

Aus dem Bereich Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Funktionale Charakterisierung der Effektor-Mechanismen humaner CD8⁺ T-Zell Memory-Subtypen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2019

Vorgelegt von: Arne Knörck

geb. am: 22.12.1988 in Berlin

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Biophysik am Zentrum für integrative Physiologie und Medizin der Universität des Saarlandes durchgeführt

Dekan:	Prof. Dr. Michael D. Menger
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. Markus Hoth
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ
Drittberichterstatter:	Prof. Dr. Markus Bleich
Tag der mündlichen Prüfung:	20.08.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 3 -
Zusammenfassung	- 6 -
Summary	- 8 -
1 Einleitung	- 10 -
1.1 Das immunologische Gedächtnis.....	- 10 -
1.2 Entstehung von CD8 ⁺ Memory-Zellen.....	- 10 -
1.3 Charakterisierungsmerkmale humaner CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen.....	- 12 -
1.4 Zytotoxische Mechanismen CD8 ⁺ T-Zellen	- 17 -
1.5 Perforin-vermittelte Zytotoxizität.....	- 18 -
1.6 Todesrezeptor-vermittelte Zytotoxizität	- 21 -
1.7 Zielsetzung.....	- 23 -
2 Material & Methoden.....	- 24 -
2.1 Material	- 24 -
2.1.1 Antikörper.....	- 24 -
2.1.2 Reagenzien	- 25 -
2.1.3 Lösungen.....	- 27 -
2.1.4 Primer.....	- 28 -
2.1.5 Laborgeräte	- 29 -
2.1.6 Kits	- 30 -
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	- 30 -
2.1.8 Verwendete Zellen	- 31 -
2.1.8.1 Raji.....	- 31 -
2.1.8.2 NALM-6/NALM-6 pCasper.....	- 31 -
2.1.8.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	- 32 -
2.1.9 Software	- 32 -
2.2 Methoden	- 32 -
2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	- 32 -
2.2.2 SEA-Stimulation von PBMCs	- 33 -
2.2.3 Calcium-Imaging	- 33 -
2.2.4 Isolation SEA-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 34 -
2.2.5 Populations-Killing Assay	- 34 -
2.2.6 Zytometrische Bead Array Analyse	- 35 -
2.2.7 Quantitative real-time PCR.....	- 35 -

Inhaltsverzeichnis

2.2.8	Durchflusszytometrische Analysen.....	- 35 -
2.2.8.1	Extrazelluläre Färbungen.....	- 36 -
2.2.8.2	Antikörper-Panels	- 37 -
2.2.9	Durchflusszytometrische Sortierung.....	- 39 -
2.2.10	Einzelzell-Killing Assay.....	- 40 -
2.2.11	Statistik.....	- 42 -
3	Ergebnisse.....	- 44 -
3.1	<i>In vitro</i> Experimente zur Gewinnung und Expansion von primären CD8 ⁺ T-Zell-Subtypen aus humanem Blut - 44 -	
3.1.1	Isolationseffizienzen und Funktionalität von zytotoxischen Zellen aus Überresten der Hämapherese	- 44 -
3.1.2	Vergleich der Reinheit durchflusszytometrischer und immunmagnetischer Isolationen	- 45 -
3.1.3	SEA-vermittelte <i>in vitro</i> Expansion von primären CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 46 -
3.2	Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen	- 48 -
3.2.1	Das zytotoxische Potential der SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zell-Population.....	- 48 -
3.2.2	SEA-stimulierte CD8 ⁺ Memory- und Effektor-Subpopulationen exprimieren Perforin.....	- 50 -
3.2.3	SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zell Memory-Subpopulationen exprimieren den TRAIL Liganden.....	- 52 -
3.2.4	Die Population SEA-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen enthält TC1 und TC17 Zellen.....	- 53 -
3.2.5	Funktionaler Nachweis der Perforin-vermittelten Zytotoxizität.....	- 55 -
3.2.6	NALM-6 Zellen als Zielzellsystem für SEA-vermittelte Zytotoxizität	- 56 -
3.2.6.1	NALM-6 Zellen exprimieren HLA-DR auf der Zelloberfläche und können mit SEA-beladen werden - 57 -	
3.2.6.2	Die Zelllinie NALM-6 ist als <i>in vitro</i> System zur Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen geeignet.....	- 58 -
3.2.6.3	NALM-6 Zellen exprimieren die Todesrezeptoren FAS-R und TRAIL-R	- 58 -
3.2.6.4	Das pCaspaseR-GR Konstrukt wird homogen von vitalen NALM-6 Zellen exprimiert	- 60 -
3.2.7	Detektion von Apoptosen und Nekrosen mittels pCaspaseR-GR in NALM-6 Zielzellen	- 61 -
3.2.8	Staurosporin-, TRAIL- und FAS-L -induzierte Apoptosen können mittels pCaspaseR in NALM-6 Zellen detektiert werden.....	- 63 -
3.2.9	SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen benutzen Todesrezeptor-vermittelte Lyse-Mechanismen als langsamen Ersatz für Perforin-vermitteltes Killing.....	- 65 -
3.3	Isolation von CD8 ⁺ T-Zell-Subtypen.....	- 70 -
3.4	Durchflusszytometrische Sortierung von T _{EM} und T _{CM} aus der SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zell-Population - 71 -	
3.5	Calciumsignale der CD8 ⁺ Subtypen T _{EM} und T _{CM}	- 72 -
3.6	Zytotoxizität von isolierten Subpopulationen	- 76 -

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	Die Subpopulation T _{EM} verfügt über ein gesteigertes zytotoxisches Potential.....	- 76 -
3.6.2	Die Expression von Effektormolekülen auf mRNA-Ebene ist in T _{EM} erhöht.....	- 77 -
3.6.3	Nachweis von Effektorproteinen nach der Zielzelllyse	- 79 -
3.6.4	Perforingehalt von isolierten T _{EM} - und T _{CM} - Populationen	- 80 -
3.7	Analyse der Subtypen-vermittelten Zytotoxizität im Einzelzell-Killing Assay	- 81 -
3.7.1	Manuelle Analyse der Zytotoxizität von T _{EM} und T _{CM} auf Einzelzell-Ebene	- 82 -
3.7.2	Die semi-automatisierte Detektion von Apoptosen auf Einzelzellebene	- 87 -
3.7.3	Die semi-automatisierte und die manuelle Analyse zeigen im direkten Vergleich keine Unterschiede.....	- 90 -
3.7.4	Manuelles Tracking der CTL Interaktion.....	- 91 -
4	Diskussion	- 95 -
4.1	Generierung von CD8 ⁺ Subpopulationen	- 96 -
4.2	Charakterisierung des zytotoxischen Potenzials der SEA-stimulierten CTL Population.....	- 98 -
4.3	Unterscheidung von Nekrosen und Apoptosen	- 103 -
4.3.1	Die Analyse von Arten des Zelltodes mit Hilfe des pCaspaseR-basierten Einzelzell-Killing Assays .. - 103 -	
4.3.2	Etablierung von NALM-6 als CTL Zielzellsystem.....	- 104 -
4.4	Quantifizierung der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CTLs im Einzelzell-Killing Assay.....	- 106 -
4.5	Separation von CD8 ⁺ Memory Subtypen	- 107 -
4.6	Analyse der Zytotoxizität von T _{EM} und T _{CM} auf Einzelzellebene	- 107 -
4.7	Vergleich der semi-automatisierten und manuellen Analyse von Zytotoxizität	- 113 -
5	Appendix.....	- 117 -
5.1	Abkürzungsverzeichnis	- 117 -
5.2	Tabellenverzeichnis	- 119 -
5.3	Abbildungsverzeichnis	- 120 -
5.4	Anhänge.....	- 121 -
5.5	Literaturverzeichnis	- 122 -
5.6	Publikationen.....	- 137 -
5.7	Danksagung.....	- 139 -

Zusammenfassung

Die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen ist für die langfristige Beseitigung von entarteten oder virusinfizierten Zellen von entscheidender Bedeutung. Während der Immunantwort werden verschiedene Effektor und Memory T-Zell-Subtypen gebildet, um einen Erreger zu beseitigen sowie ihn bei einer erneuten Infektion zu erkennen und effizient abwehren zu können. Zytotoxische T-Zellen können Tumorzellen mittels zweier unterschiedlicher Mechanismen eliminieren. Entweder durch die Freisetzung lytischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, oder durch die Bindung der Liganden FAS-L beziehungsweise TRAIL an Todesrezeptoren auf der Zielzelle. Durch diese Mechanismen werden sowohl apoptotische als auch nekrotische Zielzelllysen induziert. Mit Hilfe des FRET-basierten Apoptose-Sensors pCaspase-GR ist es möglich, Apoptosen und Nekrosen in mikroskopischen Einzelzellanalysen zu detektieren und mechanistisch voneinander zu unterscheiden. Diese Analyseverfahren wurden von unserer Arbeitsgruppe entwickelt, um die Induktion und Kinetiken der Zielzellapoptose oder -nekrose durch zytotoxische Immunzellen zu unterscheiden und die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Dazu wurde mit der Zelllinie NALM-6 pCaspase ein Zielzellsystem für stimulierte CD8⁺ T-Zellen etabliert, das sowohl gegenüber Perforin- als auch Todesrezeptor-vermittelten Lysen sensibel ist. Bisher wurde nicht funktional untersucht, welches Repertoire an zytotoxischen Mechanismen verschiedene CD8 T-Zell-Subtypen verwenden, um Zielzellen zu lysieren. Moderne Tumorthera pieansätze, wie der adoptive Transfer von modifizierten T-Zellen, basieren auf den Effektorfunktionen der transferierten Zellen und könnten von neuen Kenntnissen zur Subtypen-abhängigen Verwendung der zytotoxischen Mechanismen profitieren. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es somit, die Subtypen-abhängige Zytotoxizität von CD8⁺ Effektor-Memory (T_{EM}) und Central-Memory (T_{CM}) T-Zellen zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wird ein Protokoll präsentiert, mit dem CD8⁺ T-Zellen in ausreichender Quantität und Qualität aus peripherem Blut gewonnen und CD8⁺ Effektor-Memory und Central-Memory-Subtypen expandiert und isoliert werden können. Des Weiteren wurde die CD8⁺ T-Zell-Population mittels durchflusszytometrischer Analysen charakterisiert und die Zytotoxizität der Zellen mit Hilfe von *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays auf Populations- und Einzelzellebene untersucht. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Subtypen T_{EM} und T_{CM} mittels durchflusszytometrischer Sortierung isoliert, um sie mit Hilfe einer Kombination aus deskriptiven Analysen und den zuvor genannten Killing Assays hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials zu charakterisieren.

Zusammenfassend zeigen die deskriptive und funktionale Charakterisierung der CD8⁺ Population und ihrer Subtypen, dass die Expression der Effektormoleküle Perforin, Granzym B, FAS-L, TRAIL und IFN γ bei T_{EM} wie zu erwarten erhöht ist. Interessanterweise exprimieren aber auch T_{CM} ein breites Spektrum an Effektormolekülen und sind in der Lage, Zielzellen zu lysieren. In den funktionalen Analysen wurden Perforin-vermittelte Lysen durch eine Behandlung mit CMA, und Todesrezeptor-vermittelte Lysen durch inhibitorische Antikörper spezifisch inhibiert, um die Geschwindigkeit

Zusammenfassung

einzelner Mechanismen sowie ihr Zusammenspiel bei der Zielzellyse aufzuklären. Beide Subtypen induzieren den größten Teil der Zielzellysen über den Perforin (+/- Granzym)-vermittelten Mechanismus. Dieser ist durch die Induktion von primären Nekrosen durch Perforin (innerhalb der ersten Stunde des Assays) und Apoptosen durch Perforin+Granzym (0-4 Stunden) klar dominant. Die FAS-L (ab 2 Stunden) und TRAIL (ab 3 Stunden) induzierte Zielzellapoptose ist deutlich seltener und langsamer. T_{EM} zeigen gegenüber T_{CM} eine zweifach höhere Expression von Perforin und eine deutlich effizientere Zielzellyse. So induzieren T_{EM} beispielsweise innerhalb der ersten zwei Stunden einer Messung in über 64,8% der Zielzellen Apoptosen und Nekrosen, während T_{CM} in nur 31,4% der Zielzellen ausschließlich Apoptosen induzieren und die Induktion primärer Nekrosen ganz ausbleibt.

Parallel zu einer zeitsparenden semi-automatisierten Analyse zur Quantifizierung nekrotischer und apoptotischer Lysen wurde in dieser Arbeit auch eine manuelle Analyse etabliert, die zum einen die Identifikation primärer Nekrosen ermöglicht und zum anderen der Verifikation des semi-automatisierten Verfahrens dient. Durch die Kombination dieser Einzelzellanalyse der Zielzellen mit einer manuellen Analyse der CTL-Aktivität können zeitliche Abschnitte der Lyse, wie die Dauer der Induktion von Apoptosen, bestimmt werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass T_{EM} nach Zielzellkontakt innerhalb von $25,7 \pm 43,05$ min Apoptosen induzieren, während T_{CM} dazu $81,1 \pm 78,9$ min benötigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde so das zytotoxische Potenzial von T_{EM} und T_{CM} Subtypen charakterisiert, die Geschwindigkeit, die Art des Zielzelltodes und die Verwendung zytotoxischer Mechanismen in einem Lyseprofil für beide Subtypen zusammengefasst.

Summary

The cytotoxicity of CD8⁺ T cells is crucial for long-term elimination of tumor- or virus-infected cells. CD8⁺ T cells differentiate into various subsets of effector and memory cells to eliminate pathogens and to ensure rapid recognition and defense in case of a reinfection. CD8⁺ T cells kill tumor cells by two different main cytotoxic mechanisms. One of these involves directed release of lytic granula, which contain perforin and granzymes, the other signals through ligation of the death receptor ligands FAS-L and TRAIL. These cytotoxic mechanisms can induce apoptotic or necrotic target cell lysis. A novel microscopic single-cell analysis facilitates the detection and differentiation of apoptosis and necrosis using the apoptosis sensor pCaspaseR-GR. This analysis was developed by our group to differentiate the induction of apoptosis and necrosis of target cells and investigate the kinetics of underlying mechanisms. To this end, we established the cell line NALM-6 pCaspaseR as a target cell system for CD8⁺ T cells to identify perforin- and death receptor mediated target cell lysis. So far, it has not been functionally investigated which repertoire of cytotoxic mechanisms is used by distinct subsets to lyse target cells. Modern approaches of tumor therapy, such as adoptive transfer of modified T cells, rely on a highly efficient effector function of transferred cells and would greatly benefit from new knowledge on subtype-dependent use of cytotoxic mechanisms. A major aim of this work therefore was the investigation of the subtype-dependent cytotoxicity of CD8⁺ effector-memory (T_{EM}) and central-memory (T_{CM}) T cells.

The first part of this work describes a newly developed protocol to obtain CD8⁺ T cells in sufficient quantity and quality from peripheral blood and isolate expanded CD8⁺ subsets. Furthermore, the entire CD8⁺ T cell population was characterized by flow cytometry and the cytotoxic potential was investigated using *in vitro* cytotoxicity assays on single-cell and population level. In the second part of this work T_{EM} and T_{CM} subtypes were isolated by flow cytometric sorting to characterize their cytotoxic potential by a combination of descriptive analysis and the named killing assays.

In summary, the descriptive and functional analysis of the CD8⁺ population display an expected elevated expression of the effector molecules granzyme b, FAS-L, Trail and IFN γ in T_{EM}. Interestingly, T_{CM} also reveal a broad expression of effector molecules that should enable lysis of target cells. To investigate the pace and interplay of distinct cytotoxic mechanisms, perforin-mediated lysis was inhibited using concanamycin A and death receptor-mediated lysis was inhibited by specific inhibitory antibodies. Both subtypes mainly rely on the perforin (\pm granzyme) -mediated mechanism to induce target cell death. By induction of primary necrosis (within the first hour of the assay) and apoptosis by perforin+granzyme (0-4 hours) this mechanism is clearly dominant. Apoptosis induced by FAS-L (from 2 hours on) and TRAIL (from 3 hours on) was slower and was also observed less frequently. In contrast to T_{CM}, T_{EM} display a higher expression of perforin as well as a higher efficiency of target cell lysis. For example T_{EM} induce apoptosis and necrosis in 64,8% of target cells within two hours, in contrast T_{CM} induce apoptosis only in 31,4% of target cells, while primary necrosis is not detectable at all. In parallel to a

Summary

time-saving semi-automated quantification of necrotic and apoptotic lysis, an alternative manual analysis was established to facilitate the detection of primary necrosis and verify the semi-automated analysis. Combining single-cell analysis of target cells and the manual analysis of CTL activity, distinct phases of target cell lysis as well as the timeframe of apoptosis-induction were determined. Thus we could show that T_{EM} induce apoptosis within $25,7 \pm 43,05$ minutes from target cell contact on, while T_{CM} need $81,1 \pm 78,9$ minutes.

