

Hochdruckbehandlung humaner Zellen als Grundlage für die Entwicklung einer Tumorstoffimpfung

Jörg Benjamin Frey

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. K. Sommer
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff, i. R.
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Herrmann,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
3. Univ.-Prof. Dr.-Ing. E. Schlücker,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Die Dissertation wurde am 08. Februar 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29. März 2007 angenommen.

No pressure, no diamonds

(Thomas Carlyle 1795 - 1881)

Science is like sex, sometimes something useful comes out,
but that is not the reason we are doing it!

(Richard P. Feynman 1918 – 1988)

Meinem Großvater Georg († 2001) gewidmet.

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung.....	- 8 -
2 Problemstellung.....	- 10 -
3 Zielsetzung	- 11 -
4 Grundlagen der Hochdruckbehandlung	- 12 -
4.1 Definition des Druckes	- 12 -
4.2 Erzeugung des Druckes	- 13 -
4.3 Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf die Bestandteile biologischer Systeme.....	- 17 -
4.3.1 Auswirkung von hydrostatischem Hochdruck auf die Temperatur im geschlossenen System.....	- 18 -
4.3.2 Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf die Kompressibilität und Dissoziationskonstante von Wasser	- 19 -
4.3.3 Auswirkungen auf Proteine	- 22 -
4.3.4 Auswirkung auf Nukleinsäuren.....	- 27 -
4.3.5 Auswirkungen auf enzymatische Systeme	- 30 -
4.3.6 Auswirkungen auf Lipide und biologische Membranen	- 30 -
4.4 Zelltod und Immunogenität sterbender Zellen.....	- 33 -
4.5 Tumorgenese und Metastasierung.....	- 35 -
4.6 Therapie maligner Erkrankungen	- 37 -
5 Material und Methoden.....	- 41 -
5.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Rea-gentien.....	- 41 -
5.2 Hochdruckbehandlung	- 43 -
5.2.1 Hochdruckanlage	- 43 -
5.2.2 Hochdruckmikroskop.....	- 47 -
5.3 Zelllinien und Zellkultur.....	- 49 -
5.3.1 Zelllinien	- 49 -
5.3.2 Zellkultur.....	- 49 -
5.3.2.1 Kultivierung und Passagieren.....	- 50 -
5.3.2.2 Konservierung der Zellen	- 50 -
5.3.2.3 Mikroskopische Zellzahlbestimmung.....	- 51 -
5.3.2.4 Induktion von Zelltod	- 51 -

5.4 Messung von Proliferation und Metabolismus.....	- 51 -
5.4.1 Bestimmung der Änderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium	- 51 -
5.4.2 Grenz-Konzentrations Verfahrens (limiting dilution assay)	- 52 -
5.5 Bestimmung des Zelltodes	- 52 -
5.5.1 Durchflusszytometer.....	- 52 -
5.5.2 Beurteilung der Morphologie	- 53 -
5.5.3 Nachweis des Zelltodes mittels der AnnexinV-FITC Propidium Jodid Färbung	- 54 -
5.5.4 Messung des Gehaltes an nukleärer DNA einer Zelle	- 55 -
5.5.5 Messung der Säurelabilität der Zytoplasmamembran.....	- 56 -
5.5.6 Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials (MMP).....	- 57 -
5.6 Auftrennung nukleärer DNA mittels Gelelektrophorese	- 58 -
5.7 Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase Konzentration.....	- 59 -
5.8 Immunogene Wirkung <i>in vivo</i>	- 59 -
5.8.1 Versuchstiere	- 59 -
5.8.2 Humorale Immunantwort.....	- 60 -
6 Ergebnisse	- 61 -
6.1 Inaktivierung von Säugerzellen durch hydrostatischen Hochdruck.....	- 61 -
6.1.1 Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Vitalität von Säugerzellen	- 61 -
6.1.2 Kinetik der Inaktivierung hochdruckbehandelter Zellen.....	- 62 -
6.1.3 Komplette Inaktivierung hochdruckbehandelter Zellen	- 64 -
6.2 Hochdruckinduzierter Zelltod.....	- 66 -
6.2.1 Nachweis von Apoptose und Nekrose mittels AnnexinV-FITC Propidium Jodid Färbung.....	- 66 -
6.2.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) hochdruckbehandelter Zellen	- 69 -
6.2.3 Bestimmung der Säurelabilität und Freisetzung von Zuckerresten an Zytoplasmamembranen hochdruckbehandelter Zellen.....	- 70 -
6.2.4 Bestimmung des Gehalts an nukleärer DNA in hochdruckbehandelten Zellen.....	- 72 -
6.3 Spezielle hochdruckinduzierte Eigenschaften der behandelten Zellen	- 74 -
6.3.1 Degradation nukleärer DNA	- 74 -
6.3.2 Veränderung der Eigenschaften des Zytoplasmas	- 77 -
6.3.3 Minderung und Freisetzung zelluläre Gefahrensignale.....	- 78 -
6.3.4 Veränderung der morphologischen Kriterien.....	- 79 -
6.4 Immunogenität hochdruckbehandelter Zellen <i>in vivo</i>	- 82 -

7 Diskussion	- 84 -
7.1 Inaktivierung humaner Tumorzellen durch hohen hydrostatischen Druck <i>in vitro</i>	- 85 -
7.2 Hoher hydrostatischer Druck induziert verschiedene Wege des Zelltods in Säugetierzellen	- 86 -
7.3 Hochdruckinduzierte Veränderungen der Kompartimentierung behandelter Zellen ...	- 90 -
7.4 Reaktion des Immunsystems auf hochdruck-inaktivierte Tumorzellen	- 92 -
7.5 Ausblick auf die Weiterentwicklung einer durch hydrostatischen Hochdruck erzeugten Tumorstoffimpfung	- 93 -
8 Zusammenfassung	- 94 -
9 Summary	- 96 -
10 Literaturverzeichnis	- 97 -
11 Abbildungsverzeichnis	- 108 -
12 Veröffentlichungen	- 110 -
12.1 Originalarbeiten	- 110 -
12.2 Kurzveröffentlichungen und Kongressbeiträge	- 111 -
13 Curriculum Vitae	- 113 -
14 Danksagung	- 114 -

1 Einleitung

Ende des 19. Jahrhunderts wurde zum ersten Mal die inaktivierende Wirkung von hydrostatischem Hochdruck auf Mikroorganismen von Hite entdeckt (Hite, 1899; Hite, 1914). Nachfolgend konnte von vielen Forschergruppen gezeigt werden, dass die meisten Prokaryonten durch eine Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck inaktiviert und abgetötet werden können (Bartlett, 2002; Ludwig, 2003). Basierend auf den Untersuchungen der Hochdruckinaktivierung von Mikroorganismen wurden Verfahren zur Konservierung von Lebensmitteln entwickelt, die seit ca. 15 Jahren industrielle Anwendung finden (Balny et al., 1992; Butz, 1987; Cheffel, 1992; Fonberg-Broczek et al., 2005; Meyer-Pittroff et al., 2001; San Martin et al., 2002). Auch in der pharmazeutischen Industrie wurde der Einsatz von Hochdruck untersucht, da im Gegensatz zu thermischen Verfahren bei der Sterilisierung mit hydrostatischem Hochdruck viele temperatursensible Bestandteile geschont werden können (Meyer-Pittroff et al., 2001; Rigaldie et al., 2003). Mitte des letzten Jahrhunderts wurde erstmals der Einfluss hydrostatischen Hochdruckes auf Viren beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Pathogenität von Viren durch Hochdruckbehandlung reduziert werden kann, und es zeigte sich, dass hochdruckinaktivierte pathogene Keime für eine Vakzinierung herangezogen werden können (Atanasiu et al., 1951; Atanasiu et al., 1955; Basset, 1957; Basset et al., 1956; Basset and Maurin, 1958; Vignais et al., 1952a; Vignais et al., 1952b). Der Ansatz der hochdruckbehandelten Viren wurde in den letzten Jahren von mehreren Forschergruppen erneut aufgegriffen. Dabei wurden, auf Grund neuerer Analyseverfahren und eines besseren immunologischen Verständnisses, die hochdruckbehandelten Viren für einen Einsatz als virale Vakzine beschrieben (Gaspar et al., 2002; Gomes et al., 2003; Ishimaru et al., 2004; Meyer-Pittroff, 2003a). Die Idee, Tumorzellen mit Hochdruck zu behandeln, beruht auch auf den Untersuchungen der Gruppe um Basset, die als erste den Effekt von Hochdruck auf höhere Eukaryonten beschrieben hatte (Atanasiu and Basset, 1953). Diese Experimente lieferten auch die ersten Ansatzpunkte für die immunogene Wirkung hochdruckbehandelter Eukaryonten-Zellen *in vivo* (Dubert et al., 1952; Vignais et al., 1952a; Vignais et al., 1952b). Genauere Untersuchungen zum Tod der behandelten Zellen wurden dabei jedoch nicht beschrieben, da zu dieser Zeit noch keine weiteren Kenntnisse über verschiedene Formen des Zelltodes bestanden (Kerr et al., 1972).

Zudem wurde die Wirkung der hochdruckbehandelten Zellen auf das Immunsystem nicht untersucht, da das Wissen über den Eintrittsweg und die Signalweiterleitung der Immunantwort erst bedeutend später beschrieben wurde (Goldsby et al., 2000; Janeway et al., 2001).

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts entscheidende Fortschritte erzielt. Als die klassischen drei Säulen der Krebstherapie gelten der Stahl (Chirurgie), der Strahl (Strahlentherapie) und Medikamente (Chemotherapie). Mittels Kombination dieser drei Therapienarten können heute die meisten der an Krebs erkrankten Menschen medizinisch behandelt werden (Paukovits et al., 2004; Wedding and Höffken, 2003). Dabei kommt es jedoch nur bei relativ wenigen zu einer echten, lang anhaltenden Heilung. Daher werden den klassischen drei Therapieformen mit wachsendem Erfolg die so genannten „targeted therapies“ (gezielte Therapien) hinzugefügt. Diese versuchen, individuell die Tumorzellen anzugreifen. Dabei wird die Vakzinierung mit tumorindividuellen Proteinen, Peptiden oder DNA angewandt. Auch Vakzinierung mit autologen, inaktivierten Tumorzellen wurden in den letzten Jahren entwickelt, brachte aber bisher noch nicht die erhofften klinischen Erfolge (Berd et al., 1998; Schadendorf, 2002). Gerade bei der Therapie von Krebspatienten durch Ganz-Zell-Tumorvakzine könnte die Hochdrucktechnologie als Werkzeug zur Inaktivierung der Tumorzellen bei gleichzeitiger Erhaltung, im Idealfall sogar Erhöhung, der Immunogenität einen wichtigen Beitrag leisten (Meyer-Pittroff, 2003a).

2 Problemstellung

Mikroorganismen, Schimmelpilze (Bartlett, 2002; Ludwig, 2003) und niedere Eukaryonten (Hayakawa et al., 1998) werden durch eine Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck inaktiviert und abgetötet. Dabei stellen die Veränderungen von Proteinen (Heremans, 1982; Heremans and Smeller, 1998; Silva et al., 2001; Smeller, 2002), die Inaktivierung von Enzymen (Boonyaratanakornkit et al., 2002; Gekko, 2002), die Veränderung oder Zerstörung von Zellorganellen (Mentre et al., 1999) und die Phasenänderung von Zellmembranen (Kato et al., 2002; Winter, 2002; Winter and Dzwolak, 2004) entscheidende Einflussfaktoren dar. Es ist zu erwarten, dass das komplexere biologische System einer eukaryonten Zelle wesentlich stärkeren Veränderungen unterliegt als das der Mikroorganismen und Schimmelpilze (Bartlett, 2002; Ludwig, 2002; Mentre and Hui Bon Hoa, 2001). Erste Untersuchungen haben ergeben, dass auch Säugetierzellen durch Hochdruckbehandlung inaktiviert werden können (Atanasiu and Basset, 1953). Andere Experimente haben gezeigt, dass humane Tumorzellen und primäre Zellen wie Osteoblasten und Fibroblasten durch Behandlung mit Hochdruck abgetötet werden können (Bluemelhuber et al., 2003a; Diehl et al., 2004; Diehl et al., 2003). Diese Untersuchungen klärten jedoch nicht, welche physiologischen und pathologischen Änderungen durch die Hochdruckbehandlung induziert werden. Ferner blieb ungeklärt, wie sich die behandelten Zellen nach einer Behandlung in Kultur verhalten. Die Frage, ob die Zellen abhängig vom Druck verschiedene Zelltodprogramme, wie Apoptose und Nekrose, durchlaufen, konnte nur in ersten Ansätzen beantwortet werden (Bluemelhuber et al., 2003b).

Auf Grund der Vorarbeiten formulierten wir folgende Hypothesen: (I) Hochdruckbehandlung führt zur Inaktivierung autologer Tumorzellen und ermöglicht somit deren Einsatz zur Vakzinierung. (II) Die Behandlung maligner Erkrankungen mit autologen Ganz-Zell-Tumorvakzinen (whole cell based vaccines) kann das Immunsystem aktivieren und so eine Immunantwort gegen den Tumor und dessen Metastasen einleiten. (III) Die Vakzinierung führt nicht nur zur Elimination des Tumors, sondern schafft auch ein immunologisches Gedächtnis, das einem Rezidiv entgegenwirkt. (IV) Die Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck stellt ein legalisierbares, kostengünstiges, mobiles und schnelles Verfahren zur Inaktivierung von Ganz-Zell-Tumorvakzinen dar.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlagen für die Entwicklung einer autologen Tumorzellvakzine zu schaffen, bei der die Inaktivierung der Tumorzellen durch eine Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck erreicht wird. Hierbei soll die Inaktivierungsleistung des Hochdruckes analysiert werden. Dabei soll untersucht werden, wie sich eine hochdruckbehandelte Zelle verändert und sich *in vivo* dem Immunsystem präsentieren kann. Im Einzelnen sollen die folgenden Aspekte analysiert werden:

- (I) Können Tumorzellen durch eine Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck ausreichend inaktiviert werden?
- (II) Wenn Zellen durch hydrostatischen Hochdruck abgetötet werden, welche Form des Zelltodes wird dabei druckabhängig induziert?
- (III) Wie wird das biologische System Zelle durch die Hochdruckbehandlung verändert?
- (IV) Wie präsentieren sich die hochdruckinaktivierten Zellen dem Immunsystem und welche immunologisch relevanten Effekte gehen von ihnen aus?

4 Grundlagen der Hochdruckbehandlung

In festen Körpern sind Atome wechselseitig fest aneinander gebunden. Die Kennzeichen eines festen Körpers sind ein definiertes Volumen und eine definierte Gestalt. Flüssigkeiten haben im Gegensatz dazu bei einem festgelegten Volumen eine unbestimmte Gestalt (Hering et al., 1989). Die Struktur von Flüssigkeiten liegt zwischen der von Festkörpern, mit der geordneten Kristallstruktur, und der von Gasen, mit einer chaotischen Bewegung der Moleküle. Es gibt in Flüssigkeiten eine gewisse Nahordnung, aber kaum eine Fernordnung der Moleküle, was dazu führt, dass bei der Bewegung der Moleküle auch Stöße auf die Begrenzungswand stattfinden und somit Druck erzeugt werden kann (Atkins, 1987; Lucas, 1995).

4.1 Definition des Druckes

Durch Zusammenstöße der Moleküle einer Flüssigkeit mit der Begrenzungswand kommt es zu einer Zustandsgröße, dem Druck. Druck p ist definiert durch den Quotienten aus der Kraft F , die senkrecht auf eine Begrenzungsfläche A wirkt (Hering et al., 1989):

$$p = \frac{F}{A} \quad (4.1)$$

Unter der oben genannten Voraussetzung, dass die Moleküle in einer Flüssigkeit leichter als in einem Festkörper verschiebbar sind, gilt das Pascalsche Prinzip (Tipler et al., 2004):

Die Druckänderung einer in einem Behälter eingeschlossenen Flüssigkeit teilt sich unverändert jedem Punkt innerhalb der Flüssigkeit und den Wänden des Behälters mit.

Anhand des Pascalschen Prinzips lässt sich erkennen, dass der Druck mit demselben Betrag auf jeden Gegenstand wirkt, der in den geschlossenen Behälter eingebracht wurde.

Eine weitere Gesetzmäßigkeit, die wichtige Voraussetzungen für die Anwendung hohen hydrostatischen Druckes ist, ist das Gesetz der Isostatik (Cheftel, 1992):

Die Ausbreitung des Druckes erfolgt (praktisch) ohne zeitliche Verzögerung. Es bleibt irrelevant, ob die zu komprimierende Substanz in direktem Kontakt mit dem Druckmedium steht, oder hermetisch abgeschlossen in einer den Druck übertragenden und flexiblen Verpackung vorliegt.

Anhand dieser Gesetzmäßigkeiten wird ersichtlich, dass auf eine Probe in einem geschlossenen Behälter jederzeit der Druck wirkt, der in dem geschlossenen Behälter herrscht. Weiterhin ist die Wirkung des Druckes auf die Probe unabhängig davon, ob die Probe verpackt oder unverpackt in den Behälter eingebracht wird, sofern die Verpackung flexibel ist.

4.2 Erzeugung des Druckes

Für die Erzeugung von hydrostatischem Druck gibt es mehrere Möglichkeiten (Kalide, 1984):

- Wirkung einer Kraft auf eine Fläche
- Verkleinerung des Volumens einer Masse
- Erhöhung der kinetischen Energie in einem geschlossenen Gefäß mit konstantem Volumen.

Bei der Anwendung des hydrostatischen Druckes in den Lebenswissenschaften kommen vor allem die ersten beiden Möglichkeiten der Druckerzeugung zum Einsatz, wobei in dieser Arbeit nur das Verfahren der Verkleinerung des Volumens einer Masse angewendet wird. Dabei ist das Volumen, das verkleinert wird, vollständig mit Flüssigkeit gefüllt. Bei dieser Art der Druckerzeugung kann wiederum zwischen zwei verschiedenen Verfahren, der internen und externen Druckerzeugung, unterschieden werden. Beide Verfahren basieren auf dem Prinzip der Druckübersetzung oder Druckwandlung, die schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt ist (Gross et al., 1999; Hering et al., 1989).

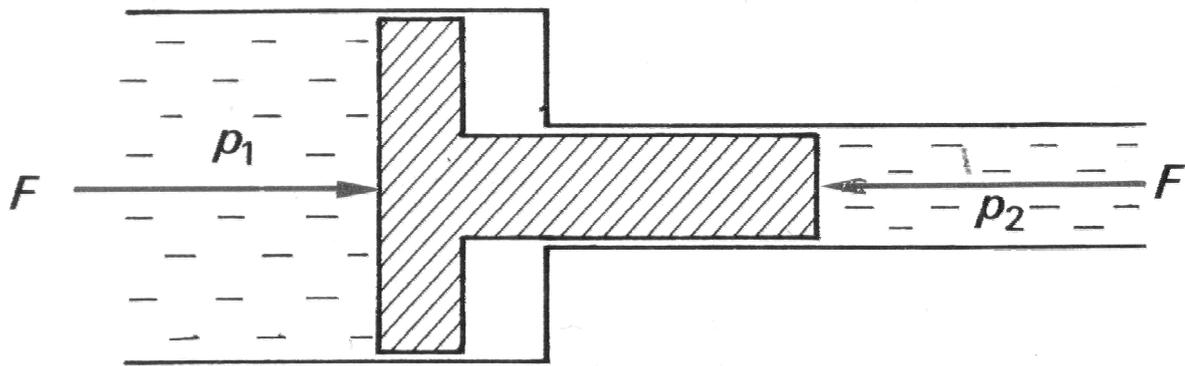


Abb. 4.1: Druckwandlung (Hering et al., 1989)

Bei einem Druckwandler sind zwei Volumina mit unterschiedlicher Querschnittsfläche durch einen dichtschließenden und beweglichen Kolben verbunden. Die Annahme wird getroffen, dass der verbindende Kolben aus inkompressiblem Material besteht. Wird nun die Kraft F , die auf beide Kolbenflächen A_1 und A_2 wirkt, konstant gehalten, so treten in den Volumina Druckunterschiede ($p_1 < p_2$) auf. Ausgehend von der Gleichung (4.1), die für beide Volumina gilt, und auf Grund der auf beiden Seiten konstanten Kraft folgt:

$$p_1 \cdot A_1 = p_2 \cdot A_2 \quad (4.2)$$

aufgelöst nach p_2 :

$$p_2 = \frac{p_1 \cdot A_1}{A_2} \quad (4.3)$$

Somit kann beim Einsatz eines Druckwandlers durch ein geeignetes Flächenverhältnis (A_1/A_2) ein sehr hoher Druck erzeugt werden. Wird bei der Erzeugung hoher hydrostatischer Drücke der Druckwandler direkt in den Probenraum (Druckautoklav) integriert spricht man von einer direkten Druckerzeugung, die in Abbildung 4.2 dargestellt ist.

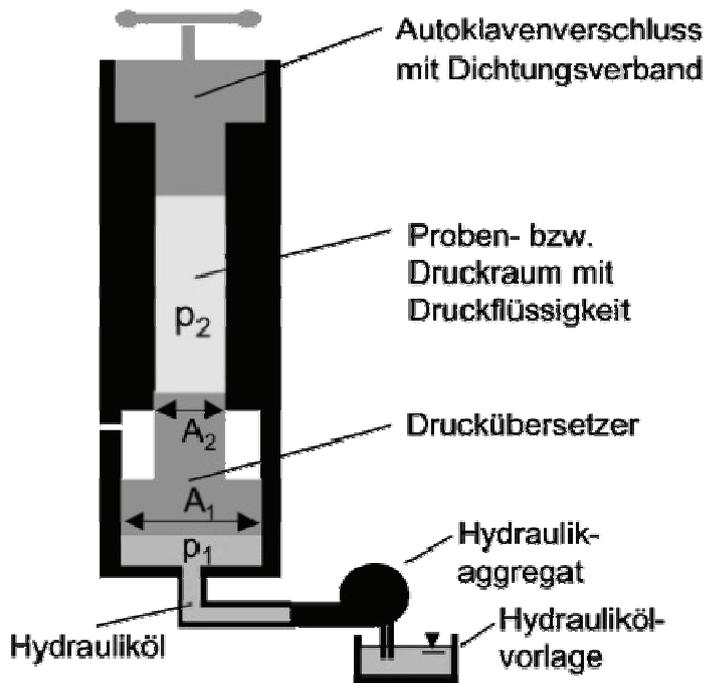


Abb. 4.2: Prinzip der direkten Druckerzeugung

Bei der direkten Druckerzeugung wird primärseitig durch ein Druckaggregat (Hydraulikpumpe) ein Druck p_1 erzeugt, der den Druckübersetzer mit dem Querschnittsflächenverhältnis (A_1/A_2) in den abgeschlossenen Probenraum schiebt und dadurch den Druck p_2 ($p_1 < p_2$) erzeugt. Der Vorteil dieser Anordnung liegt beim geringeren Platzbedarf und dem Fehlen von Verbindungsleitungen im Hochdruckbereich. Zudem muss zur Erzeugung des gewünschten Druckes weniger Energie aufgewendet werden, da nur die Flüssigkeit im Probenraum komprimiert werden muss.

Eine weitere Möglichkeit der Druckerzeugung ist die indirekte Druckerzeugung, bei der der Druckwandler ein separates Bauteil darstellt und nicht mehr in den Probenraum integriert ist. In Abbildung 4.3 ist das Prinzip einer indirekten Druckerzeugung dargestellt.

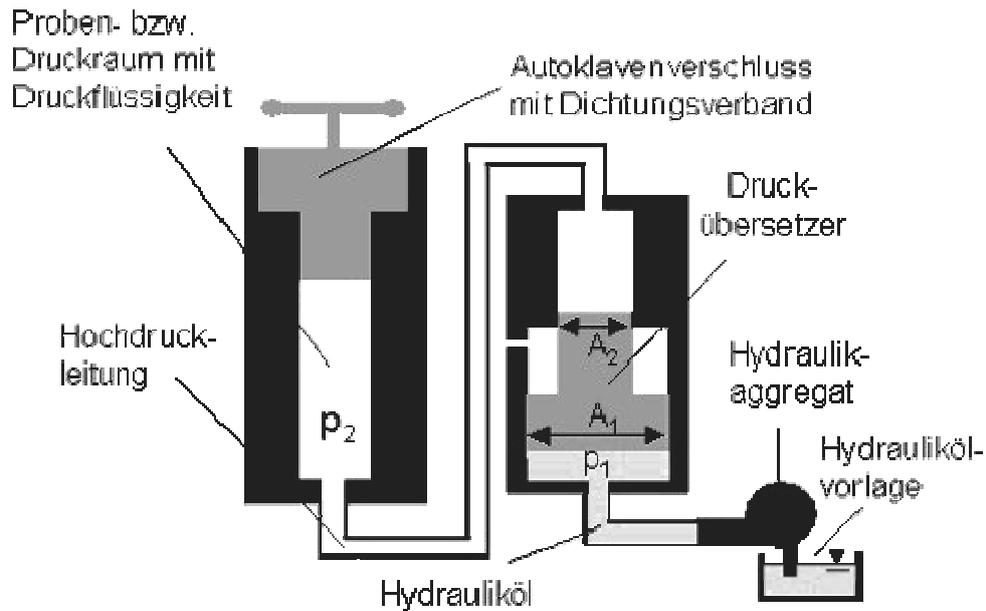


Abb. 4.3: Prinzip der indirekten Druckerzeugung

Bei dieser Art der Druckerzeugung wird durch den Druckwandler mit dem Querschnittsflächenverhältnis (A_1/A_2) der Druck p_2 erzeugt. Anschließend wird durch die Druck übertragende Flüssigkeit der erzeugte Druck in einer Leitung in den Probenraum geleitet. Der Vorteil dieser Art der Druckerzeugung liegt in der Trennung des Probenraums von den beweglichen Teilen des Druckübersetzers. Dies hat auch hygienetechnische Vorzüge, da der Niederdruckbereich mit den notwendigen Hydraulikaggregaten vom Hochdruckbereich baulich getrennt werden kann.

4.3 Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf die Bestandteile biologischer Systeme

Eine Zelle besteht aus Zellorganellen und verschiedenen Regel- und Steuerkreisen. Diese Regel- und Steuerkreise werden wiederum durch eine Vielzahl chemischer Verbindungen und Biomoleküle gesteuert. Hydrostatischer Hochdruck kann nicht nur die Säugetierzelle als Ganzes stören oder zerstören, sondern eine Vielzahl von Biomolekülen und Reaktionen beeinflussen. Dabei werden durch den Druck chemische Gleichgewichte nach dem Prinzip von Le Chatelier verschoben. Dieses Prinzip gilt sowohl für chemische Reaktionen, als auch für Phasentransitionen und molekulare Transkonformationen (Atkins, 2001; Cheftel, 1992). Das Prinzip von Le Chatelier besagt (Atkins, 2001):

Wenn ein im Gleichgewicht befindliches System gestört wird, dann reagiert das System so, dass die Wirkung der Störung minimal ist.

Das bedeutet, dass in einem System, in dem Druck ausgeübt wird, die Lage des Gleichgewichts im System in diejenige Richtung verschoben wird, die zur Verringerung der Zahl der Moleküle führt, so dass die Wirkung des Druckes möglichst klein ausfällt.

Im den folgenden Abschnitten werden auch Abbildungen aus älteren Quellen gezeigt. Hier wurde von den Autoren der Druck in der damals gebräuchlichen Einheit atm (physikalische Atmosphäre) angegeben. Eine physikalische Atmosphäre entspricht 0,101325 MPa (Tipler et al., 2004).

4.3.1 Auswirkung von hydrostatischem Hochdruck auf die Temperatur im geschlossenen System

Wie bei der Erzeugung von hohem hydrostatischem Druck in Kapitel 4.2 gezeigt, kann eine Drucksteigerung durch eine Volumenverringering erreicht werden. Diese Volumenverringering kommt z. B. zustande, indem ein beweglicher und dichtschießender Kolben reibungsfrei mit der Kraft F in einen abgeschlossenen Zylinder geschoben wird. Aus der aufgewendeten Kraft F längs des Weges von 1 nach 2 resultiert die Volumenarbeit W_{12} (Meyer-Pittroff, 2003b).

$$W_{12} = - \int_1^2 p \cdot dV \quad (4.4)$$

Nach dem ersten Hauptsatzes der Thermodynamik muss die zugeführte Energie (Wärme und/oder mechanische Arbeit) in einem geschlossenen und bis auf die Energiezufuhr gegenüber der Umgebung isolierten thermodynamischen System zur Erhöhung der inneren Energie des Systems führen (Meyer-Pittroff, 2003b). Die adiabate Zufuhr mechanischer Arbeit, die zur Erhöhung des Druckes im geschlossenen System führt, hat auch eine Temperaturerhöhung zur Folge, die proportional zur Druckerhöhung ist und formell wie folgt dargestellt wird (Atkins, 1987; Kessler, 1996):

$$\left(\frac{dT}{dp} \right)_{adiabat} = \frac{\beta_V \cdot T}{\rho \cdot c_p} \quad (4.5)$$

β_V : thermischer Ausdehnungskoeffizient
 c_p : isobare spezifische Wärmekapazität

Diese Temperaturerhöhung muss bei der Hochdruckbehandlung berücksichtigt werden, um thermische Einflüsse auf die zu behandelnde Probe zu minimieren. In der Abbildung 4.4 ist die Erhöhung der Temperatur ΔT bei adiabater Kompression von Wasser zu sehen. Die Änderung der Temperatur ΔT ist ebenfalls von verschiedenen Temperaturen T (siehe Temperaturangaben an den verschiedenen Linien in Abb. 4.4) abhängig, die vor der adiabaten Kompression in dem geschlossenen System geherrscht hatten. Hieraus ist als Faustregel abzuleiten, dass bei einer Hochdruckbehandlung ab Raumtemperatur ($T \approx 20 \text{ }^\circ\text{C}$) pro 100 MPa Druckerhöhung eine Temperaturerhöhung um 2,5 K stattfindet.

In derselben Weise findet bei der Entspannung auch eine Verringerung der Temperatur statt (Kessler, 1996).

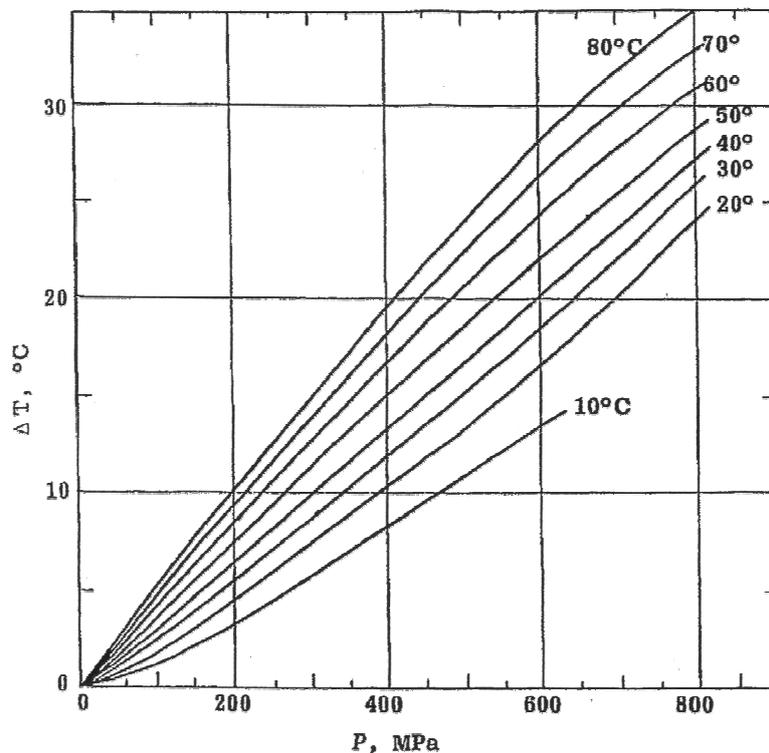


Abb. 4.4: Erhöhung der Temperatur während einer adiabaten Kompression von Wasser (Makita, 1992)

4.3.2 Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf die Kompressibilität und Dissoziationskonstante von Wasser

Wasser stellt mengenmäßig den bedeutendsten anorganischen Bestandteil lebender Organismen dar. Eine Eukaryotenzelle besteht zu mehr als 80 % aus Wasser. Durch den Dipolcharakter des Wassers sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie die biologische Funktion des Wassers geprägt (Fallert-Müller, 2000; Kornblatt and Kornblatt, 2002):

- Füllen von Hohlräumen (Kavitäten), wenn energetisch günstig
- Stabilisierung einzelner Konformationen von Proteinen und von Konformationen untereinander
- Einsatz zur Brückenbindung
- Regulation chemischer Potentiale
- Protonentransporter

Hieraus wird ersichtlich, dass Wasser in einem biologischen System nicht nur frei, sondern zu einem großen Teil auch fest an andere Moleküle gebunden vorliegt. Die thermophysikalischen Eigenschaften des „gebundenen Wassers“ können nicht direkt gemessen werden, dürfen aber gerade bei einer Hochdruckbehandlung nicht vernachlässigt werden (Makita, 1992; Mentre and Hui Bon Hoa, 2001). In der Vergangenheit wurden hochdruckinduzierte Veränderungen des Wassers beschrieben, eine strukturelle Veränderung konnte aber nicht detektiert werden (Stippl, 2005).

Wasser ist im Atmosphärendruckbereich als praktisch inkompressibel anzusehen. Für Versuche zur Inaktivierung von Säugetierzellen soll ein Druck > 100 MPa angewendet werden. Bei dieser Anwendung kann die Annahme der Inkompressibilität des Wassers nicht mehr aufrechterhalten werden. Das spezifische Volumen des Wassers mit einer Temperatur von $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einem Druck von $0,1$ MPa ist um $13,3\%$ höher als bei einem Druck von 500 MPa. Dieser Zusammenhang ist exemplarisch für die Temperatur 295 K in Abbildung 4.5 graphisch dargestellt.

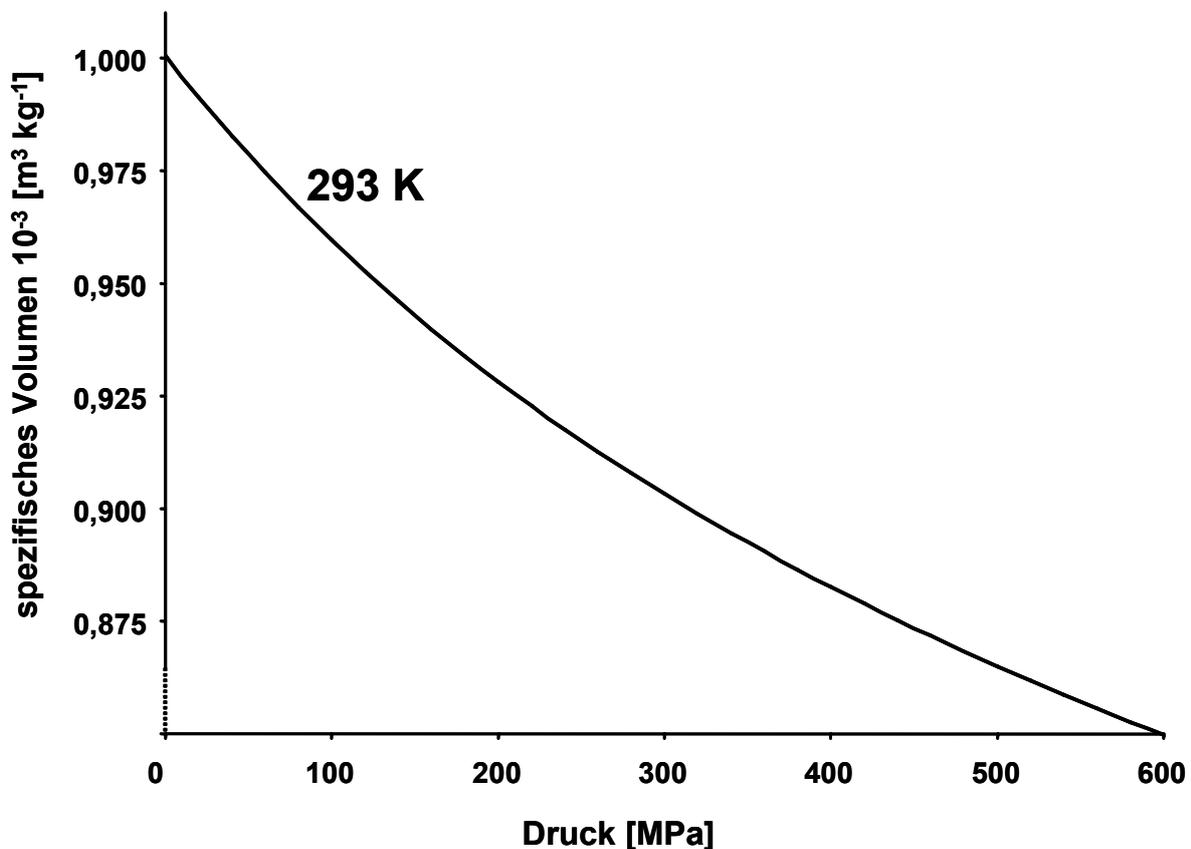


Abb. 4.5: Darstellung des spezifischen Volumens von Wasser in Abhängigkeit von Druck bei konstanter Temperatur (nach Wagner, 2005; Wagner and Pruß, 2002)

Die Kompressibilität von Wasser sowie deren Folgewirkungen vermutlich mit für das Absterben von Zellen verantwortlich (Ludwig, 2003; Silva et al., 2004). Einen weiteren Einflussfaktor auf biologische Systeme bildet die Änderung des Ionenproduktes von Wasser während der Änderung des Druckes. So wurde beobachtet, dass bei steigendem Druck und steigender Temperatur die Dissoziation von schwachen Säuren und Basen verstärkt wird, was unmittelbar zur Änderung des pH-Wertes in ungepufferten Lösungen führt (Luedemann, 1992).

