 248: 701-702.

Erklärung

Diese Arbeit wurde in den Jahren 2005 bis 2011 im Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Barbara Seliger durchgeführt.

Teile der vorliegenden Dissertation werden für Publikationen vorbereitet.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ich versichere, dass ich mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Olivia Döring

Halle (Saale), den 30.03.2011

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Seliger für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas sowie für ihre stetige Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich H. Nies, Institut für Biologie, Bereich Molekulare Mikrobiologie möchte ich mich für seine Bereitschaft der Übernahme der Betreuung dieser Dissertation am Institut für Biologie bedanken.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe des Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV der Martin-Luther-Universität Halle (Leitung Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll) für die Bereitstellung der Keimzelltumor-Zelllinien und der primären mesenchymalen Stammzellen.

Der Arbeitsgruppe PD I. Teichert v. Lüttichau (Kinderklinik der Technischen Universität München) danke ich für die Bereitstellung der immortalisierten MSC. Ebenso möchte ich

Frau Dr. Dagmar Quandt, Institut für Medizinische Immunologie danke ich für die Durchführung der Chromfreisetzungsversuche.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie und meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle herzlich für die liebevolle Unterstützung danken. Dabei gebührt meinem Lebensgefährten René besonderer Dank für seine moralische Unterstützung, den starken Rückhalt, das Verständnis, dass er für meine Arbeit aufbrachte und die motivierenden Gespräche, die mir sehr viel Kraft gegeben haben.

Publikationsliste

Artikel in Vorbereitung

“Expression and regulation of HLA class I antigen processing components in human mesenchymal stem cells of healthy and diseased persons”

“The immune-modulatory capacity of mesenchymal stem cells”

“Epigenetic silencing of the coinhibitory B7-H1 molecule as a novel mechanism in regulation of B7-H family genes”

“Expression and function of B7-H molecules in mesenchymal stem cells”

Tagungsbeiträge

Wasa Wickramasinghe, Olivia Doering, Susann Friedrich, Brad Davis, Neil Holling, Geoff Eaglesham, Glen Shaw and Michael Moore. Evaluation of several commercial ELISA kits for the detection of microcystins in drinking water. 3rd Annual Queensland Health and Medical Scientific Meeting 2003, Brisbane, Australia.

Döring O. Expression and regulation of costimulatory molecules in germ-cell tumors. Tumor immunology meets oncology IV 2008, Halle; Cancer Immunol Immunother. 2010; 59: 955-962.