Within the scope of this work the cytotoxic potential of T_{EM} and T_{CM} subtypes was characterized and the pace, the mode of cell death and the differential use of cytotoxic mechanisms were summarized for both subsets in a profile of lysis.

1 Einleitung

1.1 Das immunologische Gedächtnis

“The same man was never attacked twice — never at least fatally.”- schreibt Thukydides in „Die Geschichte der peloponnesischen Kriege“ über die Attische Seuche (430-426 v. Chr.) und beschreibt damit erstmals den durch das immunologische Gedächtnis vermittelten Schutz vor Krankheiten (Thuc 2.51; Tangye, 2015). Das immunologische Gedächtnis ist nach Janeway (9. Auflage, 2018) grundlegend definiert durch: „Eine sofortige und stärkere Reaktion auf ein erneutes Auftreten eines Krankheitserregers“. Dieser Beobachtung von Immunität liegt zugrunde, dass langlebige antigenerfahrene Zellen ein wiederauftretendes Antigen wiedererkennen und eine schnelle und effiziente Immunantwort einleiten. Die Population von CD8⁺ T-Zellen trägt in Form von Memory-Zellen zur Erkennung und Eliminierung bereits bekannter Antigene bei. Auch 2450 Jahre nach der ersten Dokumentation sind die Mechanismen der Ausbildung und Erhaltung des immunologischen Gedächtnisses Gegenstand intensiver Forschung und werden immer noch kontrovers diskutiert.

1.2 Entstehung von CD8⁺ Memory-Zellen

Zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten (CTLs) sind in der Lage, infizierte oder entartete Zellen antigenspezifisch zu erkennen und zu töten. Sie sind daher ein essenzieller Teil der adaptiven Immunantwort auf Viruserkrankungen und Krebs. Die Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen wird in drei Phasen unterteilt: Die Phase der klonalen Expansion, die Kontraktionsphase und die Phase der immunologischen Gedächtnisbildung (memory-formation) (Kaech and Cui, 2012). Für jede dieser Phasen ist ein CD8⁺ Zell-Subtyp in einem bestimmten Entwicklungsstadium entscheidend. Nach der Infektion mit einem unbekanntem Antigen reagiert die CD8⁺ T-Zell-Population mit der klonalen Expansion von antigen-spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen (T_N) (Zhang and Bevan, 2011). Die antigen-unerfahrenen naiven Zellen migrieren durch lymphatisches Gewebe und die Blutbahn bis ihnen in den Lymphknoten durch eine APC (antigen-präsentierende Zelle) ihr spezifisches Antigen präsentiert wird. Antigene sind zytosolische Peptidsequenzen, die bei der Proteasom-vermittelten Degradierung endogener Proteine generiert und von MHC- (major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse-I-Peptidkomplexen (pMHC-I) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen durch die Bindung des T-Zell Rezeptors (TCR: T cell receptors) an pMHC-I. Dendritische Zellen sind in der Lage, Antigene exogenem Ursprungs zu phagozytieren und diese über den Mechanismus der Kreuzpräsentation pMHC-I-vermittelt zu präsentieren, um naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren (Joffre *et al.*, 2012; Blum, Wearsch and Cresswell, 2013). Infizierte oder entartete Zellen präsentieren virale Peptide oder Tumorantigene ebenfalls über pMHC-I Moleküle und werden so von CD8⁺ Effektor T-Zellen antigenspezifisch erkannt und getötet.

Einleitung

Erhalten die T_N bei der als Priming (Primärprägung) bezeichneten Aktivierung durch Dendritische Zellen weitere kostimulatorische Signale, wird die klonale Expansion eingeleitet (Mescher *et al.*, 2006). Dabei vervielfacht sich die Population antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen und durch die Aktivierung von Proliferation und Zytokinproduktion kommt es zur Generierung einer Population von Effektor-CTLs, die infizierte oder entartete Zellen tötet (Badovinac, Haring and Harty, 2007). Die CTLs verlassen die sekundären lymphatischen Gewebe über die Blutbahn und migrieren in entzündetes Gewebe, um die Infektion zu bekämpfen. Kurz nachdem die $CD8^+$ T-Zell-Population ihre maximale Größe erreicht hat, kommt es zur Beseitigung des Pathogens. Die Antigenlast nimmt folglich ab und die $CD8^+$ T-Zell-Population geht nach 7-10 Tagen in die Kontraktionsphase über (Busch and Pamer, 1999; Badovinac, Porter and Harty, 2002). In der Kontraktionsphase stirbt etwa 90% der antigenspezifischen $CD8^+$ Effektorpopulation durch Apoptose (Badovinac, Porter and Harty, 2002). Nur ein kleiner Anteil der Gesamtpopulation überlebt und reift in der Phase der memory-formation zu einer Population von $CD8^+$ Memory-Zellen heran. Diese langlebigen Zellen können auch ohne erneute Stimulierung durch ihr spezifisches Antigen viele Jahre überleben und eine Immunität gegen dieses Antigen aufrechterhalten. Kommt es zu einer sekundären Infektion, einem Wiederauftreten des Antigens, können Memory T-Zellen im Gegensatz zu naiven T-Zellen binnen kürzester Zeit reaktiviert werden und das Pathogen direkt mit Effektorfunktionen bekämpfen oder zu einer neugebildeten Effektorpopulation expandieren (Ahmed and Gray, 1996; Hammarlund *et al.*, 2003). Die genauen Mechanismen der memory-formation sind allerdings immer noch weitgehend unklar. Beispielsweise ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt langlebige Memory-Zellen entstehen, oder wann es zum memory-commitment (Festlegung auf ein Memory-Schicksal) einer Zelle kommt.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle der Diversifizierung oder Differenzierung von $CD8^+$ Subtypen diskutiert. Aufgrund der hohen Anzahl der in der Literatur diskutierten Modelle wird an dieser Stelle nur ein exemplarischer Überblick gegeben (C Stemmerger *et al.*, 2007; Appay *et al.*, 2008; Kaech and Cui, 2012; Mahnke *et al.*, 2013; Farber, Yudanin and Restifo, 2014; Jameson and Masopust, 2018). Den verschiedenen Modellen liegen variable, voneinander abhängige Faktoren zugrunde, die entscheiden, ob eine Zelle zu einer kurzlebigen, terminalen Effektorzelle oder einer langlebigen Memory-Zelle differenziert. Der Zeitpunkt des memory-commitments gehört zu diesen Faktoren. So kann das Memory-Schicksal einer naiven Zelle schon sehr früh, bereits vor dem ersten Antigenkontakt festgelegt sein. Alternativ kann es aber auch erst während oder nach der Stimulation zum memory-commitment kommen. Ein weiterer Faktor ist die mögliche Heterogenität der Population naiver Zellen. Für das Separate-Precursor (engl.: Verschiedene-Vorläufer) Modell bilden Zeitpunkt und Heterogenität die Grundlage des memory-commitment. Hier ist das Schicksal einer einzelnen Zelle durch eine genetische „Vorprogrammierung“ bereits im Vorläuferstadium festgelegt. Durch den Transfer einer einzelnen naiven Zelle, die zu einer Population aus Effektor- und Memory-Zellen expandiert wurde, wurde das Separate-Precursor Modell widerlegt (Christian Stemmerger *et al.*, 2007). Alternativ könnte das memory-commitment auch erst während des Primings oder später während der Kontraktionsphase

Einleitung

in Abhängigkeit von anderen Faktoren stattfinden. Als einer dieser Faktoren gilt die Signalstärke, die eine Zelle beim Priming durch das Antigen und/oder kostimulatorische Faktoren erhält. Im Signalstärke-Modell entscheidet beispielsweise die Intensität des Antigensignals während des Primings, ob eine naive Zelle zu einer Effektor- oder einer Memory-Population differenziert. Auch die Signalstärke wird durch die Beschaffenheit der naiven CD8⁺ T-Zell-Population beeinflusst. Der Anteil antigenspezifischer Vorläuferzellen und die Heterogenität in der Expression des TCR kann zum Beispiel durch unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem Antigen Unterschiede in der Signalstärke bei der Aktivierung einzelner Zellen bewirken. Basierend auf diesen Faktoren wurden weitere Modelle entwickelt und funktional bestätigt. Im Modell der progressiven Differenzierung entscheidet die Summe aller Signale die eine Zelle während der Immunantwort erhält über das memory-commitment (Lanzavecchia and Sallusto, 2002; Gett *et al.*, 2003). Auch als nachgewiesen gilt das Modell der asymmetrischen Zellteilung, hier findet das memory-commitment während der ersten Zellteilung für eine der Tochterzellen statt (Chang *et al.*, 2007). Tatsächlich spiegelt vermutlich eine Kombination verschiedener Modelle die memory-formation im menschlichen Immunsystem wider. So könnte eine Kombination aus einer initialen asymmetrischen Zellteilung eine Tochterpopulation entstehen, die entsprechend der Summe der aktivierenden Signale zu Effektor- und Memoryzellen differenziert (Buchholz, Schumacher and Busch, 2016; Marchingo *et al.*, 2016).

1.3 Charakterisierungsmerkmale humaner CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen

Der Differenzierungsstatus einer CD8⁺ T-Zelle kann anhand verschiedenster Parameter charakterisiert werden. Die Einteilung der CD8⁺ Zellpopulation in Subtypen von naiven Zellen, Effektor- oder Memory-Zellen findet grundsätzlich anhand der Expression von Oberflächenmolekülen statt.

Die erste Aufteilung der CD8⁺ T-Zell-Population in antigenerfahrene und naive Zellen wurde anhand der Oberflächenexpression von CD45 Isoformen durchgeführt (Akbar *et al.*, 1988; Merckenschlager *et al.*, 1988). Die Tyrosin-Phosphatase CD45 wird von allen Lymphozyten exprimiert. In T-Zellen dephosphoryliert CD45 die Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase (LCK) und reguliert somit die T-Zellaktivierung (Saunders and Johnson, 2010). Anhand der reziproken Expression der CD45-Isoformen CD45RO und CD45RA können naive Zellen und antigen-erfahrene Memory-Zellen identifiziert werden (Michie *et al.*, 1992). Yamada *et al.* (1992) zeigten beispielsweise, dass im Nabelschnurblut Neugeborener keine CD45RO⁺ antigen-erfahrenen Zellen nachgewiesen werden können, sich der Phänotyp dieser Zellen durch eine Stimulation aber zu CD45RO⁺ Zellen verändert. Daraus folgt, dass CD45RA⁺ T-Zellen Neugeborener naive Zellen sind und durch eine Stimulation zu antigen-erfahrenen Memory Zellen differenzieren. Im Blut Erwachsener sind diese antigenerfahrenen CD45RO⁺ T-Zellen zusammen mit CD45RA⁺ T-Zellen zu finden und nach einer Stimulation ist eine Reversion zu einem CD45RA⁺ Phänotyp auf differenzierten Zellen zu beobachten (Yamada *et al.*, 1992). Sallusto *et al.* (1999) setzen die Einteilung von T-Zellen in phänotypische Subtypen fort und beschreiben eine ihrer Funktion entsprechende Verteilung von Memory-Subtypen über den Körper.

Einleitung

Dazu wurde zusätzlich zu der Antigen-Erfahrung einer Zelle auch das Homing (nach Hause, beschreibt die Neigung in bestimmte Gewebe zu migrieren) in lymphatisches oder peripheres Gewebe verwendet, um sie einem Subtyp zuzuordnen. Die als $CD45RA^-$ definierten Memory-Zellen wurden mit Hilfe des Homing-Moleküls CCR7 (CD197) in $CD45RA^-/CCR7^-$ Effektor-Memory (T_{EM}) und $CD45RA^-/CCR7^+$ Central-Memory (T_{CM}) T-Zellen unterteilt. Der Chemokin-Rezeptor CCR7 bindet die Chemokin-Liganden CCL19 und CCL21, die für ein Homing in sekundäre lymphatische Gewebe verantwortlich sind. Die Einteilung der CTL-Population anhand von Homing-Molekülen wird ebenso mit CD62L (L-Selectin) durchgeführt. Dieses ermöglicht Zellen, über HEV (Hohe endotheliale Venulen) oder über Peyersche Plaques von der Blutbahn in die sekundären lymphatischen Organe zu migrieren (Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, 1999; Sackstein, Schatton and Barthel, 2017). In Abbildung 1 ist die phänotypische Einteilung von $CD8^+$ T-Zellen nach Sallusto *et al.* 1999 in die Hauptsubtypen T_N ($CD45RA^+/CCR7^+$), T_{CM} ($CD45RA^-/CCR7^+$), T_{EM} ($CD45RA^-/CCR7^-$) und T_{EMRA} ($CD45RA^+/CCR7^-$) schematisch dargestellt.

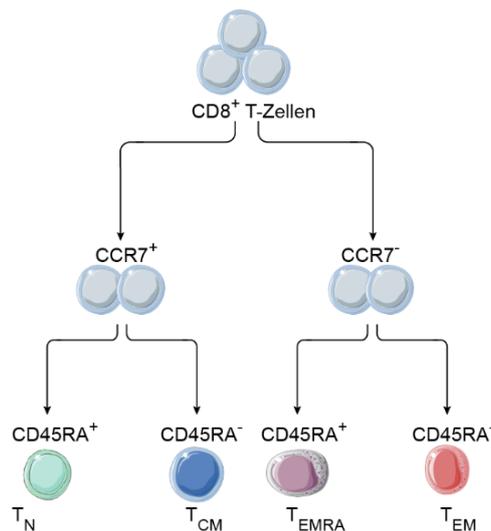


Abbildung 1: Phänotypische Einteilung von $CD8^+$ T-Zellen in T_N ($CCR7^+/CD45RA^+$), T_{CM} ($CCR7^+/CD45RA^-$), T_{EMRA} ($CCR7^-/CD45RA^+$) und T_{EM} ($CCR7^-/CD45RA^-$). Die Abbildung wurde nach Maecker, McCoy und Nussenblatt (2012) modifiziert.

Diese Hauptsubtypen der $CD8^+$ Population haben entsprechend ihrer unterschiedlichen Lokalisation und ihres Differenzierungsstatus festgelegte Funktionen. Aufgrund dessen können sie auch funktional anhand spezifischer Signatur-Expressionsmuster unterschiedlicher Moleküle definiert werden. Diese können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, wie z. B. Rezeptoren, die mit der Aktivierung und Regulation der Homöostase zusammenhängen. Zu diesen zählen kostimulatorische Rezeptoren wie CD27 und CD28 oder Zytokinrezeptor-Untereinheiten wie CD25 und CD127 (Hamann *et al.*, 1997; Appay *et al.*, 2008). Moleküle, die für bestimmte Funktionen entscheidend sind, wie Perforin, Granzyme oder $IFN-\gamma$ für die Zytotoxizität, oder beispielsweise IL-2 für die Proliferation, ermöglichen eine Bewertung der funktionalen Kapazität eines Subtyps (Appay *et al.*, 2008; Mahnke *et al.*, 2013). Anhand dieser Parameter wird im Folgenden ein Überblick der bedeutendsten $CD8^+$ T-Zell-Subtypen gegeben

Einleitung

und die proliferative sowie die zytotoxische Kapazität dieser Zellen veranschaulicht. Nach der Aktivierung ist die Differenzierung zu anderen Subtypen mit dem fortschreitenden Verlust und Gewinn spezifischer Funktionen verbunden. So geht die Migration ins periphere Gewebe mit einem Verlust an proliferativem Potential und einem Gewinn an Zytotoxizität einher. Interessanterweise ist nicht die Zytotoxizität, sondern das proliferative Potenzial, Langlebigkeit und self-renewal (stammzellartige Fähigkeit zur Selbsterneuerung) entscheidend für die anti-Tumor Wirkung eines Subtyps (siehe Abbildung 2) (Klebanoff, Christopher, Gattoni, Luca, Restifo, 2013; Restifo, 2014; Lugli and Gattinoni, 2015).