Die von El'yanov und Hamann (El'yanov and Hamann, 1975) erstellte und nach Nakahara (Nakahara, 1974) abgewandelte und vereinfachte Formel (4.6) stellt die Änderung des pH-Wertes dar (Stippl, 2005):

$$p_{k_a} = p_{k_{a_0}} + \frac{\Delta V^0 \cdot p}{2,303 \cdot R \cdot T \cdot (1 + b \cdot p)} \quad (4.6)$$

p_{k_a} : Dissoziationskonstante bei verändertem Druck
 $p_{k_{a_0}}$: Dissoziationskonstante bei Atmosphärendruck
 ΔV^0 : Volumenänderung bei Atmosphärendruck
 b : Korrekturfaktor $b = f(T)$
 R : Allg. Gaskonstante

4.3.3 Auswirkungen auf Proteine

Die ersten Beobachtungen von druckinduzierten Veränderungen der Proteinstruktur wurden von Bridgman 1914 veröffentlicht. Dabei beobachtete Bridgman bei Raumtemperatur ab einem Druck von ca. 500 MPa (5000 atm) die Denaturierung von Albumin, die er von der bekannten Hitzedenaturierung unterscheiden konnte (Bridgman, 1914). Auf Grundlage der Arbeiten von Bridgman konnte belegt werden, dass hoher hydrostatischer Druck einen Einfluss auf die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur von Proteinen hat (Heremans, 1982; Tauscher, 1995), indem vor allem die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen (in ihrer Form als chemische Bindung) durch den Druck beeinflusst werden (Boonyaratankornkit et al., 2002; Heremans and Smeller, 1998; Winter and Dzwolak, 2004):

- *Ionische Wechselwirkungen (Salzbrücken)*: Sie stabilisieren durch elektrische Anziehung zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäure-Seitenketten vornehmlich die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen. Diese Art der Stabilisierung kann durch Hochdruck gestört werden, indem Lösungsmittel (Wasser) in die globuläre Struktur von Proteinen eindringen kann. Andererseits kann der Druck auch bewirken, dass schwache ionische Wechselwirkungen, die nicht dem Lösungsmittel ausgesetzt sind, stabilisiert werden.
- *Hydrophobe Wechselwirkungen*: Sie bestehen vornehmlich zwischen unpolaren Seitenketten und bewirken eine einwandfreie Faltung der Aminosäureketten. Diese Bindungen werden durch Druck stabilisiert. Diese Stabilisierung ist eine Folge der Volumenzunahme, die von der Solvatisierung der unpolaren Oberflächen während der Auffaltung des Proteins herrührt, wobei die Volumenzunahme wiederum das Ergebnis einer Clathratformation um die unpolaren Gruppen der Aminosäurekette ist, die bei der Exposition der unpolaren Gruppen in Wasser erfolgt.

- *Van der Waals Kräfte (VDW)*: Sie sind schwache Anziehungskräfte zwischen allen Molekülen in einem Protein und bewirken damit die kompakte Struktur eines Proteins. Eigentlich müssten die VDW bei einer Behandlung mit hohem Druck bevorzugt gebildet werden, da sie eine Volumenverringerung des gesamten Proteins verursachen. Allerdings zeigen sich die VDW als äußerst drucklabil. Schon bei einem Druck < 300 MPa werden diese Bindungen getrennt und verursachen die Druckdenaturierung der Proteine.
- *Wasserstoffbrückenbindungen (WBB)*: Diese Brückenbindungen stabilisieren die Proteine. Wassermoleküle können Hohlräume füllen und somit ein kompakteres Gesamtvolumen erzeugen. Diese Bindungen erfahren eine Veränderung bei einer Druckbehandlung, indem die intermolekularen WBB zu Gunsten der intramolekularen WBB gestärkt werden. Im Inneren der Proteine kann beobachtet werden, dass WBB verkürzt werden, was mit der Auflösung der Hohlräume zu einer Komprimierung der Proteine führen kann und damit unweigerlich zur Auffaltung der Proteine. Die freien Wassermoleküle dienen dann zur weiteren Hydratisierung des Proteins und begünstigen somit die Auffaltung.

Eine Ausnahme bilden kovalente Bindungen, die durch Druck < 1000 MPa sowohl in ihrer Bindungsstabilität wie auch in ihrem Bindungswinkel nicht verändert werden. Somit bleibt die Primärstruktur von Proteinen durch eine Druckbehandlung weitgehend unbeeinflusst (Winter and Dzwolak, 2004).

Diese Veränderungen untermauern die von Bridgman gemachte makroskopische Beobachtung der druckinduzierten Denaturierung von Proteinen, die je nach Protein reversibel oder irreversibel abläuft. Im Vergleich zu anderen Denaturierungsverfahren beruht die Störung der Proteinstruktur bei einer Hochdruckbehandlung ausschließlich auf der Volumenänderung während der Behandlung (Bridgman, 1914; Silva et al., 2001; Smeller, 2002). Aus den Erkenntnissen der Druckdenaturierung von Proteinen wurde von Hawley ein allgemeines Druck-Temperatur-Phasendiagramm entwickelt, welches in Abbildung 4.6 dargestellt ist und die Phasengrenzen der Proteindenaturierung durch Druck p , Temperatur T und Denaturierungsagenzien c (Kalt-denaturierung) zeigt.

Dieses Diagramm muss für jedes Protein einzeln bestimmt werden, wobei sich die Phasengrenzen, die immer die Form einer Ellipse haben, verschieben. Aus dem Diagramm ist abzulesen, dass bereits bei Raumtemperatur (T_{Raum}) Proteine denaturiert werden können, wenn der Druck erhöht wird (Hawley, 1971).

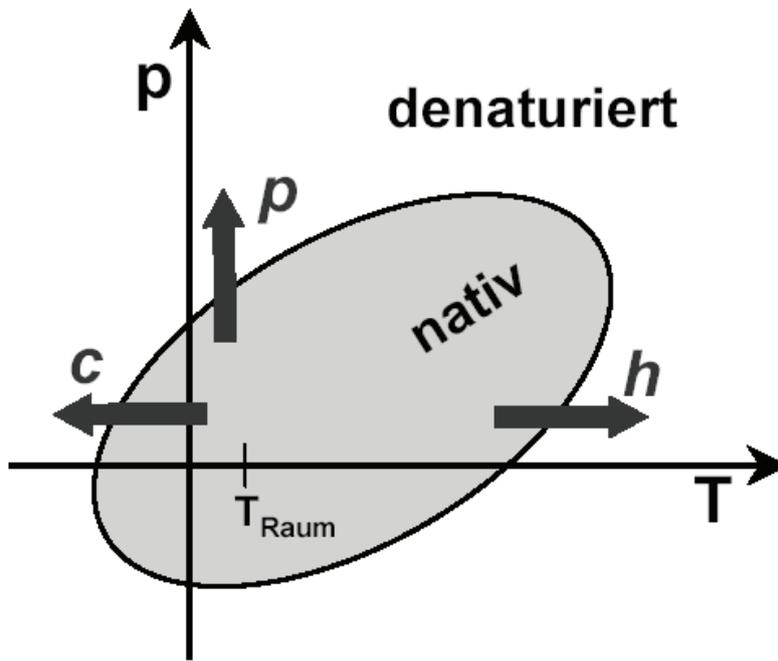


Abb. 4.6: Allgemeines Druck-Temperatur-Phasendiagramm für Proteine (nach Hawley, 1971)

Allerdings sind die Aussagen aus dem Phasendiagramm von Hawley limitiert. Gültigkeit behält dieses Phasendiagramm nur für unlösliche Proteine, da der Einfluss des Wassers auf eine Denaturierung der Proteine nicht berücksichtigt wurde. Wassermoleküle spielen bei der Denaturierung und Dissoziation von Proteinen durch Druck eine wesentliche Rolle, da sie als „Platzhalter“ dienen und Hohlräume in den Proteinen ausfüllen (Silva et al., 2001; Smeller, 2002).

Der Einfluss des Druckes auf Proteine ist abhängig von der Höhe des Druckes. In Abbildung 4.7 sind schematisch die Auswirkungen von Druck auf Proteine dargestellt.

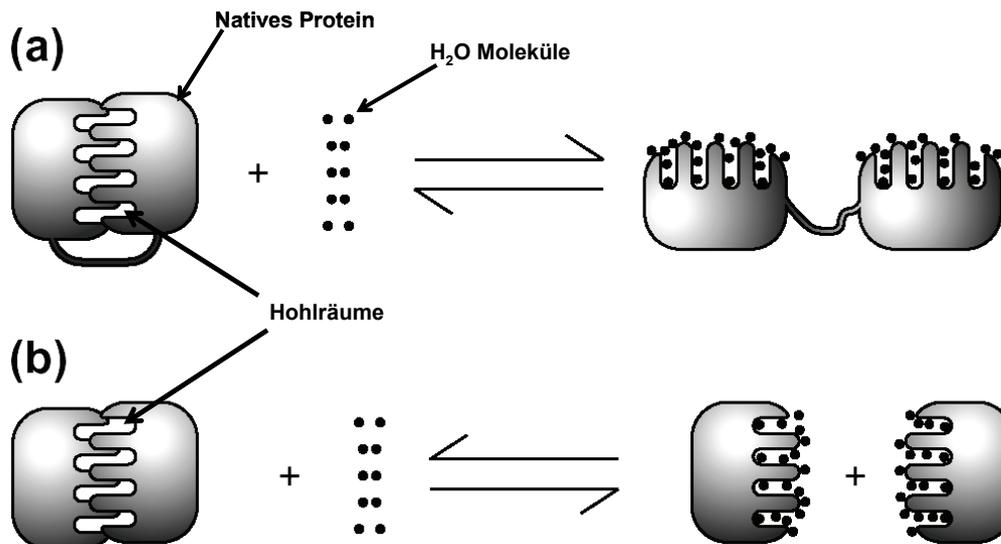


Abb. 4.7: Schematische Darstellung druckinduzierter Effekte auf Proteine (nach Silva et al., 2001)

Dabei wird bei **(a)** die Denaturierung eines Proteins und bei **(b)** die Dissoziation eines dimeren Proteins gezeigt. Beide Reaktionen entstehen durch Störung der intramolekularen Wechselwirkungen und Freigabe der Kavitäten, deren freie Bindungsstellen mit Wassermolekülen besetzt werden (Silva et al., 2001; Smeller, 2002).

Vor allem die Denaturierung von Proteinen ist abhängig vom eingesetzten Druck. In der nachfolgenden Abbildung 4.8 ist der Effekt einer Druckbehandlung mit verschiedenem Druck auf Proteine schematisch gezeigt. Dabei zeigen Proteine bis zu einem Druck von 50 MPa nahezu keine messbaren Veränderungen **(A)**. Zwischen 50 und 200 MPa finden die ersten Vorgänge statt, die zu einer Denaturierung des Proteins führen **(B)**. Dabei werden die oligomeren Proteine dissoziiert (siehe auch Abbildung 4.7), freiliegende hydrophobe Seitenketten hydratisiert und eine Volumenverringerng mit Elektrostriktion stellt sich ein. Wird der Druck bis 500 MPa erhöht **(C)**, können Wasserstoffbrückenbindungen verkürzt werden, was die ersten Konformationsänderungen nach sich zieht. Zugleich ermöglicht dieser Vorgang, dass Wasser in die Hohlräume eindringt und die Konformationsänderungen weiter vorantreibt. Bei einem Druck zwischen 500 und 1000 MPa **(D)** erreicht das Protein einen „molten globule“ Zustand, der durch eine irreversible Zerstörung seiner Tertiärstruktur und einer Öffnung sämtlicher Hohlräume charakterisiert ist (Boonyaratanakornkit et al., 2002). Die Änderung von Proteinen durch Druck hat einen direkten Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

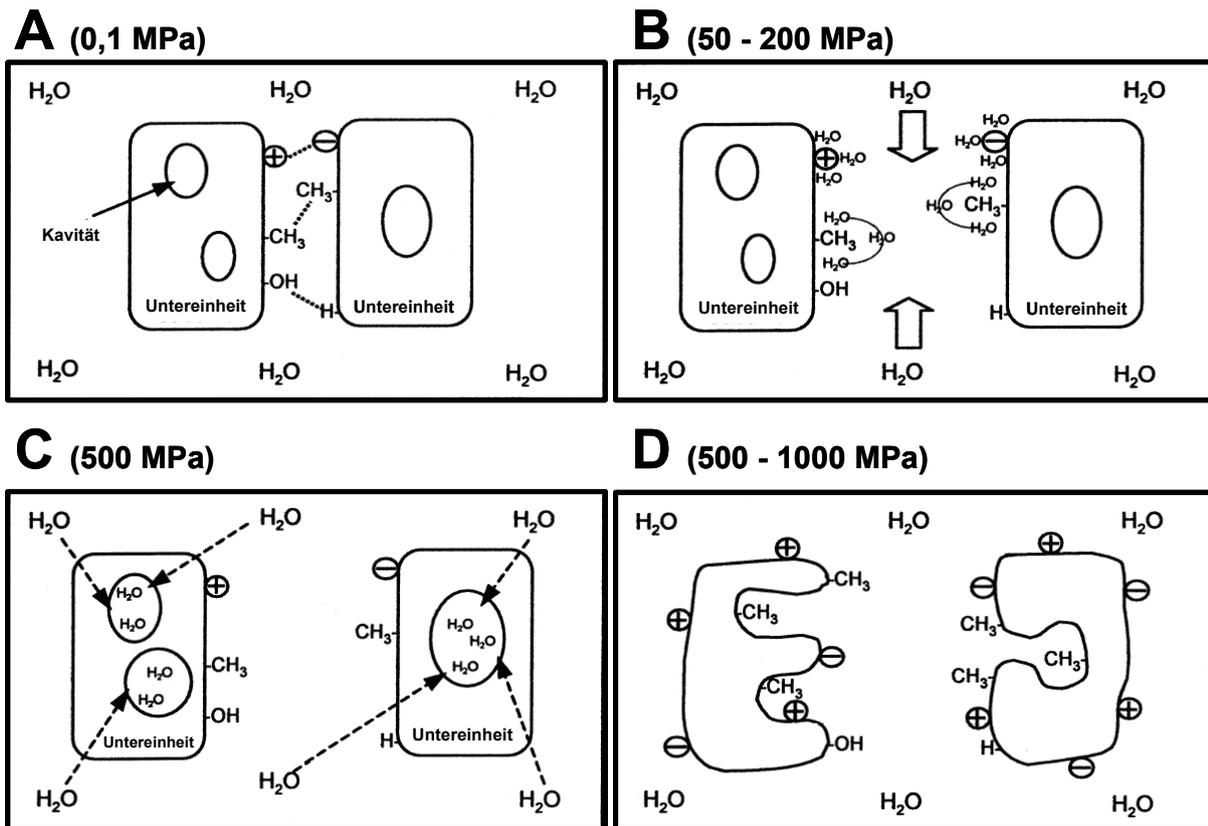


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der Effekte von Druck auf oligomere Proteine (nach Boonyaratankornkit et al., 2002).

Gerade reversible oder irreversible Änderungen bei einem Druck zwischen 50 und 200 MPa können in den Säugetierzellen zu einer Akkumulation von mißgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen und so Apoptose auslösen (Kim et al., 2006). Auch der Funktionsverlust der Proteine durch die Denaturierung bei höherem Druck > 400 MPa kann den Zelltod auslösen.

4.3.4 Auswirkung auf Nukleinsäuren

Schon 1964 wurde von Heden publiziert, dass sich nach Hochdruckbehandlung < 1000 MPa (10000 atm) die Transformation der DNA von *Bacillus subtilis* nicht messbar verändert (Heden, 1964; Heden and Rupprecht, 1966). Im Vergleich zu Proteinen ist die DNA stabiler gegenüber einer Druckbehandlung, was durch ihre Struktur bedingt ist. Wie bereits bei der Betrachtung der druckinduzierten Effekte auf Proteine herausgestellt wurde, können die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) durch die Druckbehandlung zu Gunsten der intramolekularen WBB gestärkt werden (Suzuki et al., 1971; Suzuki et al., 1972; Weida and Gill, 1966).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Messung der UV-Absorption ein geeignetes Mittel für die Bestimmung der Effekte hohen hydrostatischen Druckes auf DNA ist. Die so genannte Transition der DNA-Stränge, der Übergang vom Einzel- zum Doppelstrang und umgekehrt wird durch die Schmelztemperatur T_m (Temperatur, bei der 50 % der DNA einzelsträngig vorliegt) bestimmt, die wiederum von der Zusammensetzung der Basen der DNA-Stränge abhängt (Macgregor, 1998). Die Abhängigkeit der Schmelztemperatur vom Druck wird durch eine lineare Funktion dargestellt, die die Abhängigkeit von $\Delta T_m/\Delta p$ zur Volumenänderung ΔV beschreibt. Zusätzlich ändert sich in Abhängigkeit vom Druck die Ionenstärke der DNA *ex vivo* (Macgregor, 1998). Die Änderungen ermöglichen den Übergang von der Doppelhelix zu einem Supercoil. Die „helix to coil transition“ wird in Abbildung 4.9 zu einem Phasendiagramm zusammengefasst. Die Schmelztemperatur T_m (bei Umgebungsdruck (0,1 MPa) bestimmt) wird in Abbildung 4.9 durch verschiedenen unterbrochenen Linien dargestellt. Zur Verbesserung der Darstellung der unterschiedlichen Polymere wurde ein Teil aus dem Diagramm ausgeschnitten und die Schmelztemperaturen direkt den entsprechenden Linien zugeordnet.

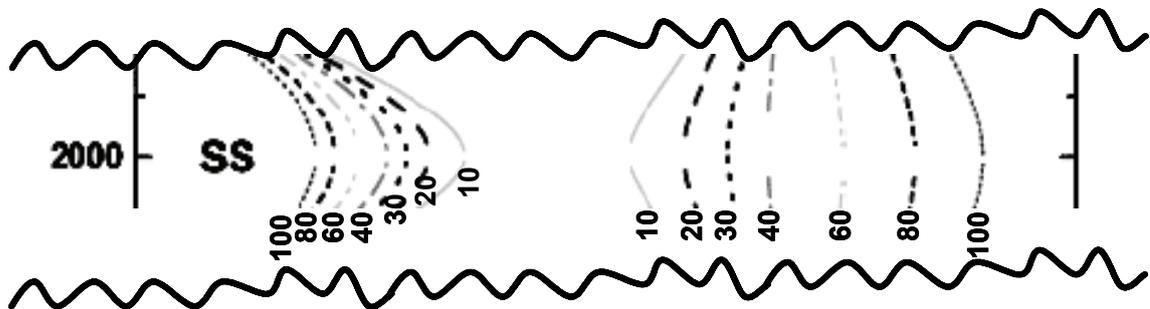
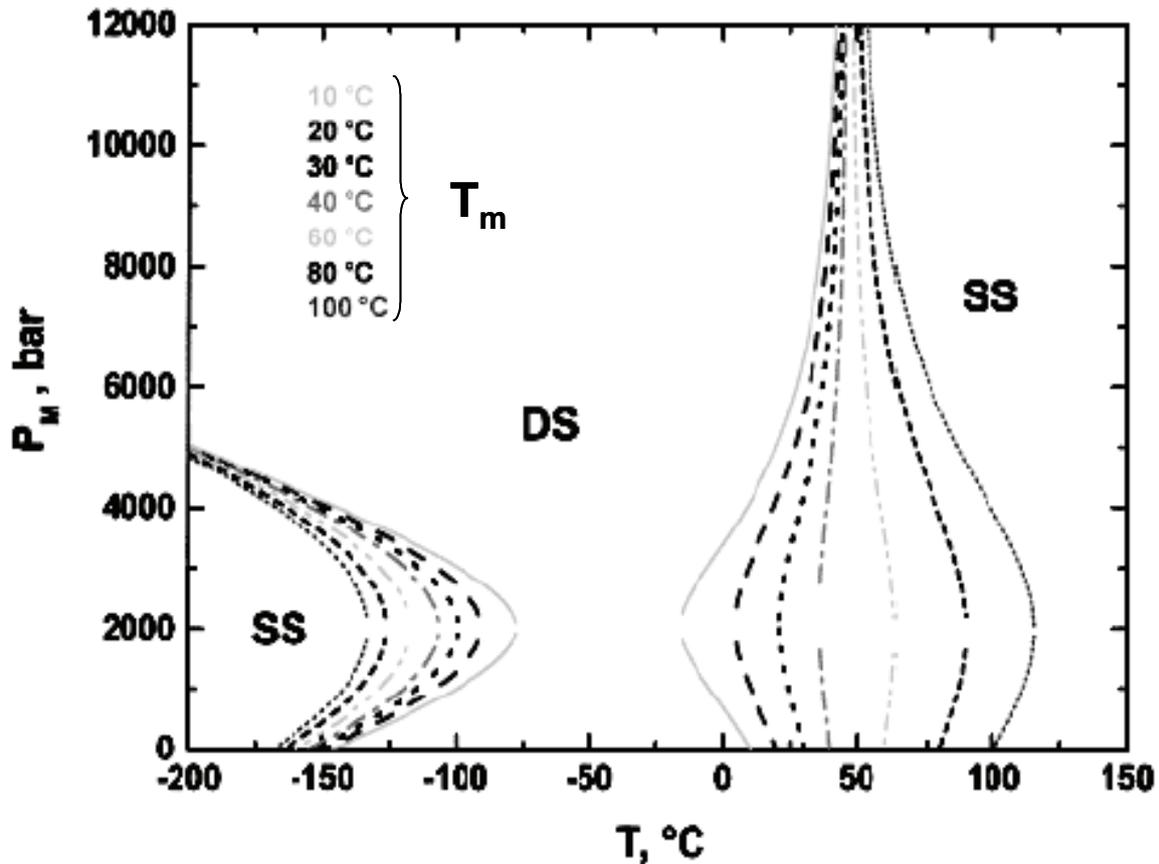


Abb. 4.9: Druck-Temperatur Phasendiagramm der „helix to coil – transition“ doppelsträngiger Nukleinsäurepolymeren mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen T_m (nach Dubins et al., 2001)

Vier der wichtigsten Beobachtungen aus dem Phasendiagramm sind im Folgenden zusammengestellt, wobei zu bemerken ist, dass sich diese Ergebnisse auf DNA und RNA in gleichem Maße beziehen (Dubins et al., 2001; Macgregor, 1998):

- Die thermodynamische Stabilität von doppelsträngigen Nukleinsäuren kann durch eine komplexe, endliche Funktion in Abhängigkeit von Druck und Temperatur beschrieben werden.

- Doppelsträngigen Nukleinsäuren, die eine Schmelztemperatur T_m von 50 °C haben, scheinen eine Grenze im Phasendiagramm darzustellen, bei der die Abhängigkeit $\Delta T_m/\Delta p$ ihr Vorzeichen von negativ zu positiv ändert. Dabei wird bei positivem $\Delta T_m/\Delta p$ der Doppelstrang stabilisiert und bei negativem Vorzeichen destabilisiert.
- Ab einem Druck von 200 MPa wird die Änderung des Vorzeichens von $\Delta T_m/\Delta p$ und damit die Stabilisierung und Destabilisierung des Doppelstranges umgekehrt.
- Eine Parallele zu der Kaltdenaturierung von Proteinen ist auch bei der „helix to coil transition“ von DNA zu erkennen.

Zusätzlich konnten Lin und Macgregor zeigen, dass unter hohem Druck eine Superhelixbildung bevorzugt stattfindet. Dabei ist es unerheblich, ob es sich nach der Formation um doppel- oder tripelsträngige DNA oder RNA handelt (Heden, 1964; Macgregor, 1998). Ferner wurde beobachtet, dass die natürlicherweise rechtsläufige Helix der DNA (B-Konformation) durch Einwirkung von hohem Druck sequenzabhängig in eine linksdrehende DNA-Helix (Z-Konformation) umgewandelt werden kann (Barciszewski et al., 1999).

Der Einfluss von Druck auf die DNA spielt nicht nur bei der Struktur der DNA eine Rolle, sondern auch bei der Interaktion der DNA mit Proteinen und Farbstoffen. Kleinere Moleküle, wie DNA-Farbstoffe wie z.B. Acridin Orange, Propidium Jodid, Rhodamin und Methylenblau, die in der kleinen Furche (minor groove) intercalieren oder durch nicht kovalente Bindung an die DNA binden, zeigen bei einem Druck < 450 MPa (4500 atm) keine veränderte Bindung an die DNA (Suzuki et al., 1972). Große Moleküle, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die nicht kovalent an die DNA binden können, werden durch eine Druckbehandlung bei der Bindung und ihrer Tätigkeit gestört (Macgregor, 2002). Somit kann geschlossen werden, dass bei Druck < 500 MPa und einer Temperatur im Bereich von 20 – 37 °C reversible Vorgänge an der DNA stattfinden, die keinen irreparablen Schaden am Erbmateriale der Zelle erzeugen.

4.3.5 Auswirkungen auf enzymatische Systeme

Ein Enzym stellt ein Protein dar, das bei biochemischen Reaktionen die Wirkung eines Katalysators einnimmt und dazu beiträgt, dass ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird. Dabei müssen die Enzyme einen Komplex bilden, bei dem das Enzym an das Substrat bindet und nach erfolgter Reaktion wieder in der nativen Form für weitere Reaktionen zur Verfügung steht (Fallert-Müller, 2000). Enzyme sind durch Druck unterschiedlich beeinflusst (Cheftel, 1992):

- Eine Behandlung mit Hochdruck resultiert in einer temperatur- sowie druck- und druckhaltezeitabhängigen:
 - o reversiblen oder irreversiblen
 - o teilweise oder vollständigen

Inaktivierung oder Aktivierung.

- Der Einfluss auf die enzymatische Reaktion ist abhängig vom Reaktions- oder Aktivierungsvolumen
- Ein Einfluss erfolgt durch Veränderung des Substrates

Für viele Enzyme wurden Kinetiken erstellt, die die Aktivität und Umsatzfähigkeit nach einer Hochdruckbehandlung beschreiben. Dabei wurde beobachtet, dass der Einfluss einer Druckbehandlung auf enzymatische Systeme nicht generalisiert werden kann, da manche Systeme durch Druck in ihrer Funktion beeinflusst werden und andere nicht. Zusätzlich kann sich die Druckbehandlung entweder inhibierend oder aktivitätssteigernd für die enzymatische Reaktion auswirken (Balny, 1996; , 1999; Balny and Hooper, 1988; Balny and Travers, 1989; Dallet and Legoy, 1996; Gekko, 2002; Heremans, 1982; Lynch et al., 2002; Masson et al., 1990; Masson and Balny, 1988; , 1990; Morild, 1981; Ruan et al., 1998; Winter and Dzwolak, 2004).

4.3.6 Auswirkungen auf Lipide und biologische Membranen

In einer Zelle sind die Grenzen nach außen, aber auch die Abtrennung der Kompartimente, durch Membranen gewährleistet (Fallert-Müller, 2000). Nach den vorangegangenen Beschreibungen der Effekte von hydrostatischem Hochdruck auf Biomakromoleküle ist anzunehmen, dass auch das gut organisierte System einer Zellmembran von der Hochdruckbehandlung verändert wird.

Als Beispiel hierfür seien die Tiefseeorganismen genannt, die spezielle Systeme besitzen, ihre Membranen auch bei hohem Druck flüide zu halten (Winter, 2002). Die zweilagige molekulare Grundstruktur der Membranen (Bilayer) entsteht durch ein Gleichgewicht zwischen abstoßenden und anziehenden Kräften zwischen den Phospholipiden. In der Abbildung 4.10 ist dieses Gleichgewicht der Kräfte skizziert. Innerhalb der Kopfgruppen besteht eine Anziehungskraft $F_{\text{liquid/water}}$, die Effekt des Kontaktes der Hydrokarbonketten mit dem umgebenden Wasser ist (hydrophobischer Effekt). Dieser Kraft entgegen wirkt eine abstoßende Kraft F_{head} , die aus der elektrostatischen Abstoßung der geladenen Kopfgruppen resultiert. Die Acylgruppen der Phospholipide werden durch eine abstoßende Kraft F_{chain} auseinander gedrängt, die aus den van Waals Kräften zwischen den CH_2 - Gruppen hervorgeht. Diese Unausgewogenheit der Kräfte führt zur Ausbildung der Membrankrümmung (Kurvatur) (Winter, 2002).

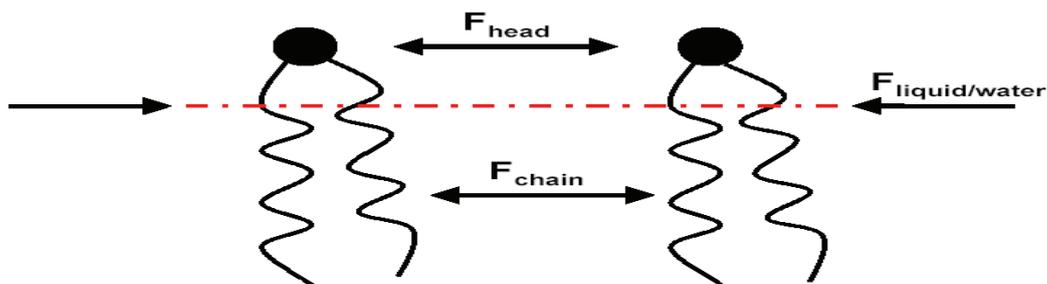


Abb. 4.10: Lateralkräfte zweier Phospholipide (nach Winter, 2002)

Bei Druckbehandlung versuchen die Lipidbilayer der Volumenänderung auszuweichen, indem sie ihre Konformation verändern. So überwiegt bei Umgebungsdruck und Raumtemperatur die lamellare, flüssigkristalline Phase L_α . Die Acylketten der Phospholipide sind nicht geordnet und liegen ausgebreitet vor. Bei Änderung der Umgebungsbedingungen sind Transformationen möglich, die von der flüssig kristallinen Phase zu einer Gelphase führen können, oder auch noch zu einer Änderung der Gelphasen L_β' oder P_β' untereinander. Die vollständig kristalline Phase L_c wird meist durch eine Erhöhung der Temperatur weit über den Schmelzpunkt der flüssig kristallinen Phase erreicht (Winter, 2002). Eine schematische Darstellung der verschiedenen beobachteten Konformationen von Membranen ist in Abbildung 4.11 zu sehen.

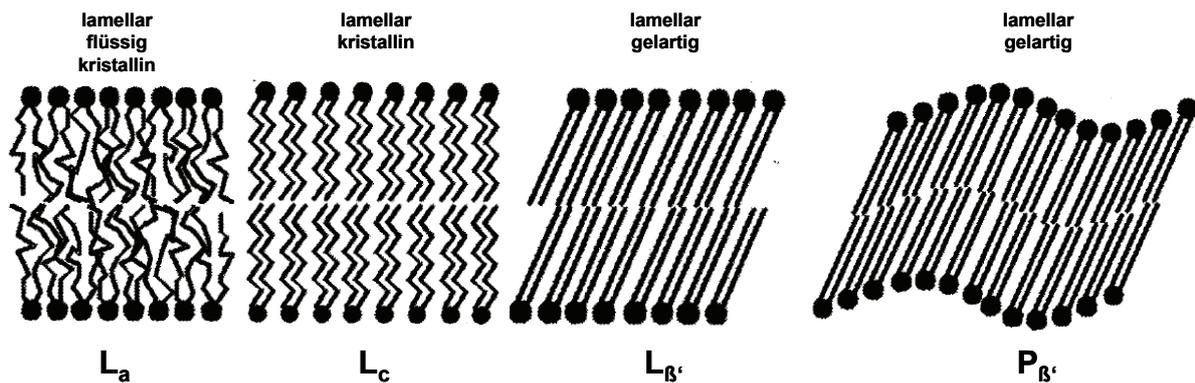


Abb. 4.11: Schematische Darstellung von Lipid-Wasser-Phasen (nach Winter and Dzwolak, 2004)

Für die in der Natur am häufigsten vorkommenden Phospholipide konnte gezeigt werden, dass Änderungen der Parameter Druck und Temperatur einen direkten Einfluss auf die Konformation der Lipid-Wasser-Phasen haben. So werden bei steigendem Druck und fallender Temperatur vor allem die lamellaren Gelphasen $L_{\beta'}$, L_β oder $P_{\beta'}$ beobachtet, während bei fallendem Druck und steigender Temperatur die flüssig kristalline Phase L_α ausgebildet wird. Die Phasengrenze zwischen lamellarer Gelphase und flüssig kristalliner Phase wird durch die Zusammensetzung der Lipide bestimmt. Für die Phospholipide DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin) und DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin) konnte für die Phasengrenze, die durch eine Gerade in einem p,T Diagramm ausgedrückt wird, eine Steigung von 22,0 K/kbar ermittelt werden. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration des Cholesterins in Lipidmischungen die Membranen unempfindlicher gegenüber Druck werden. Bei geringeren Konzentrationen des Cholesterins ist zu beobachten, dass die Lipid-Wasser-Phasen bei steigendem Druck Effekte zeigen, die normalerweise nur bei stark erniedrigter Temperatur zu beobachten sind (Winter, 2002; Winter and Dzwolak, 2004).

4.4 Zelltod und Immunogenität sterbender Zellen

Das Sterben einer Zelle wurde lange als plötzlich eintretender, unkontrolliert ablaufender Prozess angesehen, der durch schädigende Noxen hervorgerufen wird. Kerr und Mitarbeiter beschrieben 1972 jedoch einen „zellulären Selbstmord“, der sich in vielen Punkten von damals gängigen Ansichten über sterbende Zellen unterschied (Kerr et al., 1972). Seit dieser Beschreibung werden zwei Hauptformen des Zelltodes unterschieden. Der programmierte zelluläre Selbstmord, Apoptose genannt und Nekrose, ein plötzlich eintretendes Ereignis, das meist durch starke Noxen ausgelöst wird.