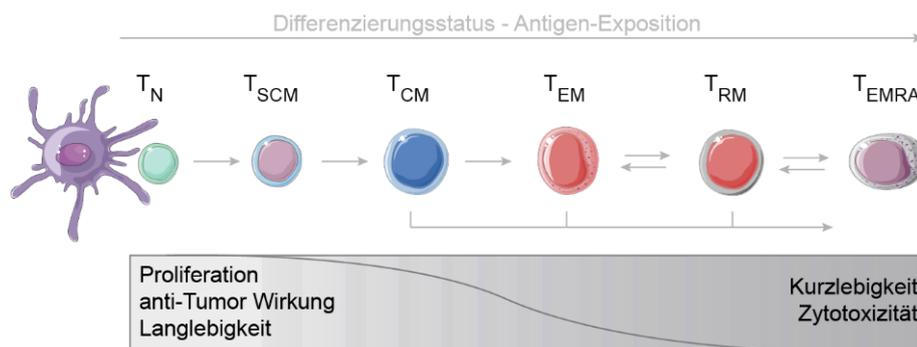


Abbildung 2: Differenzierungsstatus und funktionale Kapazität von CD8⁺ Subtypen (modifiziert nach Restifo, 2014; Lugli and Gattinoni, 2015 & SmartServier)

Den in Abbildung 2 dargestellten CD8⁺ T-Zell-Subtypen kommt in der Literatur die größte Bedeutung zu. Im Folgenden werden Phänotyp, Lokalisation und Funktion dieser Subtypen kurz umrissen.

Naïve Zellen (T_N) suchen überwiegend in sekundären lymphatischen Geweben nach ihrem spezifischen Antigen. Folglich zeigen sie eine starke und homogene Expression von CCR7 und CD62L, und werden anhand dieser Marker als CD45RO⁻/CD45RA⁺/CCR7⁺/CD62L⁺ definiert. T_N besitzen vor dem primären Antigenkontakt (Priming) keine Effektorfunktionen, erst nach dem Priming durch eine APC wird das hohe proliferative Potential aktiviert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD27 und CD28 sowie der IL-7 Rezeptor anti-Untereinheit CD127, können ebenfalls zur Identifikation von T_N genutzt werden (Mahnke *et al.*, 2013). Während der folgenden klonalen Expansion differenziert die T_N-Population, so wird beispielsweise die Expression von CD62L und CCR7 herunterreguliert und die Zellen migrieren in das periphere Gewebe. Gattinoni *et al.* (2011) beschreiben den am wenigsten differenzierten Memory-Subtyp, der einen Oberflächenphänotyp humaner T_N besitzt. Diese Zellen reagieren wie klassische Memory-Zellen innerhalb kurzer Zeit mit der Produktion von Effektormolekülen auf ein wiederauftretendes Antigen. Gleichzeitig besitzen sie die stammzellähnlichen Eigenschaften naïver Zellen, wie eine erhöhte Proliferation und Überlebenskapazität. Die Population wird als T_{SCM} (Memory-Stamm T-Zellen) bezeichnet und kann durch die Expression des FAS-Moleküls (CD95) auf der Zelloberfläche von gewöhnlichen CD95⁻ T_N unterschieden werden. Durch die Kombination der Eigenschaften von langlebigen, stammzellartigen T_N und antigenerfahrenen Memory-Subpopulationen weisen T_{SCM} ein hohes anti-tumor Potential auf und sind für den adoptiven

Einleitung

Transfer von Immunzellen (ACT) in der Tumorthherapie und die Verbesserung der Wirksamkeit von Vakzinen von großer Bedeutung (Gattinoni *et al.*, 2011, 2017; Wang *et al.*, 2016).

Während der klonalen Expansion wird eine große Population von Effektor-Zellen zur Beseitigung der Infektion gebildet. Diese setzt sich aus sogenannte MPEC (memory precursor effector cells; Memory-Vorläufer Effektor Zellen) und SLECs (short lived effector cells; kurz-lebige Effektor Zellen) zusammen. Während der Kontraktionsphase stirbt die SLEC Population und die MPEC Population entwickelt sich in Memory-Population weiter. Diese Populationen werden über die Expression von CD127 und KLRG1 definiert. Zellen die eine Sensitivität gegenüber IL-7 vermittelten Überlebens-Signalen zeigen, werden als CD127⁺/KLRG1⁻ MPECs beschrieben. Zellen die den Seneszenzmarker KLRG1 exprimieren sind als CD127⁻/KLRG1⁺ SLECs definiert (Schluns *et al.*, 2000; Kaech *et al.*, 2003; Joshi and Kaech, 2008). Durch abweichende Ergebnisse in nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Ansatz das Memory-Schicksal einer Effektorzelle anhand der Expression von CD127 und KLRG1 vorherzusagen, nicht immer zutrifft. Das Konzept von MPEC und SLECs zur Einteilung von CD8⁺ T-Zellen findet weiter Anwendung, die Sensitivität gegenüber IL-7 Signalen allein reicht jedoch nicht aus, um das Schicksal einer Zelle vorherzusagen (Lacombe *et al.*, 2005; Martin and Badovinac, 2018).

Die nach der Kontraktionsphase verbleibenden CD8⁺ Zellen bilden die Memory-Population. Die bereits beschriebenen T_{CM} zeichnen sich durch die Zirkulation zwischen Blut und sekundären lymphatischen Geweben aus und werden daher als CD45RO⁺/CD45RA⁻/CCR7⁺/CD62L⁺ definiert (Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, 1999). Dort warten T_{CM} auf eine erneute Infektion und die sekundäre Stimulation durch das Wiederauftreten ihres spezifischen Antigens. Im Vergleich zu T_N zeigen T_{CM} eine höhere Sensitivität gegenüber der Stimulation durch das spezifische Antigen und sind weniger auf kostimulatorische Signale angewiesen. Nach der Stimulation reagieren sie mit der direkten Produktion von IL-2 und starker Proliferation zu Effektorzellen. (Sallusto, Geginat and Lanzavecchia, 2004). T_{CM} Zellen werden daher zur reaktiven Memory-Antwort gezählt.

Im Gegensatz dazu werden T_{EM} Zellen der protektiven Memory-Antwort zugeordnet. Sie vermitteln also eine direkte Abwehr gegen ein wiederauftretendes Antigen. T_{EM} exprimieren keine Rezeptoren für lymphatisches Homing, zirkulieren daher im Blut oder im peripheren Gewebe und werden durch einen CD45RO⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻/CD62L⁻ Phänotyp definiert. Durch die Expression von Chemokinrezeptoren wie CXCR3, CCR5 und CX3CR1, die für die Migration in entzündetes Gewebe benötigt werden, können T_{EM} direkt am Ort der Infektion im peripheren Gewebe auf ein bekanntes Antigen reagieren (Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, 1999; Joshi *et al.*, 2007; Kaech and Cui, 2012; Gerlach *et al.*, 2016). T_{EM} zeigen ein geringeres proliferatives Potential als T_{CM}, haben aber durch die hohe Expression von Perforin und Granzymen ein höheres zytolytisches Potential und sezernieren IFN- γ und TNF- α (Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, 1999; Kaech and Cui, 2012; Bengsch *et al.*, 2016). Die Überwachung des peripheren Gewebes wird von einem weiteren spezifischen Effektor-

Einleitung

Memory Subtyp durchgeführt, den *Resident*- (ansässige) Memory T-Zellen (T_{RM}) Zellen. Diese werden durch die Expression von CD103 und CD69 definiert, die den Eintritt in spezifische Gewebe wie Haut, Darm oder Lunge ermöglichen und für die Retention der T_{RM} in diesen Geweben verantwortlich sind. T_{RM} Zellen erkennen einen bekannten, eindringenden Erreger an den Grenzflächen dieser Gewebe und beschleunigen die Abwehr durch die schnelle Sezernierung von IFN- γ (MacKay *et al.*, 2013; Mackay *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017).

Der am stärksten differenzierte $CD8^+$ T-Zell Subtyp wird durch die wiedererlangte, „revertante“ Expression von CD45RA identifiziert (siehe auch Abschnitt 1.3 (CD45)). Zellen dieses terminal differenzierten Subtyps werden als terminale Effektor T-Zellen (T_{TE}) oder T_{EMRA} -Zellen bezeichnet. Diese Zellen zeigen das geringste proliferative Potential, die geringste Telomerlänge und exprimieren weder CD27 noch CD28 (Romero *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigen T_{EMRA} -Zellen die stärkste Expression von Effektormolekülen wie Perforin, Granzym B, TNF- α und IFN- γ (Appay *et al.*, 2002; Mahnke *et al.*, 2013). Entsprechend dem Verlauf einer Infektion ist die Differenzierung zu unterschiedlichen Subtypen begünstigt, um die jeweiligen Anforderungen einer optimalen Kontrolle der Infektion zu erfüllen. Beispielsweise zeigen bei einer persistenten, chronischen Infektion mit CMV (Cytomegalievirus) Memory-Zellen einen $CD27^-/CD28^-$ „späten“ T_{EMRA} -Phänotyp, während bei einer persistenten Infektion mit HCV (Hepatitis C Virus) ein $CD27^+/CD28^+$ „früher“ T_{CM} -Phänotyp ausgebildet wird (Appay *et al.*, 2002, 2008).

Die stetige Optimierung der Analyse von T-Zell-Subtypen mit schier unbegrenzten Markern und Aufrufe diese Studien vergleichbar zu machen und zu strukturieren, haben zu einem umfassenden Bild der klassischen T-Zell-Subtypen beigetragen und die Entdeckung neuer funktionaler Subpopulationen möglich gemacht (Appay *et al.*, 2008; Bendall *et al.*, 2012; Maecker, McCoy and Nussenblatt, 2012; Mahnke *et al.*, 2013; Apetoh *et al.*, 2015). Entscheidend für die Rolle einer Subpopulation bei der Immunantwort sind vor allem die Funktion und die damit einhergehende Lokalisation einer Zelle. Parallel zu den Fortschritten in der polychromatischen Durchflusszytometrie und der Steigerung der Anzahl gleichzeitig analysierbarer Marker (Ornatsky *et al.*, 2006; Bjornson, Nolan and Fantl, 2013) hat sich auch die Technologie zum Nachweis der Zytotoxizität von CTLs, insbesondere durch hochauflösende mikroskopische Verfahren, verbessert. Dies ermöglicht präzise Analysen von Einzelzellkontakten und den Nachweis bestimmter zytotoxischer Mechanismen. Da die entscheidende Funktion von $CD8^+$ T-Zellen die spezifische Abwehr intrazellulärer Erreger mittels verschiedener zytotoxischer Mechanismen ist, sollen diese Mechanismen im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden. Wie die Studien von Appay *et al.* (2002) oder Nolz und Harty (2011) zur Kontrolle und erneuten Abwehr viraler Infektion zeigen, ist es von der Infektion abhängig, welcher Memory-Subtyp die beste protektive Kapazität vermittelt. Martin und Badovinac (2016) formulieren einen Appell zur Aufklärung der Pathogen-spezifischen Rolle von Memory-Subtypen wie T_{EM} und T_{CM} bei der Abwehr verschiedener Pathogene. Gleichzeitig heben sie die Bedeutung hervor, die der Entschlüsselung der genauen

Einleitung

Mechanismen der Generierung und Erhaltung dieser Subtypen bei der Optimierung von Vakzinen zukommt. Es ist davon auszugehen, dass diese Memory-Subtypen auch bei der Bekämpfung von Tumoren und der Vermeidung eines Rezidivs von großer Bedeutung sind. Das Konzept der Pathogenspezifischen Anforderungen an Memory-Subtypen sollte daher auch auf die der Tumorabwehr zugrunde liegenden zytotoxischen Mechanismen übertragen werden können.

1.4 Zytotoxische Mechanismen CD8⁺ T-Zellen

Der durch CD8⁺ T-Zellen (CTLs) vermittelte Schutz bei der Abwehr einer Infektion beruht auf der Bekämpfung entarteter Zellen oder intrazellulärer Krankheitserreger durch verschiedene zytotoxische Mechanismen. Der Abwehr intrazellulärer Erreger kommt eine besondere Bedeutung zu, da diese Erreger wie z. B. Viren nicht mehr durch andere Abwehrmechanismen erreicht werden können. Bereits vor über 50 Jahren gelang es bei der Erforschung der Abstoßung von Organtransplantaten, die Zytotoxizität von T-Zellen nachzuweisen (Friedman, 1964; Cerottini, Nordin and Brunner, 1970). Kurz darauf konnte durch verschiedene Gruppen gezeigt werden, dass diese T-Zellvermittelte Zytotoxizität durch Konjugation von CTL und Zielzelle vermittelt wird (Koren, Ax and Freund-Moelbert, 1973; Zagury *et al.*, 1975). Dieser Kontakt wird als immunologische Synapse (IS) bezeichnet und beruht zum einen auf der TCR-vermittelten Erkennung des durch MHC-I präsentierten spezifischen Antigens. Zum anderen ist die Bindung von LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) auf der CTL-Oberfläche an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) auf der Zielzelloberfläche für die Ausbildung der IS entscheidend (De La Roche, Asano and Griffiths, 2016; Hashimoto-Tane *et al.*, 2016). Die Ausbildung einer stabilen IS führt zu einem lange-anhaltenden Kontakt. Durch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts polarisiert die CTL und TCR-Microcluster bilden einen supramolekularen Adhäsionskomplex (SMAC) (Stinchcombe and Griffiths, 2007). *In vivo* wird ein effizienteres Killing mehrerer Zielzellen in kurzer Zeit durch die Bildung kurzer, weniger stabiler Kontakte erreicht, die als Kinapsen bezeichnet werden (Purbhoo *et al.*, 2004; Golstein and Griffiths, 2018).

CD8⁺ T-Zellen verfügen über verschiedene Effektorproteine, um infizierte oder entartete Zellen auf apoptotischen oder nekrotischen Weg zu lysieren. Diese Effektorproteine können zwei verschiedenen Mechanismen zugeordnet werden. Die Perforin-vermittelte Lyse von Zielzellen beruht auf der Freisetzung lytischer Granula, die Perforin, Granulysin und Granzyme enthalten. Der zweite Mechanismus, die Todesrezeptor-vermittelte Lyse, beruht auf der Kopplung eines Liganden auf der Oberfläche der CTL an einen Todesrezeptor, wie FAS oder TRAIL-R (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor), auf der Zielzelloberfläche (Abbildung 3).

Einleitung

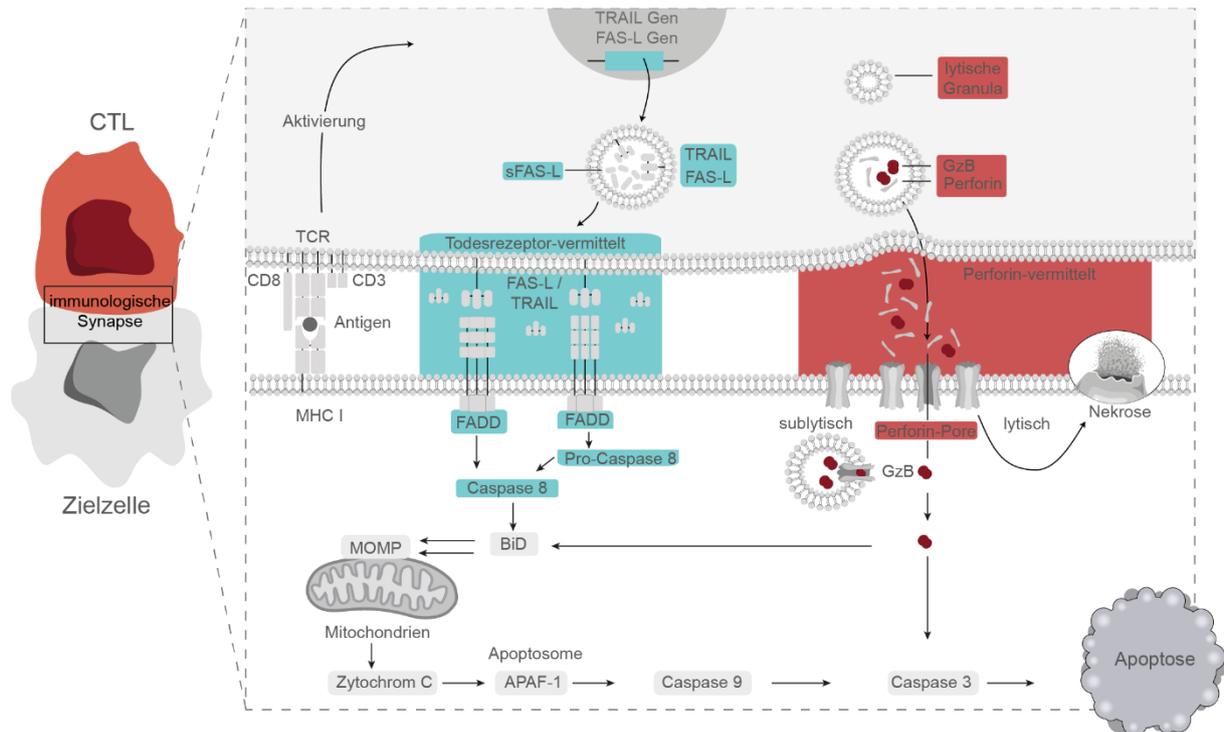


Abbildung 3: Zytotoxische Mechanismen von CD8⁺ T-Zellen. Nach der Ausbildung einer immunologischen Synapse wird durch die Formierung des MHC-I-Antigen-TCR-Komplexes die Lyse der Zielzelle durch zytotoxische Mechanismen aktiviert. Der Todesrezeptor-vermittelte Mechanismus (türkis) basiert auf der Bindung des TRAIL-Rezeptors oder des FAS-Rezeptors, auf der Zielzelloberfläche, an die Liganden TRAIL und FAS-L, auf der Oberfläche der CD8⁺ T-Zelle. TRAIL und FAS-L können auch als lösliche Liganden freigesetzt werden. Die Formierung von Trimeren des TRAIL-Rezeptors oder FAS-R aktiviert eine Caspase 8-vermittelte apoptotische Signalkette, die in der Apoptose der Zielzelle resultiert. Der Perforin-vermittelte Mechanismus (rot) basiert auf der Exozytose von lytischen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten. Perforin verursacht Läsionen in der Membran der Zielzelle, die in lytischer Konzentration eine Nekrose bewirken. In sublytischer Konzentration gelangt Granzym B durch Perforin-Poren ins Zytoplasma der Zielzelle und induziert über Bid oder Caspase 3 die Apoptose. Genauere Erläuterungen finden sich in den Abschnitten 1.5 und 1.6.