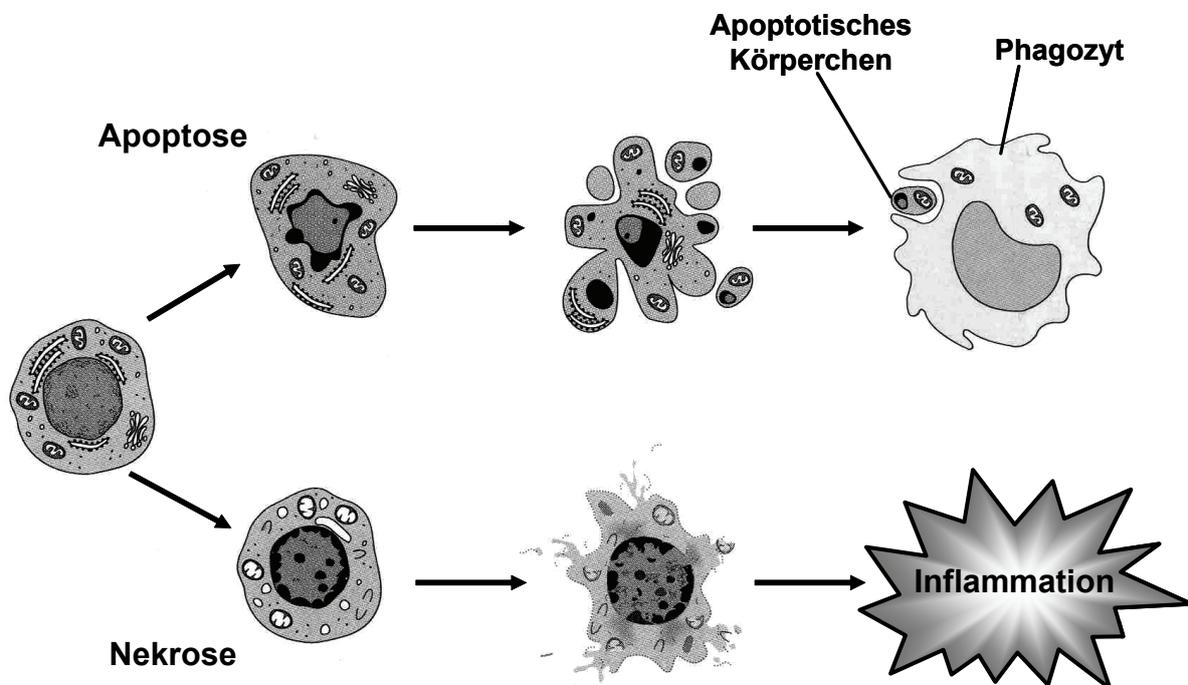


Abb. 4.12: Vergleich der morphologischen Änderungen während Apoptose und Nekrose (nach Goldsby et al., 2000)

Apoptose stellt einen physiologischen, programmierten und genetisch konservierten Vorgang dar, der in der Entwicklung und Homeostase von vielzelligen Organismen eine wesentliche Rolle spielt und aktiv unter Verbrauch von Energie abläuft (Meier et al., 2000).

Dabei beobachtet man morphologisch (Abbildung 4.12 obere Reihe) ein Schrumpfen der Zelle und eine Abschnürung von apoptotischen Körperchen, die eine intakte Membran aufweisen und mit intrazellulärem Material gefüllt sind. Der Prozess der Apoptose wird durch intrazelluläre Cysteinylproteasen, den Caspasen, gesteuert, die die Kondensierung des Chromatins, den Abbau des Zytoskeletts und der Zellorganellen steuern. Dabei erfolgt die Aktivierung der Caspasen intrinsisch, z. B. während der Embryonalentwicklung vielzelliger Organismen oder todesrezeptorvermittelt (Hengartner, 2000; Kanduc et al., 2002; Kerr et al., 1972; McConkey, 1998; McHugh and Turina, 2006; Wyllie, 1995). Typische extrinsische Stimuli, die zur Induktion des programmierten Zelltodes führen, sind z.B. UV- und ionisierende Bestrahlung, DNA-schädigende Agenzien, Ischämie und virale Infektionen (Belka et al., 2004; Dumitriu et al., 2003; Hagenhofer et al., 1998; Harmon et al., 1990; Rich et al., 2000; Roedel et al., 2002). Dabei spielt eine untergeordnete Rolle, durch welchen Einfluss Apoptose gestartet wird, da der Weg, den die Zelle einschlägt, genetisch determiniert ist (Wyllie, 1995).

Ein entscheidendes Ereignis bei der Apoptose ist, dass die Zytoplasmamembran während des gesamten „Sterbeprozesses“ intakt bleibt und charakteristische Veränderungen der Zytoplasmamembran stattfinden. Veränderungen auf der Oberfläche apoptotisch sterbender Zellen sowie die Bindung von Adaptermolekülen an die sterbende Zelle führen zu einer Opsonisierung der sterbenden Zellen und in Folge zu einer effektiven Phagozytose (Franz et al., 2006; Franz et al., 2007; Munoz et al., 2007). Somit haben apoptotische Zellen normalerweise eine geringe Fähigkeit, eine Immunantwort auszulösen, d.h., die Immunogenität apoptotischer Zellen ist gering (Bondanza et al., 2004; Kern et al., 1999; Voll et al., 1997).

Die zweite Hauptform des Zelltodes stellt die primäre Nekrose dar. Sie ist stets Ausdruck eines pathologischen Geschehens und wird durch Einwirkung starker Noxen verursacht (Abbildung 4.12 untere Reihe). Dabei kommt es zu einem Verklumpen des Chromatins, zum irreversiblen Anschwellen der Zelle und der Zellorganellen. Anschließend „platzt“ die Zelle, und die Zytoplasmamembran verliert ihre Integrität (Kanduc et al., 2002; McConkey, 1998; McHugh and Turina, 2006). Die permeable Zytoplasmamembran von nekrotischen Zellen führt zur Freisetzung intrazellulärer Gefahrensignale (Kanduc et al., 2002; Vakkila and Lotze, 2004).

Bei nekrotischen Zellen ist somit, im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, eine Entzündungsreaktion zu beobachten, deren genauer Mechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

4.5 Tumorgenese und Metastasierung

Krebs, eine bösartige Tumorerkrankung, wurde bereits im 2. Jahrhundert nach Christus von dem griechisch-römischen Arzt Galen beschrieben: „...An der Brust sahen wir häufig Tumoren, die der Gestalt eines Krebses sehr ähnlich waren. So wie die Beine des Tieres ..., so verlassen die Venen den Tumor, der seiner Form nach dem Krebskörper gleicht...“ (Wedding and Höffken, 2003). In Deutschland waren im Jahre 2002 ca. 26 % aller Todesfälle auf eine Krebserkrankung zurückzuführen (Statistisches-Bundesamt, 2004). Damit ist in Deutschland Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache (zur Hausen, 2003). Krebs stellt kein einheitliches Krankheitsbild dar, vielmehr stehen hinter dem Begriff unterschiedlichste maligne Erkrankungen (Blettner, 2003). Maligne Zellen können entstehen, wenn beispielsweise durch eine Mutation oder mehrere Mutationen die physiologische Balance zwischen Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose derart verändert wird, dass das Gleichgewicht zu Gunsten der Proliferation verschoben ist. Derartige genetischen Veränderungen können dabei entweder induziert oder spontan oder in Kombination auftreten, unterscheiden sich jedoch in Anzahl und Art der betroffenen Gene und der Anzahl der Mutationen. Jedoch gilt als gesichert, dass mehr als eine Mutation notwendig ist, um zur Entstehung solider Tumoren zu führen (Gibbs, 2003; Hanahan and Weinberg, 2000; Knippers, 1997; Murken and Cleve, 1993; Vogelstein and Kinzler, 2002; zur Hausen, 2003).

Die Tumorgenese einer Zelle besteht aus vielen unterschiedlichen Schritten. Während der Initiations- und Promotionsphase treten im Genom der Zelle Veränderungen auf, die zu einer Hyperproliferation, jedoch nicht zwangsläufig zu einer Transformation führen. In der Abbildung 4.13 ist dargestellt, wie **(A)** infolge einer Mutation einer einzelnen Zelle deren Wachstumsbalance verändert wird, und **(B)** die mutierte Zelle ungehindert wächst und einen Tumorklon (benigner Tumor) ausbildet.

Im Laufe der weiteren Proliferation (Promotionsphase) **(C)** werden die Tumorzellen durch die Anhäufung weiterer Mutationen zunehmend gewebsinvasiv, beginnen Basalmembranen zu überwinden und können **(D)** mit Hilfe des Blutkreislaufes und der Lymphbahnen in entfernten Körperregionen Tochtergeschwülste (Metastasen) bilden (Abbas, 2001; Gibbs, 2003; Goldsby et al., 2000).

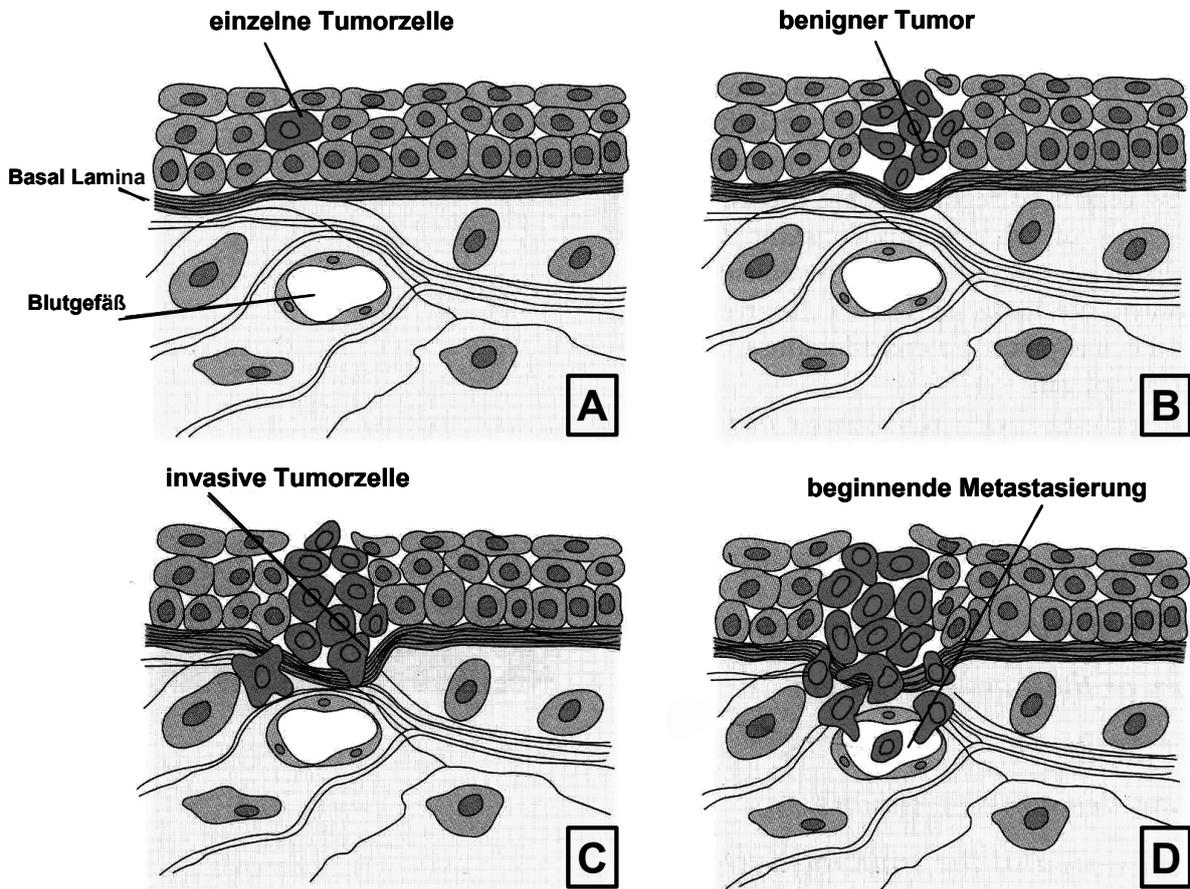


Abb. 4.13: Tumorgenesse und Metastasierung (nach Goldsby et al., 2000)

4.6 Therapie maligner Erkrankungen

Um die Krankheit Krebs einzudämmen zu können, müssen die Aspekte Prävention, Früherkennung und Heilung gleichermaßen berücksichtigt werden (Schadendorf, 2002). Prinzipiell können die einzelnen Therapieformen sowohl in heilender (kurativer) als auch in schmerz- und symptomlindernder (palliativer) Weise eingesetzt werden (Hess et al., 2001). Den klassischen drei Säulen der Krebstherapie (Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie) wurde in den vergangenen Jahren mit wachsendem Erfolg eine vierte Säule, die gezielten Therapien, hinzugefügt. Die so genannten „targeted therapies“ (gezielte Therapien), die im Vergleich zu den klassischen Krebstherapien versuchen, spezifisch die Tumorzellen anzugreifen, rücken dabei als adjuvante Behandlungsformen immer mehr in das klinische Interesse. Dabei spielt die Tumor-Vakzinierung eine bedeutende Rolle. Die Vakzinierung eines Tumorpatienten kann auf verschiedene Arten erfolgen, die eines gemeinsam haben, nämlich eine aktive Immunisierung. Da eine Tumorzelle grundsätzlich einer körpereigenen, entarteten Zelle entspringt, ist es dem Immunsystem erschwert, die entarteten Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Neben der schwachen Immunogenität und einem immunsuppressiven Potential des Tumors gehören die Ausschüttung von löslichen Antigenen und die Variation der Tumorantigene zu den „Täuschungsmanövern“ von Tumorzellen und führen damit zum Entgehen der Immunantwort (Block et al., 2002; Dunn et al., 2004; Playfair and Chain, 2001). Vakzine hingegen sollen das Immunsystem des Patienten aktivieren und eine Immunantwort gegen den schwach immunogenen Tumor einleiten. Durch die Vakzinierung soll den immunkompetenten Zellen die oft schwach immunogenen Tumorantigene in einer Art präsentiert werden, die dazu führen soll, dass der Primärtumor und eventuelle Metastasen erkannt und kontinuierlich zerstört werden (Peters and Kath, 2000; Pfitzner et al., 2000). Zu den heute möglichen Vakzinierungsstrategien zählen verschiedene Ansätze (Schadendorf, 2002):

- Vakzinierung mit bekannten häufig tumorassoziierten Proteinen und Peptiden
- Vakzinierung mit gereiften, tumorantigenbeladenen dendritischen Zellen
- Vakzinierung mit autologer Tumor-DNA
- Vakzinierung mit autologen Tumorzellen.

Besonders die Vakzinierung mit autologen, inaktivierten Tumorzellen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht (Berd et al., 1998; Schadendorf, 2002).

Alternativ wird versucht, mindestens ein Tumorantigen zu identifizieren, um dieses dann dem Immunsystem durch antigenpräsentierende Zellen (APC) anzubieten (Abbas, 2001; Block et al., 2002; Finn, 2004; Goldsby et al., 2000; Janeway et al., 2001). In Abbildung 4.15 ist schematisch eine Immunantwort gegen einen Tumor dargestellt. Diese Antwort von CD8⁺ T-Zellen gegen einen Tumor wird durch „cross presentation“ induziert, indem eine professionelle antigenpräsentierende Zelle (APC) ein Tumorantigen aufgenommen, prozessiert und präsentiert hat. Co-Stimulatoren und CD4⁺ T-Zellen helfen die T-Zell Antwort gegen den Tumor einzuleiten. Folglich können die zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) differenzierten naiven CD8⁺ T-Zellen Tumorzellen erkennen und zerstören (Abbas, 2001; Janeway et al., 2001).

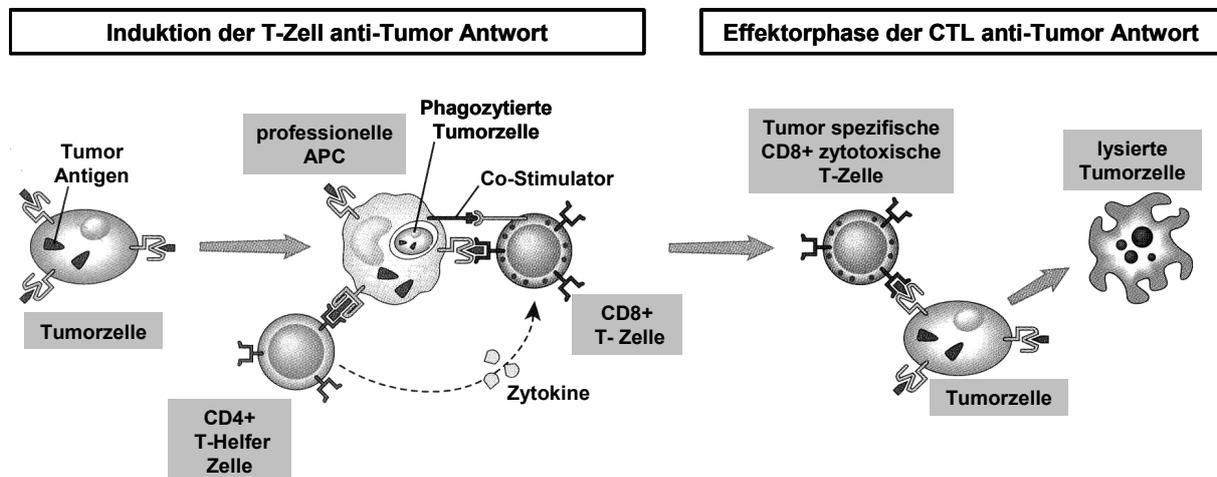


Abb. 4.15: Darstellung einer T-Zell Antwort gegen einen Tumor (nach Abbas, 2001)

Hierbei gibt es verschiedene Ansätze, um ein Tumorantigen immunstimulatorisch zu präsentieren. Allerdings haben diese Vakzinierungsstrategien in der Vergangenheit noch nicht den erhofften Erfolg erbracht. So berichten Rosenberg et al. 2004 bei verschiedenen Studien von einem Therapiemisserfolg in 428 von 440 Fällen (Rosenberg et al., 2004). Die Probleme, die genannt werden, liegen vielschichtig. So können sich die immunrelevanten Zellen bei der Aktivierung einer gerichteten Immunantwort gegen den Tumor selbst inhibieren. Weiterhin sind die meisten Therapien nur gegen ein einziges Tumorantigen gerichtet, was zur Folge hat, dass Tumorzellen weiterhin versuchen, der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen, und damit die Therapie nutzlos wird (Rosenberg et al., 2004).

Eine autologe Ganz-Zell-Tumorvakzine bietet einen facettenreichen Ansatz (Block et al., 2002). Die Ganz-Zell-Tumorvakzine zeigen dabei den Vorteil, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort und ein immunologisches Gedächtnis gegen den Tumor zu induzieren. Dabei werden die Tumorzellen aus dem Patienten entnommen und aufbereitet. Anschließend werden die aufbereiteten Tumorzellen inaktiviert (z.B. durch Röntgenstrahlung oder hohen hydrostatischen Druck). Die Zellen werden vom Medium separiert und in einer isotonen Lösung suspendiert, um sie dem Patienten zu injizieren. Für Wiederholungsvakzinierungen, die zu verstärkter Immunantwort führen, werden Aliquote behandelter Zellen kryokonserviert. Die Methode der aktiven Immunisierung wird bereits bei verschiedenen Infektionserkrankungen erfolgreich angewandt (Janeway et al., 2001; Playfair and Chain, 2001).

Eine solche aktive Immunisierung bietet die Möglichkeit, dass durch rekrutierte dendritische Zellen sowie Makrophagen nicht nur ein einzelnes Tumorantigen, sondern eine Vielzahl von Antigenen, die mit der Tumorzelle korrelieren, aufgenommen und anschließend präsentiert werden. Da die ganze Tumorzelle dem Immunsystem präsentiert wird, können nicht nur die Oberflächenantigene erkannt werden, es können auch viele Gefahrensignale, die von toten Zellen unweigerlich bei Verlust der Membranintegrität freigesetzt werden, den Vorgang der Immunantwort gegen den Tumor verstärken.

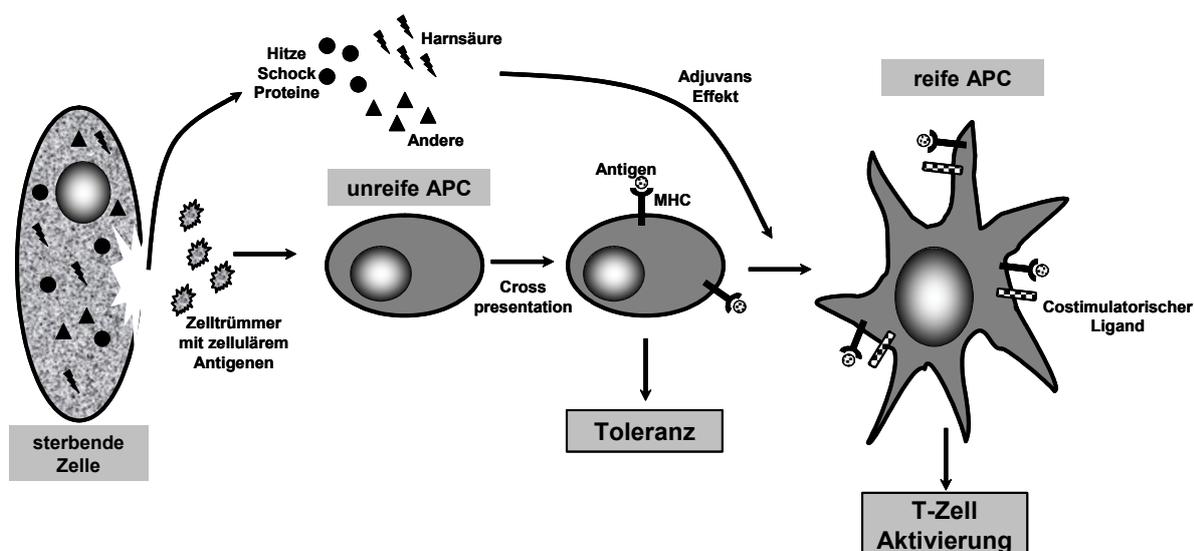


Abb. 4.16: Zelltod und adjuvante Wirkung von Gefahrensignalen (nach Rock et al., 2005)

In Abbildung 4.16 ist der adjuvante Effekt der Gefahrensignale schematisch dargestellt. Dieses Konzept bietet die Möglichkeit, die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor zu brechen. Dabei bilden endogene intrazelluläre Gefahrensignale (Hitze Schock Proteine, Harnsäure u.a.), die Rolle des Adjuvans, das die Reifung einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) fördert und somit die Toleranz unterdrückt (Andrews, 2005; Gallucci et al., 1999; Gallucci and Matzinger, 2001; Rock et al., 2005).

Wenn durch eine Ganz-Zell-Tumorvakzine Antigene von unreifen APCs aufgenommen und prozessiert werden und zusätzlich durch die toten mitinjizierten Zellen immunstimulierende Gefahrensignale ausgelöst werden, könnte die Selbsttoleranz gegenüber dem Tumor gebrochen werden und sich eine starke Immunantwort gegen die vermeintlichen körpereigenen, aber entarteten Zellen richten (Mellmann, 2006; Rock et al., 2005; Sauter et al., 2000; Smyth et al., 2001; Steinman and Mellman, 2004). Gerade bei dieser Form der Tumorthherapie kann die Hochdrucktechnologie einen wichtigen Beitrag zur Inaktivierung der Tumorzellen leisten.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagentien

Geräte:

CO ₂ Inkubator	Heareus Instruments GmbH	Hanau	Deutschland
Durchflusszytometer Epics XL MCL	Beckman Coulter Inc.	Fullerton	USA
Zentrifuge für Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Hochdruckanlage	RECORD Maschinenbau GmbH	Königsee	Deutschland
Hochdruckanlage zur HPDS Sichtzelle	SITEC-Sieber Engineering AG	Maur/Zürich	Schweiz
HPDS Sichtzelle	RECORD Maschinenbau GmbH	Königsee	Deutschland
Laminar-Flow Werkbank	Heareus Instruments GmbH	Hanau	Deutschland
Mikroskop zur Sichtzelle	Leica Microsystems AG	Wetzlar	Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Plattenphotometer	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim	Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
UV-Tisch	Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen	Deutschland
Zellzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen	Deutschland

Reagentien:

[6-H3] Thymidin	Amersham Biosciences UK Limited	Buckinghamshire	England
1 kb Ladder	New England Biolabs	Ipswich	USA
Annexin V-FITC	responsif AG	Erlangen	Deutschland
Coulter Clenz	Beckman Coulter Inc.	Fullerton	USA
Cytox96	Promega	Mannheim	Deutschland
DioC6 (3,3'-dihexyloxacarbocyanine jodide)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze	Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze	Deutschland
Dneasy Kit	QIAGEN	Hilden	Deutschland
Fetal Bovine Serum	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Glycantin Protect Plus/G48	BASF AG	Ludwigshafen	Deutschland
HEPES	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
ImmunoPrep	Beckman Coulter Inc.	Fullerton	USA
ISOTON II	Beckman Coulter Inc.	Fullerton	USA
Lektin Narcissus Pseudonarcissus	PeQ Lab	Erlangen	Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Millipore H ₂ O	Delta Select GmbH	Pfullingen	Deutschland
Natrium Acetat	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Parafomaldehyd	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Penicillin/Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Phosphat buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze	Deutschland
Ringer Spüllösung	Delta Select GmbH	Pfullingen	Deutschland
TQ-Prep	Beckman Coulter Inc.	Fullerton	USA
tri-Natriumcitrat (2xH ₂ O)	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze	Deutschland
Zellkulturmedium RPMI 1640	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Zenon [®] Mouse IgG Labeling Kits	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland

Verbrauchsmaterial:

BD Microtainer®	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	Deutschland
Einfrieröhrchen (Cryo Vials)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Einwegmaterial Zellkultur	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Immuno Röhchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Multiwellplatten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Polypropylen Röhchen mit Schraubverschluss 15 und 50 ml (Falcons)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland

Tiere und Zelllinien:

C57/BL6 Mäuse	Charles River Laboratories	Heidelberg	Deutschland
Jurkat, Raji, U937	DSMZ	Braunschweig	Deutschland
B-ALL	RIKEN BioResource Center	Ibaraki	Japan

Alle nicht verzeichneten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), alle nicht aufgeführten Chemikalien von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

5.2 Hochdruckbehandlung

5.2.1 Hochdruckanlage

Für die Hochdruckbehandlung der kultivierten Zellen wurde eine Anlage der Record Maschinenbau GmbH, Königsee, verwendet. Diese Anlage ermöglicht die Erzeugung eines Druckes bis 600 MPa und ist auf Grund ihres Gewichts (ca. 250 kg) und der Abmessungen (ca. 2000 x 600 x 600 mm) portabel.



Abb. 5.1: Frontalansicht der Hochdruckanlage der Record Maschinenbau GmbH

Diese Anlage erzeugt hydrostatischen Druck mit dem Prinzip der direkten Druckübertragung. Als druckübertragendes Medium wurde eine Mischung aus destilliertem Wasser und Glysantin® (4+1) verwendet.

Der Zusatz des Glysantin[®] dient nicht nur zur Verhinderung lokaler Eisbildung sondern auch als Rostschutz und Schmiermittel. Das Schaltbild der Record Hochdruckanlage ist in Abbildung 5.2 dargestellt. In dieser Abbildung werden auch die vier Haupteinheiten der Anlage gezeigt. Dazu gehören das Druckerzeugeraggregat und Regelventile (1), der Druckübersetzer (2), der Druckreaktor, im folgenden Text Autoklav genannt (3) und die Steuerung (4).

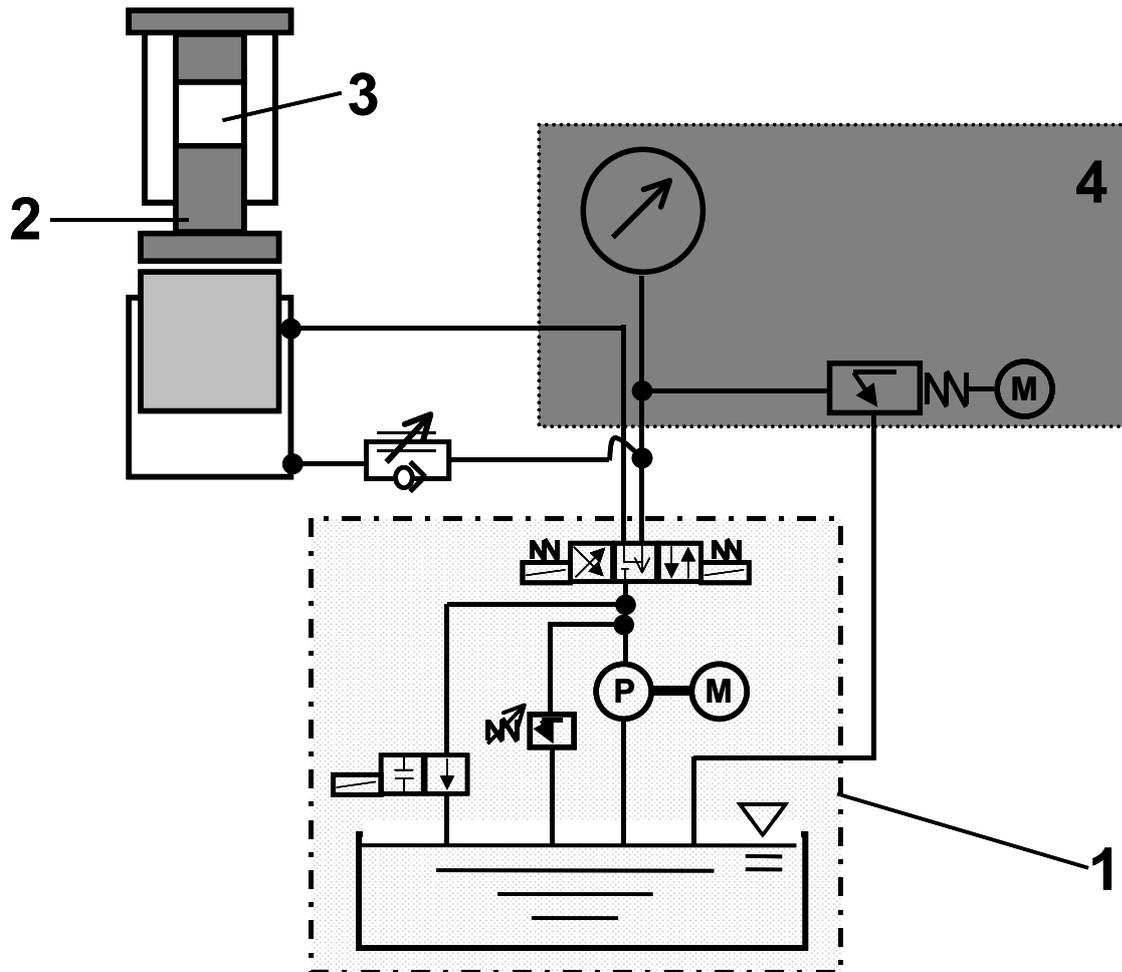


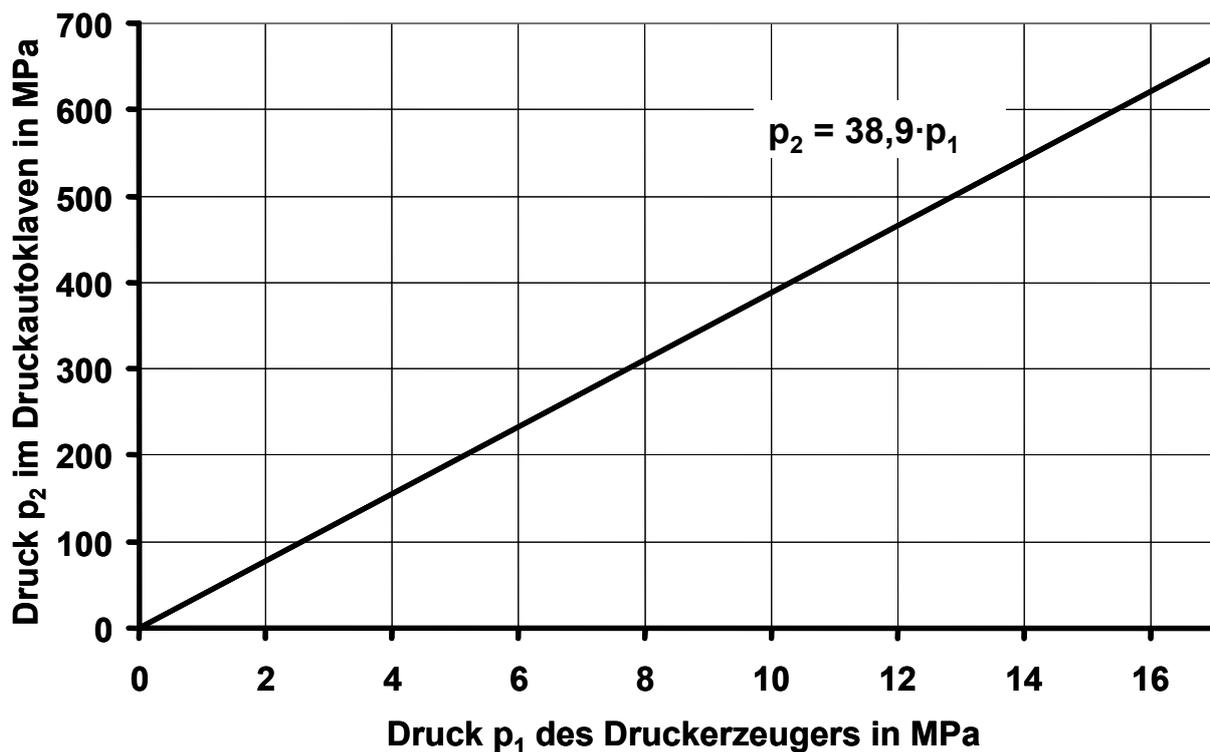
Abb. 5.2: Schaltbild der RECORD Hochdruckanlage

Als Druckerzeugungsaggregat wird ein Hydraulikaggregat der Firma Stiefel verwendet, das die Betriebsdaten wie in Tabelle 5.1 beschrieben aufweist.

Tab. 5.1: Technische Daten Druckerzeuger

Betriebsdaten Druckerzeuger	
Betriebsspannung	380 V
\dot{Q}	0,75 l min ⁻¹
Leistung	0,37 kW
Betriebsmedium	Hydrauliköl

Der Druckübersetzer dieser Anlage ist auf zwei Bauteile verteilt. So bildet der Hydraulikstempel, der vom Druckerzeuger angetrieben wird, die größere Fläche. Die kleinere Fläche wird durch den Querschnitt des in den Autoklaven von unten einfahrenden Stempels dargestellt. Der Quotient der Querschnittsflächen errechnet sich bei dieser Anlage auf 38,9, womit sich die entsprechende Übersetzerkennlinie ergibt, die in der Abbildung 5.3 dargestellt ist.

**Abb. 5.3:** Kennlinie des Druckübersetzers

Das Nutzvolumen des Autoklaven der Anlage, der in Abbildung 5.4 dargestellt ist beträgt ca. 120 ml. Der komplette Autoklav besteht aus fünf Bauteilen dem Mantel (1), der aus einem Stück Stahl zu einem Hohlzylinder mit einer Wanddicke von 15 mm verarbeitet wurde, dem Deckel mit einer Belüftungsschraube (2), einer Deckelsicherung (3) und einem Stempel auf der Unterseite (4), auf dem die Aufnahme des Druckübersetzers (5) befestigt ist.

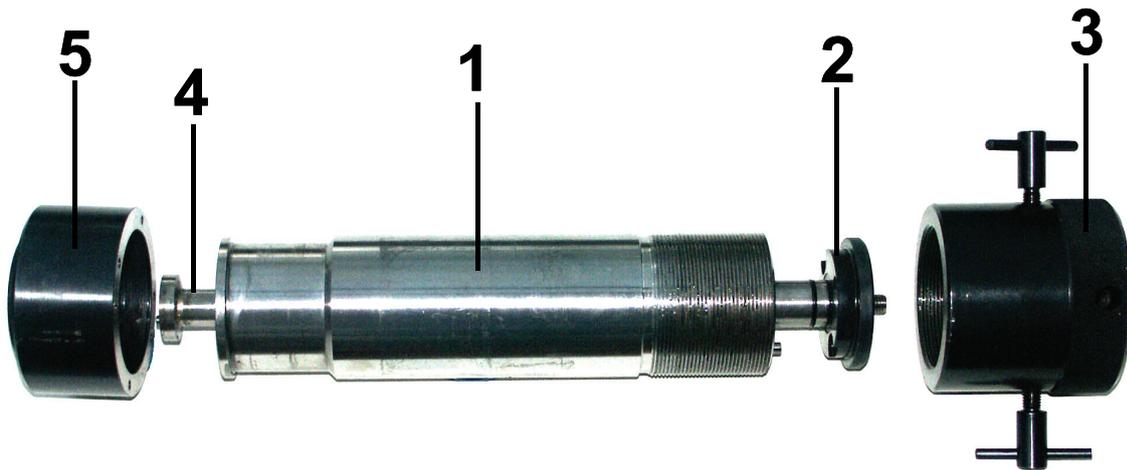


Abb. 5.4: Der ausgebaute Autoklav der Hochdruckanlage

Der Druckautoklav muss vor der Druckbehandlung komplett mit dem Druckmedium gefüllt werden. Anschließend kann die Probe eingebracht werden, und der Autoklav wird mit dem Deckel verschlossen. Bei diesem Vorgang ist die Entlüftungsschraube geöffnet, um den Druckraum vollständig zu entlüften. Danach wird der Sicherheitsdeckel aufgeschraubt und anschließend die Entlüftungsschraube geschlossen. Somit ist gewährleistet, dass der Innenraum des Autoklaven komplett mit Flüssigkeit gefüllt ist.