1.5 Perforin-vermittelte Zytotoxizität

Der Perforin-vermittelte Mechanismus wurde erstmals durch den Nachweis ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) -vermittelter röhrenartiger Läsionen in der Zielzellmembran nach der Koinkubation mit humanen Lymphozyten des peripheren Blutes beschrieben (Dourmashkin *et al.*, 1980). Durch *in vitro* Experimente mit aufgereinigten Granulen aus T-Zellen konnte die Funktion und Lokalisation von Perforin beschrieben werden (Podack and Konigsberg, 1984; Masson and Tschopp, 1985; Golstein and Griffiths, 2018). Perforin wird von CTLs bei der Exozytose lytischer Granula, als lösliches Monomer, in den Spalt der IS in Richtung der Zielzelle sezerniert. Auf der Zelloberfläche der Zielzelle oligomerisieren die Perforin-Monomere in Gegenwart von Calcium an der Zielzellmembran (Henkart *et al.*, 1984; Role *et al.*, 2005; Voskoboinik *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2010; Spicer *et al.*, 2017). Durch ein Ansammeln kleiner Oligomere bilden sich Transmembranporen mit einem Durchmesser von 10-20 nm (Leung *et al.*, 2017), die die Zielzelle schädigen und in Nekrose oder Apoptose resultieren. Die Bestimmung der Röntgenstruktur hat gezeigt, dass sich Perforin aus drei funktional unterschiedlichen Domänen zusammensetzt, dem N-terminalen MACPF (Membrane Attack Complex/Perforin), der die helicalen Transmembranregionen TMH1 und TMH2 enthält, der zentralen

Einleitung

EGF-(epidermal growth factor) Domäne und der C-terminalen C2-Domäne, die für die Calcium-abhängige Bindung an die Zielzellmembran verantwortlich ist (Law *et al.*, 2010; House *et al.*, 2017). Präsynaptisch wird Perforin nach der Synthese in lytischen Granula gespeichert. Durch die monomere Struktur und das saure Milieu der lytischen Granula, liegt es dort in inaktiver Form vor und erlangt seine lytische Funktion erst in Gegenwart von Calcium nach der Exozytose in den pH-neutralen synaptischen Spalt (Voskoboinik, Whisstock and Trapani, 2015; Spicer *et al.*, 2017).

Perforin und Nekrosen

In vitro induziert die Inkubation von Zielzellen mit aufgereinigtem oder rekombinantem Perforin eine nekrotische Lyse der Zielzellen (Backes *et al.*, 2018; Golstein and Griffiths, 2018). Bei dieser ist die Zielzelle nicht in der Lage die Perforin-vermittelten Poren zu reparieren. Daraufhin geht die Integrität der Zielzellmembran verloren und die Zielzelle geht in Nekrose über. Die Nekrose ist morphologisch durch ein Anschwellen und Abrunden der Zelle definiert. Durch das Aufplatzen der Membran dringt extrazelluläre Flüssigkeit in das Zellinnere ein, Organellen verlieren ihre Struktur und Zytoplasma entweicht in den Extrazellularraum (Kroemer *et al.*, 2009; Berghe *et al.*, 2010). Obwohl die Nekrose im Vergleich zur Apoptose als ungeordneter Prozess betrachtet wird, der das Resultat einer physischen oder chemischen Schädigung der Zelle ist, scheinen auch nekrotische Prozesse einer Signalkette zu folgen. Der Nekrose kommt durch die, mit der Zerstörung der Zellmembran einhergehende Freisetzung von DAMPs, (damage-associated molecular patterns) eine pro-inflammatorische physiologische Bedeutung zu (Berghe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018).

Perforin und Apoptosen

Im Gegensatz zu der nekrotischen Wirkung von aufgereinigtem Perforin werden Zielzellen bei der Koinkubation mit CTLs apoptotisch lysiert. Anhand einer Perforin-defizienten Mauslinie und knock-down Experimenten mit menschlichen Zellen konnte gezeigt werden, dass die CTL-vermittelte Zytotoxizität von Perforin abhängig ist (Acha-Orbea *et al.*, 1990; Kägi *et al.*, 1994). Die Perforin-vermittelte Induktion von Apoptosen konnte jedoch erst durch den Nachweis von später als Granzymen bezeichneten Serin-Esterasen in den lytischen Granula erklärt werden (Pasternack and Eisen, 1985; Golstein and Griffiths, 2018). Diese gelangen über die Perforin-Poren in das Zytoplasma der Zielzelle und können dort auf verschiedenen Wegen die Apoptose der Zielzelle induzieren. Die Proteinfamilie humaner Granzyme wird in fünf Granzyme unterteilt. Während die Granzyme H, K und M *in vivo* eine unterstützende Funktion bei der Abwehr intrazellulärer Erreger zeigen (Joeckel and Bird, 2014), vermitteln die Granzyme A und B eine zytotoxische Wirkung. Granzym B ist das am besten charakterisierte Granzym und zeigt den stärksten pro-apoptotische Effekt auf Zielzellen. Die Induktion der Apoptose durch Granzym B kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, beruht aber in beiden Fällen auf der Aktivierung von Caspasen (Cysteinyl-Aspartat spezifische Proteasen). Granzym B kann den intrinsischen Apoptoseweg durch das Schneiden des Moleküls BID (BH3 interacting domain death

Einleitung

agonist) auslösen, was die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) und somit die Freisetzung von Zytocrom C zur Folge hat. Cytochrom C bindet an das Apoptosom APAF1 und initiiert die Spaltung der Initiatorcaspase Procaspase 9, woraufhin es zu einer Aktivierung der Effektorcaspase 3 kommt. Die aktivierte Caspase 3 kann spezifische Substrate wie ICAD (Inhibitor der Caspase-Aktivierten DNase) spalten, so dass CAD freigesetzt wird, in den Nucleus transloziert und die DNA fragmentiert wird (Pradelli, Bénétéau and Ricci, 2010). Alternativ spaltet Granzym B auch die Initiatorcaspase Procaspase 8 oder die Effektorcaspase Procaspase 3, und löst so die Apoptose der Zielzelle aus. *In vitro* Experimente mit rekombinanten Granzym B haben gezeigt, dass die apoptotische Lyse der Zielzelle innerhalb weniger Minuten erfolgen kann. Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose als kontrollierter, selbstgesteuerter Abbau der Zelle beschrieben (Kerr, Wyllie and Currie, 1972; Lopez, Jenkins, Whisstock, *et al.*, 2013). Auch wenn unterschiedliche physiologische oder pathologische Signale eine Apoptose auslösen können, die intrazelluläre Weiterleitung des Signals findet immer über den intrinsischen oder extrinsischen Signalweg statt. Granzym B kann durch die Interaktion mit BID den intrinsischen Signalweg aktivieren, durch die direkte Interaktion mit den Procaspasen 3 und 8 ist aber auch eine extrinsische Aktivierung der Apoptose möglich. Beide Signalwege resultieren in der Aktivität der Effektorcaspasen 3, 6 oder 7, welche in der Fragmentierung der DNA, der Reorganisation des Zytoskeletts, der Kondensation des Zytoplasmas und der Abschnürung von apoptotischen Körperchen resultiert (Kerr, Wyllie and Currie, 1972). Ein weiteres Merkmal zur Identifikation von Apoptosen ist der Nachweis von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen (Vermees *et al.*, 1995). Dies gilt *in vivo* als „eat me“ („friss mich“)-Signal für Phagozyten, die die apoptotische Zelle anschließend phagozytieren (Fadok *et al.*, 1992). So wird eine Beseitigung der apoptotischen Zelle ermöglicht, ohne dass potentielle intrazelluläre Erreger oder immunogene Signale entweichen können (Zhang *et al.*, 2018).

Bisher ist der genaue Mechanismus, mit dem Granzyme über Perforinporen in die Zielzelle gelangen nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich ist bestätigt, dass Granzyme in die Zelle eindringen, auch wenn die Zelle in der Lage ist, die durch Perforin gebildeten Läsionen innerhalb weniger Sekunden zu reparieren. Die erste Hypothese, die den Eintritt von Granzymen durch Perforinporen in der Plasmamembran beschreibt, gilt mittlerweile als bestätigt (Lopez, Jenkins, Whisstock, *et al.*, 2013). Die „Endosomolyse“-Hypothese, nach der Perforin erst in Endosomen der Zielzelle Poren von ausreichender Größe bildet, gilt hingegen als immer unwahrscheinlicher (Kurschus *et al.*, 2008). Das zuletzt entdeckte Effektormolekül in lytischen Granula ist Granulysin. Das Saposin-ähnliche antibakterielle Toxin dringt wie Granzym B durch Perforinporen in die Zielzelle ein und lysiert dort intrazelluläre Bakterien wie *Listeria monocytogenes*. Auch für Granulysin konnte eine Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen werden, diese ist jedoch deutlich ineffizienter als die Granzym B-vermittelte Aktivierung von Caspasen (Saini *et al.*, 2011; Martinez-Lostao *et al.*, 2015).

Einleitung

Fehlfunktionen bei der Exozytose lytischer Granula oder loss-of-function (Verlust der Funktion) Mutationen des *PRF1*-Gens erzeugen ein schweres Krankheitsbild der Hämophagozytischen Lymphohistiozytose. Diese defekte des Perforin-vermittelten Mechanismus steigern das Krebsrisiko und schränken die Abwehr viraler Infektionen stark ein. Die Lyse von Zielzellen durch die Exozytose lytischer Granula gilt als der effizienteste Mechanismus. *In vitro* wird bereits seit 1978 das sequentielle oder serielle Killing von mehreren Zielzellen binnen weniger Minuten durch NK oder CTLs beschrieben. Ob diese Form der Zielzellyse auch *in vivo* relevant ist, ist bisher jedoch unklar (Halle, Halle and Förster, 2017). Eine gut eingeteilte Verwendung der lytischen Granula sowie eine effiziente Neusynthese und ein schneller Transport von Perforin und Granzymen zur IS sind jedoch essentiell für die hocheffiziente serielle Lyse von Tumor oder virusinfizierten Zellen (Hersperger, Makedonas and Betts, 2008; Lesteberg, Orange and Makedonas, 2017).

1.6 Todesrezeptor-vermittelte Zytotoxizität

Der alternative Hauptmechanismus der CTL-vermittelten Zytotoxizität ist die Todesrezeptor-vermittelte Induktion von Apoptosen. Diese beruht auf der Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs durch die Bindung des FAS-Liganden (FAS-L, CD178) oder TRAIL (CD253) an die jeweiligen Rezeptoren FAS-R (CD95) oder die TRAIL-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle. Diese Mechanismen wurden nach der Perforin-vermittelten Lyse entdeckt, da auch CTLs Perforin-defizienter Mäuse in der Lage, waren Zielzellen zu lysieren und die CTL-vermittelte Zytotoxizität auch im calciumfreien Milieu beobachtet werden konnte. Die Anerkennung eines weiteren zytotoxischen Mechanismus war lange umstritten (Golstein, 1987) und konnte erst 1993 mit Hilfe von FAS-exprimierenden und FAS-defizienten Zielzellen nachgewiesen werden (Rouvier *et al.*, 1993).

Der FAS-vermittelten Zytotoxizität kommt eine anti-virale und eine anti-Tumorfunktion zu, so gilt die Expression des FAS-Rezeptors CD95 auf Tumorzellen beispielsweise als positive Prognose (Shrestha and Diamond, 2007; Blok *et al.*, 2017). Die Hauptfunktion des FAS-Signalwegs ist jedoch die Erhaltung der Immunhomöostase und die Beseitigung autoreaktiver Zellen (Peter *et al.*, 2015). Der FAS-Rezeptor gehört zur Tumor Nekrose Rezeptor (TNFR) Typ I Familie und wird von Tumorzellen und von allen aktivierten T-Zellen exprimiert. So sind immunprivilegierte Gewebe, wie das Gehirn oder das Auge, durch die Expression von FAS-L vor der Aktivität autoreaktiver Immunzellen geschützt (Chávez-Galán *et al.*, 2009). Dieser Mechanismus kann auch von Tumorgeweben verwendet werden, um tumorinfiltrierende CTLs zu bekämpfen (Yu *et al.*, 2003; Strasser, Jost and Nagata, 2009; Peter *et al.*, 2015; De La Roche, Asano and Griffiths, 2016; Nagata and Tanaka, 2017).

Das von CTLs exprimierte Effektormolekül FAS-L wird in Mikrovesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Ob diese Vesikel in CTLs mit lytischen Granula assoziiert sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine stimulationsabhängige Regulation der Expression und Zytotoxizität von FAS-L konnte jedoch nachgewiesen werden. FAS-L kann in zwei Formen die Apoptose von Zielzellen induzieren.

Einleitung

Zum einen als membrangebundenes in Trimeren organisiertes Protein auf der Oberfläche von CTLs, zum anderen als löslicher FAS-L (sFAS-L). Nicht trimerisiert hat sFAS-L eine anti-apoptotische Wirkung, da es den FAS-Rezeptor blockiert. Durch die Interaktion mit extrazellulären Matrix-Proteinen kann aber auch sFAS-L trimerisieren und eine zytotoxische Wirkung entfalten. Der Zytotoxizität durch membrangebundenes FAS-L auf der Oberfläche von CTLs kommt jedoch eine größere Bedeutung zu. Die Bindung an den FAS-Rezeptor führt zur Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs. Dabei formiert sich um die zytoplasmatische death domain (DD, Todesdomäne) des FAS-Rezeptors der death-inducing signaling complex (DISC) aus dem Adaptermolekül FADD (Fas-assoziierte death domain), den Procaspasen 8 und 10 sowie dem Caspase 8/10 Regulator c-FLIP. Die Aktivierung der Initiatorcaspase 8 hat die Prozessierung von Procaspase 8 zu Caspase 3 zur Folge, wodurch es zur Überschneidung mit dem intrinsischen Apoptose-Signalweg kommt und die Zielzelle in die Apoptose übergeht (Peter and Krammer, 2003; Peter *et al.*, 2015).