Die zu behandelnden Proben werden in Kryoröhrchen (1,8 ml) oder 15 ml Kunststoff-Röhrchen so verfüllt, dass kein Kopfraumvolumen in den Röhrchen verbleibt. Ein vorhandener Kopfraum könnte, auf Grund der Kompressibilität von Luft, dazu führen, dass die Röhrchen bei der Druckbeaufschlagung beschädigt wird. Vor dem Verbringen der befüllten Proben in den Autoklaven wurde der schraubbare Deckel zusätzlich noch mit PARAFILM® gesichert.

5.2.2 Hochdruckmikroskop

Um Zellen während der Druckbeaufschlagung zu beobachten, wird sich einer Hochdruck Sichtzelle bedient. Diese ermöglicht es, Proben mittels eines Invers- und Fluoreszenzmikroskops *in situ* zu beobachten. Der Hauptbestandteil des Hochdruckmikroskops ist die HPDS (Hartmann-Pfeifer-Dornheim-Sommer) Sichtzelle (Hartmann et al., 2004; Hartmann et al., 2003), deren Querschnitt in Abbildung 5.5 dargestellt ist. Hier zeigt die Ziffer (1) das Unterteil der Sichtzelle, (2) das Oberteil der Zelle, (3) die sechs Schrauben, die zur festen Verbindung zwischen Ober und Unterteil dienen. Der O-Ring (4) dient zur Abdichtung bei Drücken bis 50 MPa. Die beiden Saphirscheiben (5) ermöglichen den Blick auf die zu untersuchende Probe, die in dem verbleibenden Hohlraum (6) über der unteren Saphirscheibe eingebracht wird. Ein Polypropylenplättchen (7) trennt die Probe vom druckübertragenden Wasser und der Druck wird über die beiden Druckanschlüsse (8) von der Spindelpresse zur HPDS Zelle übertragen.

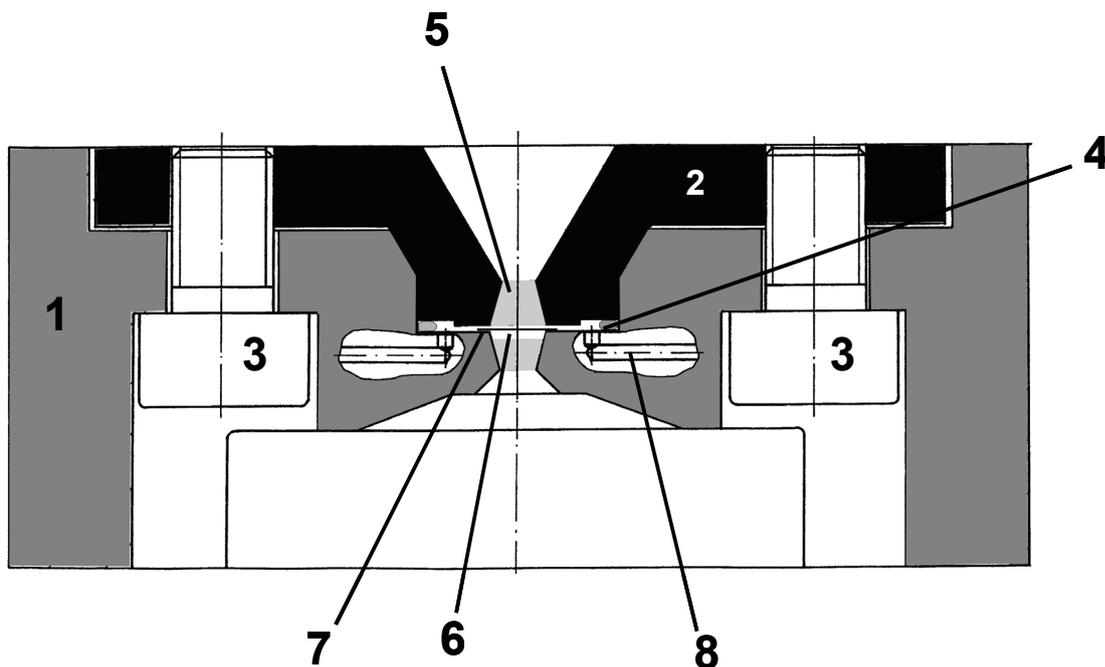


Abb. 5.5: Querschnitt durch die HPDS Sichtzelle (Frey et al., 2006)

Die Zelle wird im geöffneten Zustand mit der zu untersuchenden Probe beladen, indem ein Volumen von ca. 5 μl mit der Pipette auf die untere Saphirscheibe aufgebracht wird. Anschließend wird dieser Flüssigkeitstropfen mit einem 0,1 mm dicken Polypropylen-Plättchen bedeckt. Damit wird verhindert, dass die Probe beim Fluten und Entlüften der HPDS Zelle weggespült wird.

Der Druck wird durch eine Hochdruckanlage mittels einer Handspindelpresse erzeugt und mit zwei flexiblen Hochdruckschläuchen zur Zelle geleitet, wo ein Zugang zum Innenraum durch die Druckanschlüsse gewährleistet ist. Ein Schaltbild der Anlage, die zur Erzeugung des Druckes verwendet wird, ist in der Abbildung 5.6 zu sehen. Bei dieser Anlage wird als Druckmedium destilliertes Wasser verwendet. In der Abbildung 5.6 bezeichnet die Ziffer (1) die HPDS Zelle, die mittels flexibler Schläuche (4) an den Druckerzeuger angeschlossen ist. Als Druckerzeuger wird eine Handspindelpresse (2) verwendet. Das Druckmedium wird im Vorlagegefäß (6) bevorratet. Die Vordruckpumpe (3) dient in zum Spülen des gesamten Systems und zur Verdrängung sämtlicher Luft aus den Leitungen und der HPDS Zelle. Die Messung von Druck und Temperatur erfolgt durch einen Druck- und Temperatursensor (5), der über einen A/D Wandler an einen Computer (nicht dargestellt) angeschlossen ist

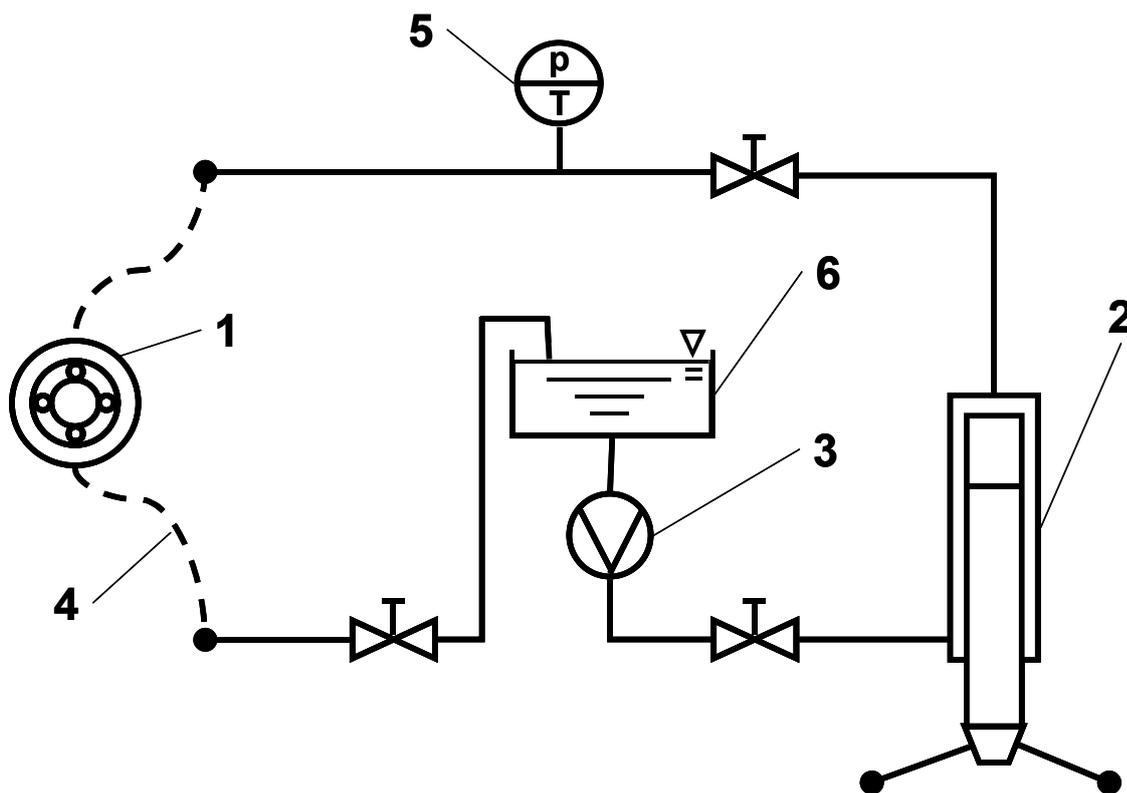


Abb. 5.6: Schaltbild der Hochdruckanlage an der HPDS Zelle (nach Hartmann et al., 2003)

5.3 Zelllinien und Zellkultur

5.3.1 Zelllinien

Zur Untersuchung der Auswirkung von hohem hydrostatischem Druck auf humane Tumorzellen wurden verschiedene Zelllinien verwendet, die in Tabelle 5.2 zusammengefasst sind.

Tab. 5.2 Übersicht über die für die Versuche verwendeten Zelllinien

Kurzbezeichnung	Zelltypus	Pathologie/Literatur	Herkunft
B-ALL	Humaner B – Lymphozyt	Akute lymphatische Leukämie (Miyoshi et al., 1977)	RIKEN BioResource Center Nr.: RCB0256
Jurkat	Humaner T – Lymphozyt	Akute T – Zell Leukämie (Schneider et al., 1977)	DSMZ Nr.: ACC 282
Raji	Humaner B – Lymphozyt	Burkitt Lymphom (Pulvertaft, 1964)	DSMZ Nr.: ACC 319
U 937	Histiozytäre Monozyten	Histiozytäres Lymphom (Sundstrom and Nilsson, 1976)	DSMZ Nr.: ACC 5

5.3.2 Zellkultur

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin) verwendet. Dem Medium wurden noch 1,0 Vol.-% L – Glutamin (200 mM), 1,0 Vol.-% Penicillin/Streptomycin und 1,0 Vol.-% HEPES-Lösung (1,5 M; pH 7,2) zugesetzt. Als Wachstumsfaktor wurde 10 Vol.-% FBS (Fetal Bovine Serum) zugesetzt, das zuvor 30 min bei 56 °C inaktiviert wurde. Im weiteren Text werden dieses Medium mit „R10“ und das Medium mit 20 % FBS mit „R20“ abgekürzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂ – Konzentration von 5,0 Vol.-% und einer relativen Luftfeuchte von 80 %. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CELLSTAR® Zellkulturflaschen aus klarem Polystyrol ohne Beschichtung der Oberfläche mit gasdurchlässigen Verschlusskappen („vented cap“).

5.3.2.1 Kultivierung und Passagieren

Die Zellen in Suspensionskultur wurden jeweils nach 48 h passagiert und im Verhältnis 1:4 mit frischem Medium versetzt. Der Verbrauchszustand des Mediums kann anhand eines dem Zellkulturmedium zugefügten Indikators (Phenolrot) abgelesen werden. Zusätzlich wurde in regelmäßigen Abständen eine Vitalitätskontrolle mit dem Durchflusszytometer durchgeführt.

5.3.2.2 Konservierung der Zellen

Da die verwendeten Zelllinien nicht permanent in Kultur waren, wurde in regelmäßigen Abständen ein Aliquot aus laufender Kultur kryokonserviert. Beim Einfrieren der Zellen erfährt die Zellmembran die größte Belastung. Um die Krümmung der Membran zu erhalten und um zu vermeiden, dass beim Einfrieren und Auftauen die Glycerinreste der Phospholipide aneinander kleben bleiben, bedient man sich der lipophilen Substanz DMSO (Dimethylsulfoxid), die zum Einfrieren als DMSO Mix (16 % DMSO in FCS) verwendet wurde.

Einfrieren von Zellen:

Es wurden ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen mit $360 \times g$ für 5 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und in $900 \text{ }\mu\text{l}$ R20 resuspendiert. Die Zellen wurden in Einfrierröhrchen überführt und $900 \text{ }\mu\text{l}$ DMSO Mix zugetropft. Anschließend wurden die Röhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen der Zellen:

Die Zellen wurden sofort nach Auftauen im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf 10 ml R10 gegeben und für 5 min. bei $360 \times g$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und die Zellen wurden in R10 aufgenommen.

5.3.2.3 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot Zellen mit Trypanblau-Lösung (färbt tote Zellen blau) verdünnt und die lebenden Zellen (ungefärbt) wurden in einem Großquadrat der Zählkammer ausgezählt. Die Zelldichte wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/ml.}$$

5.3.2.4 Induktion von Zelltod

Um die Ergebnisse der Hochdruckbehandlung mit herkömmlichen Zelltodauslösern zu vergleichen, wurde bei den Untersuchungen parallel ein Aliquot der Zellen einer 30-minütigen Temperaturbehandlung im Thermomixer bei 56 °C unterzogen, was eine sofortige Nekrose der Zellen zur Folge hat (Harmon et al., 1990). Als Modell für einen apoptotischen Sterbeprozess wurden die Zellen mit ultravioletter Strahlung vom Typ B an einem UV-Tisch mit einem Energieeintrag von 240 mJ/cm² bestrahlt. Die Behandlung der Zellen mit ultravioletter Strahlung vom Typ B erzeugt einen DNA-Schaden und führt zum apoptotischen Sterben der Zellen (Sheikh et al., 1998).

5.4 Messung von Proliferation und Metabolismus

5.4.1 Bestimmung der Änderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium

Eine qualitative Möglichkeit, den Metabolismus und die Proliferationsfähigkeit der hochdruckbehandelten Zellen nachzuweisen, ist die Beobachtung der Farbe des Zellkulturmediums. Das für die Zellkultur verwendete RPMI 1640 Medium enthält den Indikator Phenolrot (0,0133 mM). Im Bereich zwischen pH 6,8 und pH 8,2 ändert sich die Farbe von rot zu hellgelb. Nach der Behandlung wurden 2,5 x 10⁵ Zellen in einer Vertiefung einer 24er Vertiefungsplatte ausgesät, und der Umschlag des Indikators wurde protokolliert. Die Veränderung der Indikatorfarbe im Medium wurde in vier verschiedene Abstufungen eingeteilt.

Diese Abstufungen reichten von dunkelrot (normales Medium) über hellrot (leicht verbraucht) nach dunkelgelb (stark verbraucht) bis hin zu leuchtend gelb (Medium aufgebraucht). Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch beurteilt.

5.4.2 Grenz-Konzentrations Verfahrens (limiting dilution assay)

Zur Bestimmung des Überlebens einzelner Zellen nach einer Hochdruckbehandlung wurde das Grenz-Konzentrations Verfahren angewendet. Dieses Verfahren wird normalerweise eingesetzt, um genetisch veränderte Säugerzellen zu differenzieren. Bei dem hier angewandten Verfahren wurde die Zelldichte der behandelten Zellen in R10 so eingestellt, dass in 150 µl Suspension 0,3 Zellen vorhanden sind. 150 µl dieser Suspension wurden anschließend in eine Vertiefung einer 96er Vertiefungsplatte (Rundboden) pipettiert und kultiviert. Die Platten wurden ein- bis zweimal pro Woche auf das Wachsen von Zellen kontrolliert. Wenn die Zellen in einer Vertiefung zu wachsen begonnen hatten, wurde die Zellsuspension in dieser Vertiefung entfernt.

5.5 Bestimmung des Zelltodes

In dieser Arbeit soll auch geklärt werden, welche Formen des Zelltodes durch die Hochdruckbehandlung induziert werden können. Die Form des Zelltodes (Apoptose oder Nekrose) lässt einen Schluss auf die immunogene Wirkung der Zellen *in vivo* zu. Zur Charakterisierung des Zelltodes *in vitro* werden unterschiedliche Analyseverfahren angewandt, die auf einer Messung in einem Durchflusszytometer beruhen.

5.5.1 Durchflusszytometer

Für die Messungen kam ein Durchflusszytometer der Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA zum Einsatz. Das Gerät mit der Typenbezeichnung Coulter® Epics XL-MCL ermöglicht es, nebst Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht vier unterschiedliche Fluoreszenzen zu messen. Zur Fluoreszenzanregung verwendet das Gerät einen luftgekühlten Argonionenlaser. Zusätzlich war dieses Durchflusszytometer mit einem so genannten Multi Carousel Loader (MCL) ausgestattet.

Dieser ermöglicht es, 32 Proben automatisch und nacheinander zu vermessen. Für alle Versuche wurde als Hüllfluid das ISOTON II® verwendet. Die Auswertung der Daten, die als Listmode-File (***.lmd) vorlagen, erfolgte mit der XL SYSTEM II™ Software, Version 3.0.

5.5.2 Beurteilung der Morphologie

Im Verlauf des Zelltodes unterliegen Zellen morphologischen Veränderungen, deren Kriterien mit dem Durchflusszytometer bestimmt werden können. Dabei werden Veränderungen des Vorwärtsstreulichtes (Forwardscatter, FSc) und des Seitwärtsstreulichtes (Sidescatter, SSc) erfasst. Die Größe der betrachteten Zellen wird durch FSc charakterisiert und SSc gibt Auskunft über die Granularität einer Zelle. Anhand der Parameter FSc und SSc kann die Vitalität einer Zellsuspension bestimmt werden (Elstein and Zucker, 1994; Hagenhofer et al., 1998; Herrmann et al., 1998). Dazu wurden zu 100 µl der behandelten Zellsuspension 400 µl einer 1,0 %igen Paraformaldehydlösung (in PBS) gegeben. Die Lagerung der zu messenden Proben erfolgte bei 4 °C maximal 12 h. Die Abbildung 5.7 zeigt schematisch die Lage verschiedener Zellpopulationen in einem Punktwolkendiagramm, bei dem SSc über dem FSc aufgetragen wurde. Vitale Zellen besitzen eine niedrige Granularität und sind im Vergleich zu toten Zellen größer. Nekrotische Zellen zeigen einen sehr hohen SSc und einen sehr geringen FSc. Im Übergangsbereich befinden sich sterbende Zellen, dabei kann anhand der Morphologie, jedoch nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltod unterschieden werden.

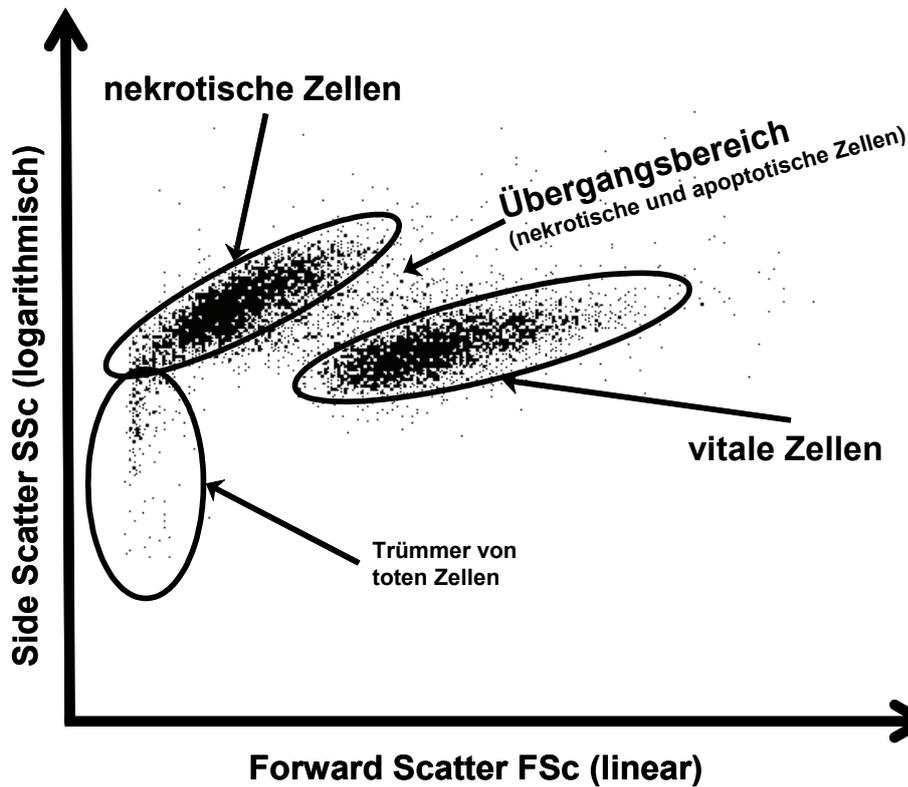


Abb. 5.7: Schematisches Punktwolkendiagramms mit linearer Auftragung des Vorwärts- und logarithmischer Auftragung des Seitwärtsstreulichts

5.5.3 Nachweis des Zelltodes mittels der AnnexinV-FITC Propidium Jodid Färbung

Im Zuge des programmierten Zelltodes wird Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Membran exponiert. Das Protein Annexin V (AxV) kann mit sehr hoher Affinität an PS binden. Somit kann im Durchflusszytometer zwischen AxV positiven (AnnexinV-FITC bindet) und negativen (AnnexinV-FITC bindet nicht) Zellen unterschieden werden. Für die Abgrenzung nekrotischer Zellen wurde Propidium Jodid (PI) eingesetzt (Herrmann et al., 1998; Vermes et al., 1995). Durch die durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz von PI und FITC konjugierten AxV können vier verschiedene Kombinationen dargestellt werden, deren Bedeutung in Tabelle 5.2 wiedergegeben wurde.

Tab. 5.2: Spezifische Eigenschaften von behandelten Zellen nach einer Annexin V – FITC/Propidium Jodid Färbung

	Annexin V – FITC Bindung	Propidium Jodid Permeabilität
vitale Zellen	-	-
apoptotische Zellen	+	-
nekrotische Zellen	+	+
Kerne, Zelltrümmer	-	+

Bei der Färbung wurden 80 µl der zu untersuchenden Zellsuspension mit 400 µl Annexin/PI Mix (2 µg/ml AnnexinV-FITC; 20 µg/ml PI in Ringer-Lösung) versetzt. Die Messung der gefärbten Probe erfolgte nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C.

5.5.4 Messung des Gehaltes an nukleärer DNA einer Zelle

Während des Zyklus einer Zelle verändert sich der Gehalt der nukleären DNA. Die einzelnen Zellzyklusphasen und deren DNA-Menge sind im Folgenden dargestellt (Alberts, 1995):

- G1-Phase: → einfacher DNA Gehalt
- S-Phase: → einfacher DNA Gehalt
- G2-Phase: → doppelter DNA Gehalt
- M-Phase: → doppelter DNA Gehalt.

Zudem kann eine Zelle direkt nach ihrer Teilung in die G0-Phase übergehen, bei der die Zelle in eine Art Ruhephase eintritt. Während dieser Phase sind bei einfachem nukleären DNA-Gehalt weder Wachstum noch Teilung zu beobachten (Alberts, 1995). Während des programmierten Zelltodes wird die zelluläre DNA durch enzymatische Systeme abgebaut und bildet den so genannten subG1 Anteil der DNA.

Zur Messung des Gehaltes nukleärer DNA wurden die Zellen über 24 h bei 4 °C in einer hypertonen Propidium Jodid-Lösung (0,1 % Triton X-100, 0,1 % Natrium Citrat (2 x H₂O), 1 µg/ml PI in Millipore H₂O) inkubiert. Die 24-stündige Inkubationszeit dient zum Abbau der RNA mittels zellulärer RNasen die ansonsten bei der durchflusszytometrischen Messung Artefakte liefern würde (Nicoletti et al., 1991). In der Abbildung 5.8 ist das exemplarische Bild einer durchflusszytometrischen Messung des Gehaltes an nukleärer DNA zu sehen. Der Gehalt der DNA wird durch die Fluoreszenzintensität bestimmt; die Häufigkeit des Auftretens des Gehaltes durch die Zahl der gemessenen Ereignisse. Die den Zellzyklusphasen zugehörigen Scheitelwerte sind in der Abbildung 5.8 gekennzeichnet.

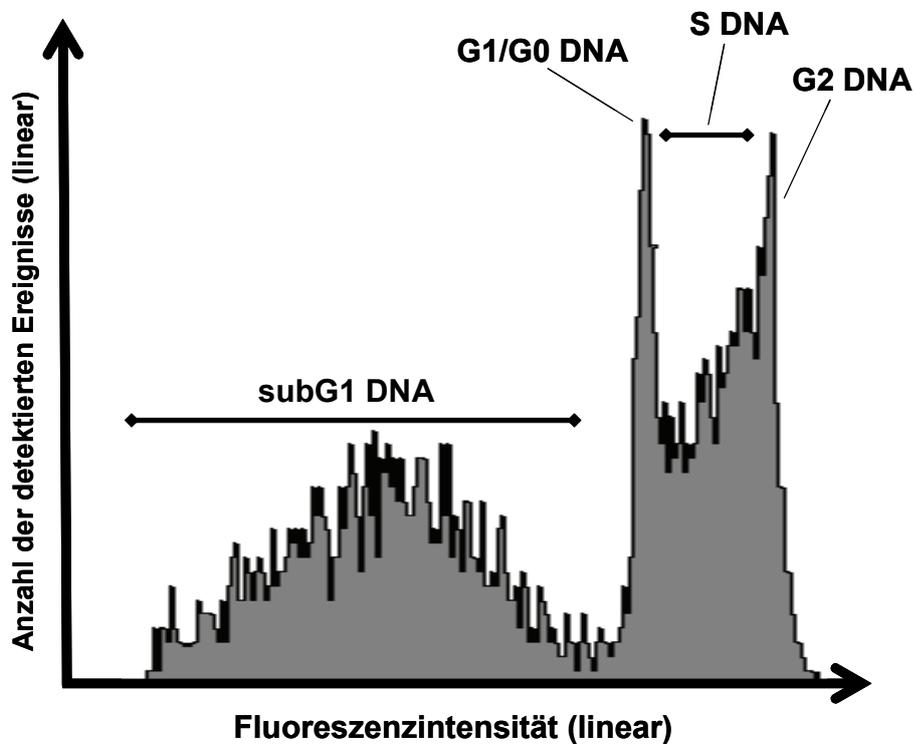


Abb. 5.8: Durchflusszytometrische Analyse einer Zellsuspension nach einer PI-Triton Färbung

5.5.5 Messung der Säurelabilität der Zytoplasmamembran

Im Verlauf des programmierten Zelltodes wird unter anderem die Zytoplasmamembran verändert. Dazu gehören zum einen die Exposition verschiedener Moleküle, wie zum Beispiel Phosphatidylserin oder verschiedene Glykoproteine, auf der Außenseite der Zytoplasmamembran (Green and Beere, 2001).

Zum anderen verändert sich die pH-Sensibilität der Zytoplasmamembran, so dass in der frühen Phase der Apoptose die Zelle eine hohe Sensibilität gegenüber einer Säurebehandlung aufweist. Diese Labilität wird durch Lektine detektiert, die mit hoher Affinität an die Zuckerreste der Glykoproteine binden (Heyder et al., 2003).

Die zu untersuchende Zellsuspension (1×10^5 Zellen) wird mit 4 μg FITC-markiertem Lektin aus *Narcissus pseudonarcissus* (bindet spezifisch an Mannose und Galaktomannose) versetzt und 30 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Die anschließende Kurzzeit-Säure-Behandlung, Neutralisation und Fixierung erfolgten automatisch mit dem TQ-Prep™ und dem ImmunoPrep™ Reagenziensatz von Beckman Coulter.

5.5.6 Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials (MMP)

Eine ausreichende Versorgung mit Energie ist essentiell für das Überleben einer Zelle. Die von der Zelle benötigte Energie wird von den Mitochondrien in Form von Energieäquivalenten (ATP) zur Verfügung gestellt. ATP wird in einem Multienzymkomplex der Atmungskette in der Mitochondrienmembran gebildet. Dabei wird auch ein Potential ($\Delta\Psi_m$) zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran gebildet, um die für den Energieübertrag wichtigen Elektronen fließen zu lassen. Ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials hat einen Stopp der Energielieferung und den Tod der Zelle zur Folge (Alberts, 1995). Das MMP kann durch den fluoreszierenden Farbstoffes DioC₆ (3,3'-Dihexyloxycarbocyaninjodid) durchflusszytometrisch bestimmt werden (Petit et al., 1995).

100 μl Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen) werden mit 400 μl DioC₆ Mix (40 nM DioC₆ in Ringer-Lösung) 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, und anschließend wird die Reaktion gestoppt, indem die inkubierten Proben auf Eis gestellt werden. Je nach Höhe des MMP leuchtet der Fluoreszenzfarbstoff DioC₆ stärker oder schwächer, somit kann durch die Änderung der Fluoreszenzintensität das MMP charakterisiert werden.

5.6 Auftrennung nukleärer DNA mittels Gelelektrophorese

Die DNA aus den behandelten Zellen wurde mit einem Dneasy Kit isoliert. Dabei wurden DNA Moleküle mit mindestens 100 Basenpaaren (bp) extrahiert. Anschließend konnte die wässrige DNA-Lösung noch mittels alkoholischer Präzipitation in Anwesenheit von Natriumacetat (0,3 M) aufkonzentriert werden. Die zelluläre DNA wurde anschließend in einem Agarosegel bei 100 V 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden mit UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer 50 x

40 mM Tris 243.3 g / l

1 mM EDTA (Titriplex III) 18.62 g / l

in Millipore H₂O

pH 7.8

DNA Ladepuffer 5 x

100 mM Tris-Acetat pH 7.5

50 mM EDTA (Titriplex III)

15 % (w/v) Ficoll

0.5 % (w/v) SDS

0.05 % (w/v) Bromphenolblau

0.05 % (w/v) Xylencyanol

5.7 Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase Konzentration

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym und kommt in unterschiedlichen Konzentrationen in fast allen Körperzellen gelöst im Zytoplasma vor. Bei einer Schädigung der Zytoplasmamembran kann LDH aus der Zelle austreten. Somit ist die Konzentration der LDH nicht nur ein Maß für die Zytotoxizität einer Behandlung, sondern indirekt auch für andere Gefahrensignale, die ebenfalls innerhalb der Zelle vorliegen. Die LDH Konzentration im Überstand der behandelten Zellen wurde mittels des CytoTox 96[®] Kit bestimmt (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Korzeniewski and Callewaert, 1983). Der Test beruht auf folgenden Reaktionen:



Das gebildete rote Formazan kann dann mittels eines Plattenphotometers quantitativ über die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt werden.

5.8 Immunogene Wirkung *in vivo*

Die immunogene Wirkung von behandelten Zellen unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob die Zellen apoptotisch oder nekrotisch sterben (Voll et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung hochdruckbehandelter Zellen auf das Immunsystem bei Mäusen untersucht.

5.8.1 Versuchstiere

Die durchgeführten Tierversuche wurden nach den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt und nach § 8a des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Mittelfranken angezeigt. Zur Immunisierung wurden 6 Wochen alte weibliche C57/Bl6 Mäuse verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall der Medizinischen Klinik III, Institut für klinische Immunologie, bei definierter Temperatur, Luftfeuchte und Hell-Dunkel-Rhythmus.

5.8.2 Humorale Immunantwort

Dazu wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer Zellsuspension von 10^6 Zellen/ml immunisiert. Bei der Immunisierung wurden 500 μ l der behandelten Zellsuspension (in Ringerlösung) injiziert. Eine Wiederholungsimmunisierung erfolgte mit derselben Menge und Zelldichte drei Wochen nach der ersten Immunisierung. Vor jeder Immunisierung wurde den Tieren an der Schwanzvene Blut entnommen. Die finale Blutentnahme am narkotisierten Tier erfolgte 3 Wochen nach der letzten Immunisierung. Aus dem entnommenen Blut wurde mittels Zentrifugation in einem BD Microtainer[®] Serum gewonnen und bei -20 °C konserviert. Das Serum der Mäuse wurde anschließend mit Hilfe eines Zenon[®] Mouse IgG Labeling Kit auf spezifische murine IgG Antikörper gegen Raji Zellen untersucht.

6 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit soll erste Ansätze für die Entwicklung einer autologen, zellbasierten, hochdruckbehandelten Tumorstoffimpfung liefern. Dabei müssen die hochdruckbehandelten Zellen zwei grundlegende Eigenschaften besitzen. Zum einen muss gewährleistet sein, dass die Zellen inaktiviert sind, um bei einer Reinjektion ein stoffimpfung-assoziiertes Metastasieren zu verhindern. Zum anderen sollen die Zellen eine möglichst hohe Immunogenität besitzen, um eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren.

6.1 Inaktivierung von Säugerkörperzellen durch hydrostatischen Hochdruck

6.1.1 Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Vitalität von Säugerkörperzellen

In der vorliegenden Arbeit stellt die Inaktivierung nicht adhärenter Tumorstoffimpfungslinien eine zentrale Aufgabe dar. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Säugerkörperzellen durch Druck > 250 MPa abgetötet werden können (Blumelhuber et al., 2003a; Diehl et al., 2003). Aus diesen Vorarbeiten wurde abgeleitet, dass eine Druckhaltezeit von 300 s ausreichend ist, um die Zellen zu inaktivieren. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche grundsätzlich eine Druckhaltezeit von 300 s festgelegt.

Um die Auswirkung einer Druckbehandlung auf die Vitalität der Zellen zu bestimmen wurden verschiedene Tumorstoffimpfungslinien behandelt und die Vitalität mittels ihrer Morphologie im Durchflusszytometer untersucht. In Abbildung 6.2 ist der Anteil vitaler Zellen nach einer Hochdruckbehandlung für vier verschiedene Stoffimpfungslinien dargestellt. Der Anteil der vitalen Zellen errechnet sich aus dem Mittelwert aus drei Experimenten und als Fehler ist die Standardabweichung um den Mittelwert angegeben.

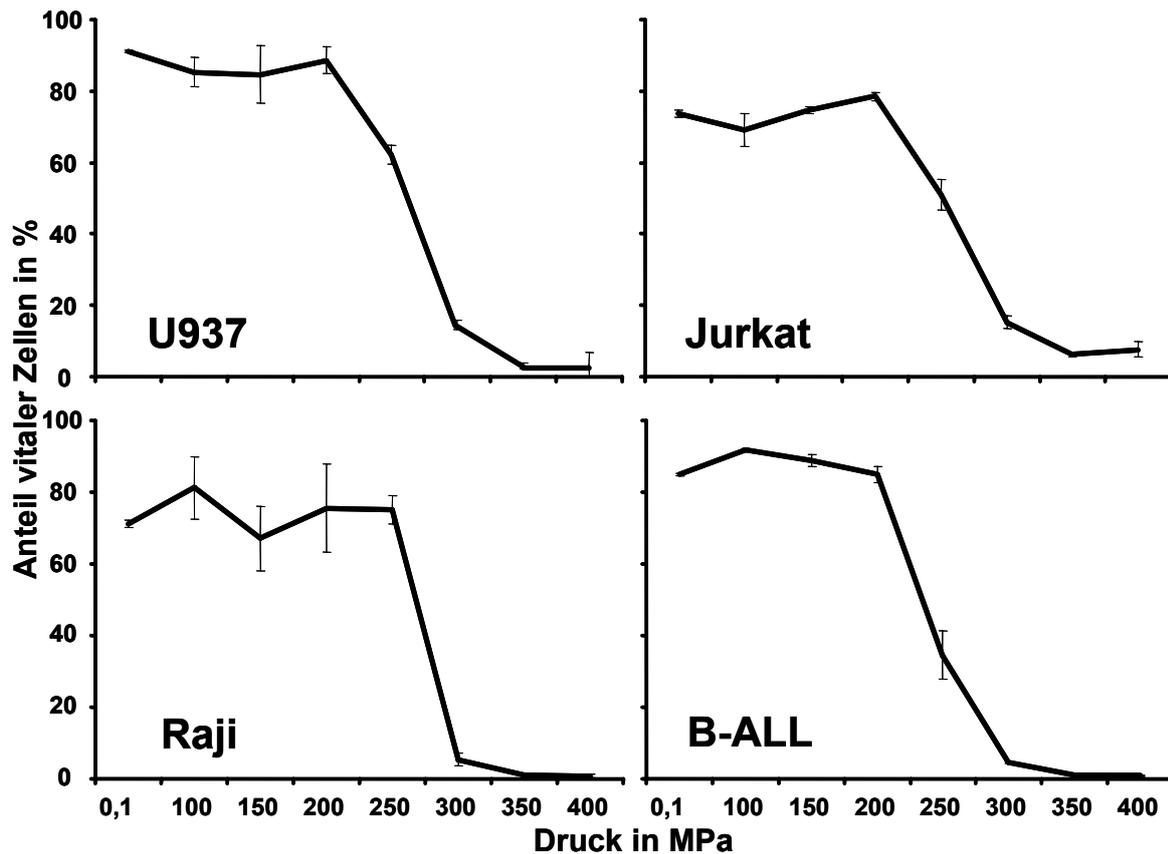


Abb. 6.1: Anteil vitaler Zellen verschiedener Tumorzelllinien

Wie aus Abbildung 6.1 ersichtlich ist, nimmt der Anteil der vitalen Zellen bei geringer Erhöhung des Druckes über 200 MPa rapide ab. Eine vollständige Inaktivierung der humanen B-Zelllinien Raji und B-ALL sowie der Monozytenzelllinie U937 ist nur durch einen Druck ≥ 350 MPa möglich. Die humane T-Zelllinie Jurkat zeigt bis zu einem Druck von 400 MPa morphologisch keine vollständige Inaktivierung. Diese Daten zeigen, dass zur Inaktivierung der meisten Tumorzellen mindestens ein Druck von 300 MPa nötig ist.

6.1.2 Kinetik der Inaktivierung hochdruckbehandelter Zellen

Es wird vermutet, dass eine Behandlung mit hohem hydrostatischem Druck Zellen subletal schädigen kann, so dass diese Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten oder durch Trypanblau - Vitalfärbung nicht als inaktiviert detektiert werden können. Weiterhin kann eine Analyse auf Vitalität direkt nach Behandlung nicht aufzeigen, ob die behandelten Zellen so stark geschädigt wurden, dass sie in der nachfolgenden Kultur sterben.

Um primär nicht letale druckinduzierte Effekte zu beobachten, wurden die Zelllinien B-ALL (B) und U937 (A) nach Behandlung wieder in Kultur genommen. Anschließend wurde in regelmäßigen Zeitabständen die Vitalität im Durchflusszytometer anhand der Morphologie der Zellen bestimmt und in Abbildung 6.2 dargestellt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die Werte eines Zeitpunktes wurden auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert. Die Fehler stellen die ebenfalls normierte Standardabweichung um den Mittelwert dar.

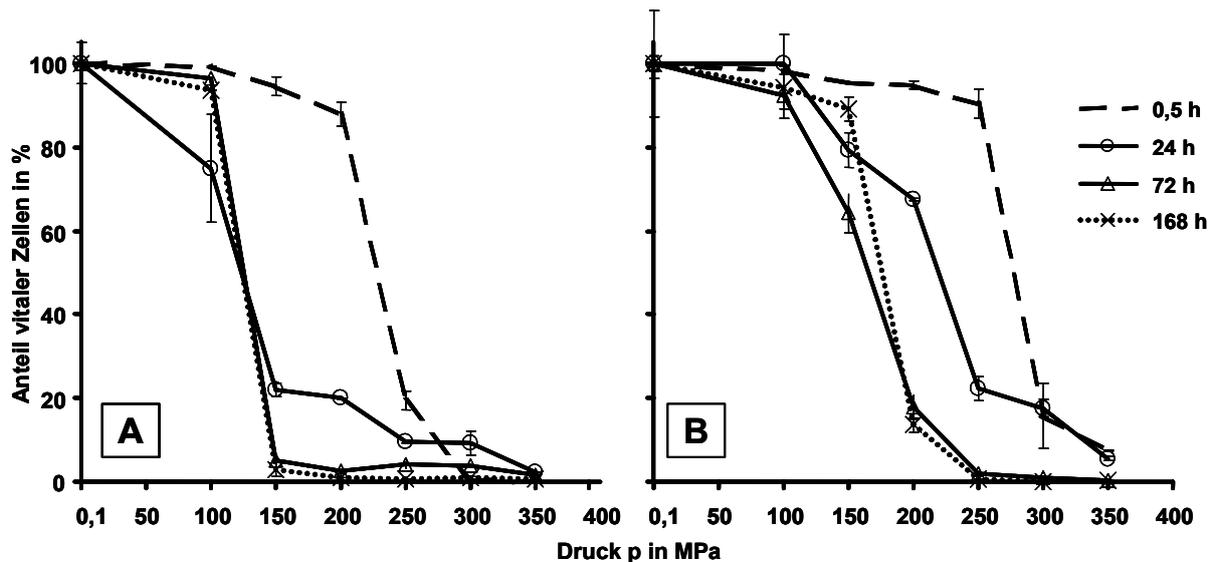


Abb. 6.2: Anteil an vitalen Zellen einer hochdruckbehandelten Zellsuspension, die über 168 Stunden in Kultur gehalten wurde

Die Abbildung 6.2 zeigt, dass bei beiden Zelllinien druckbedingte Effekte bereits 0,5 Stunden nach einer Behandlung nachweisbar sind. Weiterhin wird deutlich, dass sich der Anteil vitaler Zellen während der Kultivierung druckabhängig ändert. Die zwei betrachteten Zelllinien zeigen unterschiedliche Auswirkungen der Druckbehandlung. Während bei U937 - Zellen bei 300 MPa direkt nach der Behandlung keine vitalen Zellen mehr vorliegen, können bei den B-ALL - Zellen noch bis zu einem Druck von 350 MPa vitale Zellen nachgewiesen werden. Auch bei niedrigerem Druck scheinen B-ALL Zellen resistenter gegenüber der Behandlung zu sein. So sind bei den mit 250 MPa behandelten U937 Zellen 30 min nach der Behandlung kaum mehr als 20 % der Zellen vital, während beim gleichen Druck noch mehr als 95 % der B-ALL Zellen zunächst noch eine vitale Morphologie aufweisen. Bei beiden Zelllinien ist auffällig, dass eine Erhöhung des Behandlungsdruckes um 50 MPa eine rapide Abnahme der vitalen Zellen nach sich zieht.

Betrachtet man den Anteil vitaler Zellen 24 Stunden nach der Behandlung (Abbildung 6.2), so zeigt sich, dass U937 Zellen nach einem Druck von 150 und 200 MPa weniger als 30 % vitale Zellen aufweisen. B-ALL Zellen zeigen bei 200 MPa ebenfalls eine Abnahme an vitalen Zellen, jedoch ist diese Abnahme schwächer als bei U937 Zellen. Die nächste Messung der zellulären Vitalität wurde 72 Stunden nach Behandlung durchgeführt und zeigt, dass bei U937 Zellen bereits ab einem Druck von 150 MPa keine vitalen Zellen mehr zu detektieren sind. Bei B-ALL Zellen ist zu erkennen, dass der Effekt des verzögerten Sterbens erst bei einem Druck von 250 MPa auftritt. Der letzte Zeitpunkt der Beobachtung lag bei 168 Stunden nach der Behandlung und zeigt bei U937 Zellen keinen Unterschied im Vergleich zu der Beobachtung bei 72 Stunden. In der Abbildung 6.2 B ist jedoch zu erkennen, dass die B-ALL Zellen, die mit 150 MPa behandelt wurden im Laufe der Kultur an Vitalität verlieren, aber sich wieder erholen und proliferieren können. Diese Ergebnisse zeigen, dass abhängig von der Zelllinie bei einem Druck zwischen 150 und 250 MPa Apoptose induziert wird. Allerdings reicht die alleinige Betrachtung der morphologischen Eigenschaften der Zellen nicht aus, um mit Sicherheit eine hochdruckinduzierte Apoptose nachzuweisen.

6.1.3 Komplette Inaktivierung hochdruckbehandelter Zellen

Die mit hydrostatischem Hochdruck behandelten Zellen sollten nach einer Behandlung nicht nur subletal geschädigt, sondern sicher tot sein. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen mit Hochdruck in verschiedenem Druck behandelt und anschließend in 24er Vertiefungsplatten für 48 Tage kultiviert. Die nachfolgende Abbildung 6.3 zeigt die Inaktivierungsleistung einer Behandlung mit unterschiedlichem Druck. Der Verbrauchszustand des Zellkulturmediums wurde anhand der Mediumfarbe bestimmt und in Wachstumseinheiten dargestellt. Dabei bezeichnet die Wachstumseinheit 1 kein Wachstum und 4 starkes Wachstum.

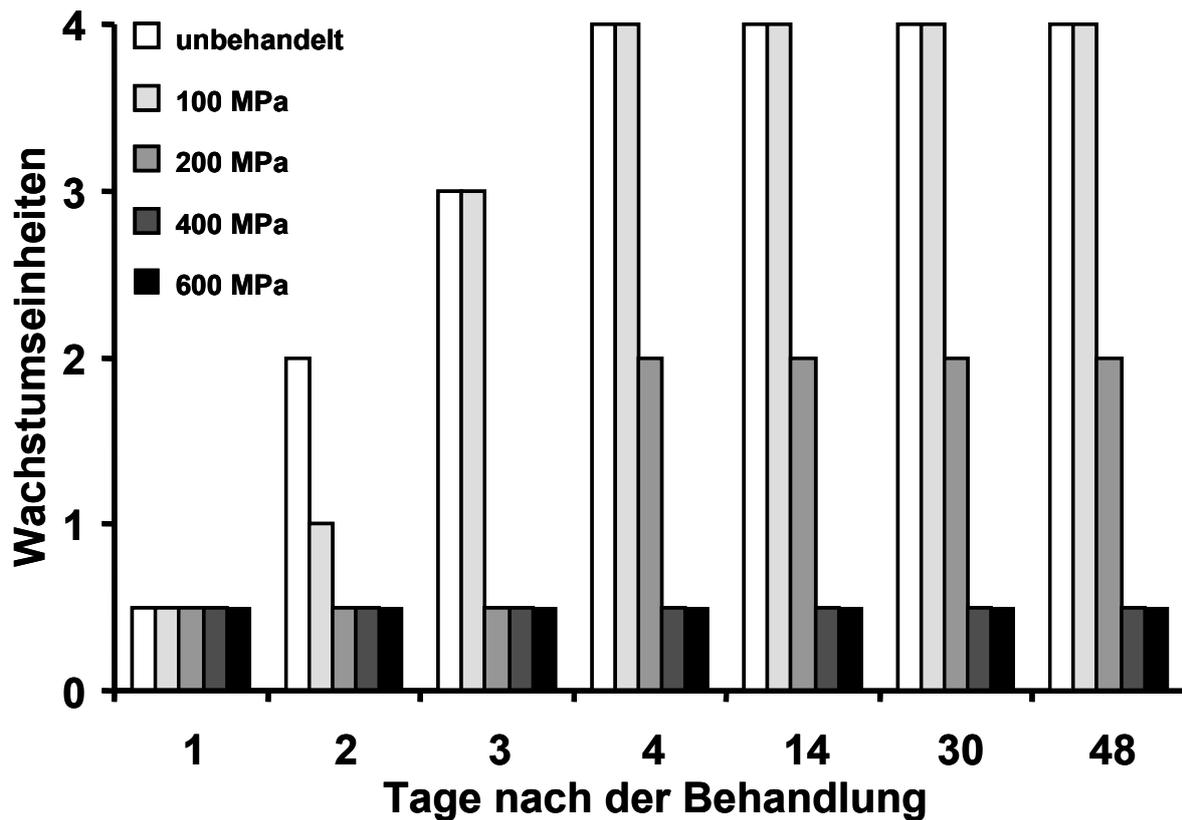


Abb. 6.3: Kontrolle der Inaktivierungsleistung hydrostatischer Hochdruckbehandlung gemessen am Verbrauchszustand des Zellkulturmediums

Eine langfristige Inaktivierung der Tumorzellen ist durch einen Druck von mindestens 400 MPa realisierbar (Abbildung 6.3). Dieses Experiment belegt, dass Zellen, die mit einem Druck von ≥ 400 MPa behandelt werden, auch sicher tot sind, und auch in einer Kultivierungsphase über sechs Wochen nicht mehr in der Lage sind, sich zu erholen. Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten Zellen eine unverminderte Proliferation, ebenso wie Zellen, die mit 100 MPa behandelt wurden. Die Beobachtung, dass Druck ≥ 400 MPa die Zellen ausreichend inaktiviert, wurde mit der Grenzverdünnungsmethode bestätigt. Dabei wurden Raji - und Jurkat - Zellen mit einem Druck von 300, 400 und 500 MPa behandelt und anschließend über 20 Wochen kultiviert. Während der Kultivierungszeit konnte bei keinem Behandlungsdruck ein Anwachsen der Zellen beobachtet werden.

6.2 Hochdruckinduzierter Zelltod

Wie aus den Dosis-Wirkungs-Beziehungen hervorgeht, wird durch eine Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck sowohl ein plötzlicher, als auch ein zeitlich verzögerter Zelltod induziert. Die Kenntnis der Form des Zelltodes, der durch die Hochdruckbehandlung induziert wird, ist von großem Interesse für eine Vakzine, da die verschiedenen Formen des Zelltodes auch unterschiedliche Immunogenität besitzen (Bonnotte et al., 1998; Melcher et al., 1999; Ponner et al., 1998; Sauter et al., 2000; Voll et al., 1997).

6.2.1 Nachweis von Apoptose und Nekrose mittels AnnexinV-FITC Propidium Jodid Färbung

Um den Zelltod genauer zu charakterisieren, wurden U937 Zellen mit Druck zwischen 100 und 400 MPa (Druckhaltezeit 300 s) und bekannten Zelltodauslösern (Hitze und UVB) behandelt und wieder in Kultur genommen. Anschließend wurde direkt nach der Behandlung (0 h) bis 48 h nach der Behandlung ein Aliquot der Zellen aus der Kultur entnommen und mittels AnnexinV-FITC und Propidium Jodid Färbung (Ax-PI) auf die Art des durch Druck induzierten Zelltodes untersucht. Der Anteil der vitalen, apoptotischen, nekrotischen und degradierten Zellen wird in Abbildung 6.4 zu 100 % summiert dargestellt. Die dargestellten Werte bilden den Mittelwert aus fünf Experimenten, als Fehler wurde die Standardabweichung um den Mittelwert angegeben.

Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, werden die Zellen durch eine Behandlung mit 100 MPa nicht getötet. Diese Beobachtung lässt sich auch durch die Ax-PI Färbung bestätigen, da nach der Behandlung ein Anteil vitaler Zellen von über 90 % beobachtet werden kann. Der Anteil von 10 % toter Zellen ist ein Effekt der Zellkulturhomeostase, der auch bei unbehandelten Zellen eintritt. Wird bei der Behandlung jedoch ein Druck von 200 MPa gewählt, dann verringert sich im Vergleich zu den Zellen, die mit 100 MPa behandelt wurden, der Anteil der vitalen Zellen deutlich. In der Abbildung 6.4 ist die zeitliche Abhängigkeit der Abnahme an vitalen Zellen dargestellt. Vergleicht man bestrahlte Zellen mit Zellen, die Hochdruck behandelt wurden, kann eine Abnahme der vitalen und eine Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellen beobachtet werden.

Allerdings verläuft der hochdruckinduzierte Zelltod zeitlich schneller als der durch ultraviolette Strahlung induzierte. Schon nach 12 h binden mehr als 35 % der Zellen AnnexinV-FITC (AxV), ohne dabei die Integrität der Membran zu verlieren.

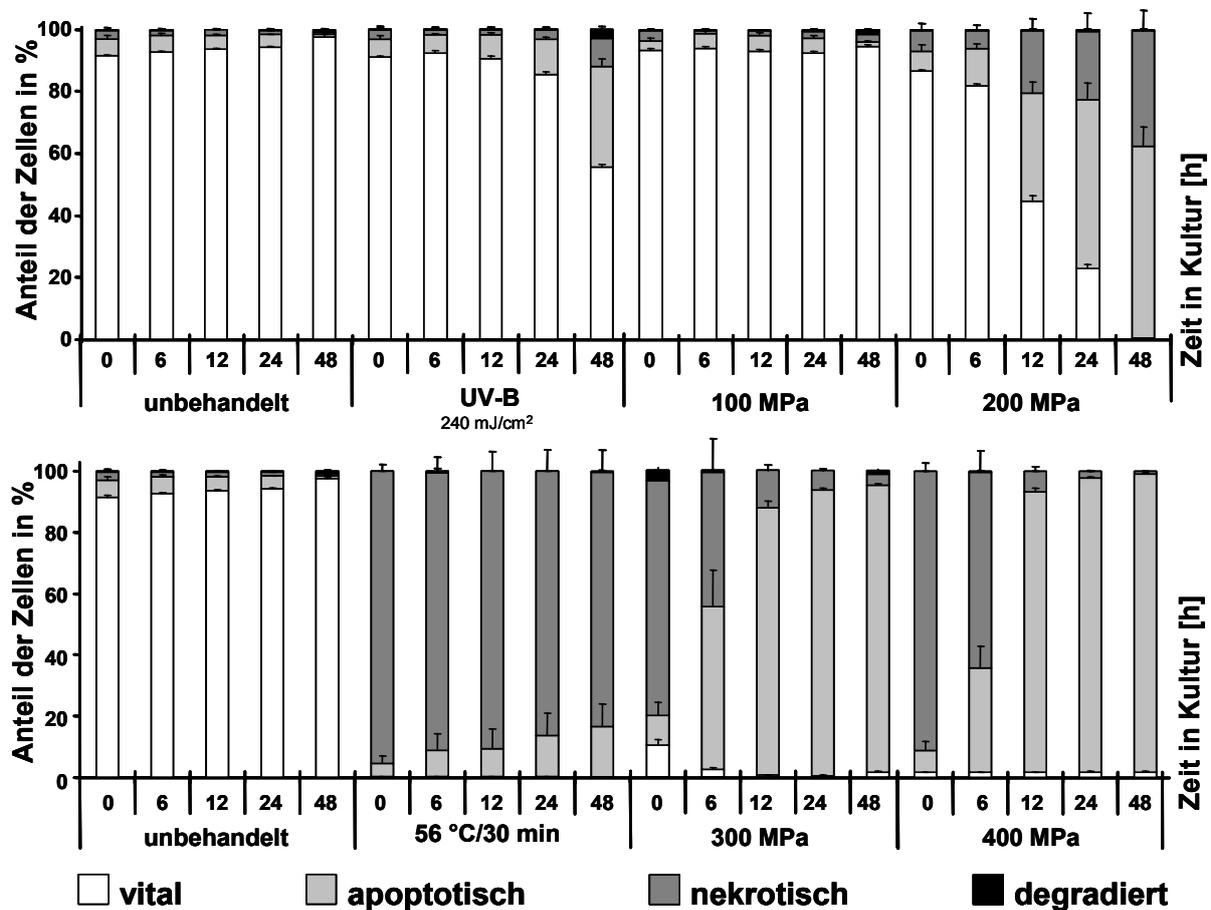


Abb. 6.4: AnnexinV-FITC – PI Färbung hochdruckbehandelter Zellen

Zugleich haben zu diesem Zeitpunkt auch schon mehr als 20 % der Zellen ihre Membranintegrität verloren und sind sekundär nekrotisch. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen bestrahlte Zellen über die gesamte Kultivierungszeit eine langsame Zunahme an apoptotischen Zellen. Nach 48 h sind mehr als 35 % apoptotische Zellen nachweisbar, und nur noch 62 % der Zellen zeigen vitale Eigenschaften. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass bei einer Behandlung mit Druck ≥ 300 MPa die Zellen direkt nach der Behandlung absterben. Diese Zellen sollten per definitionem nekrotische Eigenschaften aufweisen, ähnlich Zellen, die mit 56 °C über 30 min behandelt wurden.

Diese primär nekrotischen Zellen binden sehr stark AnnexinV, haben eine permeable Zytoplasmamembran und zeigen im weiteren Kulturverlauf keine Veränderungen ihrer Eigenschaften. Diese Eigenschaften sollten auch bei den hochdrucknekrotisierten Zellen beobachtet werden. Allerdings zeigt die Ax–Pi Färbung der hochdruckbehandelten Zellen einen überraschenden Verlauf. Werden die mit 300 MPa behandelten Zellen im Vergleich zu den hitzeinaktivierten Zellen betrachtet, so sind sofort nach der Behandlung mehr als 90% nekrotische Zellen nachweisbar. Dann lässt allerdings die Zahl der PI positiven Zellen im Verlauf der Kultur nach und schon 12 Stunden nach der Behandlung zeigen nur noch 12 % der Zellen diese Eigenschaft nekrotischer Zellen. Werden Zellen analysiert, die mit 400 MPa behandelt wurden, kann beobachtet werden, dass die Zellen direkt nach einer Behandlung mit Hochdruck zu über 90 % PI positiv waren, diese Eigenschaften aber während der Kultur verlieren und einen scheinbar „apoptotischen“, PI negativen Phänotyp annehmen. Ein Übergang von einem nekrotischen zu einem apoptotischen Phänotyp ist jedoch zellbiologisch nicht möglich. Die Vermutung lag nahe, dass sich die Zahl der durch das Durchflusszytometer detektierten Ereignisse verringert und die Zellen, die direkt nach der Behandlung nekrotische Eigenschaften aufweisen, im Laufe der Kultur vollständig degradieren und sich somit der Detektion entziehen. Aus diesem Grund wurde die Zahl der im Durchflusszytometer detektierten Ereignisse ermittelt und in Abbildung 6.5 über der Zeit aufgetragen. Die Werte in Abbildung 6.5 stellen den Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen dar und als Fehlerbalken ist die Standardabweichung gegeben.

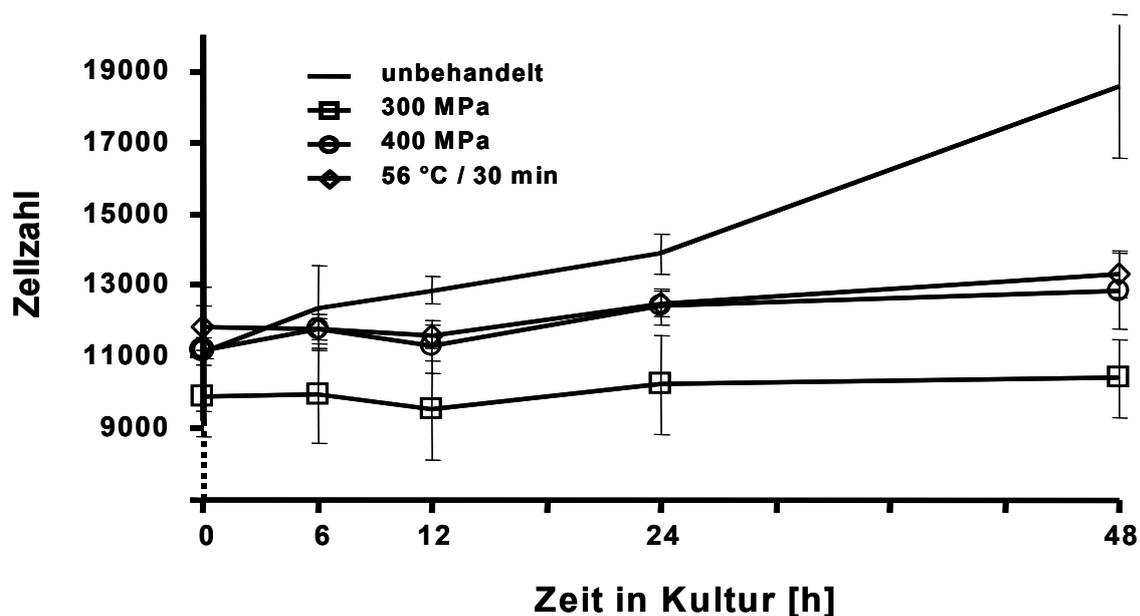


Abb. 6.5: Anzahl der im Durchflusszytometer detektierten Ereignisse

Es ist zu beobachten, dass die Anzahl der detektierten Ereignisse im Laufe der Zeit konstant bleibt. Die Vermutung, dass Zellen, die mit Druck ≥ 300 MPa behandelt wurden, im Laufe der Rekultivierung vollständig degradieren und nicht mehr erfasst werden können, lässt sich also nicht bestätigen. Das Verschwinden des PI Signals ist also nicht durch die Zahl der detektierten Ereignisse zu erklären. Ein weiterer Erklärungsversuch für den Verlust des PI Signals wird in Kapitel 6.3.1 gegeben.

6.2.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) hochdruckbehandelter Zellen

Ein Zusammenbruch des Membranpotentials hat den Tod einer Zelle zur Folge, und somit kann die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mittels fluoreszierendem DioC₆ zur Bestimmung der Vitalität einer Zelle verwendet werden (Petit et al., 1995). In Abbildung 6.6 ist das mitochondriale Membranpotential verschieden behandelter Zellen direkt nach einer Behandlung dargestellt.

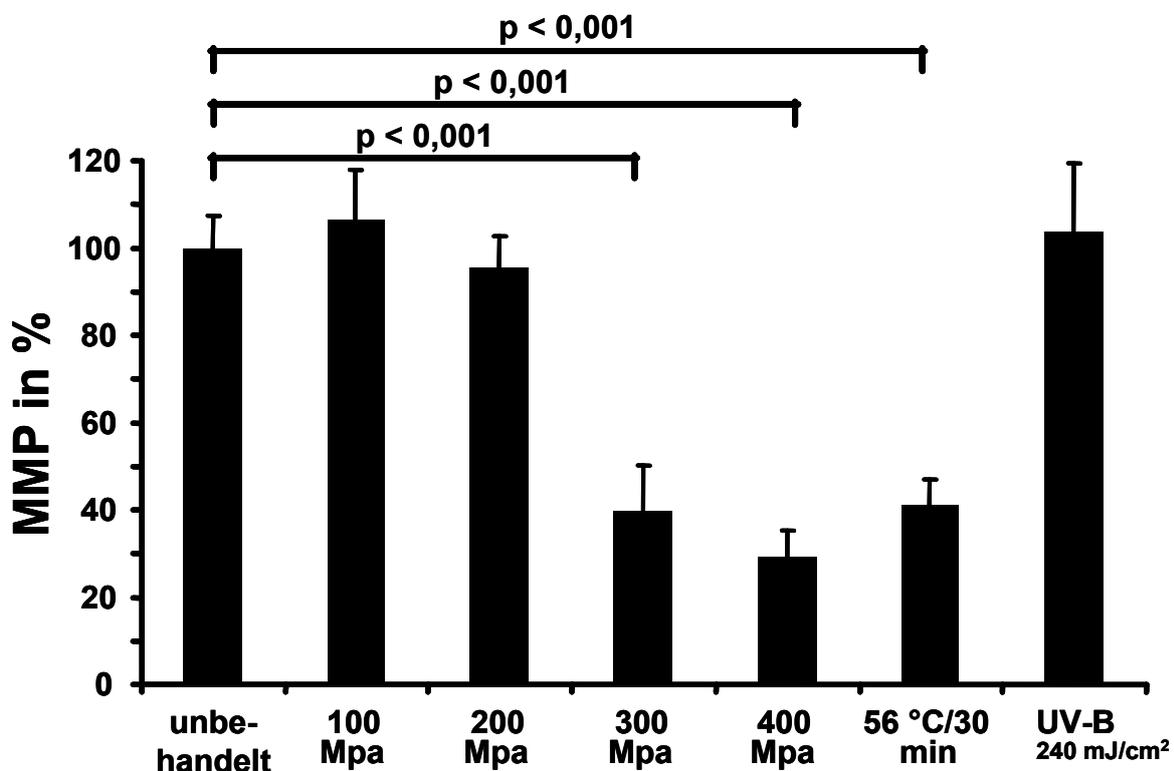


Abb. 6.6: Darstellung des MMP von U937 Zellen, die verschieden behandelt wurden

Die Messung des MMP erfolgte direkt nach der Behandlung. Das MMP unbehandelter Zellen wurde zu 100 % gesetzt und das MMP der anderen Behandlungen auf die unbehandelten Zellen normalisiert.

Der Wert spiegelt den Mittelwert aus fünf Wiederholungen wieder und als Fehlerbalken wurde die Standardabweichung um den Mittelwert angegeben. Diese Daten zeigen, dass das MMP bei Zellen, die mit einem Druck ≥ 300 MPa oder mit Hitze behandelt wurden, kleiner als 50 % des Ausgangswertes ist. Dieser Abfall des MMP hat zur Folge, dass die Zellen keine neuen Energieäquivalente mehr bilden können. Ein deutlich höheres MMP zeigen die Zellen, die mit 200 MPa oder ultravioletter Strahlung behandelt worden sind. In Abbildung 6.4 konnte bereits gezeigt werden, dass diese Zellen apoptotisch sterben, wobei sich das MMP langsam verringert, da der Prozess der Apoptose energieabhängig ist. Zellen, die mit 100 MPa behandelt wurden, zeigen ein Potential, das sogar noch höher ist als das Potential un behandelter Zellen, was die Vitalität dieser Zellen bestätigt. Die Signifikanzwahrscheinlichkeit p in Abbildung 6.6 wurde durch einen zweiseitigen Student T-Test ermittelt.

6.2.3 Bestimmung der Säurelabilität und Freisetzung von Zuckerresten an Zytoplasmamembranen hochdruckbehandelter Zellen

Die Membranen apoptotischer Zellen weisen eine hohe Sensibilität gegenüber einer kurzzeitigen Säurebehandlung und eine anschließende Zugänglichkeit zu verschiedenen Zuckerresten von Glykoproteinen auf der Zytoplasmamembran auf, was durch das FITC markierte Lektin aus *Narcissus Pseudonarcissus* (NPn) nachgewiesen wird und als weiterer Apoptosenachweis dient (Franz et al., 2006; Heyder et al., 2003). Dazu wurde eine Suspension von U937 Zellen mit Druck von 100 bis 400 MPa und bekannten Zelltodauslösern (Hitze und UVB) behandelt und anschließend wieder in Kultur genommen. Danach wurde direkt nach der Behandlung (0 h) bis 48 h nach der Behandlung ein Aliquot der Zellen aus der Kultur entnommen und die Säurelabilität der Zytoplasmamembranen untersucht. Der Anteil der Zellen, welche NPn gebunden haben, wird in Abbildung 6.7 dargestellt, dabei wird auch der Anteil der Zellen dargestellt, die eine sehr hohe Bindung an NPn aufwiesen (MFI > 50 Einheiten). Als Fehler wurde die Standardabweichung um den Mittelwert bei fünf Versuchen angegeben.

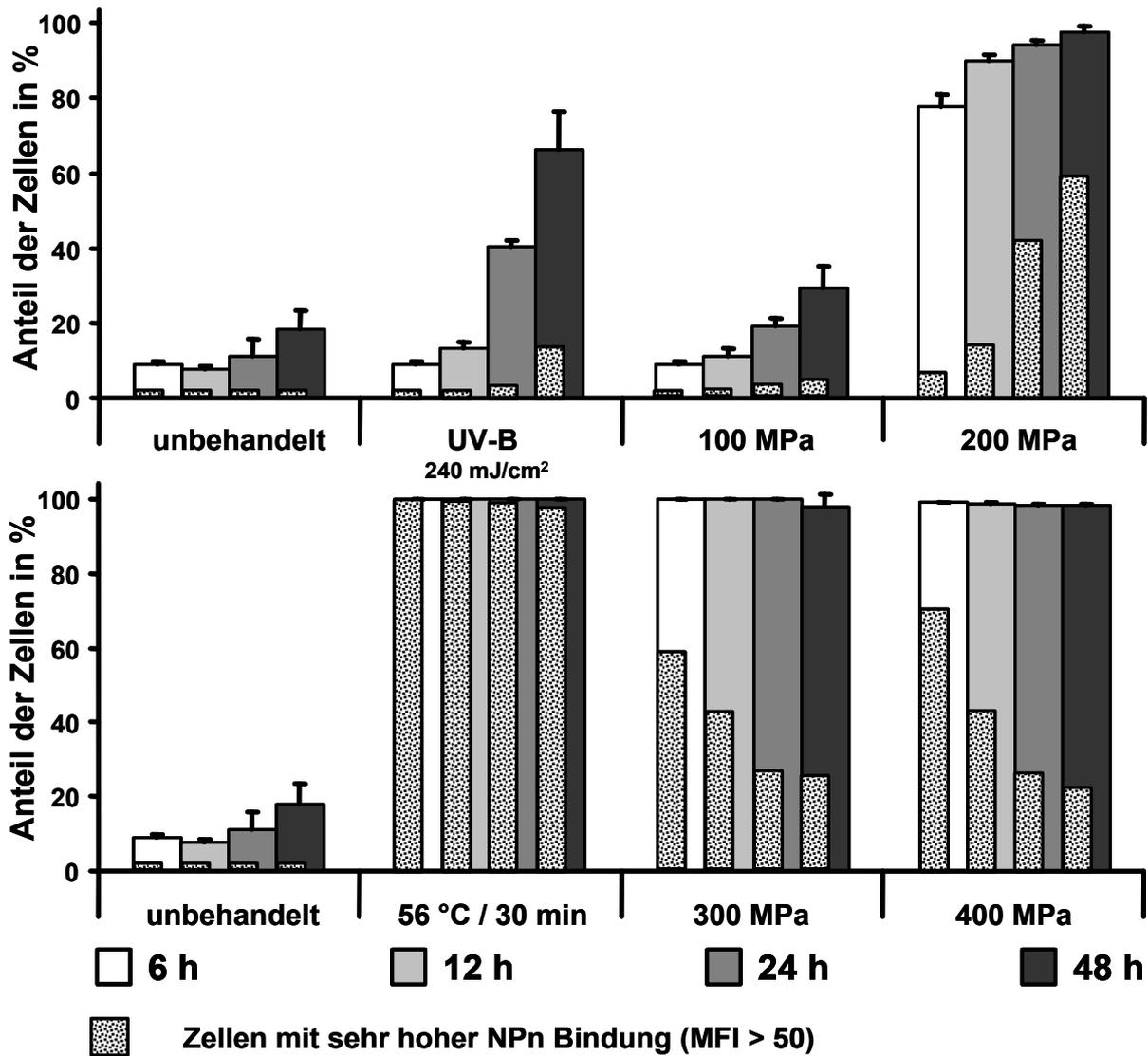


Abb. 6.7: NPn Färbung hochdruckbehandelter Zellen

Abbildung 6.7 zeigt, dass bei unbehandelten Zellen weniger als 10 % eine Bindung von NPn an der Zytoplasmamembran aufweisen. Genauso zeigen auch die mit 100 MPa behandelten Zellen wenig Zunahme an NPn positiven Zellen. Bei UVB bestrahlten Zellen steigt die Zahl der Zellen, die eine säurelabile Membran besitzen, deutlich an und erreicht nach 48 h ein Niveau von über 60 %. Im Gegensatz dazu ist bei Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden, die Zahl der positiven Zellen bereits 6 h nach der Behandlung auf 80 % angestiegen, und bei weiterer Beobachtung zeigen nahezu alle Zellen eine Bindung von NPn. Bei der Modellnekrose (56 °C/30 min) kann beobachtet werden, dass alle Zellen NPn binden können. Da die Membran der nekrotischen Zellen permeabel ist, kann NPn nicht nur an der Oberfläche der Zellen binden, sondern auch intrazelluläre Strukturen erkennen.

Ähnlich wie bei den hitzenekrotisierten Zellen zeigen nahezu alle der mit 300 und 400 MPa behandelten Zellen eine Bindung von NPn. Zudem fällt auf, dass zusätzlich noch ein Anteil an Zellen beobachtet werden kann, deren Fluoreszenz sehr hoch liegt. Der Anteil an „hochpositiven“ Zellen ist in Abbildung 6.7 durch gepunktete Balken wiedergegeben. Bei den hitzenekrotisierten Zellen bleibt die Zahl der „hochpositiven“ Zellen über den gesamten Zeitraum der Beobachtung konstant. Ein anderes Verhalten zeigen Zellen, die mit hohem Druck behandelt worden sind. Wenn eine Behandlung mit 200 MPa erfolgt, ist zu beobachten, dass die Zahl der „hochpositiven“ Zellen im Laufe der Beobachtungszeit kontinuierlich zunimmt. Jedoch ist diese Zunahme nicht so stark wie die Zunahme der einfach positiven Zellen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass mit 300 oder 400 MPa behandelte Zellen überwiegend nekrotische Eigenschaften aufweisen. Allerdings ist zu beobachten, dass die Zahl der „hochpositiven“ Zellen bei 300 und 400 MPa deutlich unter dem Anteil der hitzenekrotisierten Zellen liegt und abnimmt. So zeigt sich nach 48 h nur noch ein Anteil von unter 30 %.