Die Todesrezeptor-vermittelte Lyse kann auch durch das Molekül TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) induziert werden. Im Gegensatz zu FAS-L kann TRAIL an verschiedene Rezeptoren auf der Zielzelloberfläche binden. Nur die Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 können ein Apoptose-induzierendes Signal weiterleiten, da sie eine funktionale zytoplasmatische death domain besitzen. Die Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 werden auch als Decoy (Köder)-Rezeptoren bezeichnet, da sie die benötigte zytoplasmatische Death Domain nicht besitzen und keine Apoptosen induzieren können. Nach der Bindung an TRAIL-R1 und -R2 kommt es, wie bei der Interaktion von FAS-L und FAS, zur Trimerisierung der DDs von TRAIL-R1 oder R2 und durch die Bildung von DISC zur Aktivierung der Procaspasen 8 und 10. Der TRAIL Ligand wird von aktivierten Immunzellen exprimiert und zeigt gegenüber TRAIL-Rezeptor-exprimierenden Tumoren eine zytotoxische Wirkung, während er keinen Effekt auf gesundes Gewebe hat. Somit ist der TRAIL-Mechanismus an der Abwehr von Tumoren beteiligt. TRAIL-defiziente Mäuse entwickeln beispielsweise mehr Lymphome als Wildtyp Mäuse, darüber hinaus scheint TRAIL eine wichtige Rolle bei der Regulation und Abwehr von Metastasen zu spielen (Lopez, Jenkins, Whisstock, *et al.*, 2013; Martinez-Lostao *et al.*, 2015). Die Induktion von Apoptosen in Tumorzellen durch TRAIL wurde bereits in klinischen Studien angewendet, dabei wurden zum einen rekombinantes TRAIL, zum anderen agonistische Antikörper gegen TRAIL-R1 und -R2 in einzelnen oder kombinierten Studien verwendet (Lemke *et al.*, 2014; Martinez-Lostao *et al.*, 2015). Leider zeigen alle Studien nur eingeschränkten Erfolg in der Tumorthherapie, was vermutlich auf Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber Apoptosen zurückzuführen ist. Die Apoptoseresistenz ist ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen und wird durch Mutationen im Apoptosesignalweg, die Expression von immunregulatorischen Molekülen, oder eine reduzierte Präsentation von Antigenen erreicht (Hanahan and Weinberg, 2011). Diese Mutationen sind entscheidend für die Entstehung von Tumoren und verhindern gleichzeitig den Erfolg verschiedener bestehender Tumortherapiemöglichkeiten. Im Gegensatz zu den Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen, die auf die Formierung der DISC angewiesen sind, scheint der über lytische Granula vermittelte Mechanismus

Einleitung

weniger anfällig gegenüber einzelnen Apoptoseresistenzen. Bestimmte Melanoma Zelllinien zeigen jedoch auch Abwehrmechanismen gegenüber Perforin und Granzym B, beispielsweise durch einen sekretorischen Ausbruch an der IS (Khazen *et al.*, 2016).

Der Erfolg kombinierter Immuntherapien, wie der Einsatz von genetisch modifizierten autologen CAR (chimeric antigen receptor)-T-Zellen in der adoptiven Zelltherapie (adoptive cell therapy, ACT) zusammen mit der klassischen Antikörper-vermittelten Immuntherapie, zeigt, dass der Angriff dieser Resistenzmechanismen auf verschiedenen Ebenen vielversprechend ist. Diese modernen Zell-vermittelte Ansätze der Tumorthherapie basieren auf dem Erfolg der zytotoxischen Mechanismen. In dieser Arbeit wird daher die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zell Memory Subtypen detailliert untersucht und ein Lyseprofil für einzelne Subtypen erstellt, das dazu beiträgt, das Zusammenspiel von zytotoxischen Mechanismen während der Zielzellyse genauer zu verstehen. Genauere Kenntnisse zur Verwendung der zytotoxischen Mechanismen durch verschiedene T-Zell-Subtypen könnten somit zu einer Verbesserung von T-Zell basierten personalisierten Therapien beitragen (Busch *et al.*, 2016).

1.7 Zielsetzung

Bei der Beseitigung von entarteten oder viral infizierten Zellen spielt die Differenzierung und die zelluläre Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle. In der Therapie von Krebs ist die Bekämpfung von Tumorzellen durch den therapeutischen Transfer von T-Zellen in jüngster Zeit von immer größerer Bedeutung. Die Eliminierung von Tumorzellen mit Hilfe adoptiver Zelltherapie basiert auf einer effizienten und persistenten Zytotoxizität der transferierten zytotoxischen Lymphozyten gegen Tumorzellen (Benmebarek *et al.*, 2019; Martinez and Moon, 2019). Dabei nimmt der Differenzierungsstatus einer Zelle großen Einfluss auf ihre Effektorfunktionen wie beispielsweise die Zytotoxizität (Klebanoff, Christopher, Gattoni, Luca, Restifo, 2013; Gattinoni *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Somit ist speziell die Subtypen-vermittelte Zytotoxizität gegen Tumorzellen für die Weiterentwicklung dieser Therapieansätze von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit soll das zytotoxische Potential von humanen T-Zell-Subtypen mittels moderner *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays auf Populations- und Einzelzellebene analysiert werden. Insbesondere soll untersucht werden, inwiefern sich das zytotoxische Potential von CTL-Subtypen unterscheidet, welche Faktoren mögliche Unterschiede in der Zytotoxizität verschiedener Subtypen gegen Tumorzellen beeinflussen und welche Mechanismen diesen Unterschieden zugrunde liegen. Um diese Ziele zu erreichen muss die Gewinnung und Expansion von CD8⁺-Subtypen *in vitro* aus peripherem Blut in der Arbeitsgruppe etabliert werden, sowie anschließend eine deskriptive und funktionale Charakterisierung durchgeführt werden. Weiterhin müssen die Zytotoxizitäts-Assays zur Unterscheidung und Kinetik der Apoptose- und Nekroseinduktion der Zielzellen durch zytotoxische CD8⁺-Subtypen entwickelt, weiterentwickelt oder optimiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

In dieser Arbeit wurden Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und zur funktionalen Inhibition von Todesrezeptor-vermittelter Zytotoxizität verwendet. Alle verwendeten Antikörper besitzen eine Spezifität gegen humane Epitope (anti-human).

Tabelle 1: Liste der verwendeten durchflusszytometrischen Antikörper unter Angabe von Spezifität, gekoppeltem Fluorophor, Klon, Hersteller und Bestellnummer

Spezifität	Fluorophor	Klon	Hersteller	Bestellnummer
anti-CD3	PerCP	SK7	Biolegend	344814
anti-CD4	BV421	RPA-T4	BD Biosciences	562424
anti-CD8a	eFluor® 450	SK1	eBioscience	48-0087-42
anti-CD8	FITC	SK1	Biolegend	344703
anti-CD14	Pe-Cy7	MφP-9	BD Biosciences	562698
anti-CD16	PE	B73.1	BD Biosciences	561313
anti-CD19	BV421	HIB19	BD Biosciences	562440
anti-CD45	BV510	HI30	BD Biosciences	563204
anti-CD45RO	FITC	UCHL-1	Biolegend	304204
anti-CD45RO	Pe-Cy7	UCHL-1	Biolegend	304230
anti-CD45RA	Pe-Cy7	HI100	Biolegend	304126
anti-CD56	APC	NCAM16.2	BD Biosciences	555518
anti-CD62L	APC	DREG-56	Biolegend	304810
anti-CD62L	PerCp-Cy5.5	DREG-56	Biolegend	304824
anti-CD95	Alexa Fluor 488	DX-2	Biolegend	305615
anti-CD107a	BV421	H4A3	Biolegend	328626
anti-CD178	PE	NOK-1	Biolegend	306406
anti-CD197	Alexa Fluor 647	150503	BD Biosciences	353217
anti-CD253	PE	RIK-2	Biolegend	308205
anti-HLA-A2	FITC	BB7.2	Biolegend	343303
anti-CD261 (TRAIL-R1)	PerCP	69036	R&D Systems	FAB347C

Material & Methoden

anti-CD262 (TRAIL-R2)	APC	DJR2-4 (7-8)	Biolegend	307408
anti-CD263 (TRAIL-R3)	BV421	B-D44	BD Biosciences	744764
anti-CD264 (TRAIL-R4)	PE	104918	R&D Systems	FAB633P
anti-Perforin	FITC	dG9	Biolegend	308104
anti-Perforin	PE	B-D48	Biolegend	353304
anti-IFNy	FITC	B27	BD Biosciences	561053
anti-IL-4	Alexa Fluor 647	8D4-8	Biolegend	500712
anti-IL-17	APC-Cy7	BL168	Biolegend	512320

Tabelle 2: Liste der verwendeten stimulatorischen oder inhibitorischen Antikörper unter Angabe von Spezifität, Klon, Hersteller und Bestellnummer

Spezifität	Klon	Hersteller	Bestellnummer
anti-CD3	UCHT1	AbD Serotec	MCA463XZ
anti-CD28	CD28.2	BD Biosciences	555725
anti-CD95	Apo-1-1	Enzo Life Sciences	ALX-805-022
anti-CD178	NOK-1	BD Biosciences	556371
anti-CD178	NOK-2	BD Biosciences	556375
anti-CD253	RIK-2	Biolegend	308208

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
BSA	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
CaCl ₂	J.T. Baker	0504
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
CellTiter-Blue®	Promega	G8081
CMA	Santa Cruz	sc-202111A
DMSO	Sigma Aldrich	D4540-100ML
EDTA	Sigma Aldrich	E9884
Ethanol	Sigma Aldrich	32205
FACSClean Solution	BD Biosciences	340345

Material & Methoden

FACSFlow Sheath Fluid	BD Biosciences	342003
FCS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Fibronectin	Sigma Aldrich	F1141
Fura-2 AM	Thermo Fisher Scientific	F1221
GolgiStop™	BD Biosciences	554724
HEPES	Sigma Aldrich	H-7523
IL-12 (human)	Miltenyi Biotec	130-096-704
IL-15 (human)	Miltenyi Biotec	130-095-760
IL-2 (human)	Thermo Fisher Scientific	PHC0023
IL-7 (human)	Peptotech	200-07
Ionomycin, free acid	VWR/Calbiochem	407950
Isopropanol	Sigma Aldrich	19516
MgCl ₂	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemical	M3950
Natriumazid	Sigma Aldrich	S8032
Paraformaldehyd	Polysciences	00380-250
PBS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck	524400
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333-100ML
Poly-L-ornithine	Sigma Aldrich	P3655
Saponin	Sigma Aldrich	S7900-25G
Staphylokokken Enterotoxin A	Sigma Aldrich	S9399
Staurosporin	Sigma Aldrich	S4400 1MG
Thapsigargin	Thermo Fisher Scientific	T7458
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizol	Thermo Fisher Scientific	15596018
Trypan Blau	Sigma Aldrich	T8154
Trypsin EDTA liquid	Thermo Fisher Scientific	10780384
z-AAD-CH ₂ CL	Abcam	ab142034
Zombie-Aqua	Biolegend	423102

2.1.3 Lösungen

Erythrozyten Lysepuffer

155 mM NH₄Cl
9,99 mM KHCO₃
130 µMEDTA
pH 7,3

HEPES-Puffer

10 mM HEPES
150 mM NaCl
pH 7,4

LB-Agarplatten

LB-Medium
1,5% Agar

Imaging Lösung 0 mM Kalzium

CaCl₂ 0 mM
MgCl₂ 3 mM
NaCl 155 mM
KCl 4,5 mM
HEPES 5 mM
Glucose 10 mM
Osmolarität: ~320 mosm

Imaging Lösung 0,5 mM Kalzium

CaCl₂ 0,5 mM
MgCl₂ 2,3 mM
NaCl 155 mM
KCl 4,5 mM
HEPES 5 mM
Glucose 10 mM
Osmolarität: ~320 mosm

Lösungen für durchflusszytometrische Analysen

Färbepuffer

0,5% BSA
5% FCS
in PBS, pH 7,4

Intrazellulärer Färbepuffer

0,5% BSA
5% FCS
0,1% Saponin
0,007% NaN₃
in PBS, pH 7,4

Tabelle 4: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Medium	Hersteller	Bestellnummer
AIM-V Medium	Thermo Fisher Scientific	12055-083
Hank's BSS	PAA Laboratories	H15-009
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific	21875-034
RPMI-1640 (ohne Phenolrot)	Sigma Aldrich	R7509
Transcription Factor Buffer Set	BD Biosciences	562574
WBC separation medium	PromoCell	C-44010

2.1.4 Primer

Tabelle 5: Liste verwendeter qPCR Primer unter Angabe der Forward und Reverse Primer Sequenzen

Ziel mRNA	Vorwärtsprimer 5' - 3'	Rückwärtsprimer 5' - 3'
Orai1	ATGAGCCTCAACGAGCACT	GTGGGTAGTCGTGGTCAG
Orai2	TGGAAGTGGTCACCTCTAAC	GGGTACTGGTACTGCGTCT
Orai3	GTACCGGGAGTTCGTGCA	GGTACTCGTGGTCACTCT
Stim1	CAGAGTCTGCATGACCTTCA	GCTTCCTGCTTAGCAAGGTT
Stim2	GTCTCCATTCCACCCTATCC	GGCTAATGATCCAGGAGGTT
FAS-L	GCACACAGCATCATCTTTGG	CAAGATTGACCCCGGAAGTA
Granzym B	GAGACGACTTCGTGCTGACA	CTGGGCCTTGTTGCTAGGTA
Perforin	ACTCACAGGCAGCCAACTTT	CTCTTGAAGTCAGGGTGCAG

Tabelle 6: Liste verwendeter Primer unter Angabe des Herstellers und der Bestellnummer

Ziel Gen	Hersteller	Bestellnummer
IFN- γ	Qiagen	QT00000525
TNF- α	Qiagen	QT00029162
TRAIL	Qiagen	QT00079212

2.1.5 Laborgeräte

Tabelle 7: Liste der wesentlichen Komponenten im ImageXpress Micro XLS System unter Angabe des Herstellers und der Wellenlängenspezifikationen

Komponente	Hersteller	Spezifikationen
Filter Set GFP-3035B	Semrock	Ex 472/30, Em 520/35
Filter Set Cy3-4040B	Semrock	Ex 531/40, Em 593/40
Filter Set FRET	Semrock	Ex 472/30, Em 641/75
Spectra X LED (Lichtquelle)	Lumencor	(GFP) Ex 470/24, (RFP) Ex 524/27
20 × S Fluor Objektiv	Nikon	NA: 0,75

Tabelle 8: Liste der wesentlichen Komponenten des TILL Photonics (FEI Company) Calcium-Imaging Systems

Komponente	Hersteller	Spezifikationen
Axio Observer A1	Zeiss	
Polychrom V	Till Photonics	320 nm - 680 nm
Imaging Control Unit	Till Photonics	
Clara (Lichtquelle)	Andor	
F76-521 Fura-2 HC Filter	AHF Analysetechnik	Em 510/84

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Observer A1	Zeiss
CFX96Real-TimeSystemC1000ThermalCycler	BioRad
CO ₂ Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Heraeus	Thermo Scientific
FACSARIA™ III	BD Biosciences
FACSVerse™	BD Biosciences
Genios Pro	Tecan
Heizblock	Bioer
ImageXpress Micro XLS System	Molecular Devices
Infinite M200 Pro	Tecan

Material & Methoden

Magnetrührer IKA RCT basic	Sigma Aldrich
pH Elektrode accumet Basic	Fisher Scientific
Pipetboy acy	Integra Biosciences
Sterilwerkbank	HERAsafe
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortex Thriller	Peqlab
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Zellzähler Moxi Z	Orflo
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

2.1.6 Kits

Tabelle 10: Liste der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers und der Bestellnummer

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Dynabeads CD8 Pos Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	11333D
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega	G8081
LEGENDplex™ Human CD8 Panel (13-plex)	Biolegend	740267

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
MACS SmartStrainers, 30 µm	Miltenyi Biotec	130-098-458
96-Well Imaging Platte (Black/Clear)	VWR	353219
96-Well Microplatte, PP, V-Boden	Greiner	651201
96-Well Microplatte, PS, Rundboden	Corning	353910
LeucoSep Röhrchen	Greiner Bio-One	227290
PluriStrainer 40 µm	PluriSelect	43-50040-01

Nicht näher aufgeführte, alltägliche Verbrauchsmaterialien, wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (Tubes), Zellkulturflaschen und 6- bis 96-Well Zellkulturplatten wurden von VWR, BD Biosciences, Peqlab oder Sarstedt bezogen.

2.1.8 Verwendete Zellen

Tabelle 12: Liste der verwendeten Zelllinien unter Angabe der Bezugsquelle

Zelllinie	Zellbank	zur Verfügung gestellt von
Jurkat E6.1	ATCC® TIB-152™	
K562	DSMZ ACC 10	
NALM-6		Tillmann Pick, Pharmakologie, Universität des Saarlandes
Raji	DSMZ ACC 319	
NALM-6 pCasper		generiert von Eva Schwarz, Dalia Alansary, Susanne Renno und Arne Knörck

2.1.8.1 Raji

Die Zelllinie Raji (DSMZ ACC 319) wurde aus B-Lymphozyten eines 11-jährigen Burkitt's Lymphoma Patienten generiert. Diese Zellen zeigen die Morphologie von Lymphoblasten und exprimieren MHC Klasse II, daher können sie mit dem Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) beladen werden. Die Präsentation von SEA ermöglicht die Staphylokokken Enterotoxin (SE) abhängige zelluläre Zytotoxizität (Dohlsten *et al.*, 1990). Daher sind SEA-beladene Raji Zellen ein etabliertes Zielzellensystem für SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (Kummerow *et al.*, 2014; Bhat *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). Die Kultivierung von Raji Zellen erfolgt in RPMI 1640 + 10%FCS + 1% PS.