6.2.4 Bestimmung des Gehalts an nukleärer DNA in hochdruckbehandelten Zellen

Während des Zellzyklus, vor allem in der späten SG2 Phase und im Verlauf der Apoptose, verändert sich der Gehalt an nukleärer DNA (Alberts, 1995). Der so genannte subG1-Gehalt an nukleärer DNA tritt vor allem auf, wenn Zellen apoptotisch sterben und die nukleäre DNA enzymatisch in 180 bp und Vielfache davon gespalten wird (Alberts, 1995; Hagenhofer et al., 1998; Nicoletti et al., 1991). Zur Bestimmung nukleärer DNA wurde eine Suspension von U937 Zellen wurde mit Druck von 100 bis 400 MPa und bekannten Zelltodinduktoren (Hitze und UVB) behandelt und anschließend wieder in Kultur genommen. Anschließend wurde direkt nach der Behandlung (0 h) bis 48 h ein Aliquot der Zellen entnommen und mit hypertoner Propidium Jodid Lösung versetzt und nach 24 h im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Versuchen mit Standardabweichung um den Mittelwert als Fehler.

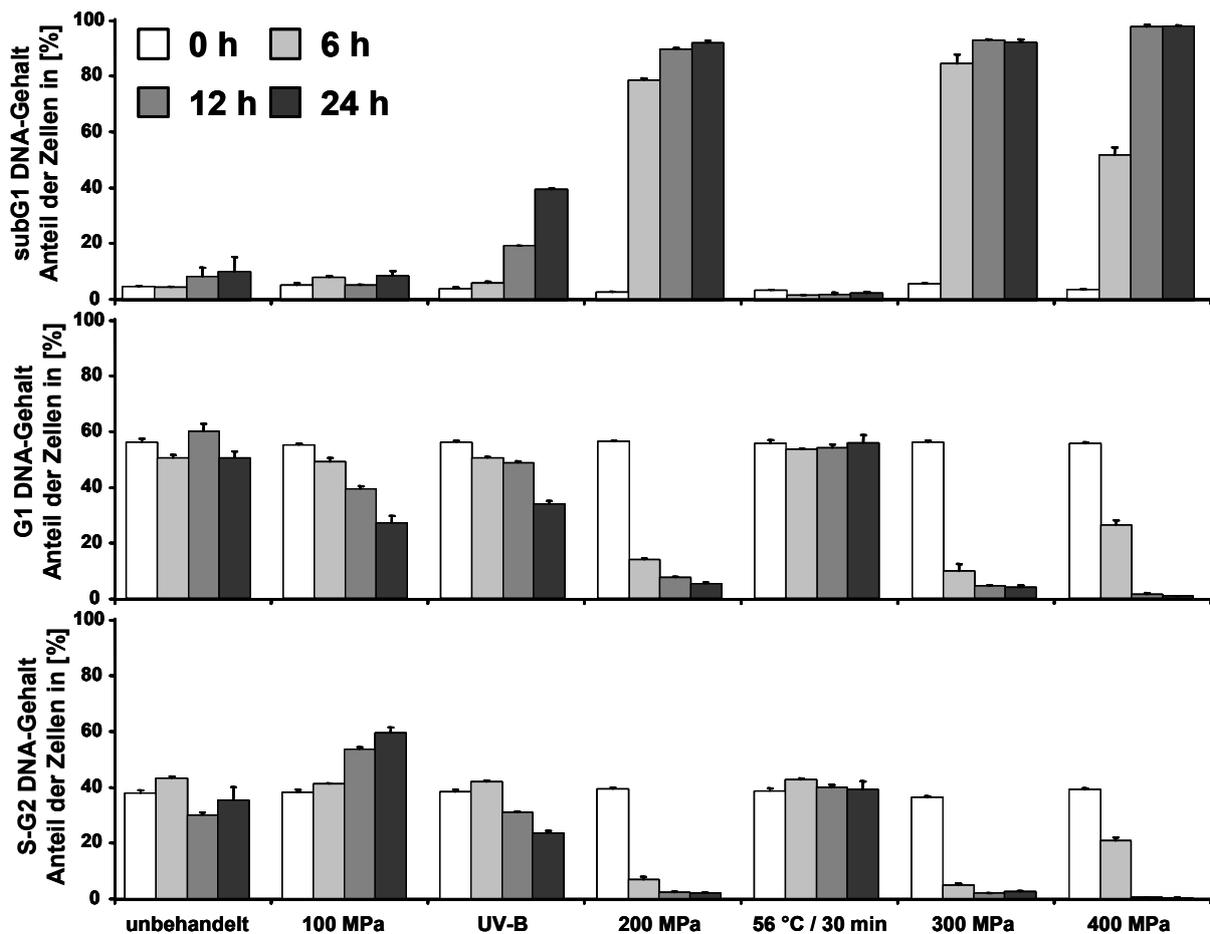


Abb. 6.8: Bestimmung des DNA-Gehalts von hochdruckbehandelter Zellen

Die unbehandelten Zellen spiegeln den DNA-Gehalt während einer Kultivierung unter normalen Bedingungen wieder. Es befinden sich jeweils zwei Drittel der Zellen in der G1 Phase und ein Drittel befinden sich in der S oder G2 Phase. Dieses Gleichgewicht kann durch verschiedene Noxen gestört werden. In den Untersuchungen fällt auf, dass sich bereits nach einer Druckbehandlung von 100 MPa ohne Änderung der Gesamtzellzahl (nicht gezeigt) der Anteil der Zellen aus der G1 Phase in die S-G2 Phase verschiebt und ein G2 Arrest induziert wird. Dieser Arrest dauert nicht länger als 24 h an, dann beginnen die Zellen wieder zu proliferieren. Die Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden, zeigen bei der Zellzyklusanalyse ein anderes Bild. Direkt nach einer Behandlung ist kaum eine Veränderung im Gehalt der DNA, ähnlich bei UVB bestrahlten Zellen, nachzuweisen. Während der Kultivierung zeigen die Zellen eine deutliche Degradation der DNA, die sich in zunehmender subG1 sowie abnehmender G1 und S-G2 DNA widerspiegelt. Nach 24 h ist die DNA nahezu vollständig degradiert. Bei den bisherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei einer Behandlung mit einem Druck ≥ 300 MPa die Zellen nekrotische Eigenschaften aufweisen.

Mit Hitze nekrotisierte Zellen zeigen einen konstanten Anteil an DNA über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg. Erwartungsgemäß sollten hochdruckbehandelte Zellen ebenfalls in ihrem Zyklus arretiert werden, wenn der Druck ≥ 300 MPa beträgt. Allerdings zeigt die Abbildung 6.8, dass nach 24 h in Kultur kaum noch Zellen in der G1 oder der S-G2 Phase detektierbar sind. Die Geschwindigkeit der Degradation scheint von der Höhe des zur Behandlung eingesetzten Druckes abzuhängen, jedoch bereits nach 12 h vollständig abgeschlossen zu sein.

6.3 Spezielle hochdruckinduzierte Eigenschaften der behandelten Zellen

6.3.1 Degradation nukleärer DNA

Bei der Bestimmung des durch Druck induzierten Zelltodes ist auffällig, dass hochdruckbehandelte Zellen scheinbar von einem nekrotischen zu einem apoptotischen Phänotyp wechseln. Diese Wandlung ist biologisch nicht erklärbar und legt die Vermutung nahe, dass die DNA der Zellen degradiert wird. Diese Annahme soll mit der gelelektrophoretischen Untersuchung der nukleären DNA hochdruckbehandelter Zellen weiter verifiziert werden. Bei dem in Abbildung 6.9 dargestellten 0,8 %igem Agarosegel wurde eine Suspension von U937 Zellen mit Druck von 200 bis 400 MPa behandelt und anschließend wieder in Kultur genommen. Dann wurden direkt nach der Behandlung (0 h) und 24 h später Zellen aus der Kultur entnommen, die DNA wurde isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 6.9 zeigt (A) DNA von Zellen direkt nach der Behandlung, (B) DNA von Zellen 24 h nach der Behandlung, (C) DNA von Zellen 24 h nach der Behandlung mit 5 mM EDTA im Kulturmedium.

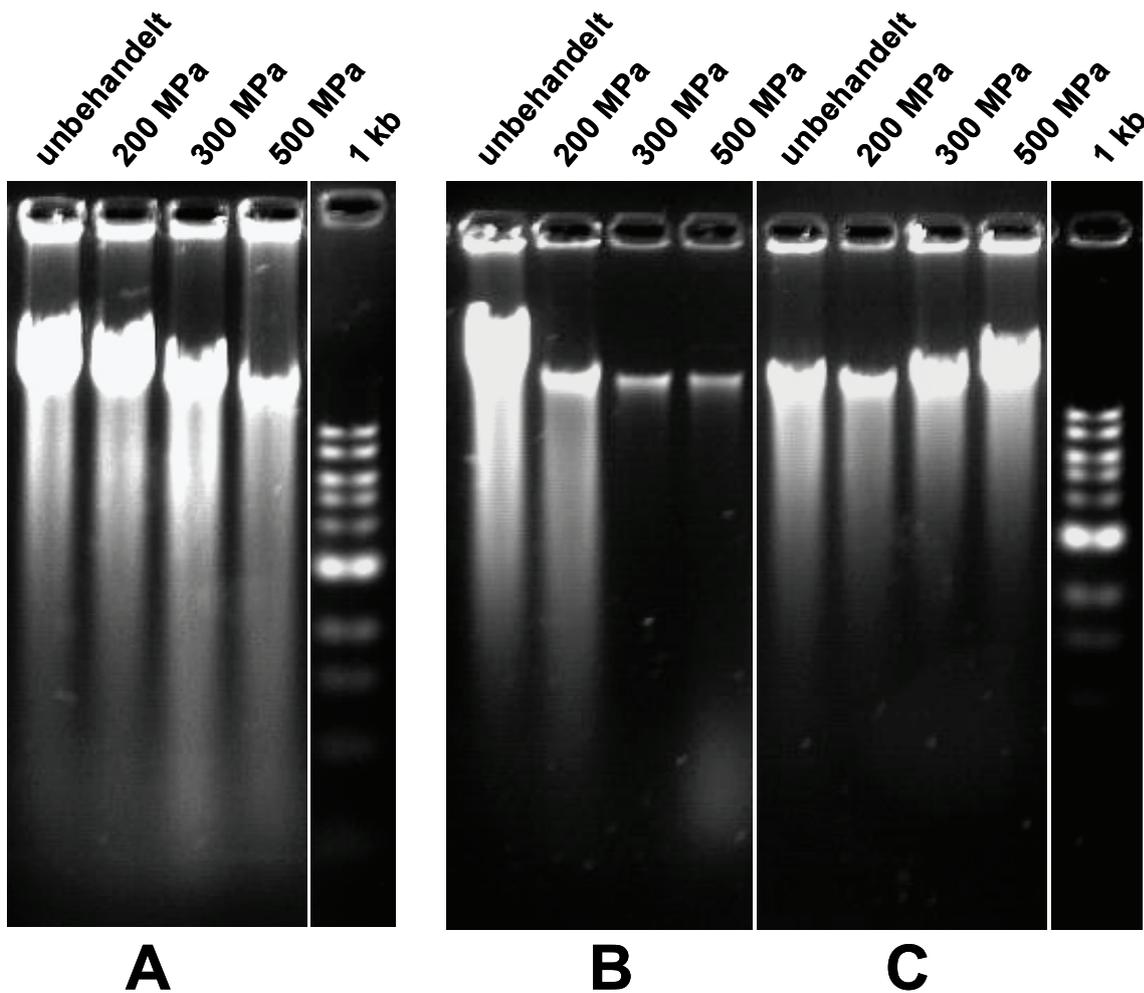


Abb. 6.9: Auftrennung der DNA hochdruckbehandelter Zellen auf einem Agarosegel

In Abbildung 6.9(A) ist bei unbehandelten und mit 200 MPa behandelten Zellen ein konstanter Anteil hochmolekularer DNA zu erkennen. Bei Zellen die mit ≥ 300 MPa behandelt wurden, kann schon direkt nach der Behandlung eine Degradation der DNA beobachtet werden, während bei mit 300 und 500 MPa behandelten Zellen nach 24 h kaum mehr hochmolekulare DNA detektierbar ist. In Kontrollen konnte die Degradation der DNA von Zellen, die mit 300 oder 500 MPa behandelt wurden, durch die Zugabe von 5 mM EDTA verhindert werden. Es kann deshalb geschlossen werden, dass die Degradation von aktiven DNasen abhängig ist. Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass die Degradation der DNA zeitabhängig ist und schon während der ersten sechs Stunden nach einer Behandlung auftritt. Daher wurden in einem separaten Experiment U937 Zellen mit Druck von ≥ 300 MPa behandelt, in Kultur genommen, wobei dem Zellkulturmedium noch vor der Behandlung PI zugefügt wurde. Anschließend wurden die behandelten Zellen während eines Zeitraumes von 30 bis 1400 min im Durchflusszytometer gemessen.

Dabei wurde der Mittelwert der PI Fluoreszenz (FL4) über alle Zellen bestimmt. In Abbildung 6.10 sind die Fluoreszenzintensitätswerte dargestellt. Die Fluoreszenzintensitätswerte zeigen den Mittelwert aus Triplikaten der Messung, die Fehlerbalken werden durch die Standardabweichung um den Mittelwert bestimmt.

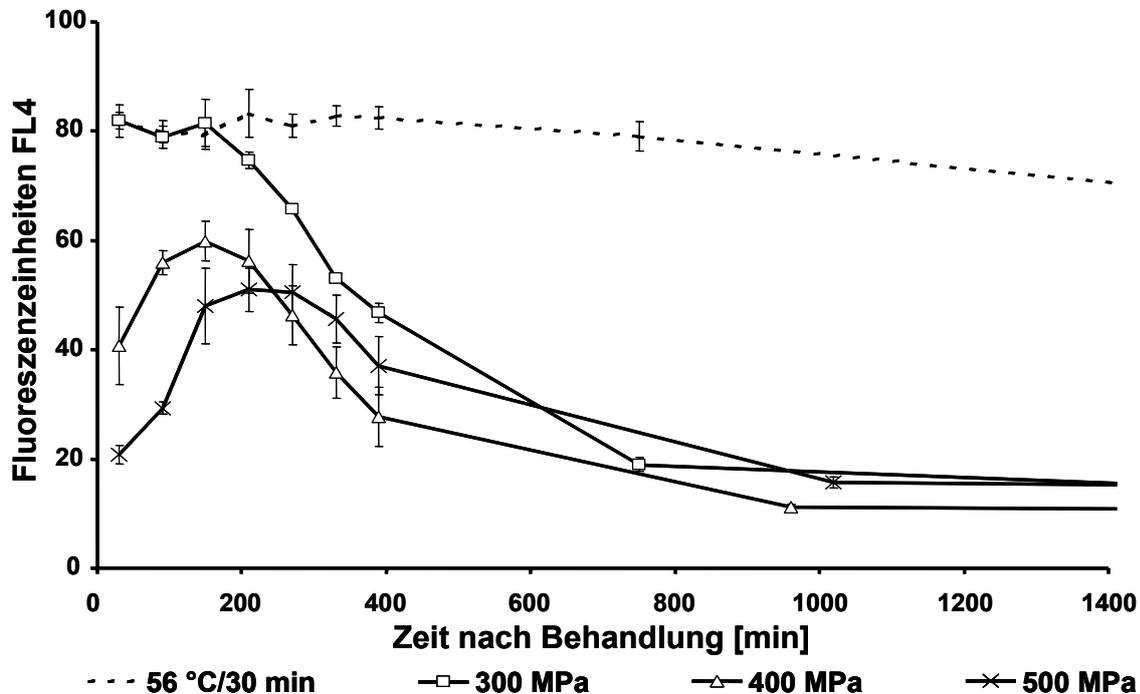


Abb. 6.10: Bestimmung der PI Fluoreszenz hochdruckbehandelter U937 Zellen

Auch bei diesem Experiment wurden als Kontrolle durch Hitze nekrotisierte Zellen mitgeführt, deren Fluoreszenzintensität sofort ein Maximum erreichte und über die gesamte Beobachtungsdauer nur marginal abnahm. Zellen, die einer Behandlung mit 300 MPa unterzogen wurden, zeigen bis 150 min nach der Behandlung dieselbe Intensität wie hitzenekrotisierte Zellen. Anschließend nimmt die Intensität jedoch schnell ab. Zellen, welche mit 400 und 500 MPa behandelt wurden, zeigten ein vollkommen anderes Bild. Hier war während der ersten drei Stunden nach Behandlung ein deutlicher Anstieg der Intensität zu beobachten, die das Maximum 150 min (400 MPa) bzw. 210 min (500 MPa) nach der Behandlung aufwies. Der interkalierende Farbstoff PI benötigt also nach einer Hochdruckbehandlung mehr als zwei Stunden, um die DNA der behandelten Zellen zu färben. Anschließend zeigt sich auch in diesem Experiment die Aktivität zellulärer DNasen, die die DNA ungerichtet in kleinste Bruchstücke degradieren, was den schnellen Abfall der PI-Fluoreszenz zur Folge hat. Ein Einfluss des Kulturmediums kann ausgeschlossen werden, da es in einer serumfreien Kultur und in Ringerlösung zur Degradation kommt (Daten nicht gezeigt).

6.3.2 Veränderung der Eigenschaften des Zytoplasmas

Bei der Untersuchung der Degradation nukleärer DNA wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz druckabhängig nicht sofort nach der Behandlung den gleichen Betrag erreicht wie bei hitzenekrotisierten Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der DNasen durch Komplexierung freien Kalziums durch Zugabe von EDTA zum Zellkulturmedium blockiert werden konnte. In Abbildung 6.11 ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität von PI nach einer Hochdruckbehandlung in Anwesenheit von EDTA dargestellt. Dazu wurde eine Suspension von U937 Zellen mit Druck von ≥ 300 MPa behandelt und wieder in Kultur genommen, wobei vor der Behandlung dem Zellkulturmedium 5 mM EDTA zugegeben wurde. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 1400 min nach der Behandlung die PI-Fluoreszenz im Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenzintensitätswerte zeigen den Mittelwert aus Triplikaten der Messung, die Fehlerbalken werden durch die Standardabweichung über dem Mittelwert bestimmt.

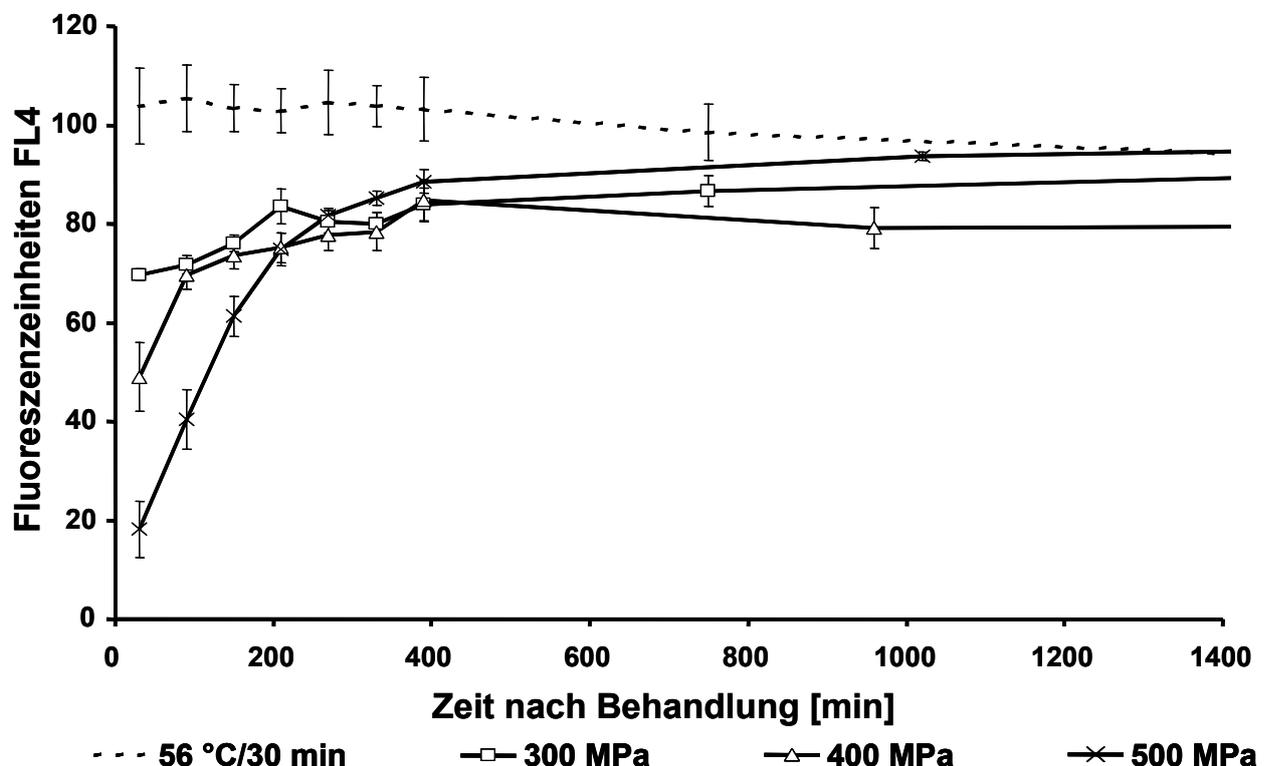


Abb. 6.11: Bestimmung der PI Fluoreszenz hochdruckbehandelter U937 Zellen

Aus der Abbildung 6.11 ist zu entnehmen, dass eine Behandlung mit 300 MPa zur Folge hat, dass die PI Fluoreszenz stetig bis zu dem Maximum zunimmt. Wenn die Zellen mit ≥ 400 MPa behandelt werden, liegen die Werte der PI-Fluoreszenz direkt nach der Behandlung deutlich niedriger als bei den hitzenekrotisierten Zellen. Um das Maximum der Fluoreszenzintensität zu erreichen, vergehen 400 min.

6.3.3 Minderung und Freisetzung zelluläre Gefahrsignale

Nekrotische Zellen verlieren die Integrität ihrer Membran und setzen verschiedene Gefahrsignale frei, die zu einer proinflammatorischen Antwort *in vivo* führen können (Andrews, 2005; Gallucci and Matzinger, 2001; Kanduc et al., 2002; Rock et al., 2005; Savill et al., 2002). Ein solches Gefahrsignal ist das zytoplasmatische Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) (Andrews, 2005). Es wurde nach Hochdruckbehandlung die absolute Konzentration von LDH im Kulturüberstand (Zellkulturüberstand LDH) und als Vergleich die durch Triton-Lyse aus den Zellen freigesetzte anschließend als Lösung vorliegende hochdruckbehandelte LDH (LDH Lösung) photometrisch bestimmt. Dann wurde der Prozentsatz der freigesetzten LDH zu Gesamt LDH berechnet und aufgetragen (Abb. 6.12). Wie man sieht, erfolgte die LDH Freisetzung bei allen Druckstufen mindestens 1 h verzögert, bei den mit 200 MPa behandelten Zellen sogar erst nach 24 h.

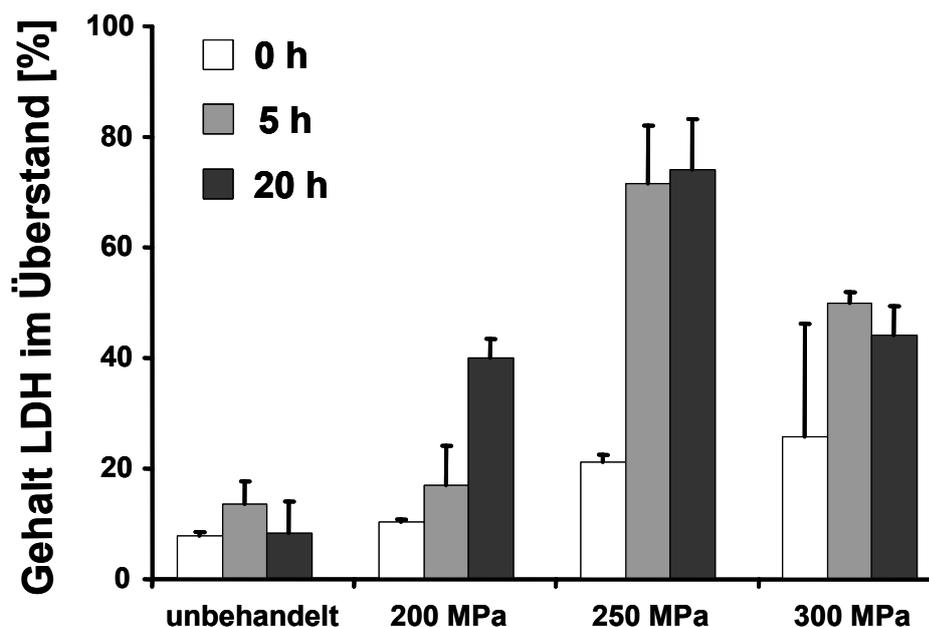


Abb. 6.12: Bestimmung des Gehalts von LDH im Zellkulturüberstand

Bei diesen Experimenten zeigte es sich zudem, dass die LDH in Lösung wesentlich drucksensitiver war als innerhalb einer Zelle (nicht gezeigt).

6.3.4 Veränderung der morphologischen Kriterien

Zur Bestimmung der morphologischen Eigenschaften wurden im Durchflusszytometer die Größe der Zellen, gemessen mit dem Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSc), und die Änderung der Granularität, gemessen mit dem Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSc), analysiert, indem nach einer Behandlung von U937 Zellen mit 100 bis 400 MPa und bekannten Zelltodinduktoren (Hitze und UVB) direkt nach der Behandlung (0 h) bis 48 h nach der Behandlung eine Probe der Zellen im Durchflusszytometer analysiert wurde. Aus den gewonnenen Daten konnte die Änderung der Morphologie nach der Behandlung graphisch dargestellt werden. Diese Änderung wird durch die Mittelwerte der Scatereinheiten festgelegt und in der Grafik dargestellt. Dabei bezeichnet Δ die FSc-Einheiten und \bullet die SSc-Einheiten. Die Werte geben den Mittelwert aus fünf Versuchen mit Standardabweichung wider.

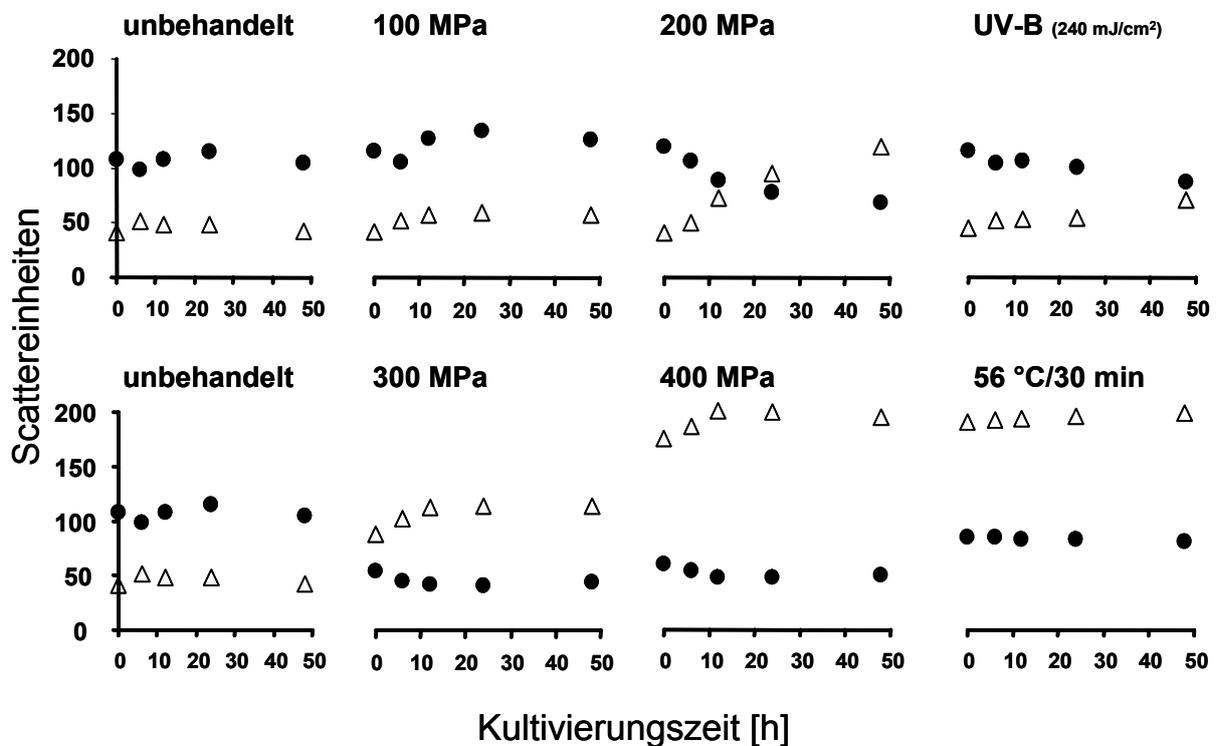


Abb. 6.13: Hochdruckinduzierte morphologische Änderungen

Die Morphologie von unbehandelten und von 100 MPa behandelten Zellen ändert sich nur marginal (Abbildung 6.13).

Veränderungen in der Morphologie sind erst zu erkennen, wenn Zellen mit 200 MPa behandelt werden. Hier sind nach einer Behandlung eine Abnahme der Größe sowie eine Zunahme der Granularität zu erkennen. Außerdem ist zu beobachten, dass Zellen, die durch thermische Behandlung inaktiviert wurden, sofort nach der Behandlung wesentlich granulärer und ein wenig kleiner als unbehandelte Zellen sind. Zellen, die mit 300 MPa behandelt wurden, zeigen direkt nach der Behandlung kleinere Größe als die unbehandelten und hitzenekrotisierten Zellen. Diese Verkleinerung der Zellen steigt weiter an. Die Granularität der behandelten Zellen ist deutlich geringer als bei hitzenekrotisierten Zellen. Dagegen verhalten sich die Zellen, welche mit 400 MPa behandelt wurden, ähnlich. Die Granularität nimmt auch im Laufe der Kultur zu, erreicht aber nach 48 h in Kultur den Wert, den hitzenekrotisierte Zellen bereits schon direkt nach der Behandlung besitzen. Die Größe nimmt auch bei diesen Zellen ähnlich wie bei den mit 300 MPa behandelten Zellen ab. Die Veränderung der Morphologie wurde auch im „Hochdruck-Mikroskop“ analysiert und exemplarisch in einer *in situ* Analyse in Abbildung 6.14 dargestellt. Für die Ausschnitte wurden charakteristische Punkte beim Druckauf- und -abbau sowie bei Beginn, Mitte und Ende der Haltezeit festgelegt. Die Bilder 1 bis 9 können mit Hilfe des Druckprofils zugeordnet werden. Die Betrachtung erfolgte im Phasenkontrast mit einem NPLAN 40x/0.55 COR PH2 Objektiv. Mit dem Pfeil sind die so genannten Pagoden gekennzeichnet (Verbindungen der Zellmembran zum Untergrund).

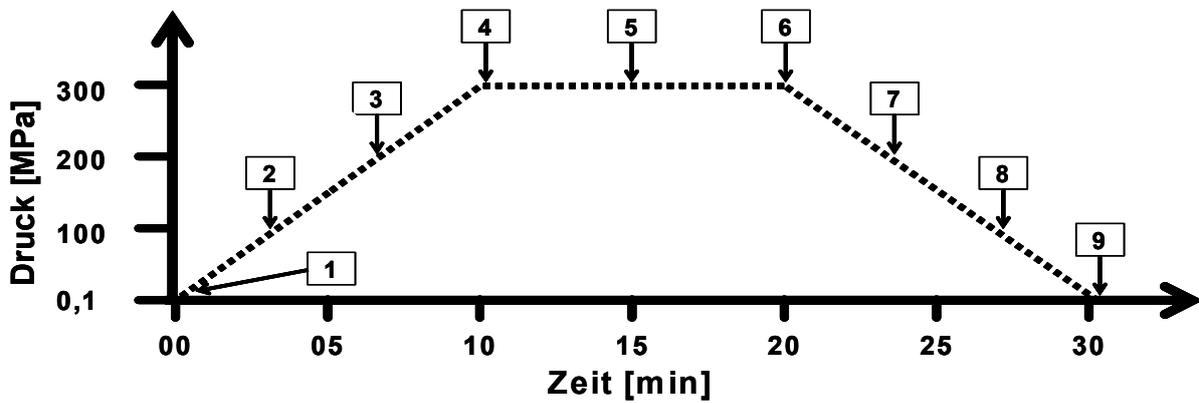
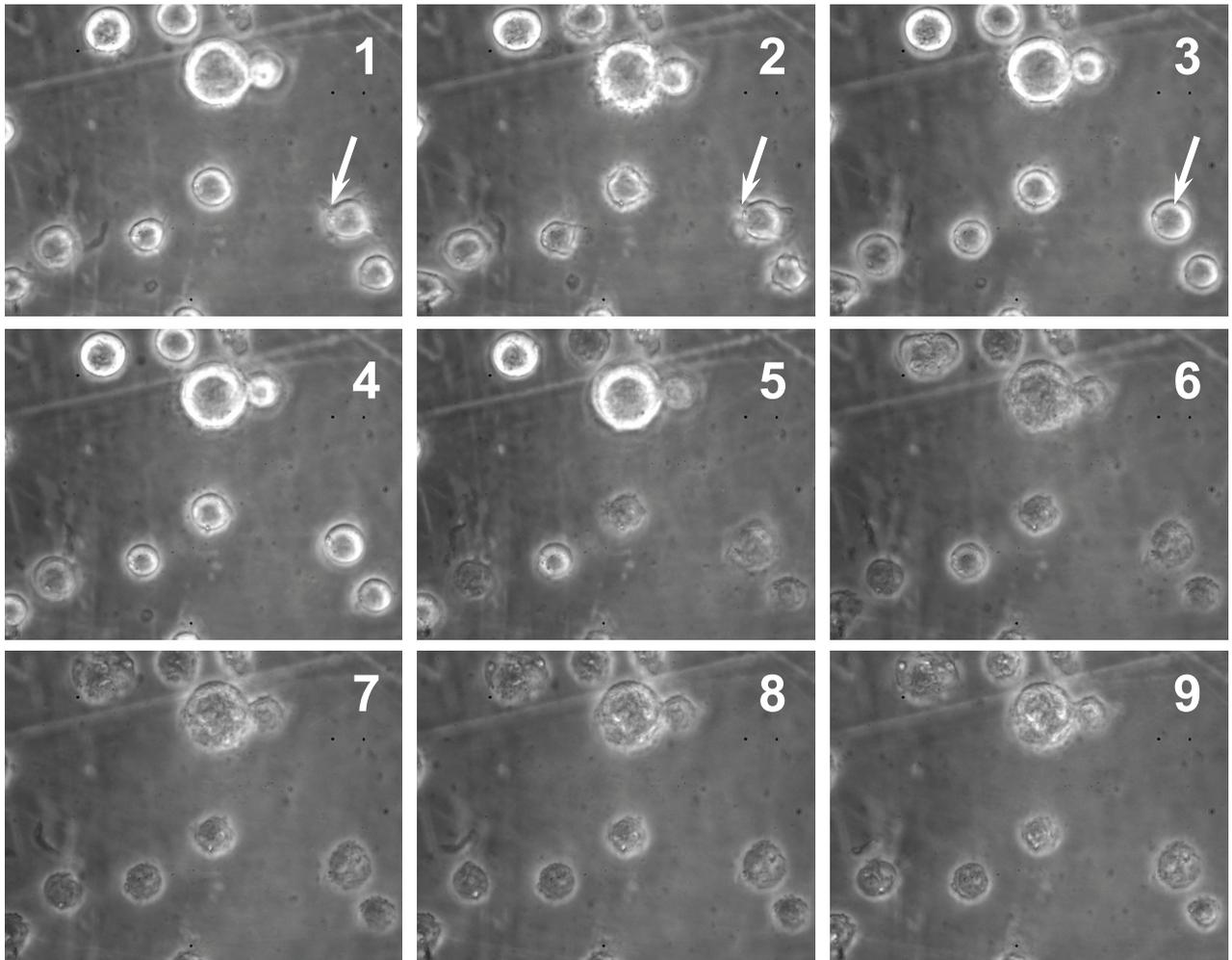


Abb. 6.14: In situ Analyse von hochdruckbehandelten Zellen

Die Aufnahmen zeigen, dass schon während des Druckaufbaus die Morphologie der Zellen sich ändert. So werden im Laufe des Druckaufbaus die Pagoden zurückgebildet, und die Membranen der Zellen bei 100 MPa erscheinen sehr rau mit der Eigenschaft, das Licht stärker brechen zu können. Bei einer weiteren Drucksteigerung verschwindet dieser Effekt wieder. Bei einem Druck von 200 MPa zeigen die Zellen einen nahezu vollkommenen Kreisquerschnitt. Es wird angenommen, dass die Zelle in die Form einer Kugel gezwungen wird, die die druckstabilste geometrische Form darstellt (Breuer, 1991). Bei Erreichen von 300 MPa zeigen viele Zellen nekrotische Eigenschaften, die durch einen Verlust des Kontrasts im Zytoplasma und der Zytoplasmamembran erkannt werden können. Während der Druckhaltezeit werden alle Zellen nekrotisch, und beim anschließenden Druckabbau sind keine Veränderungen mehr zu erkennen.