2.1.8.2 NALM-6/NALM-6 pCasper

Die Zelllinie NALM-6 (DSMZ ACC 10) wurde aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) generiert. Die Zellen zeigen die Morphologie von B-Zell Vorläuferzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden NALM-6 Zellen als alternative Zielzellen für CD8⁺ T-Zellen. Diese Zytotoxizität beruht ebenfalls auf der SE-abhängigen zellulären Zytotoxizität. Dalia Alansary, Susanne Renno und Eva Schwarz konnten eine das pCasper-GR FRET Konstrukt stabil exprimierende NALM-6 Zelllinie herstellen. Die Zelllinie NALM-6 pCasper wird für die Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Einzelzell-Killing Assay verwendet. Die Kultivierung von NALM-6 Zellen erfolgt in RPMI 1640 + 10%FCS + 1% PS (für NALM-6 pCasper) + 0,2 µl/ml Puromycin.

2.1.8.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Der Begriff PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) beschreibt mononukleäre Zellen, die sich im peripheren Blut bewegen. Zu diesen zählen Lymphozyten, wie B-Zellen, T-Zellen und NK, sowie Monozyten und dendritische Zellen. PBMCs können mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation aus frischem Blut oder alternativen Quellen für peripheres Blut gewonnen werden. In dieser Arbeit erfolgte die Isolation von PBMCs aus Überresten der Thrombozyten-Apherese (siehe 3.1.1) (Knörck *et al.*, 2018). Diese Überreste stammen von gesunden anonymen Spendern (Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Unbedenklichkeitserklärung vom 16.4.2015 (83/15; Prof. Dr. Rettig-Stürmer) und vom 20.8.2010 (Prof Re/Ha)). In dieser Arbeit wurden PBMCs zur Stimulation und Isolation von CD8⁺ T-Zellen verwendet.

2.1.9 Software

Tabelle 13: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
FACSDiva V6.1.3	BD Biosciences
FACSSuite V1.0.5.3841	BD Biosciences
FlowJo V10.1	BD Biosciences
ImageJ 1.51d	National Institutes of Health
Prism 8	Graphpad
Igor Pro 6.2.2.2	Wavemetrics
IMARIS 8.1.2	Bitplane
Excel 2016	Microsoft
Word 2016	Microsoft
PowerPoint 2018	Microsoft
Legendplex V8	VigeneTech
Illustrator CC 2018	Adobe

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMCs wird im Labor routiniert von Carmen Hässig durchgeführt. Die Isolation von PBMCs anonymen Spender erfolgt aus Blut in LRS-Kammern, die als Abfallprodukt der Thrombozyten-Apherese von der lokalen Blutbank zur Verfügung gestellt werden. Kurz zusammengefasst wird in der LRS-Kammer verbliebenes Blut mit HBSS (PAA) für die

Material & Methoden

Dichtegradientenzentrifugation in ein Leucosep Röhrchen gespült, das bereits mit WBC-Separationsmedium 1077 (PromoCell) befüllt ist. Während der Dichtegradientenzentrifugation (30min, 450g, RT) werden PBMCs entsprechend ihrer Dichte in einer Schicht zwischen Blutplasma und Separationsmedium angereichert. Blutbestandteile mit einer Dichte über 1,077g/ml, wie Granulozyten und Erythrozyten werden abzentrifugiert. Die Isolation wurde wie beschrieben durchgeführt (Knörck *et al.*, 2018).

[Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Haemotherapie). Bundesärztekammer, 2017 [cited 2018 Mar 15]. Available from: http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie_Haemotherapie_2017.pdf.]

2.2.2 SEA-Stimulation von PBMCs

Um eine aktivierte Population CD8⁺ T-Zellen in ausreichender Quantität zu generieren, wurde die SEA-Stimulation verwendet. Diese eignet sich speziell bei einer geplanten Analyse der Zytotoxizität, da SEA-Stimulierte CD8⁺ T-Zellen eine SE-abhängige zelluläre Zytotoxizität gegenüber MHC-I⁺ Zielzellen zeigen (Dohlsten *et al.*, 1990; Bueno *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde die SEA-Stimulation wie beschrieben durchgeführt (Zhou *et al.*, 2018). Kurz zusammengefasst wurden pro Stimulationsansatz 200x10⁶ PBMC bei einer Zelldichte von 1,25x10⁸ Zellen/ml für 1h bei 37° C und 5% CO₂ mit SEA (2,5 µg/ml) beladen und anschließend in einer Zelldichte von 3,5 x 10⁶ Zellen/ml in AIMV+10% FCS+ 50 ng IL-2/ml resuspendiert.

2.2.3 Calcium-Imaging

Die Calcium-Imaging Experimente zum Nachweis der zytosolischen Calciumkonzentration von sortierten Subtypen wurden an einem Calcium-Imaging Setup von TILL-Photonics mit Fura-2-AM durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Methodik, kann der Dissertation von Maik Konrad oder der Dissertation von Anna Maria Miederer entnommen werden. Kurz zusammengefasst wurden 3x10⁵ SEA-stimulierte T_{EM}, T_{CM} oder SEA-Kontrollzellen für 20 min in Medium mit 1 µM Fura-2-AM inkubiert, abzentrifugiert (5 min, 200g) in 10 - 20 µl (abhängig von der Pelletgröße) 0,5 mM Calciumlösung aufgenommen und 10 min vor der Messung zum Absitzen auf ein Poly-L-Ornithin beschichtetes Coverslip gegeben. Die ratiometrische Messung der Fura-2-AM Fluoreszenz erfolgte durch eine sequentielle Anregung in 5 Sekunden Intervallen bei 340 nm und bei 380 nm für 10 ms. Das Fura-2 Signal wurde bei 510 nm detektiert und im Anschluss an die Messung in manuell platzierten ROIs mit Hilfe des Offline-Analyse Programms die hintergrundkorrigierte Fura-2 Ratio 340 nm/380 nm der ROI bestimmt.

Um den speichergesteuerten Calciumeinstrom zu untersuchen wurde das Calcium-readdition-Protokoll verwendet (Kircher *et al.*, 2018). Die Messung erfolgte über 300 Zyklen, am Ende eines 5 sekündigen

Material & Methoden

Zyklus erfolgte die Aufnahme der Fura-2 Fluoreszenz bei den Anregungswellen 340 nm und 380 nm. Tabelle 14: Calcium-readdition-Protokoll veranschaulicht das verwendete Protokoll für die Messung des durch TG aktivierten speichergesteuerten Calciumeinstroms.

Tabelle 14: Calcium-readdition-Protokoll

Zyklus	0-15	16-30	31-132	133-232	233-300
Calcium-konzentration (mM)	0,5 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺ +TG	0,5 Ca ²⁺ +TG	0 Ca ²⁺ +TG

2.2.4 Isolation SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen

Nach der fünftägigen SEA-Stimulation wurde die expandierte Population CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des Dynabeads CD8 positiv Isolations Kits isoliert. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden im Anschluss in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in AIMV+10% FCS+ 25 ng IL-2/ml bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und über einen Zeitraum von 72 Stunden für weiterführende Experimente verwendet.

2.2.5 Populations-Killing Assay

Der Calcein-basierte Populations-Killing Assay ermöglicht die Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ T-Lymphozyten gegen Zielzellen in Echtzeit in einer Populationskinetik (Kummerow *et al.*, 2014). Dieser Assay ist eine Weiterentwicklung von klassischen Endpunkt-Zytotoxizitäts-Assays wie dem Cr⁵¹-Release oder dem LDH-Assay. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Populations-Killing Assay die Zytotoxizität gegen SEA-beladenen Raji oder NALM-6 Zielzellen durch SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen analysiert. Durch die Lyse einer Calcein-beladenen Zielzelle kommt es zum Entweichen des Farbstoffs in den Überstand, was die Reduktion der Calcein-Fluoreszenz zur Folge hat. Der Populations-Killing Assay beruht auf der kinetischen Detektion dieser Reduktion der Calcein-Fluoreszenz am Boden des Wells. Der Assay wurde wie beschrieben durchgeführt (Kummerow *et al.*, 2014). Kurz zusammengefasst wurden Raji oder Nalm-6 Zielzellen für 30 min mit SEA (1 µg/ml) in AIMV+10% FCS bei 37 °C und 5% CO₂ beladen. Anschließend wurden die Zielzellen mit Calcein-AM (500nM) für 15 min bei RT im Dunkeln in AIMV+10mM HEPES inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden $2,5 \times 10^4$ Zielzellen pro Well auf eine schwarze 96-Well Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert und nach ca. 15 Minuten zum Absitzen der Zielzellen Effektorzellen im angegebenen Verhältnis hinzugegeben. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen (E:T-Ratio) ist in den jeweiligen Abbildungsbeschriftungen vermerkt. Die Messungen wurden über vier Stunden mit einem zehnminütigen Intervall in einem Genios Pro Plattenreader bei 37 °C durchgeführt.

2.2.6 Zytometrische Bead Array Analyse

Nach einem Killing Assay können im Überstand verbleibende Zytokine und Effektorproteine der zytotoxischen Mechanismen mit Hilfe eines CBA (cytometric bead array) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu klassischen Methoden zum Nachweis von Zytokinen ist bei Bead-basierten Immunoassays sowohl eine genaue durchflusszytometrische Quantifizierung der Proteinmenge, als auch eine simultane Analyse verschiedener Zytokine aus einem Überstand möglich. Für diese Analyse wurde das Biolegend Legendplex CD8/NK 13-plex Kit verwendet. Durch Populationen von Beads die sich in Größe und APC-Fluoreszenz unterscheiden ist die simultane Quantifizierung von 13 Proteinen möglich. Jede dieser Bead-Populationen ist mit einem Antikörper zur Bindung eines jeweiligen Proteins konjugiert. Durch die Zugabe eines biotinylierten Detektions-Antikörpers entsteht ein Bead-Protein-Detektions-Antikörper-Sandwich, der durch die Zugabe Streptavidin-PE markiert wird. Bei der durchflusszytometrischen Analyse ist das PE-Fluoreszenzintensitätssignal proportional zur gebundenen Proteinmenge. Das Kit wurde nach Hersteller Angaben verwendet und die Analyse an einem FACSVerse durchgeführt. Nach einem Killing Assay (4 h) wurden 150 µl Medium pro Well entnommen und für 5 min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Um den Assay im 96-Well Plattenformat pipettieren zu können, wurden 96 Wellplatten aus Polypropylen mit einem V-Boden (Greiner) verwendet. Die Analyse am FACSVerse erfolgte ebenfalls aus 96-Well Platten (Rundboden, Corning, Polystyren).

2.2.7 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) zur Analyse der Protein Expression auf mRNA-Ebene wurde von Gertrud Schwär wie beschrieben durchgeführt (Zhou *et al.*, 2018). Kurz zusammengefasst wurde die Gesamt-RNA von 1,5 - 3x10⁶ Zellen, der SEA-stimulierten CD8⁺ Gesamtpopulation oder sortierter Subtypen, mit Hilfe von Trizol (72 Stunden nach Positiv Isolation) isoliert. Die gesamte RNA wurde revers transkribiert und 1 µl der cDNA für die qRT-PCR verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 6 dargestellt.

2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung und Analyse mehrerer optischer Eigenschaften von Zellen oder Partikeln in einer Suspension. Zu untersuchende Zellen durchlaufen in einem hydrodynamisch fokussierten Probenstrom einzeln einen oder mehrere Laserstrahlen (interrogation point). Dadurch entstehen charakteristische Streulicht- (FSC/SSC) und Fluoreszenzsignale, die durch Photodetektoren erfasst werden. Mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper können die Epitope intra- und extrazellulärer Proteine markiert werden. Durch die Anregung der Fluorochrome am Interrogation-Point kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht, das jeweils einem Antikörper zugeordnet werden kann und dessen Intensität proportional zur Anzahl gebundener Fluorochrome ist. Für die durchflusszytometrischen Analysen in dieser Arbeit wurde eine FACSVerse

Material & Methoden

Durchflusszytometer (Laser: 488 nm, Filter: 530/30, 575/26, 670/14, 695/40, 780/60; Laser: 640 nm, Filter: 660/20, 780/60; Laser: 405 nm, Filter: 450/40, 525/50) mit der BD FACSuite™ Software verwendet. Die Markierung mit Antikörpern erfolgte nach verschiedenen Protokollen, die im Folgenden dargestellt sind. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit Hilfe von FlowJo, Gates wurden anhand von internen Kontrollen und FMO (fluorescent minus one) Kontrollen gesetzt. Die Quantifizierung erfolgte wie im jeweiligen Experiment beschrieben in prozentualen Anteil von Ereignissen in einem Gate oder mit Hilfe der MFI (Mediane Fluoreszenz Intensität). Alle Färbungen wurden mit einer Software-gestützten Kompensation (FACSSuite) kompensiert.

2.2.8.1 Extrazelluläre Färbungen

Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen aus Medium entnommen, zweimal mit 1 ml PBS + 0,5%BSA gewaschen (5 min, 250g). Währenddessen wurde ein Antikörpermix in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe in PBS + 0,5%BSA vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS + 0,5%BSA resuspendiert, zu jeder Probe 50 µl vom Antikörpermix gegeben und nach sanftem Vortexen für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS + 0,5%BSA gewaschen (5 min, 250g) und in 150 µl PBS + 0,5%BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

Degranulations-Assay

Der Degranulations-Assay ist ebenfalls eine extrazelluläre Färbung. Um das nachzuweisende Molekül CD107a nach der Degranulation auf der Oberfläche detektieren zu können, wurde jedoch zuvor eine vierstündige Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen durch Inkubation mit Zielzellen (E:T 20:1) oder Behandlung mit PMA (5 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) in Gegenwart von GolgiStop™ (nach Herstellerangaben 4 µl in 6 ml AIMV-Medium) durchgeführt.

Markieren von Zielzellen mit SEA-Atto

Die Beladung von NALM-6 Zellen mit SEA wurde mit Hilfe von markiertem SEA-Atto633 durchgeführt. Dazu wurde SEA verwendet, das von Xiao Zhou mit dem Fluorochrom Atto633 markiert wurde. Die Zellen wurden in AIMV+10%FCS für 30 min im Brutschrank mit 1 µg /ml SEA-Atto633 inkubiert und nach zwei Waschschritten im Durchflusszytometer analysiert.

Intrazelluläre Färbung

Intrazellulär wurde zum einen Perforin und zum anderen die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-17 nachgewiesen. Dazu wurden verschiedene Protokolle verwendet.

Zum Nachweis von Perforin wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen entnommen zweimal mit 1 ml Färbepuffer (PBS+ 0,5%BSA+ 5%FCS) gewaschen (5 min, 250g) und eine extrazelluläre Färbung durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben in 2% PFA fixiert, mit Färbepuffer gewaschen und in 50 µl

Material & Methoden

intrazellulärem Färbepuffer aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT wurde der Perforin-Antikörper (in 50 µl intrazellulärem Färbepuffer) hinzugefügt und weitere 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal in 500 µl intrazellulärem Färbepuffer gewaschen (5 min, 250g) in 150 µl PBS+0,5% BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

Zytokine

Die Zytokin-Färbung wurde nach Angaben von Maylin MerinoWong mit dem Protokoll des Transcription Factor Buffer Sets (BD Biosciences) durchgeführt (siehe Tabelle 17). Der fixierbare Viabilitäts-Farbstoff Zombie-Aqua wurde bei dieser Färbung entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2.8.2 Antikörper-Panels

Für die Analyse von PBMCs oder isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden bestimmte Kombinationen von Antikörpern wiederholt verwendet. Diese sind in den dargestellten Panels zusammengefasst. Die mit „variabel“ angegebene Antikörper wurden nicht bei jeder Färbung mit diesen Panels verwendet, sondern nur zur Untersuchung spezifischer Fragestellungen mit dem bestehenden Panel kombiniert.

Tabelle 15: PBMC-Subpopulationen Panel. Auflistung der Antikörper, die zur Analyse von PBMC-Subpopulationen wie CD4 oder CD8 T-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten verwendet wurden.

Fluorochrom	Antikörper	Menge [µl]
BV421	anti-CD4	2
BV421	anti-CD19	2
BV510	anti-CD45	2
FITC	anti-CD8	2,5
PE	anti-CD16	2
PerCP	anti-CD3	0,5
Pe-Cy7	anti-CD14	2
APC	anti-CD56	2

Tabelle 16: CD8 Panel 1. Auflistung der Antikörper, die zur Analyse der Subtypen-Verteilung von CD8⁺ T-Zellen innerhalb der PBMC-Population verwendet wurden.

Fluorochrom	Antikörper	Menge [µl]
eFluor450	anti-CD8	2
BV510	variabel	

Material & Methoden

FITC	anti-CD45RO	2,5
PE	variabel	
PerCP	anti-CD3	0,5
Pe-Cy7	anti-CD45RA	2
Alexa Fluor 647	anti-CCR7	2

Tabelle 17: CD8 Panel 2. Auflistung der Antikörper die zur Analyse der Expression von Effektormolekülen in CD8⁺ Memory-Subtypen innerhalb der isolierten CD8⁺ Gesamtpopulation verwendet wurden.

Fluorochrom	Antikörper	Menge [μ l]
BV421	variabel (anti-CD107a)	2,5
BV510	variabel	
FITC	variabel (anti-Perforin, anti-IFN γ)	3,5; 1
PE	variabel (anti-Perforin, anti-CD253, anti-CD178)	3,5; 2; 5
PerCP-Cy5.5	anti-CD62L	3,5
Pe-Cy7	anti-CD45RO	2
Alexa Fluor 647	variabel (anti-CCR7, anti-IL-4)	2
APC-Cy7	variabel (anti-IL-17)	2,5

Tabelle 18: CD8 Panel 3. Auflistung der Antikörper, die zur Analyse durchflusszytometrisch sortierter T_{EM}- und T_{CM} Subtypen verwendet wurden.

Fluorochrom	Antikörper	Menge [μ l]
BV421	variabel	2,5
BV510	variabel	
FITC	variabel (anti-Perforin)	3,5
PE	variabel	
PerCP-Cy5.5	bereits durch Sort blockiert	
Pe-Cy7	bereits durch Sort blockiert	
Alexa Fluor 647	anti-CCR7	2
APC-Cy7	variabel	

Nicht in den Panels aufgeführte Färbungen wurden nach dem extrazellulären Färbeprotokoll und den im Experiment vermerkten Antikörpern und Zielzellen durchgeführt.

2.2.9 Durchflusszytometrische Sortierung

Die durchflusszytometrische Sortierung ermöglicht zusätzlich zu der durchflusszytometrischen Analyse von Streulicht- und Fluoreszenz-Parametern einer Zelle auch die Separation einzelner vitaler Subpopulationen. Mit dem verwendeten Zellsortierer FACS Aria III ist es möglich, bis zu vier Zellpopulationen gleichzeitig zu sortieren. Prinzipiell handelt es sich bei einem Zellsortierer um ein Durchflusszytometer, bei dem der Probenstrom nach dem Durchlaufen der Messküvette durch die Schwingung eines piezoelektrischen Wandlers in Tröpfchen aufgebrochen wird. In Abhängigkeit von der Zeit, dem Durchmesser und Druck des Probenstroms (Nozzle-Größe) kann durch die Bestimmung des Drop-Delays (Zeitspanne zwischen Signaldetektion und Tropfenabbruchpunkt) jedes detektierte Signal einem Tropfen zugeordnet werden. Um einzelne Tropfen sortieren zu können wird der Probenstrom zum Zeitpunkt des Tropfenabbruchs elektrisch geladen. Nach dem Tropfenabbruch bleibt die Ladung eines Tropfens erhalten und der Tropfen kann mit Hilfe eines von Deflektorplatten erzeugten elektrischen Feldes in eines der Auffang-Tubes abgelenkt werden. Der Sortierungsprozess unterliegt vielen zusätzlichen Variablen wie dem Auftreten zusätzlicher Partikel in einem Tröpfchen oder der Position einer Zelle innerhalb eines Tropfens. Mit Hilfe verschiedene Sortiermodi ist es möglich, ein auf Reinheit oder ein auf Ausbeute optimiertes Sortierverfahren durchzuführen.

Die Sortierung der CD8⁺ T-Zell-Population in T_{EM} (CD45RO⁺/CD62L⁻), T_{CM} (CD45RO⁺/CD62L⁺) und T_N (CD45RO⁻/CD62L⁺) wurde an einem FACSARIA III Sorter 24 h nach der Positivisolation SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Abhängig von der verfügbaren Zellzahl wurden 20-40 x10⁶ CD8⁺ T-Zellen zweimal in kaltem PBS+0,5% BSA gewaschen (8min, 200g), anschließend in einer Zelldichte von 4x10⁷ Zellen/ml in PBS+0,5% BSA resuspendiert und anti-CD45RO (7,5 µl/1x10⁷ Zellen) und anti-CD62L (10 µl/1x10⁷) Antikörper hinzugefügt. Die Oberflächenfärbung erfolgte nach einem von der extrazellulären Färbung abgewandelten Protokoll für 30 min bei 4 °C im Dunkeln bei schonendem Rotieren. Währenddessen wurden Auffang-Tubes (15 ml Reaktionsgefäße) mit 4 ml Auffangpuffer (PBS+0,5% BSA+ 25% FCS) befüllt und die Gefäßwände durch horizontales Rollen der Auffang-Tubes mit Puffer benetzt. Nach der Antikörper-Färbung wurde der Probe 5 ml PBS+0,5% BSA hinzugefügt und ein Waschschrift durchgeführt (8min, 200g). Anschließend wurden mit Hilfe eines 40 µm Siebes Zellklumpen entfernt. Optional kann vor dem Sortieren eine Zellzählung durchgeführt werden, um die nach der Sortierung die Ausbeute berechnen zu können. Vor der Sortierung wurden die Zellen in einer Zelldichte von 10-15x10⁶ in PBS+0,5% BSA aufgenommen und bis zur Sortierung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Drop-Delay und Probenstrom (70 µm Nozzle) wurden nach Herstellerangaben für jeden Sortiervorgang optimiert. Die Sortierung wurde im 4-way Purity Mode bei einem Threshold (Schwelle) von 10000 und einer Flussgeschwindigkeit von 2-6 (maximal 10000 Ereignisse/s) durchgeführt.

Material & Methoden

Nach der Sortierung wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 150g), gezählt und anschließend in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ in AIMV+ 10% FCS aufgenommen. Sortierten Subtypen wurden Zytokine hinzugefügt, um den jeweiligen Phänotyp zu stabilisieren. T_{EM} erhielten zusätzlich 25 µg IL-2/ml, 5 ng IL-12 /µl und 10g IL-15/ml. T_{CM} wurden 25 µg/ml IL-2, 5n g/ml IL-7 und 5 ng/ml IL-15, T_N wurden 25 µg/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 hinzugefügt. Die Zellen wurden nach der Sortierung bis zu 48 h im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) aufbewahrt.

2.2.10 Einzelzell-Killing Assay

Für die Messungen des Einzelzell-Killing Assays wurde das Screening System ImageXpress Micro XLS der Firma Molecular Devices verwendet. Dieses System ist ein Weitfeld-Fluoreszenz Mikroskop, das die parallele Analyse verschiedener Bedingungen im 96-Well Plattenformat unter Brutschrank-Inkubationsbedingungen ermöglicht. So wurde in dieser Arbeit die Zytotoxizität CD8⁺ T-Zell-Subtypen gegen NALM-6 pCaspR Zellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren untersucht.

Wie für den Populations-Killing Assay wurden NALM-6 pCaspR Zielzellen 30 min in AIMV bei 37 °C und 5% CO₂ mit SEA (1 µg/ml) beladen (siehe 2.2.5). Gleichzeitig wurde der Well-Boden von schwarzen 96-Well Platten für 30 min bei RT mit 50 µl Fibronectin beschichtet. Nachdem überstehendes Fibronectin abgesaugt wurde, wurden 10.000 NALM-6 pCaspR Zellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS in die jeweiligen Wells pipettiert. Um die Zielzellen absinken zu lassen, wurde die Platte für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Mikroskop präinkubiert. Im Anschluss wurden 20.000 Effektorzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS auf die Zielzellen pipettiert und der Assay gestartet. Für 8 h wurden bei einem Intervall von 5 min in 1-4 Bereiche pro Well im Durchlicht-, FRET- und GFP-Kanal mit einem 20x Objektiv aufgezeichnet.

Um einzelne zytotoxische Mechanismen gezielt zu inhibieren, wurden einzelne Wells mit CMA, z-AAD-CMK oder inhibitorischen Antikörpern (siehe 3.2.9 und 3.7) behandelt und die Zielzelllyse in einem Gesamtvolumen von 200 µl untersucht.

Behandlung mit CMA

Perforin-vermittelte Lysen wurden durch eine zweistündige Präinkubation der Effektorzellen mit 50nM CMA und durch eine Behandlung mit 50 nM CMA während der Messung inhibiert. Daher wurden 10.000 Zielzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 50 nM CMA in die Wells vorgelegt. Nach einer zweistündigen Präinkubation im Brutschrank wurden 20.000 Effektorzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 50 nM CMA hinzugefügt.

Behandlung mit z-AAD-CMK

Der spezifische Inhibitor von Granzym B, z-AAD-CMK, wurde dem Medium von Zielzellen und Effektorzellen in einer Konzentration von 10 µM zugefügt. Daher wurden 10.000 Zielzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 10 µM z-AAD-CMK in die Wells vorgelegt. Nach einer

Material & Methoden

zweistündigen Präinkubation im Brutschrank wurden 20.000 Effektorzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 10 µM z-AAD-CMK hinzugefügt.

Behandlung mit anti-FAS-L

FAS-vermittelte Lysen wurden durch die inhibitorischen Maus-anti-human-CD178 Antikörper (Klon: NOK-1 und NOK-2) inhibiert. Dazu wurden sowohl 10.000 Zielzellen als auch 20.000 Effektorzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 10 µg/ml je Antikörper aufgenommen. Nach einer zweistündigen Präinkubation im Brutschrank wurden die Effektorzellen zu den Zielzellen gegeben.

Behandlung mit anti-TRAIL

TRAIL-vermittelte Lysen wurden durch die inhibitorischen Maus-anti-human-CD253 Antikörper (Klon: RIK-2) inhibiert. Dazu wurden sowohl 10.000 Zielzellen als auch 20.000 Effektorzellen in 100 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS+ 10 µg/ml je Antikörper aufgenommen. Nach einer zweistündigen Präinkubation im Brutschrank wurden die Effektorzellen zu den Zielzellen gegeben.

Induktion von Apoptosen

Um die Funktionalität des pCasper-GR Konstrukts in NALM-6 pCasper-Zielzellen zu verifizieren, wurden die Zellen mit Apoptose-induzierenden Substanzen wie Staurosporin (20 µg/ml), dem anti-FAS Antikörper Apo1-1 (5 µg/ml) und rekombinantem TRAIL (5 µg/ml) behandelt. Dazu wurden die Substanzen vor der Messung zu 25.000 Zielzellen in 200 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 + 10% FCS hinzugefügt.

Bildanalyse

Im Einzelzell-Killing Assay aufgezeichnete Bilder wurden nach dem in (Backes *et al.*, 2018) beschriebenen Prinzip analysiert. Die Bilder wurden als Zeitreihe in ImageJ prozessiert. Mit Hilfe des Rolling-Ball Algorithmus ($r=100$ Pixel) wurde in allen Kanälen der Hintergrund subtrahiert und als Durchlicht-GFP-FRET-Overlay in Fiji dargestellt. Anschließend ist eine manuelle oder eine semi-automatisierte Analyse der Bilder möglich.

Manuelle Analyse

Bei der manuellen Analyse wurden ca. 25 Zellen pro aufgezeichnetem Ausschnitt mit Hilfe des SpeckleTrackerJ Plugins (Smith *et al.*, 2011) *getracked* (verfolgen der Spur einer Zelle). Dazu wurde für jeden Zeitpunkt manuell der Mittelpunkt einer Zielzelle markiert und anschließend mittels des Speckle Intensity Trajectories Plugins (Smith *et al.*, 2011) ROIs (Region of Interest; $r=7$) erzeugt und die GFP- und FRET-Fluoreszenzintensitäten exportiert. In Excel 2016 erfolgte die weiterführende Analyse der Intensitäten einer Zelle zur Identifikation von Apoptosen und Nekrosen. Die GFP- und FRET-Fluoreszenzintensitäten einer Zelle wurden auf den ersten Zeitpunkt normiert (F/F_0) und die Intensitäts-

Material & Methoden

unabhängige Donor-Ratio anhand der Division von FRET-Signal durch GFP-Signal ermittelt. Mit Hilfe der Donor-Ratio und eines FRET-Schwellenwerts wurde der Zustand einer Zielzelle in lebend (Donor-Ratio > 0,75), apoptotisch (Donor-Ratio < 0,75) und nekrotisch (schlagartiger Verlust beider Fluoreszenzen, FRET-Signal < 150 Einheiten) eingeteilt. So wurde für jeden gemessenen Zeitpunkt der Zustand einer getrackten Zelle erfasst. Geht der Nekrose einer Zielzelle eine Apoptose voraus, wurde diese als sekundäre Nekrose identifiziert. Eine Nekrose ohne einen Anstieg des GFP-Signals und dem damit verbundenen Absinken der Donor-Ratio, wurde als primäre Nekrose definiert. Der Zustand aller Zellen zu einem Zeitpunkt wurde zusammengefasst und die prozentualen Anteile eines Zustandes an der Gesamtzahl detektierter Zellen in Zelltod-Plots dargestellt (Abbildung 28).

Semi-automatisierte Analyse

Bei der semi-automatisierten Analyse der Lyse von NALM-6 pCapseR Zielzellen wurden Zielzellen mit Hilfe der Software Imaris (Bitplane) anhand der GFP-Fluoreszenz und dem durchschnittlichen Durchmesser adhärerender NALM-6 Zellen (Größe: 15 μm) für jeden einzelnen Zeitpunkt detektiert. Um mögliche Fehler eines vollautomatisierten Trackings durch Kollisionen einzelner Zellen oder längere Zellkontakte zu vermeiden, wurden die zu einem jeweiligen Zeitpunkt detektierten "Spots" einer Zelle nicht verknüpft. Daher ist lediglich die Anzahl lebender, apoptotischer oder lysierter Zellen zu einem jeweiligen Zeitpunkt bekannt. Der Zustand einer Zelle zum vorherigen Zeitpunkt ist unbekannt, weshalb es mit der semi-automatisierten Analyse nicht möglich ist, primäre und sekundäre Nekrosen zu unterscheiden. Lebende Zellen wurden mittels einer Donor-Ratio von > 0,75 identifiziert. Im Verlauf der Messung sinkt die Donor-Ratio bei apoptotisch lysierten Zellen unter diesen Schwellenwert von 0,75 bis zu einer Ratio von 0,3 - 0,1 ab. Sobald eine Zelle eine Donor-Ratio von < 0,75 zeigt, wurde sie daher als Apoptose detektiert. Ähnlich wie bei der manuellen Analyse und der Darstellung in Abbildung 16 zeichnen sich Nekrosen durch einen Verlust jeglicher FRET und GFP Fluoreszenz aus. Detektierte Zellen mit einer Fluoreszenzintensität nahe dem Hintergrund (mittlere Hintergrundfluoreszenz + 10%), sowie Zellen mit einer FRET-Fluoreszenzintensität von < 150 Einheiten wurden als Nekrosen erfasst. Bevor es zu ersten Zellkontakten zwischen CLTs und Zielzellen kommt entspricht die Anzahl detektierter Spots, der gesamten Anzahl an Zielzellen im untersuchten Bereich. Da die automatisierte Detektion nicht in der Lage ist, lysierte Zellen ohne verbleibende Fluoreszenz zu erkennen, wird die Anzahl nekrotischer Zellen zusätzlich aus der Differenz detektierter Spots zu der maximalen detektierten Zellzahl ermittelt. Der Anteil der nekrotischen Zellen kann so auch in der semi-automatisierten Analyse abgeschätzt und zusammen mit den Anteilen lebender und apoptotischer Zielzellen prozentual in Zelltod-Plots (Abbildung 32) dargestellt werden.

2.2.11 Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet. Ein Test auf Normalverteilung eines Datensatzes wurde mit dem „D’Agostino & Pearson normality test“

Material & Methoden

durchgeführt. Der jeweils verwendete Test ist im Ergebnisteil in der Abbildungsbeschriftung vermerkt. Beim Vergleich zweier Gruppen (bspw. T_{EM} und T_{CM}) wurde abhängig von der Normalverteilung der gepaarte/ungepaarte t-Test oder der Wilcoxon Test (nonparametrisch/gepaart) bzw. der Mann-Whitney-U Test (nonparametrisch/ungepaart) angewendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine one-way ANOVA (Analysis of Variance Test) oder der Kruskal-Wallis Test (nonparametrisch/ungepaart) beziehungsweise der Friedman Test (nonparametrisch/gepaart) oder für mehrfaktorielle Datensätze eine two-way ANOVA entsprechend der Vorgaben der Software verwendet. Multiple comparisons adjusted p-Werte wurden ebenfalls mit Hilfe von Graphpad Prism 8.0 bestimmt. p-Werte werden als * p<0,05; ** p<0,01; *** p>0,001 veranschaulicht.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Experimente zur Gewinnung und Expansion von primären CD8⁺ T-Zell-Subtypen aus humanem Blut

CD8⁺ T-Zellen sind eine Subpopulation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Im ersten Abschnitt der Ergebnisse wird daher die Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen aus Blut, die Isolation aus PBMCs sowie die *in vitro* Expansion von CD8⁺ T-Zellen thematisiert. Diese Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und sind bereits publiziert.