6.4 Immunogenität hochdruckbehandelter Zellen *in vivo*

Eine Vakzinierung mit inaktiven Tumorzellen zur Krebstherapie ist nur sinnvoll, wenn die hochdruckbehandelten Zellen noch immunogene Eigenschaften aufweisen. Als Nachweis für die durch die Zellen induzierte Immunantwort wurde der Antikörpertiter im Serum immunisierter Mäuse bestimmt. Dazu wurden weibliche C57/Bl6 Mäuse mit hochdruckbehandelten und unbehandelten (mock) Zellen intraperitoneal immunisiert. Anschließend wurde Serum gewonnen und mittels indirekter Immunfluoreszenz der Antikörpertiter bestimmt. Bei der Immunisierung wurden Raji Zellen verwendet, da diese Zellen bei vielen Krankheitsmodellen verwendet werden und dafür bekannt sind, sich der Immunantwort zu entziehen. In Abbildung 6.15 ist der Antikörpertiter in Einheiten gegen die immunisierten Zellen über der jeweiligen Behandlung aufgetragen. In der linken Spalte (Ringer) ist der Gehalt an Antikörpern dargestellt, den das Serum der Mäuse enthält, die nur mit Ringer-Lösung immunisiert wurden. Dabei stellt im Diagramm jeder Kreis ein einzelnes Tier dar.

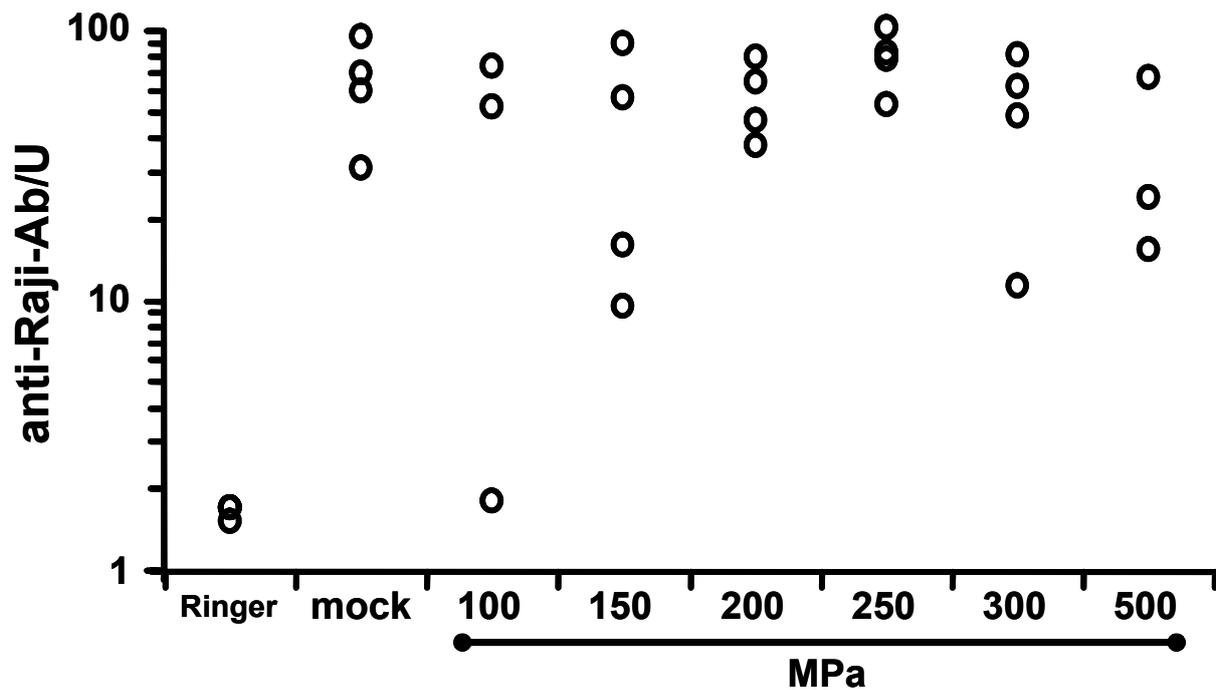


Abb. 6.15: Analyse der humoralen Immunantwort gegen hochdruckinaktivierte Raji Zellen *in vivo* (nach Korn et al., 2004).

Im Vergleich zu Tieren, die nur mit Ringer Lösung behandelt wurden, ist zu erkennen, dass die Tiere, welche unbehandelte Raji Zellen injiziert bekamen, einen wesentlich höheren Titer an Antikörpern gegen die Raji Zellen haben. Die Tiere, die mit unbehandelten Raji Zellen immunisiert wurden, werden als Positivkontrolle definiert. Die meisten Tiere, denen hochdruckbehandelte Zellen injiziert wurden, zeigen eine ähnliche Antikörperproduktion wie die Positivkontrolle. Besonders auffällig sind dabei die Tiere die mit Zellen immunisiert wurden, die mit 200, 250 und 300 MPa behandelt wurden. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, dem Immunsystem als gutes Antigen zu dienen. Speziell Zellen, die direkt nach der Behandlung bereits hinreichend gut inaktiviert sind (Behandlung mit 300 bis 500 MPa) eignen sich besonders für eine Vakzinierung. Es zeigt sich also, dass eine inaktivierende Hochdruckbehandlung durchaus die Immunogenität der Zellen erhalten kann.

7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Frage zu klären, ob und in wie weit die Hochdrucktechnologie geeignet ist, eine autologe Zellvakzine herzustellen. Was passiert mit Zellen, die hohem hydrostatischen Druck ausgesetzt sind? Über das Verhalten von Säugetierzellen während und nach einer Hochdruckbehandlung gibt es bisher nur wenige Quellen. In ersten Untersuchungen der Arbeitsgruppe, zu der der Autor gehörte war bereits gezeigt worden, dass Tumorzellen, wie auch primäre Fibroblasten und Osteoblasten, durch Behandlung mit hohem hydrostatischen Druck (≥ 250 MPa) weitgehend abgetötet werden (Bluemelhuber et al., 2003a; Diehl et al., 2004; Diehl et al., 2003). Allerdings blieben immer noch Fragen offen. So wurde bei den genannten Untersuchungen nicht kontrolliert, ob die Zellen auch in Langzeitkulturen bzw. *in vivo* sicher inaktiviert waren. Weiterhin wurde nur mittels Trypanblaufärbung zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden, eine detaillierte Analyse des induzierten Zelltodes war jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchungen.

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Tumorzellen durch Hochdruckbehandlung sicher inaktiviert werden können. Es wurde gezeigt, dass abhängig vom Druck, mit dem die Säugetierzellen behandelt wurden, verschiedene Formen des Zelltodes induziert werden. Wir beobachteten bisher nicht beschriebene Eigenschaften hochdruckbehandelter Zellen, die bei Induktion des Zelltodes durch Bestrahlung oder Hitze nicht detektierbar sind und die Immunogenität hochdruckbehandelter Zellen *in vivo* positiv beeinflussen.

7.1 Inaktivierung humaner Tumorzellen durch hohen hydrostatischen Druck *in vitro*

Bisherige Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass Säugetierzellen durch Druck abgetötet werden können (Atanasiu and Basset, 1953; Diehl et al., 2003). Um die Inaktivierungsleistung von hydrostatischem Hochdruck detaillierter untersuchen zu können, wurden verschiedene Tumorzelllinien mit einem Druck zwischen 100 und 500 MPa behandelt, und anschließend wurde deren Vitalität bestimmt. Ein Druck größer 300 MPa war ausreichend, um die Vitalität der Tumorzellen direkt nach Behandlung um mehr als 95 % zu mindern. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von Diehl et al., die zeigen, dass Säugetierzellen durch Hochdruckbehandlung von 300 MPa abgetötet werden. Es blieb aber die Frage ungeklärt, ob alle Zellen dabei die Fähigkeit zur Proliferation verloren hatten. Da den Untersuchungen zur Ermittlung der Vitalität nur eine Trypanblaufärbung zugrunde lag (Diehl et al., 2003), stellt sich zudem die Frage, ob die Membranen der Zellen durch die Druckbehandlung lediglich ihre Konformation geändert hatten (Winter, 2002; Winter and Dzwolak, 2004) und nur kurzfristig für Farbstoffe wie Trypanblau (Lebend-Tot-Nachweis) durchlässig werden. Anschließend könnte der Membranschaden wieder repariert werden, und die Zellen können überleben und weiter proliferieren (Andrews, 2005). Auch ein falsch positives Ergebnis des Tests ist vorstellbar. Zellen, die unmittelbar nach Behandlung noch vital erscheinen, können bereits auf dem Weg in den programmierten Zelltod sein. Der Trypanblau-Test ist auch bezüglich des Probendurchsatzes limitiert, da er im Mikroskop ausgelesen wird. Mit Hilfe von Zellkultur nach Behandlung und von Durchflusszytometrie zum Bestimmen des PI Ausschlusses können innerhalb weniger Minuten bis zu 10 Mio. Zellen einzeln analysiert werden, was zu einer statistisch sicheren Aussage über Leben und Tod nach einer Hochdruckbehandlung führt.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit mittels eines Grenz-Konzentrations Verfahrens und einer Langzeitkultur zeigen, dass eine Behandlung mit einem Druck ≥ 300 MPa ausreicht, um Tumorzellen langfristig sicher zu inaktivieren. Wie aus den Experimenten mit Mikroorganismen und Viren zu erwarten war, sind somit auch Tumorzellen suszeptibel gegenüber hohem hydrostatischen Druck (Cheftel, 1992; Ishimaru et al., 2004; Ludwig, 2003).

Einige Zellen, die direkt nach Behandlung mit einem Druck zwischen 150 und 250 MPa noch eine vitale Morphologie aufwiesen starben bei der anschließenden Kultur innerhalb der ersten Woche. Zur Klärung der zugrunde liegenden biologischen Zelltod-Mechanismen nach Hochdruckbehandlung wurden Zellvitalitäts-Untersuchungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Die mit diesem Gerät detektierten morphologischen Veränderungen geben dabei Aufschluss über die Art des induzierten Zelltodes (Elstein and Zucker, 1994; Hagenhofer et al., 1998). Wir stellten die Hypothese auf, dass durch Behandlung mit einem Druck zwischen 150 und 250 MPa programmierter Zelltod (Apoptose) induziert wird. Da dieser für die Ausführung mehrere Stunden benötigt, könnte so die zeitabhängige Abnahme der vitalen Zellen nach Hochdruckbehandlung erklärt werden (Hengartner, 2000; Kanduc et al., 2002; McConkey, 1998).

7.2 Hoher hydrostatischer Druck induziert verschiedene Wege des Zelltods in Säugetierzellen.

Bisher hatten wir gezeigt, dass eine Behandlung mit hohem hydrostatischem Druck Säugetierzellen inaktiviert. Dabei wurde auffällig, dass unterschiedlicher Behandlungsdruck die Art und den Ablauf des Zelltodes beeinflusst. Dabei kann prinzipiell zwischen dem genetisch determinierten, apoptotischen, und dem plötzlichen, nekrotischen, Zelltod unterschieden werden. Diese Differenzierung ist für die vorliegenden Untersuchungen insoweit von Interesse, da diese Formen des Zelltodes typischerweise eine unterschiedliche Immunogenität aufweisen. Apoptotisch sterbenden Zellen ohne zusätzliches Gefahrensignal erzeugen *in vivo* meist keine Immunantwort – oft sind sie sogar immunsuppressiv (Voll et al., 1997). Im Gegensatz dazu induzieren nekrotische Zellen oft eine gute Immunantwort (Bonnotte et al., 1998; Melcher et al., 1999; Ponner et al., 1998; Voll et al., 1997). Die Immunogenität der behandelten Zellen spielt für eine Vakzinierung eine unabdingbare Rolle und ist essentiell für deren Erfolg (Todryk, 2002; Ward et al., 2002).

Es wird in dieser Arbeit gezeigt, dass abhängig vom Behandlungsdruck die Zellen auf unterschiedliche Art und Weise sterben. Es wurden deshalb charakteristische morphologische und biochemische Änderungen der Apoptose und Nekrose an hochdruckbehandelten Zellen analysiert und mit alternativen Auslösern des Zelltodes verglichen.

Zur Analyse dienen die Färbung der Membran apoptotischer Zellen mit AnnexinV-FITC und die Diskriminierung von nekrotischen Zellen mittels Propidium Jodid. Bei dieser Untersuchung wurde bestätigt, dass eine Behandlung mit einem Druck ≤ 100 MPa die Zellen nicht schädigt und diese nach einer kurzen lag-Phase weiter proliferieren können. Wenn mit 200 MPa behandelt wird, zeigt sich ein Einfluss des Druckes, der nicht sofort nach der Behandlung auffällig wird, da zu diesem Zeitpunkt noch alle Zellen morphologisch und nach AnnexinV-FITC/PI Färbung vitale Charakteristika aufweisen. Die Exposition von Phosphatidylserin (PS) durch Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden, erfolgt jedoch in der anschließenden Zellkultur. Das geschah bereits ca. 6 h nach der Behandlung. Anschließend schreitet der Prozess der Apoptose schnell voran und tötet die Zellen innerhalb von 48 h effektiv ab (Korn et al., 2004). Bei der Analyse der druckinduzierten Apoptose beobachteten wir, dass der Prozess deutlich schneller vorangeht als bei UVB-induzierter Apoptose, bei der erst nach 12 h charakteristische Änderungen nachweisbar sind. Die Analyse der behandelten Zellen mit der AnnexinV-FITC/PI Färbung zeigt außerdem, dass der Anteil an sekundär nekrotischen Zellen, die als Folge von Apoptose *in vitro* auftreten, nach der Behandlung schneller ansteigt als bei UVB induzierter Apoptose.

Werden Zellen mit einem Druck ≥ 300 MPa behandelt, zeigen diese primär einen Verlust der Integrität der Zytoplasmamembran und werden aus diesem Grund als primär nekrotische Zellen eingestuft (Kanduc et al., 2002). Zusätzlich konnte bei *in situ* Analysen mittels der HPDS (Hartmann Pfeiffer Dornheim Sommer) Sichtzelle (Hartmann et al., 2004; Hartmann et al., 2003) beobachtet werden, dass hochdruckinduzierte Nekrose nicht nur vom Druck sondern auch von der Haltezeit abhängt (Frey et al., 2006). Werden die Daten der AnnexinV-FITC/PI Färbung bei der hochdruckinduzierten Nekrose analysiert, zeigen sich Auffälligkeiten, die bei durch Hitze induzierter Nekrose nicht zu beobachten sind.

So scheinen die hochdrucknekrotisierten Zellen eine „Reversion des Phänotyps“ von Nekrose zu Apoptose zu vollziehen, indem nach Behandlung alle Zellen zwar AnnexinV-FITC positiv sind, der Anteil der PI positiven Zellen jedoch stetig abnimmt. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass die nekrotischen Zellen so stark geschädigt wurden, dass sie anschließend vollständig degradiert werden und nicht mehr durch das Durchflusszytometer erfasst werden können. Allerdings konnte diese Hypothese falsifiziert werden, da die Auswertung der Anzahl der detektierten Ereignisse zeigte, dass diese konstant blieb, und somit keine Ereignisse durch Degradation verloren gehen. Die Erklärung für das Erscheinen „pseudoapoptotischer“ Zellen wird in Kapitel 7.3 weiter behandelt.

Eine nekrotische Zelle ist durch eine ionenpermeable Zytoplasmamembran definiert, während die Membran apoptotischer Zellen lange Zeit ionenselektiv bleibt (Franz et al., 2007). Zellen, die ohne Anzeichen von Apoptose ihre Membranintegrität verlieren, gelten als primär nekrotisch. Solche, deren Membranen in der Spätphase der Apoptose ihre Ionenselektivität verloren haben, werden als sekundär nekrotisch bezeichnet. Die Empfindlichkeit der Zytoplasmamembran gegenüber Kurzzeitsäurebehandlung gilt als ein sehr frühes Ereignis während des apoptotischen Sterbens einer Zelle und wird aus diesem Grund für die Detektion frühapoptotischer Zellen eingesetzt. Dabei werden durch die Säurebehandlung Zuckerstrukturen freigesetzt, die von dem FITC markierten Lektin NPn gebunden werden (Heyder et al., 2003; van Engeland et al., 1997). Bei der Messung der Säurelabilität der Zellen wurde beobachtet, dass die Membranen von Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden im Laufe der Rekultivierung labil gegenüber pH-Wert Änderungen werden und somit einen frühapoptotischen Phänotyp aufweisen. Diese Transition hat im Vergleich zu UVB behandelten Zellen einen schnelleren Verlauf. Bei der Analyse der apoptotischen Zellen wird ein Anteil an Zelle detektiert, der eine FITC Fluoreszenz von ≥ 50 Fluoreszenzeinheiten aufweisen („hochpositive“ Ereignisse). Diese hohe Fluoreszenz weist auf den Aufbruch von inneren Strukturen wie ER und Golgi-Apparat hin, was vor allem bei nekrotischen Zellen zu sehen ist (Franz et al., 2006; Heyder et al., 2003). Die beobachtete Zunahme an „hochpositiven“ Ereignissen bei Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden, kann potentiell auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden.

Zum einen werden immer mehr Zellen sekundär nekrotisch und verlieren die Integrität der Zytoplasmamembran, zum anderen könnten durch Hochdruckbehandlung auch das ER und der Golgi-Apparat zerstört werden (Wu et al., 2001). Der Anteil der „hochpositiven“ Ereignisse zeigt sich bei hitzenekrotisierten Zellen sofort nach der Behandlung und liegt bei annähernd 100 %. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, welche mit ≥ 300 MPa behandelt wurden eine Abnahme der „hochpositiven“ Ereignisse. Obige Überlegungen legen die Vermutung nahe, dass die intrazellulären Strukturen wie ER und Golgi durch nicht inaktivierte Enzyme degradiert werden (Balny, 1996; , 1999; Balny et al., 2002).

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) gibt Aufschluss über den Energiehaushalt der behandelten Zellen (Petit et al., 1995). Der Energiehaushalt wiederum bestimmt über Leben und Tod der Zellen und nimmt während der Apoptose ab, während bei nekrotischen Zellen das MMP gegen Null geht (Green and Kroemer, 1998; Hengartner, 2000). Bei Behandlungen mit 200 MPa ist ein ungestörtes MMP zu beobachten, das für den aktiven Prozess der Apoptose zur Verfügung gestellt werden kann (Hengartner, 2000). Dagegen zeigt sich nach einer Behandlung mit einem Druck ≥ 300 MPa ein Zusammenbruch des Membranpotentials und der Energieversorgung, die es der Zelle unmöglich macht, energieabhängige Prozesse auszuführen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass in Zellen, die mit einem Druck ≥ 300 MPa behandelt wurden, Zellorganellen zerstört werden. Allerdings konnte auch durch *in situ* Beobachtungen nicht geklärt werden, welcher Effekt zuerst eintritt: Verlust der Membranintegrität oder die Zerstörung des MMP (Frey et al., 2006).

Die Bestimmung des DNA Gehalts einer Zelle gibt nicht nur Auskunft über den Zellzyklus, sondern auch über das Sterben der Zelle, da beim Prozess der Apoptose durch nukleäre DNasen die DNA in definierte Bruchstücke degradiert wird. Diese Bruchstücke können im Durchflusszytometer als subG1 DNA erfasst werden (Nicoletti et al., 1991). Die Analyse des DNA Gehalts von Zellen, die mit 200 MPa behandelt wurden, ergibt eine Zunahme an Zellen, die subG1 DNA enthalten und bestätigt die bereits gemachten Beobachtungen über die hochdruckinduzierte Apoptose. Als Einschränkung ist zu werten, dass die Beobachtungen nur bei humanen Tumorzelllinien erfolgten (Frey et al., 2004; Korn et al., 2004).

Wird nun der DNA Gehalt von Zellen beobachtet, die mit einem Druck ≥ 300 MPa behandelt wurden, so kann festgestellt werden, dass auch hier eine Zunahme an Zellen mit subG1 DNA erfolgt. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den bekannten Charakteristika nekrotischer Zellen, die durch alternative Methoden erzeugt worden sind (Kanduc et al., 2002; McConkey, 1998; McHugh and Turina, 2006). Weiterhin kann beobachtet werden, dass die als Kontrolle für nekrotische Zellen analysierte Probe der hitzeinaktivierten Zellen ebenfalls keine Zunahme an subG1 DNA zeigt. Somit kann gefolgert werden, dass in hochdruckbehandelten nekrotischen Zellen die DNA durch enzymatische Vorgänge degradiert wird.

7.3 Hochdruckinduzierte Veränderungen der Kompartimentierung behandelter Zellen

Die Untersuchung der hochdruckinduzierten Formen des Zelltodes zeigen Besonderheiten, die bei etablierten Zelltodauslösern nicht auftreten. Dabei ergab die Analyse des Zelltodes mit der AnnexinV-FITC/PI Färbung, dass Zellen, die mit ≥ 300 MPa behandelt wurden, direkt nach der Behandlung einen nekrotischen Phänotyp zeigen und anschließend wieder in einen apoptotischen Phänotyp konvertieren. Innerhalb einiger Stunden Kultur zeigten sie kein PI-Signal mehr, blieben aber AnnexinV-FITC positiv. Scheinbar war die Membran der Zellen wieder dicht gegenüber PI. Der Wechsel einer Zelle von einem nekrotischen in einen apoptotischen Phänotyp ist jedoch biologisch nicht erklärbar und höchst unwahrscheinlich (Kanduc et al., 2002). Es ist zwar möglich, dass Zellen, z.B. durch Schädigung durch Pathogene, durch eine kurze Schädigung der Membranen temporär durchlässig für Farbstoffe wie PI werden und anschließend diesen Schaden wieder reparieren (Andrews, 2005). Ein solcher Vorgang könnte auch hier für den Verlust der PI Fluoreszenz bei den hochdruckbehandelten Zellen verantwortlich sein. Dagegen spricht jedoch, dass direkt nach der Hochdruckbehandlung das MMP dieser Zellen zerstört ist und somit keine energieabhängigen Prozesse in der Zelle ablaufen können. Die Analyse der Kerne der hochdrucknekrotisierten Zellen zeigte dann, dass das Chromatin hochgradig degradiert war und somit das reduzierte PI-Signal erklärt werden konnte. Die Chromatindegradation war dabei von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen abhängig.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob und in wie weit die Degradation der DNA bei einer Vakzinierung von Vorteil oder Nachteil ist. Zwar gibt es einige Ansätze zur Tumorheilung, bei denen mit DNA vakziniert wird (Abou-Jawde et al., 2003; Antonia et al., 2004; Finn, 2004), aber es werden bei derartigen Therapieansätzen ausschließlich bestimmte Regionen der DNA verwendet, die für Tumorantigene kodieren und den Immunzellen präsentiert werden sollen. Bei einer Vakzinierung mit inaktivierten Tumorzellen würde eine Degradation der zellulären DNA eher einen Vorteil darstellen, da die degradierte DNA nicht mehr in der Lage ist, antinukleäre Autoantikörper und damit eine Autoimmunerkrankung auszulösen (Gaipf et al., 2004; Herrmann et al., 2000; Wellmann et al., 2005). Auch die Inaktivierung der Tumorzellen wird durch die Chromatindegradation unterstützt.

Es konnte auch gezeigt werden, dass Zellen, die mit ≥ 300 MPa behandelt wurden, nicht sofort nach der Behandlung dieselbe PI-Fluoreszenzintensität aufweisen wie hitzenekrotisierte Zellen. Vielmehr beobachteten wir, dass bei Behandlungen mit 400 und 500 MPa die Zellen mehr als 6,5 h benötigen, um dieselbe Fluoreszenzintensität zu erreichen. Es kann vermutet werden, dass die Zellmembranen zwar ihre Ionenselektivität verloren haben, aber dass eine durch die Druckbehandlung ausgelöste Gelierung des Zytoplasmas und des Nukleoplasmas die Diffusion des PI inhibieren. Weitere Beobachtungen *in situ* zeigten, dass PI auch während einer Druckbehandlung durch die permeable Membran hindurch treten und auch unter Druck in die DNA interkalieren kann (Frey et al., 2006). In weiteren Experimenten beobachteten wir eine retardierte Freisetzung von Gefahrensignalen (LDH) aus der hochdrucknekrotisierten Zelle, was durch eine verlangsamten Diffusion des PI erklärbar ist. Da das Zytoplasma aus einer hochkonzentrierten, flüssigen Proteinlösung besteht (Alberts, 1995), deren Proteinkonzentration durch Aufbruch intrazellulärer Strukturen noch erhöht wird, kann sich durch die Druckbehandlung ein stabiles Proteingel bilden. Dieses vermag das PI-Molekül, mit einer Molekularmasse von 668,39 g/mol und die LDH an der Permeation durch das Zytoplasma hindern. Die Bildung eines Proteingels im Zytoplasma hochdruckbehandelter Zellen liegt nahe, da der Vorgang der Gelierung von Proteinen durch Hochdruck schon mehrfach beobachtet und beschrieben wurde (Heremans and Smeller, 1998; Kunugi et al., 2005). Die Ausbildung eines stabilen Proteingels im Zytoplasma der hochdruckbehandelten Zellen bildet einen weiteren Vorteil bei einer Vakzinierung.

Die hohe Viskosität des Zytoplasmas entlässt intrazelluläre Gefahrensignale nur langsam aus dem Zytoplasma. Diese Depotfunktion stellt eine wichtige Eigenschaft der Vakzine dar, da so die Wirkdauer der Vakzine, bei gleichzeitiger Erhöhung der Immunogenität, verlängert werden kann (Janeway et al., 2001; Pfitzner et al., 2000; Playfair and Chain, 2001).

7.4 Reaktion des Immunsystems auf hochdruck-inaktivierte Tumorzellen

Eine Behandlung von Zellen mit hohem hydrostatischem Druck hat multiple Auswirkungen auf das zelluläre System. Die gefundenen Eigenschaften lassen den Schluss zu, dass nach Hochdruckbehandlung die Zelle einen Partikel darstellt, der komplett inaktiv ist, dessen DNA degradiert wurde und dessen Zytoplasma eine gelähnliche Struktur aufweist, die in der Lage ist, Moleküle an ihrer Permeation aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein zu hindern. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine Immunreaktion gegen hochdruckbehandelte, xenologe Zellen induziert werden konnte. Gemessen wurde der Antikörpertiter im Serum der immunisierten Mäuse gegen die immunisierten Zellen. Die Immunreaktion auf Zellen, die mit 250 MPa behandelt wurden ist der Mischung aus einem Teil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen zuzuschreiben, da diese Mischung besonders dafür geeignet sind, das Immunsystem zu aktivieren (Andrews, 2005; Sauter et al., 2000). Erstaunlich ist, dass Zellen, die mit einem Druck ≥ 300 MPa behandelt wurden, ebenfalls über eine gute Immunreaktion *in vivo* verfügen. Die Beobachtungen zeigen, dass diese Zellen besser als „nekrotische Partikel“ zu beschreiben sind, die jegliches Potential zur Replikation verloren haben. Gerade diese Zellen könnten also einen guten Ansatz für eine Tumorstoffimpfung liefern, da durch die Gelierung des Zytoplasmas länger anhaltend Gefahrensignale freigesetzt werden, die ein immunologisches Gedächtnis schaffen können, das eine effektive Abwehr gegen den Tumor ermöglicht (Andrews, 2005; Rosenberg et al., 2004; Sauter et al., 2000; Soiffer et al., 2003; Steinman and Mellman, 2004).

7.5 Ausblick auf die Weiterentwicklung einer durch hydrostatischen Hochdruck erzeugten Tumorstoffimpfung

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen leitet sich folgende Hypothese ab:

Die hochdruckbehandelten Zellen verlieren bei geeigneter Druckbehandlung die Fähigkeit zu proliferieren. Die Freisetzung intrazellulärer autologer Gefahrensignale nach einer Hochdruckbehandlung bestimmt über das inflammatorische Mikromilieu die lokale Entzündungsreaktion und hat so einen direkten Einfluss auf die Immunantwort. Dabei kann durch die Hochdruckbehandlung das Zytoplasma derart verändert werden, dass die fluide Masse in einen gelähnlichen Zustand überführt wird, der eine zeitabhängige und lang anhaltende lokale Zugänglichkeit der Gefahrensignale ermöglicht. Durch die Degradation der DNA und die Konservierung des Zytoskeletts können hochdruckbehandelte Zellen eine Depot- und Retardfunktion ausführen, die wesentlichen Einfluss auf eine effiziente Immunreaktion gegen einen Tumor haben.

Diese Arbeit sollte Grundlagen liefern, durch Hochdruckbehandlung eine Tumorstoffimpfung zu erzeugen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass hochdruckbehandelte Zellen Eigenschaften besitzen, die für Ganz-Zell-Tumorstoffimpfung vorteilhaft sind (Berzofsky et al., 2004; Block et al., 2002; Gallucci et al., 1999; Mellmann, 2006; Rosenberg et al., 2004; Sauter et al., 2000; Todryk, 2002; Ward et al., 2002). Um diese These zu festigen, müssen jedoch weitere *in vivo* Experimente durchgeführt werden, bei denen die Immunogenität der hochdruckbehandelten Zellen genauer aufgeklärt wird. Dabei sollte analysiert werden, ob und wie antigenpräsentierende Zellen die hochdruckbehandelten Zellen erkennen und phagozytieren und welche dieser Zellen an der Immuninduktion beteiligt sind. Weiterhin sollte mit hochdruckbehandelten Zellen eine Therapie eines manifestierten Tumors im Mausmodell durchgeführt werden, wobei das Augenmerk auf die Regression des Tumors gelenkt werden sollte.

8 Zusammenfassung

Krebs ist nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Trotz verschiedener Ansätze zur Heilung maligner Erkrankungen kann bei den heute eingesetzten Therapien meist keine Heilung erreicht werden, obwohl manche Therapieansätze die Lebenserwartung der Krebspatienten signifikant verlängern. Ein viel versprechender Ansatz bei der Heilung maligner Erkrankungen ist die Vakzinierung von Krebspatienten mit inaktivierten, autologen Tumorzellen. Die Anforderungen an eine solche Tumorzellvakzine sind: (I) die komplette Inaktivierung der Tumorzellen, um ein vakzineassoziiertes Metastasieren zu vermeiden, (II) die Erhaltung der Immunogenität der injizierten Zellen, um das Immunsystem des Patienten gegen den Tumor zu richten, und (III) die Vereinbarkeit mit bestehenden gesetzlichen Rahmenbedingungen, wie dem deutschen Arzneimittelgesetz. Diese Anforderungen konnten jedoch von bisher verwendeten Verfahren nicht gleichzeitig erfüllt werden. Daher soll zur Inaktivierung von Tumorzellen zur Vakzinierung von Krebspatienten die Hochdrucktechnologie eingesetzt werden, die ein mobiles, kostengünstiges und legalisierbares Verfahren zur Erzeugung von Tumorzellvakzinen darstellt. Es ist bekannt, dass hoher hydrostatischer Druck (> 100 MPa) Mikroorganismen und Viren hemmen und inaktivieren kann. Zudem ist bekannt, dass viele Biomoleküle, wie Proteine, Enzyme und Lipide, durch hydrostatischen Hochdruck beeinflusst werden können. Außerdem konnte in eigenen Experimenten gezeigt werden, dass auch humane primäre Zellen durch eine Hochdruckbehandlung abgetötet werden.

Auf Basis der Vorarbeiten wird in dieser Arbeit untersucht, ob durch Hochdruckbehandlung Tumorzellen, bei Erhalt ihrer Immunogenität *in vivo*, inaktiviert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass ein Druck von 100 MPa die Zellen in ihrer Vitalität nicht beeinflusst - die Zellen beginnen nach einem kurzen Zellzyklusarrest wieder zu proliferieren. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl hochdruckbehandelte apoptotische, als auch nekrotische Zellen ihre Immunogenität *in vivo* beibehalten. Eine Behandlung mit Druck von 200 MPa führt zu hochdruckinduzierter Apoptose mit den bekannten Eigenschaften, wie Erhalt der Zytoplasmamembranintegrität, Exposition von Phosphatidylserin auf der Zytoplasmamembran, Fragmentierung der DNA und weitere apoptotetypische morphologische Veränderungen.

Allerdings tritt die hochdruckinduzierte Apoptose deutlich schneller ein als eine durch UVB Bestrahlung induzierte Apoptose. Wenn Tumorzellen mit einem Druck von ≥ 300 MPa behandelt werden, verlieren sie noch während der Behandlung die Integrität der Zytoplasmamembran. Die so induzierte Nekrose unterscheidet sich morphologisch und biochemisch von bekannten Nekroseinduktoren wie Hitze, oxidativem Stress und Detergenzien. Es konnte gezeigt werden, dass Kerne der hochdrucknekrotisierten Tumorzellen durch eine Ca^{2+} abhängige DNase komplett degradiert werden. Ebenso wird das proteinreiche Zytoplasma der behandelten Zellen gelartig. Diese Erhöhung der Viskosität verhindert die Permeation von Molekülen durch das Zytoplasma, einige lösliche Gefahrensignale können so im Zytoplasma zurückgehalten werden, und die Form der Zelle wird über Wochen konserviert. Diese Eigenschaften der hochdrucknekrotisierten Tumorzellen sind wichtige Voraussetzungen für die Immunogenität hochdruckbehandelter Zellen. Anhand der in dieser Arbeit gefundenen Eigenschaften behandelter Zellen kann geschlossen werden, dass durch eine Hochdruckbehandlung eine Tumorstoffimpfung erzeugt werden kann, die potentiell nicht nur zur Elimination des Tumors führt, sondern auch ein immunologisches Gedächtnis schaffen kann, das einem Rezidiv entgegenwirken kann.

9 Summary

Various forms of cancer cause the death of every fourth human in Germany. The classical therapies for solid cancer have limitations in prolonging the life span of the patients. Some therapeutic approaches are based on the vaccination of cancer patients with inactivated autologous tumour cells. The main requirements for the production of cell based tumour vaccines are (I) the complete inactivation of the tumour cells, (II) the preservation of their immunogenicity, and (III) the accordance with statutory provisions. Currently, irradiation and chemotherapeutics are used to inactivate tumour cells. However, both procedures have methodological, therapeutical, and legal restrictions.

Aim of this work was to test the treatment of cells with high hydrostatic pressure (HHP) as an alternative technique to inactivate cell based vaccines by retaining their immunogenicity. It is well known that HHP inactivates microorganisms and causes changes in most cellular biomolecules. Some former experiments demonstrated the effect of pressure on human cells (e.g. cancer cells) but inactivation was only monitored by trypan blue staining immediately after treatment. Here we analyzed the matter of cell death, the efficacy of the inactivation, and the immunogenicity of cells treated applying HHP.

The treatment of tumour cells with pressure up to 100 MPa did not affect their viability. After a short cell cycle arrest the cell continued proliferation. Treatment of the cells with pressure above 100 MPa, however, results in cell death and a safe inactivation of the cells over weeks. Most importantly, both pressurized apoptotic and necrotic cells retained their immunogenicity *in vivo*. At 200 MPa, cells died by apoptosis characterized by preservation of the ion selectivity of the plasma membrane, phosphatidylserine exposure, DNA fragmentation, and morphological alterations. However, the HHP induced apoptosis proceeded faster than apoptosis induced by UVB irradiation. Cells pressurized above 300 MPa necrotized during treatment, detected by the loss of plasma membrane integrity. In contrast to alternative methods for the induction of necrosis (heat, detergent, oxidative stress), the nuclei of HHP treated cells were efficiently degraded within a few hours in culture. This degradation was driven by a Ca^{2+} -dependent DNase. Furthermore, the viscosity of the cytoplasm increased. Soluble constituents of the cells are retained within the cytoplasm. This proteinaceous, gelificated cytoplasm conserves the shape of the treated cells over weeks and permits a retarded release of some danger signals. These features are good candidates to explain the maintenance of the immunogenicity of pressurized cells. We conclude that HHP is a powerful technique to inactivate tumour cells while preserving their immunogenicity.

10 Literaturverzeichnis

Abbas AK, editor. 2001. Basic Immunology: functions and disorders of the immune system. Philadelphia: W.B. Saunders Company

Abou-Jawde R, Choueiri T, Alemany C, Mekhail T. 2003. An overview of targeted treatments in cancer. *Clin Ther* 25(8):2121-37

Alberts B. 1995. Molekularbiologie der Zelle. Jaenicke L, Translator: VCH Verlagsgesellschaft

Andrews NW. 2005. Membrane repair and immunological danger. *EMBO Rep* 6(9):826-30

Antonia S, Mule JJ, Weber JS. 2004. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr Opin Immunol* 16(2):130-6

Atanasiu, Basset J. 1953. [Effect of elevated pressures on the virus of leukosis and the erythroblastic cells of the chick embryo; effect of same pressures on the cells of lymphoid leukosis of the mouse.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 85(4):500-3

Atanasiu P, Barbu E, Basset J. 1951. [Effect of very high pressure on Newcastle virus. I. Dissociation of infectious power and of hemagglutination.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 81(3):340-3

Atanasiu P, Edipides T, Basset J. 1955. [New data on hemolysin of Newcastle virus; action of high pressure.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 89(5):523-30

Atkins PW. 1987. Physikalische Chemie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH

Atkins PW. 2001. Kurzlehrbuch Physikalische Chemie. Ludwig R, Appenhagen A, Schmauder F, Translator. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH

Balny C. 1996. Thermodynamics of transient enzyme kinetics. In: Hayashi R, Balny C, editors. High Pressure Bioscience and Biotechnology. Montpellier: Elsevier France B.V:

Balny C. 1999. High Pressure Enzyme Kinetics. In: Ludwig H, Editor. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology. Berlin: Springer Verlag

Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, Editors. 1992. High Pressure and Biotechnology. Montrouge: Editions John Libbey Eurotext Ltd

Balny C, Hooper AB. 1988. Effect of solvent, pressure and temperature on reaction rates of the multiheme hydroxylamine oxidoreductase. Evidence for conformational change. *Eur J Biochem* 176(2):273-9

Balny C, Masson P, Heremans K. 2002. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):3-10

Balny C, Travers F. 1989. Activation thermodynamics of the binding of carbon monoxide to horseradish peroxidase. Role of pressure, temperature and solvent. *Biophys Chem* 33(3):237-44

Barciszewski J, Jurczak J, Porowski S, Specht T, Erdmann VA. 1999. The role of water structure in conformational changes of nucleic acids in ambient and high-pressure conditions. *Eur J Biochem* 260(2):293-307

- Bartlett DH. 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):367-81
- Basset J. 1957. [Effect of high pressures on viruses. Variation with temperature of inactivation pressure of certain viruses.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 93(1):69-80
- Basset J, Lepine P, Chaumont L. 1956. [Effects of high pressures on the poliomyelitis virus (Lansing strain).]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 90(5):575-93
- Basset J, Maurin J. 1958. [The effects of high pressures on viruses; variation with temperature of the pressure required for inactivation of poliomyelitis virus in tissue culture.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 95(4):374-84
- Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, Budach W. 2004. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(2):542-54
- Berd D, Kairys J, Dunton C, Mastrangelo MJ, Sato T, Maguire HC, Jr. 1998. Autologous, haptan-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Semin Oncol* 25(6):646-53
- Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. 2004. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113(11):1515-25
- Blettner M. 2003. Riskante Umwelt - riskantes Verhalten. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 3/2003:34-38
- Block KI, Boyd DB, Gonzalez N, Vojdani A. 2002. Point-counterpoint: the immune system in cancer. *Integr Cancer Ther* 1(3):294-316
- Bluemelhuber G, Diehl P, Fischer S, Frey B, Hadaller M, van Laak S, Mittelmeier W, Schmitt M, Weiss C, Meyer-Pittroff R. 2003a. High Pressure Treatment of Human Bone Tissue - First Investigations to Mechanics and Biology. In: Winter R, editor. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 307 - 309
- Bluemelhuber G, Fischer S, Gaipf U, Voll R, Kalden J, Herrmann M, Meyer-Pittroff R. 2003b. Apoptosis and Necrosis of Mammalian Cells after High Pressure Treatment - Prospects for a Tumour Vaccine. In: Winter R, editor. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 311 - 314
- Bondanza A, Zimmermann VS, Rovere-Querini P, Turnay J, Dumitriu IE, Stach CM, Voll RE, Gaipf US, Bertling W, Poschl E, Kalden JR, Manfredi AA, Herrmann M. 2004. Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo. *J Exp Med* 200(9):1157-65. Epub 2004 Oct 25
- Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Fromentin A, Solary E, Martin M, Martin F. 1998. Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumorigenicity of spontaneously regressive tumors. *J Immunol* 161(3):1433-8
- Boonyaratankornkit BB, Park CB, Clark DS. 2002. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):235-49
- Breuer H. 1991. *dtv-Atlas zur Physik*. München: Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG

- Bridgman PW. 1914. The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry* 19:511 - 512
- Butz P. 1987. *Biochemische Systeme unter hohem hydrostatischen Druck* [Dissertation]. Heidelberg
- Cheftel J-C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, editors. *High Pressure and Biotechnology*. Montrouge: INSERM/John Libbey Eurotext Ltd
- Dallet S, Legoy MD. 1996. Hydrostatic pressure induces conformational and catalytic changes on two alcohol dehydrogenases but no oligomeric dissociation. *Biochim Biophys Acta* 1294(1):15-24
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(1):61-9
- Diehl P, Reuning U, Gollwitzer H, Magdolen U, Gerdesmeyer L, Schauwecker J, Tuebel J, Gradinger R, Mittelmeier W, Schmitt M. 2004. Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability. *Oncol Rep* 12(2):369-73
- Diehl P, Schmitt M, Bluemelhuber G, Frey B, Van Laak S, Fischer S, Muehlenweg B, Meyer-Pittroff R, Gollwitzer H, Mittelmeier W. 2003. Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery. *Oncol Rep* 10(6):1851-5
- Dubert JM, Slizewicz P, Macheboeuf M, Basset J. 1952. [Action of increased hydrostatic pressures on the reaction between antigens and antibodies.]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 34(3-4):418-30
- Dubins DN, Lee A, Macgregor RB, Jr., Chalikian TV. 2001. On the stability of double stranded nucleic acids. *J Am Chem Soc* 123(38):9254-9
- Dumitriu IE, Roedel F, Beyer TD, Gaipf US, Kalden JR, Herrmann M. 2003. UV or X-irradiation increases the cytoplasmic accumulation of rhodamine 123 in various cancer cell lines. *Strahlenther Onkol* 179(8):564-70
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21(2):137-48
- El'yanov BS, Hamann SD. 1975. Quantitative relations for ionization reactions at high pressures. *Australian Journal of Chemistry* 28(5):945-54
- Elstein KH, Zucker RM. 1994. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Exp Cell Res* 211(2):322-31
- Fallert-Müller, editor. 2000. *Lexikon der Biochemie*. München: Elsevier GmbH
- Finn OJ. 2004. Tumor immunology at the service of cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16(2):127-9
- Fonberg-Broczek M, Windyga B, Szczawinski J, Szczawinska M, Pietrzak D, Prestamo G. 2005. High pressure processing for food safety. *Acta Biochim Pol* 52(3):721-4
- Franz S, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Beer A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. 2006. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A* 69(4):230-9

- Franz S, Herrmann K, Führrohr B, Sheriff A, Frey B, Gaipf US, Voll RE, Kalden JR, Jaeck HM, Herrmann M. 2006. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death and Differentiation*, Dec. 15th (in press)
- Frey B, Franz S, Sheriff A, Korn A, Bluemelhuber G, Gaipf US, Voll RE, Meyer-Pittroff R, Herrmann M. 2004. Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50(4):459-67
- Frey B, Hartmann M, Herrmann M, Meyer-Pittroff R, Sommer K, Bluemelhuber G. 2006. Microscopy under pressure - An optical chamber system for fluorescence microscopic analysis of living cells under high hydrostatic pressure. *Microscopy Research and Technique* 69(2)
- Gaipf US, Franz S, Voll RE, Sheriff A, Kalden JR, Herrmann M. 2004. Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity. *Curr Rheumatol Rep* 6(6):401-7
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5(11):1249-55
- Gallucci S, Matzinger P. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13(1):114-9
- Gaspar LP, Silva AC, Gomes AM, Freitas MS, Ano Bom AP, Schwarcz WD, Mestecky J, Novak MJ, Foguel D, Silva JL. 2002. Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *J Biol Chem* 277(10):8433-9. Epub 2001 Nov 26
- Gekko K. 2002. Compressibility gives new insight into protein dynamics and enzyme function. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):382-6
- Gibbs WW. 2003. Untangling the roots of cancer. *Sci Am* 289(1):56-65
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 2000. *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company
- Gomes AM, Pinheiro AS, Bonafe CF, Silva JL. 2003. Pressure-induced fusogenic conformation of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochemistry* 42(18):5540-6
- Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*. 8(7):267-71
- Green DR, Beere HM. 2001. Apoptosis. Mostly dead. *Nature* 412(6843):133-5
- Gross D, Hauger W, Schnell W, Wriggers P. 1999. *Technische Mechanik*. Berlin: Springer Verlag
- Hagenhofer M, Germaier H, Hohenadl C, Rohwer P, Kalden JR, Herrmann M. 1998. UV-B irradiated cell lines execute programmed cell death in various forms. *Apoptosis* 3:123-32
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70
- Harmon BV, Corder AM, Collins RJ, Gobe GC, Allen J, Allan DJ, Kerr JF. 1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol* 58(5):845-58

- Hartmann M, Kreuss M, Sommer K. 2004. High pressure microscopy--a powerful tool for monitoring cells and macromolecules under high hydrostatic pressure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50(4):479-84
- Hartmann M, Pfeifer F, Dornheim G, Sommer K. 2003. HPDS-Hochdruckzelle zur Beobachtung mikroskopischer Phänomene unter Hochdruck. *Chemie Ingenieur Technik* 11:1763 - 1767
- Hawley SA. 1971. Reversible pressure--temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* 10(13):2436-42
- Hayakawa K, Ueno Y, Kawamura S, Kato T, Hayashi R. 1998. Microorganism inactivation using high-pressure generation in sealed vessels under sub-zero temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 50(4):415-8
- Heden CG. 1964. Effects of Hydrostatic Pressure on Microbial Systems. *Bacteriol Rev* 28:14-29
- Heden CG, Rupprecht A. 1966. Semiconductivity of dried oriented DNA. *Acta Chem Scand* 20(2):583-5
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6
- Heremans K. 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng* 11:1-21
- Heremans K, Smeller. 1998. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim Biophys Acta* 1386(2):353-70
- Hering E, Martin R, Stohrer M. 1989. *Physik für Ingenieure*. Düsseldorf: VDI-Verlag GmbH
- Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. 1998. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41(7):1241-50
- Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Lorenz H, Geiler T, Kalden JR. 2000. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 123(1):28-35
- Hess V, Biedermann B, Meier G, Herrmann R. 2001. *Prinzipien der Chemotherapie: Grundlagen*. *Swiss Medical Forum* 40:985-989
- Heyder P, Gaipf US, Beyer TD, Voll RE, Kern PM, Stach C, Kalden JR, Herrmann M. 2003. Early detection of apoptosis by staining of acid-treated apoptotic cells with FITC-labeled lectin from *Narcissus pseudonarcissus*. *Cytometry* 55A(2):86-93
- Hite BH. 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia University of Agriculture Experiment Station Morgantown* 58
- Hite BH. 1914. The effects on pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bulletin of the West Virginia University of Agriculture Experiment Station Morgantown* 146(1)
- Ishimaru D, Sa-Carvalho D, Silva JL. 2004. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine* 22(17-18):2334-2339
- Janeway CA, Travers P, Walport MJ, Shlomchik MJ. 2001. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. New York: Garland Publishing

- Kalide W. 1984. Einführung in die technische Strömungslehre. München: Carl Hanser Verlag
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *Int J Oncol* 21(1):165-70
- Kato M, Hayashi R, Tsuda T, Taniguchi K. 2002. High pressure-induced changes of biological membrane. Study on the membrane-bound Na(+)/K(+)-ATPase as a model system. *Eur J Biochem* 269(1):110-8
- Kern P, Keilholz L, Forster C, Seegenschmiedt MH, Sauer R, Herrmann M. 1999. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol* 75(8):995-1003
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57
- Kessler HG. 1996. Lebensmittel und Bioverfahrenstechnik. München: Verlag A. Kessler
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. 2006. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 11(1):5-13
- Knippers R. 1997. Molekulare Genetik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Korn A, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Franz S, Meyer-Pittroff R, Bluemelhuberh G, Herrmann M. 2004. High hydrostatic pressure inactivated human tumour cells preserve their immunogenicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50(4):469-77
- Kornblatt JA, Kornblatt MJ. 2002. The effects of osmotic and hydrostatic pressures on macromolecular systems. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):30-47
- Korzeniewski C, Callewaert DM. 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64(3):313-20
- Kunugi S, Kameyama K, Tada T, Tanaka N, Shibayama M, Akashi M. 2005. Differences in pressure and temperature transitions of proteins and polymer gels. *Braz J Med Biol Res* 38(8):1233-8. Epub 2005 Jul 30
- Lucas C. 1995. Thermodynamik: Die Grundgesetze der Energie- und Stoffumwandlungen. Berlin: Springer Verlag
- Ludwig H. 2002. Cell biology and high pressure: applications and risks. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):390-1
- Ludwig H. 2003. Effects of high pressure on Bacteria and Fungi. In: Winter R, editor. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 259 - 265
- Luedemann H-D. 1992. Water and aqueous solutions under high pressure. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, editors. *High Pressure and Biotechnology*. Montrouge: Editions John Libbey Eurotext Ltd
- Lynch TW, Kosztin D, McLean MA, Schulten K, Sligar SG. 2002. Dissecting the molecular origins of specific protein-nucleic acid recognition: hydrostatic pressure and molecular dynamics. *Biophys J* 82(1 Pt 1):93-8

- Macgregor RB. 2002. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):266-76
- Macgregor RB, Jr. 1998. Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. *Biopolymers* 48(4):253-63
- Makita T. 1992. Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology. *Fluid Phase Equilibria* 76:87 - 95
- Masson P, Arciero DM, Hooper AB, Balny C. 1990. Electrophoresis at elevated hydrostatic pressure of the multiheme hydroxylamine oxidoreductase. *Electrophoresis* 11(2):128-33
- Masson P, Balny C. 1988. Effects of high pressure on the single-turnover kinetics of the carbamylation of cholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 954(2):208-15
- Masson P, Balny C. 1990. Conformational plasticity of butyrylcholinesterase as revealed by high pressure experiments. *Biochim Biophys Acta* 1041(3):223-31
- McConkey DJ. 1998. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 99(3):157-68
- McHugh P, Turina M. 2006. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. *Surg Infect (Larchmt)* 7(1):53-68
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407(6805):796-801
- Melcher A, Gough M, Todryk S, Vile R. 1999. Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? *J Mol Med* 77(12):824-33
- Mellmann I. 2006. Where Next for Cancer Immunotherapy? *The Scientist* 20(1):47 - 53
- Mentre P, Hamraoui L, Hui Bon Hoa G, Debey P. 1999. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(3):353-62
- Mentre P, Hui Bon Hoa G. 2001. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int Rev Cytol* 201:1-84
- Meyer-Pittroff R. 2003a. High Pressure Applications in Medicine. In: Winter R, editor. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 295 - 305
- Meyer-Pittroff R. 2003b. Vorlesungsskriptum Technische Thermodynamik. Freising - Weihenstephan
- Meyer-Pittroff R, Hoehn G, Fischer S. 2001. Hochdruck in der Lebensmittelindustrie- und Medizintechnik. *Brauwelt* 34/35:1291 - 1295
- Miyoshi I, Hiraki S, Tsubota T, Kubonishi I, Matsuda Y, Nakayama T, Kishimoto H, Kimura I, Masuji H. 1977. Human B cell, T cell and null cell leukaemic cell lines derived from acute lymphoblastic leukaemias. *Nature* 267(5614):843-4
- Morild E. 1981. The theory of pressure effects on enzymes. *Adv Protein Chem* 34:93-166

Munoz LE, Frey B, Pausch F, Wolfgang B, Mueller RB, Brachvogel B, Poschl E, Rödel F, von der Mark K, Herrmann M, Gaipf US. 2007. The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. *Current medicinal chemistry* (in press)

Murken J, Cleve H. 1993. *Humangenetik*. München: Enke Verlag

Nakahara M. 1974. Derivation of El'yanov and Hamann's empirical formula and another new formula for pressure dependence of ionization constants. *Review of Physical Chemistry of Japan* 44(2):57-64

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2):271-9

Paukovits P, Himmler G, Loibner H. 2004. [Immunotherapy of malignant diseases--developments and prospects]. *Wien Med Wochenschr* 154(9-10):235-41

Peters HD, Kath R. 2000. Neue Therapiekonzepte – Ausblicke in die nähere und weitere Zukunft. *Der Onkologe* 10(6):992 - 995

Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130(1):157-67

Pfützner T, Barth S, Engert A. 2000. Tumorstimmstoffe: Immuntherapie im Jahr 2000. *Der Onkologe* 6(0):s31-s35

Playfair JHL, Chain B. 2001. *Immunology at a Glance*. Walden: Blackwell Publisher

Ponner BB, Stach C, Zoller O, Hagenhofer M, Voll R, Kalden JR, Herrmann M, Schwartzman RA, Cidowski JA. 1998. Induction of apoptosis reduces immunogenicity of human T-cell lines in mice. *Scand J Immunol* 47(4):343-7

Pulvertaft JV. 1964. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 39:238-40

Rich T, Allen RL, Wyllie AH. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature* 407(6805):777-83

Rigaldie Y, Largeteau A, Lemagnen G, Ibalot F, Pardon P, Demazeau G, Grislain L. 2003. Effects of high hydrostatic pressure on several sensitive therapeutic molecules and a soft nanodispersed drug delivery system. *Pharm Res* 20(12):2036-40

Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y. 2005. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 26(3):231-46

Roedel F, Kley N, Beuscher HU, Hildebrandt G, Keilholz L, Kern P, Voll R, Herrmann M, Sauer R. 2002. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol* 78(8):711-9

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 10(9):909-15

Ruan K, Lange R, Zhou Y, Balny C. 1998. Unusual effect of high hydrostatic pressure on basic phospholipase A2 from venom of *Agkistrodon Halys Pallas*. *Biochem Biophys Res Commun* 249(3):844-8

- San Martin MF, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(6):627-45
- Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191(3):423-34
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2(12):965-75
- Schadendorf D. 2002. Hat die Vakzination von Tumorpatienten eine Zukunft in der klinischen Onkologie? *Onkologie* 25(Suppl. 1):38-42
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19(5):621-6
- Sheikh MS, Antinore MJ, Huang Y, Fornace AJ, Jr. 1998. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* 17(20):2555-63
- Silva JL, Foguel D, Royer CA. 2001. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci* 26(10):612-8
- Silva JL, Foguel D, Suarez M, Gomes AMO, Oliveira AC. 2004. High-pressure applications in medicine and pharmacology. *Journal of Physics: Condensed Matter* 16(14):S929-S944
- Smeller L. 2002. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):11-29
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2(4):293-9
- Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M, Bueno R, Cliff S, Hardy S, Neuberger D, Mulligan R, Webb I, Mihm M, Dranoff G. 2003. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 21(17):3343-50
- Statistisches-Bundesamt. 2004. Gesundheitswesen - Todesursachen Deutschland. Fachserie 12/Reihe 4 ed: www.destatis.de
- Steinman RM, Mellman I. 2004. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science.* 305(5681):197-200
- Stippl VM. 2005. Optical In-Situ Measurement of the pH-Value During High Pressure Treatment of Fluid Food. Freising: Technische Universität München
- Sundstrom C, Nilsson K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17(5):565-77
- Suzuki K, Miyosawa Y, Taniguchi Y. 1971. The effect of pressure on deoxyribonucleic acid. *J Biochem (Tokyo)* 69(3):595-8

- Suzuki K, Taniguchi Y, Miyosawa Y. 1972. The effect of pressure on the absorption spectra of DNA and DNA-dye complex. *J Biochem (Tokyo)* 72(5):1087-91
- Tauscher B. 1995. Pasterization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 200:3-13
- Tipler PA, Mosca G. 2004. Physik für Wissenschaftler und Ingenieure. Pelte D, Editor. München: Elsevier GmbH
- Todryk S. 2002. A sense of tumour for the immune system. *Immunology* 107(1):1-4
- Vakkila J, Lotze MT. 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 4(8):641-8
- van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B. 1997. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 235(2):421-30
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1):39-51
- Vignais P, Barbu E, Macheboeuf M, Basset J. 1952a. [Antigenic and vaccinating power of bacteria killed by pressure. II.]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 34(7-8):798-805
- Vignais P, Barbu E, Macheboeuf M, Basset M. 1952b. [Antigenic and vaccinal power of bacteria killed by pressure.]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 34(1-2):43-6
- Vogelstein B, Kinzler KW, editors. 2002. The Genetic Basis of Human Cancer. Second Edition ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-351
- Wagner W. 2005. FLUIDCAL. Version Basic Package Water (IAPWS95). Bochum
- Wagner W, Pruß A. 2002. The IAPWS formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 31:387-535.
- Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. 2002. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 51(7):351-7
- Wedding U, Höffken K. 2003. Leben verlängern, Nebenwirkungen mindern. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 3/2003:62-65
- Weida B, Gill SJ. 1966. Pressure effect on deoxyribonucleic acid transition. *Biochim Biophys Acta* 112(1):179-81
- Wellmann U, Letz M, Herrmann M, Angermüller S, Kalden JR, Winkler TH. 2005. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9258-63
- Winter R. 2002. Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure. *Biochim Biophys Acta* 1595(1-2):160-84

Winter R, Dzwolak W. 2004. Temperature-pressure configurational landscape of lipid bilayers and proteins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50(4):397-417

Wu X, Molinaro C, Johnson N, Casiano CA. 2001. Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum* 44(11):2642-52

Wyllie AH. 1995. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 5(1):97-104

zur Hausen H. 2003. Krebs - Eine Herausforderung für die Forschung. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 3/2003:6-11.

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1: Druckwandlung (Hering et al., 1989)	14 -
Abb. 4.2: Prinzip der direkten Druckerzeugung.....	15 -
Abb. 4.3: Prinzip der indirekten Druckerzeugung.....	16 -
Abb. 4.4: Erhöhung der Temperatur während einer adiabaten Kompression von Wasser (Makita, 1992).....	19 -
Abb. 4.5: Darstellung des spezifischen Volumens von Wasser in Abhängigkeit von Druck bei konstanter Temperatur (nach Wagner, 2005; Wagner and Pruß, 2002).....	20 -
Abb. 4.6: Allgemeines Druck-Temperatur-Phasendiagramm für Proteine	24 -
Abb. 4.7: Schematische Darstellung druckinduzierter Effekte auf Proteine (nach Silva et al., 2001)	25 -
Abb. 4.8: Schematische Darstellung der Effekte von Druck auf oligomere Proteine (nach Boonyaratanakornkit et al., 2002).....	26 -
Abb. 4.9: Druck-Temperatur Phasendiagramm der „helix to coil – transition“ doppel-strängiger Nukleinsäurepolymeren mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen T_m (nach Dubins et al., 2001).....	28 -
Abb. 4.10: Lateralkräfte zweier Phospholipide (nach Winter, 2002)	31 -
Abb. 4.11: Schematische Darstellung von Lipid-Wasser-Phasen (nach Winter and Dzwolak, 2004)	32 -
Abb. 4.12: Vergleich der morphologischen Änderungen während Apoptose und Nekrose (nach Goldsby et al., 2000).....	33 -
Abb. 4.13: Tumorgenese und Metastasierung (nach Goldsby et al., 2000).....	36 -
Abb. 4.15: Darstellung einer T-Zell Antwort gegen einen Tumor (nach Abbas, 2001)	38 -
Abb. 4.16: Zelltod und adjuvante Wirkung von Gefahrensignalen (nach Rock et al., 2005)	39 -
Abb. 5.1: Frontalansicht der Hochdruckanlage der Record Maschinenbau GmbH	43 -
Abb. 5.2: Schaltbild der RECORD Hochdruckanlage	44 -
Abb. 5.3: Kennlinie des Druckübersetzers	45 -
Abb. 5.4: Der ausgebaute Autoklav der Hochdruckanlage	46 -
Abb. 5.5: Querschnitt durch die HPDS Sichtzelle (Frey et al., 2006).....	47 -
Abb. 5.6: Schaltbild der Hochdruckanlage an der HPDS Zelle (nach Hartmann et al., 2003).....	48 -
Abb. 5.7: Schematisches Punktwolkendiagramms mit linearer Auftragung des Vorwärts- und logarithmischer Auftragung des Seitwärtsstreulichts.....	54 -
Abb. 5.8: Durchflusszytometrische Analyse einer Zellsuspension nach einer PI-Triton Färbung	56 -
Abb. 6.1: Anteil vitaler Zellen verschiedener Tumorzelllinien.....	62 -
Abb. 6.2: Anteil an vitalen Zellen einer hochdruckbehandelten Zellsuspension, die über 168 Stunden in Kultur gehalten wurde	63 -
Abb. 6.3: Kontrolle der Inaktivierungsleistung hydrostatischer Hochdruckbehandlung gemessen am Verbrauchszustand des Zellkulturmediums.....	65 -
Abb. 6.4: AnnexinV-FITC – PI Färbung hochdruckbehandelter Zellen.....	67 -
Abb. 6.5: Anzahl der im Durchflusszytometer detektierten Ereignisse	68 -
Abb. 6.6: Darstellung des MMP von U937 Zellen, die verschieden behandelt wurden	69 -

Abb. 6.7: NPn Färbung hochdruckbehandelter Zellen	- 71 -
Abb. 6.8: Bestimmung des DNA-Gehalts von hochdruckbehandelter Zellen	- 73 -
Abb. 6.9: Auftrennung der DNA hochdruckbehandelter Zellen auf einem Agarosegel.....	- 75 -
Abb. 6.10: Bestimmung der PI Fluoreszenz hochdruckbehandelter U937 Zellen	- 76 -
Abb. 6.11: Bestimmung der PI Fluoreszenz hochdruckbehandelter U937 Zellen	- 77 -
Abb. 6.12: Bestimmung des Gehalts von LDH im Zellkulturüberstand	- 78 -
Abb. 6.13: Hochdruckinduzierte morphologische Änderungen	- 79 -
Abb. 6.14: In situ Analyse von hochdruckbehandelten Zellen	- 81 -
Abb. 6.15: Analyse der humoralen Immunantwort gegen hochdruckinaktivierte Raji Zellen <i>in vivo</i> .-	- 83 -

12 Veröffentlichungen

12.1 Originalarbeiten

Munoz L.E., **Frey B.**, Pausch F., Baum W., Mueller R.B., Brachvogel B., Poschl E., Rödel F., von der Mark K., Herrmann M., Gaipf U.S. „The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells.“ *current medicinal chemistry*. 2007, 14 (3): 271 - 278 (M.L.E. and F.B. are equally contributed to the work)

Franz S., Herrmann K., Führrohr B., Sheriff A., **Frey B.**, Gaipf U.S., Voll R.E., Kalden J.R., Jaeck H.M., Herrmann M. „After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes.“ *Cell Death and Differentiation*. 2007 Apr;14(4):733-42

Friedrich, O., Wegner, F.v., Hartmann, M., **Frey, B.**, Sommer, R., Ludwig, H., Fink, R.H.A. „In situ' High Pressure confocal Ca²⁺-fluorescence Microscopy in skeletal muscle: a new method to study pressure limits in mammalian cells.“ *Undersea Hyperbaric Medicine* 2006 May-Jun;33(3):181-95

Friedrich, O., Kress, K.R., Hartmann, M., **Frey, B.**, Sommer, K., Ludwig, H., Fink R.H.A. “Prolonged high-pressure treatments in mammalian skeletal muscle result in loss of functional sodium channels and altered calcium channel kinetics.” *Cell biochemistry and biophysics* 2006 May;45(1):71-84.

Franz, S., **Frey, B.**, Sheriff, A., Gaipf, U.S., Beer, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., Herrmann, M. “Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis.” *Cytometry Part A*, 2006, Apr;69(4): 230-9.

Frey, B., Hartmann, M., Herrmann, M., Meyer-Pittroff, R., Sommer, K., Bluemelhuber, G. “Microscopy under pressure – An optical chamber system for fluorescence microscopic analysis of living cells under high hydrostatic pressure.” *Microscopy Research and Technique*, 2006, Feb;69(2):65-72.

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Bluemelhuber, G., Gaipf, U.S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R. Meyer-Pittroff, R., Herrmann, M. "High hydrostatic pressure treated tumour cells – Cell death pathways and immunogenicity." In: Proceedings of the "Joint 20th AIRAPT and 43rd EHPRG International Conference on High Pressure Science and Technology", E. Dinjus, E. Dahman (Ed.), Forschungszentrum Karlsruhe GmbH 2005.

Frey, B., Franz, S., Sheriff, A., Korn, A., Bluemelhuber, G., Gaipf, U.S., Voll, R.E., Meyer-Pittroff, R., Herrmann, M. "Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis." Cellular and Molecular Biology, 2004, 50 (4), 459 – 467.

Korn, A., **Frey, B.**, Sheriff, A., Gaipf, U.S., Franz, S., Meyer-Pittroff, R., Herrmann, M., Bluemelhuber, G. "High hydrostatic pressure inactivated human tumour cells preserve their Immunogenicity." Cellular and Molecular Biology, 2004, 50 (4), 469 – 477.

Diehl, P., Schmitt, M., Bluemelhuber, G., **Frey, B.**, van Laak, S., Fischer, S., Muehlenweg, B., Meyer-Pittroff, R., Gollwitzer, H., Mittelmeier, W. „Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery." Oncol Rep. 2003 Nov-Dec;10(6):1851-5.

Bluemelhuber, G., Diehl, P., Fischer, S., **Frey, B.**, Hadaller, M., van Laak, S., Mittelmeier, W., Schmitt, M., Weiss, C., Meyer-Pittroff, R., "High pressure treatment of human bonetissue – first investigations about mechanics and biology." In: High pressure bioscience and biotechnology II, p. 307 – 310, R.Winter (Ed.), Springer Verlag 2003.

12.2 Kurzveröffentlichungen und Kongressbeiträge

Frey, B., Franz S., Meister, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., U.S. Gaipf, Roedel, F. , Herrmann M. , Bluemelhuber G. "Inactivation of Tumour Cells by High Hydrostatic Pressure preserves their immunogenicity" 1st International GK Symposium „Regulators of Adaptive Immunity“ September 2006 – Erlangen. *Poster*

Frey, B., Franz S., Meister, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., U.S. Gaipf, Roedel, F. , Herrmann M. , Bluemelhuber G. "Inactivation of Tumour Cells by High Hydrostatic Pressure preserves their immunogenicity" 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology - 16th European Congress of Immunology – ECI September 2006 – Paris (France). *Poster*

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., Gaipl, U.S., Meister, S., Voll, R.E., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "High hydrostatic pressure treated tumour cells. – Cell death pathways and immunogenicity of treated cells." *Immunobiology* 210 (2005), 478.

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., Gaipl, U.S., Meister, S., Voll, R.E., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "High hydrostatic pressure treated tumour cells. – Cell death pathways and immunogenicity of treated cells." Joint Meeting, German and Scandinavian Societies for Immunology 2005, September 2005, Kiel. *Vortrag*

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., Gaipl, U.S., Meister, S., Voll, R.E., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "High hydrostatic pressure treated tumour cells. – Cell death pathways and immunogenicity of treated cells." Joint Meeting, German and Scandinavian Societies for Immunology 2005, September 2005, Kiel. *Poster*

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Bluemelhuber, G., Gaipl, U.S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R. Meyer-Pittroff, R. and Herrmann M. "High hydrostatic pressure treated tumour cells – Cell death pathways and immunogenicity." Joint 20th AIRAPT and 43rd EHPRG International Conference on High Pressure Science and Technology, Juni 2005, Karlsruhe. *Vortrag*

Frey, B., Franz, S. Korn, A., Gaipl, U.S., Voll, R.E., Meyer-Pittroff, R., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "Hydrostatic pressure induced cell death of mammalian cells engages either apoptotic or necrotic pathways. - Implications for inflammation and immune response." *Hochdrucklebensmitteltechnologie und –bioverfahrenstechnik*, Oktober 2004, Freising – Weihenstephan. *Poster*

Frey, B., Franz, S., Korn, A., Meyer-Pittroff, R., Gaipl, U.S., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis." *HPBB 2004* September 2004, Rio de Janeiro (Brasilien). *Vortrag*

Frey, B., Franz, S. Korn, A., Gaipl, U.S., Voll, R.E., Meyer-Pittroff, R., Bluemelhuber, G., Herrmann, M. "Hydrostatic pressure induced cell death of mammalian cells engages either apoptotic or necrotic pathways. - Implications for inflammation and immune response." 4. Erlanger IZKF-Workshop" September 2004, Erlangen. *Poster*

13 Curriculum Vitae

Persönliche Daten: Jörg Benjamin Frey
M.Sc. (TUM), Dipl.-Ing. (FH)
geb. 31. Januar 1972 in Günzburg

Schulbildung:
1978 – 1982 Grundschole, Lauingen (Donau)
1982 – 1992 Albertus Gymnasium, Lauingen (Donau)

Hochschulbildung:
Nov. 1993 – Mai 1997 TU München, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaften,
Diplomstudiengang „Brauwesen und Getränketechnologie“
Juni 1997 – Feb. 2001 TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan,
Fachhochschulstudium „Lebensmitteltechnologie“
Diplomarbeit „Verhalten von primären, humanen Zellen unter Hochdruck“
Nov. 2002 – Aug. 2003 TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Master Studium „Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel“
Master's Thesis „Hochdruckinduzierte Apoptose und Nekrose bei humanen Tumorzellen“
Okt. 2003 – Okt. 2005 TU München, wiss. Angestellter und Doktorand am Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie unter Anleitung von Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff zum Thema „Hochdruckbehandlung humaner Zellen als Grundlage für die Entwicklung einer Tumorstimmung“
März 2004 – Dez. 2006 Assoziierter Kollegiat des DFG Graduiertenkollegs 592: Lymphozyten: Differenzierung, Aktivierung und Deviation
Nov. 2005 – anhaltend Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der FAU Erlangen-Nürnberg, Klinik für Strahlentherapie, Fachgebiet Strahlenbiologie

14 Danksagung

Am Ende meiner Promotion möchte ich es nicht versäumen, den Menschen zu danken, die in vielfältiger Art und Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

VIELEN HERZLICHEN DANK:

- Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit
- Herrn Dr.-Ing. Blümelhuber für die Betreuung und den wiss. Austausch
- Herrn Prof. Dr.-Ing. E. Schlücker für die Übernahme des Koreferates
- Herrn Prof. Dr.-Ing. K. Sommer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes
- Herrn Prof. Dr. Dr. Martin Herrmann für die Mitarbeit in seinem Labor, in dem die Experimente für diese Arbeit stattgefunden haben, die Übernahme des Koreferates und die „Einführung in die Welt der Immunologie“
- Herrn Prof. Dr. H.-M. Jäck für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg und die immerwährende Diskussionsbereitschaft
- Meiner Betreuungskommission, Herrn Prof. Dr. Lutz und PD Dr. Pahl
- Herrn PD Dr. Franz Rödel für die Beratung, Korrektur und andauernden wissenschaftlichen Austausch während der Erstellung dieser Arbeit
- Allen Mitgliedern der AG Herrmann und AG Voll, die nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht immer für mich da waren und „dem Schwaben“ ein sehr angenehmes Arbeitsklima ermöglichten
- Dem ganzen Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der TUM, die immer und immer wieder den „Besucher“ ertragen haben
- Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 592 für die schöne Zeit
- Herrn Dr.-Ing. M. Hartmann für die wunderbare Kooperation und die vielfältigen Diskussionen bis spät in die Nacht
- Der Doktor Robert Pflieger Stiftung für die finanzielle Unterstützung
- Meinen Eltern ganz besonders, da sie meine wissenschaftliche Ausbildung immer unterstützt und gefördert haben
- Meinem Bruder Magnus, ohne den ich mit der Schreibmaschine tippen müsste
- Herrn H. Müller, der nicht nur einen Blick auf meine Finanzen hat
- Frau Dr. Meister für... .. so vieles und noch viel mehr
- Den Toten Hosen, AC/DC, Iron Maiden und Manowar für die Inspiration und aufbauenden Worte in schweren Zeiten.