3.1.1 Isolationseffizienzen und Funktionalität von zytotoxischen Zellen aus Überresten der Hämapherese

Peripheres Blut ist eine weit verbreitete Quelle zur Isolation von Immunzellen für *in vitro* Experimente. Eine gängige Alternative ist die in dieser Arbeit verwendete Gewinnung von PBMCs aus Überresten der Thrombozyten Apherese (Moog, 2004; Dietz *et al.*, 2006; Néron *et al.*, 2007; Strasser *et al.*, 2007). Diese Zellüberreste befinden sich nach der Apherese im nicht wiederverwendbaren Schlauchsystem der Hämapherese-Apparatur. Bei dem Apheresegerät Terumo BCT werden die verbliebenen Zellen aus der LRSC (Leukocyte Reduction System Chamber = Leukozyten-Reduktionssystems-Kammer) gewonnen. Alternativ wurde in der lokalen Blutbank auch das AMICUS-System zur Apherese von Thrombozyten verwendet. Bei diesem wurden die im System verbliebenen Zellen aus zwei Kammern (C1 und C2) des Schlauchsystems gewonnen. In dieser Untersuchung wurden Quantität und Qualität von PBMC-Subpopulationen aus beiden Systemen mit peripherem Blut verglichen, das parallel entnommen wurde. Dieser Vergleich und die Verifizierung des AMICUS-Systems als Quelle für funktionale PBMCs wurden 2018 publiziert (Knörck *et al.*, 2018). In Abbildung 4A) ist die Gatingstrategie zur Bestimmung der Anteile von CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, NK Zellen, B Zellen und Monozyten anhand der PBMCs eines repräsentativen Spenders dargestellt. Nach dem Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern wurde die CD45⁺ Population von Leukozyten ausgewählt und in weitere Subpopulationen unterteilt. Der Anteil CD8⁺ T-Zellen macht 11% der PBMC Population aus (C). In PBMCs die aus der Kammer C2 des AMICUS-Systems stammen, ist der Anteil CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu LRSC (p=0,012) oder FB (p=0,003) signifikant erhöht.

Ergebnisse

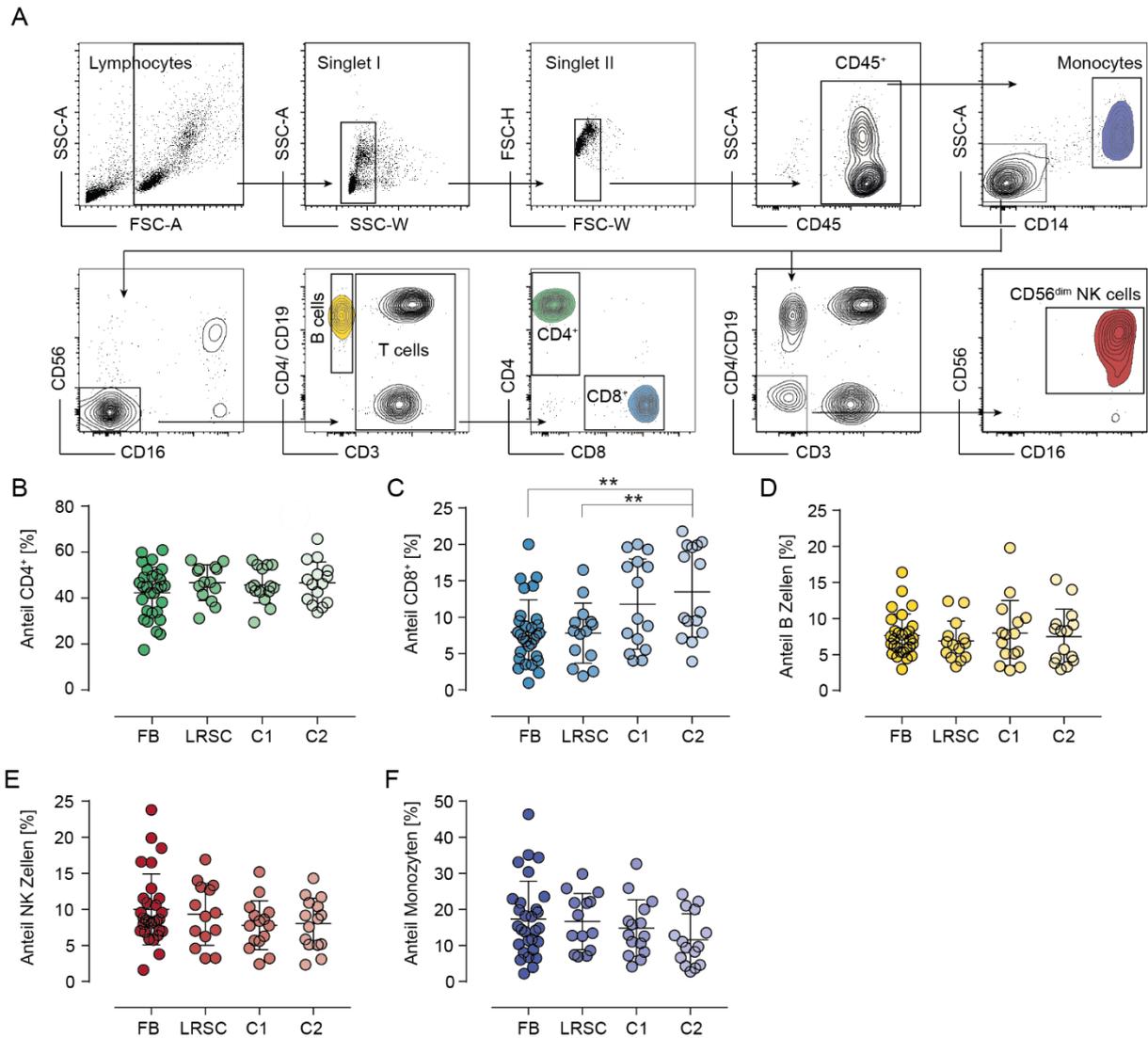


Abbildung 4: Subtypenzusammensetzung von PBMCs isoliert aus frischem Blut (FB), Trima Accel (LRSC) oder AMICUS Systems (Kammern C1 & C2). A) Darstellung der Gatingstrategie am Beispiel eines repräsentativen Spenders. Nach dem Ausschluss von Zelltrümmern und Dupletten anhand der Streulichtparameter (FSC & SSC) wurde die Population CD45⁺ Leukozyten ausgewählt. Die Monozytenpopulation wurde mittels SSC-A und CD14 quantifiziert, nicht-Monozyten Zellen wurden zur Identifikation von NK Zellen, B Zellen und T-Zellen ausgewählt. Der Anteil an NK Zellen wurde nach dem Ausschluss von CD4⁺, CD3⁺ und CD19⁺ Zellen mit Hilfe von CD16 und CD56 bestimmt. Der Anteil von B- und T-Zellen wurde nach dem Ausschluss CD16⁺ und CD56⁺ NK Zellen durchgeführt. B Zellen werden als CD19⁺ und CD3⁻ quantifiziert. T-Zellen wurden mittels CD3 erfasst und in CD4⁺ und CD8⁺ aufgeteilt. B-F) zeigt die Anteile von CD4⁺ T-Zellen (B), CD8⁺ T-Zellen (C), B-Zellen (D), NK-Zellen (E) und Monozyten (F) an CD45⁺ Einzelzellen. Punkte stellen einzelne Spender dar, horizontale Linien zeigen den Mittelwert \pm SD. p-Werte wurden mittels one-way ANOVA oder Kruskal-Wallis-Tests bestimmt. FB n=29, LRSC n=14, C1 n=15, C2 n=15. Abbildung modifiziert aus Knörck *et al.* (2018).

Neben der für die CD8 Population beschriebenen Varianz sind die Anteile aller anderen Subpopulationen unabhängig von der Quelle vergleichbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Isolation von CD8⁺ T-Zellen PBMCs aus LRSC oder Kammern des AMICUS Systems verwendet.

3.1.2 Vergleich der Reinheit durchflusszytometrischer und immunmagnetischer Isolierungen

CD8⁺ T-Zellen können mit Hilfe verschiedener erwerblicher Systeme aufgereinigt werden. Im Rahmen einer miRNA Analyse in Kooperation der Arbeitsgruppe Keller (Bioinformatik, Universität des

Ergebnisse

Saarlandes) wurde die Reinheit der positiven und der negativen immunmagnetischen Isolation von T-Zellen mit der durchflusszytometrischen Sortierung (FACS) verglichen und der Effekt der Isolationsmethode auf das miRNA Profil der Subpopulation bestimmt (Schwarz *et al.*, 2016). Auch unabhängig von der bioinformatischen Analyse der miRNA Profile liefert der Vergleich der Isolationsmethode für diese Arbeit relevante Ergebnisse. In Abbildung 5 A) ist zu erkennen, dass der Anteil an CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen vom jeweiligen Spender abhängig ist. Die positive Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ist zu 99% bzw. 98% rein. Mittels FACS isolierte Populationen zeigen eine vergleichbare Reinheit (CD3: 98%, CD4: 99%, CD8: 97%), in negativ isolierten Proben finden sich bis zu 16% Kontaminationen anderer Zelltypen. Dieses Ergebnis wurde bei der Planung weiterer Experimente berücksichtigt und ein Protokoll ausgewählt, dass eine positive immunmagnetische Isolation und FACS anstelle von negativen Isolationen vorsieht. Die anschließende Analyse der miRNA Profile ergab beim Vergleich technischer und biologischer Replikate, dass CD8⁺ T-Zellen eine geringere technische als auch biologische Reproduzierbarkeit aufweisen. Im Vergleich zur CD4⁺ Population zeigte sich für die CD8⁺ Population auch eine verringerte Stabilität des miRNA Profils bei einer erneuten Analyse eines Spenders nach zwei bis drei Wochen (Schwarz *et al.*, 2016).

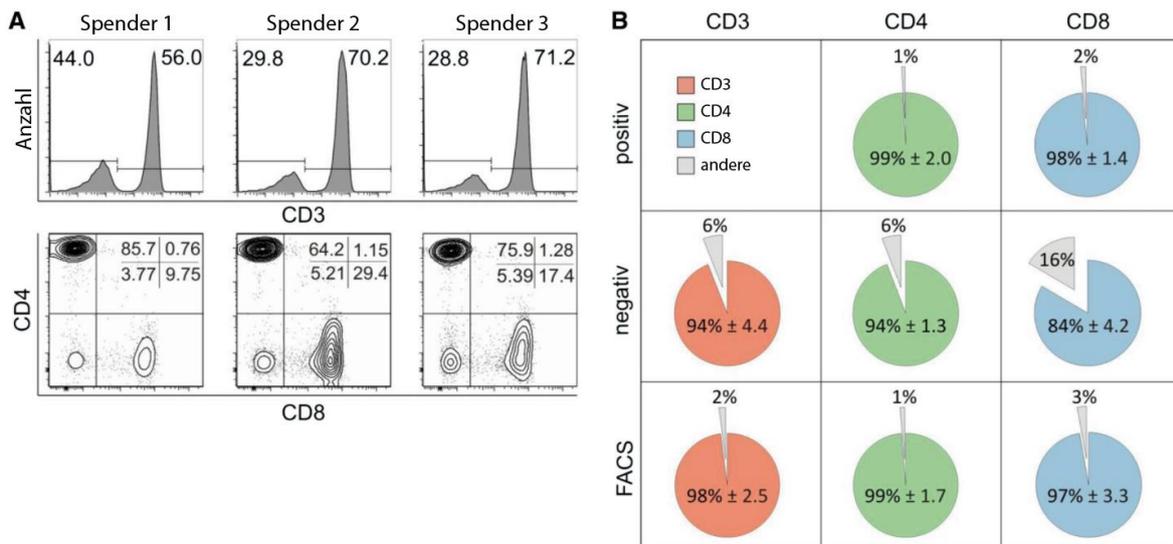


Abbildung 5: Vergleich der Reinheit der immunmagnetischen (positiv und negativ) und der FACS-basierten Isolationsmethode für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. A) Darstellung der Gatingstrategie anhand von drei untersuchten Spendern. Nach dem Ausschluss von toten Zellen und Zelltrümmern mittels Streulichtparametern (FSC und SSC) wurde die CD3⁺ Population ausgewählt und in CD4⁺, CD8⁺ sowie doppelt positive und doppelt negative Zellen aufgeteilt. B) Darstellung der Reinheit der positiven Isolation, negativen Isolation oder FACS Isolation von CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen. Die Kreisdiagramme veranschaulichen die prozentuale Reinheit (farbig) der isolierten Zielpopulation. Die Abbildung stammt aus Schwarz *et al.*, 2016. Die positive Isolation wurde von Coras Hoxha, die negative Isolation von Eva Schwarz durchgeführt.

3.1.3 SEA-vermittelte *in vitro* Expansion von primären CD8⁺ T-Zellen

Aus PBMCs isolierte CD8⁺ T-Zellen können *in vitro* expandiert werden, um eine erhöhte Viabilität und Proliferation über mehrere Tage zu gewährleisten. Neben der *in vitro* Generierung von antigenspezifischen T-Zellen (Wöfl and Greenberg, 2014) gibt es zeitlich und ökonomisch weniger

Ergebnisse

aufwändige Methoden, um CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Der Verzicht auf eine antigenspezifische Stimulation ermöglicht die polyklonale Aktivierung eines Großteils der T-Zell-Population.

Bei der Stimulation mit dem Staphylokokken Enterotoxin A kommt es zur Formierung einer unspezifischen artifiziellen IS. Die unspezifische Bindung des TCR kommt dabei über eine Kreuzvernetzung zwischen MHC-II - SEA -und der variablen Region der TCR $\nu\beta$ -Kette zustande (Thomas *et al.*, 2009). Das costimulatorische Signal und das Zytokin-Signal werden dabei jedoch normal durch die APC und das Milieu übermittelt. SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, mit SEA-beladenen Zielzellen eine IS zu bilden und diese zu lysieren (Dohlsten *et al.*, 1990).

Da die Analyse der Zytotoxizität expandierter CD8⁺ T-Zellen in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung ist und die Verwendung SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen in der Arbeitsgruppe standardmäßig etabliert ist (Bhat *et al.*, 2016), wurde in dieser Arbeit eine Expansion der CD8⁺ Population mittels SEA durchgeführt. In Abbildung 6 A) ist der zeitliche Ablauf der Stimulation schematisch dargestellt. Die CD8⁺ T-Zellen werden durch die SEA-vermittelte Kreuzvernetzung der TCR $\nu\beta$ -Kette mit dem MHCII Rezeptor einer antigenpräsentierenden Zelle aktiviert und für fünf Tage in der PBMC Population expandiert. Die positive immun-magnetische Isolation der CD8⁺ Population erfolgt am fünften Tag. In Abbildung 6 B und C) ist Entwicklung der Subpopulation durch die Veränderung der Anteile der Subpopulationen T_N (CD45RO⁻, CD62L⁺), T_{CM} (CD45RO⁺, CD62L⁺), T_{EM} (CD45RO⁺, CD62L⁻) und T_{EMRA} (CD45RO⁻, CD62L⁺) zwischen Tag 0 und Tag 5 dargestellt. Die T_{CM}-Subpopulation macht in der nicht-stimulierten Probe den kleinsten Anteil aus. Nach der fünftägigen Stimulation verdreifacht sich der Anteil an T_{CM} (p=<0,0001), während der Anteil an T_N (p=<0,0001) und T_{EM} (p=<0,0001) durch die Stimulation jeweils halbiert wird und die T_{EMRA} Population bis auf wenige Zellen verschwindet (2,14 ± 2,4%). Nach der Stimulation sind durchschnittlich 64,5 ± 14,1% T_{CM}, 18,3 ± 11,4% T_N, 15,1 ± 10% T_{EM} verfügbar. Die in Abbildung 6 D) zuerkennende Streuung der Einzelwerte veranschaulicht die spenderabhängige Varianz der Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen. Jede Subpopulation zeigt jedoch ein homogenes Populationszentrum und die Grenzen zwischen den Populationen sind deutlich zu erkennen. Die SEA-stimulierte CD8⁺ Population ist somit für die durchflusszytometrische Sortierung dieser Subpopulationen geeignet.

Ergebnisse

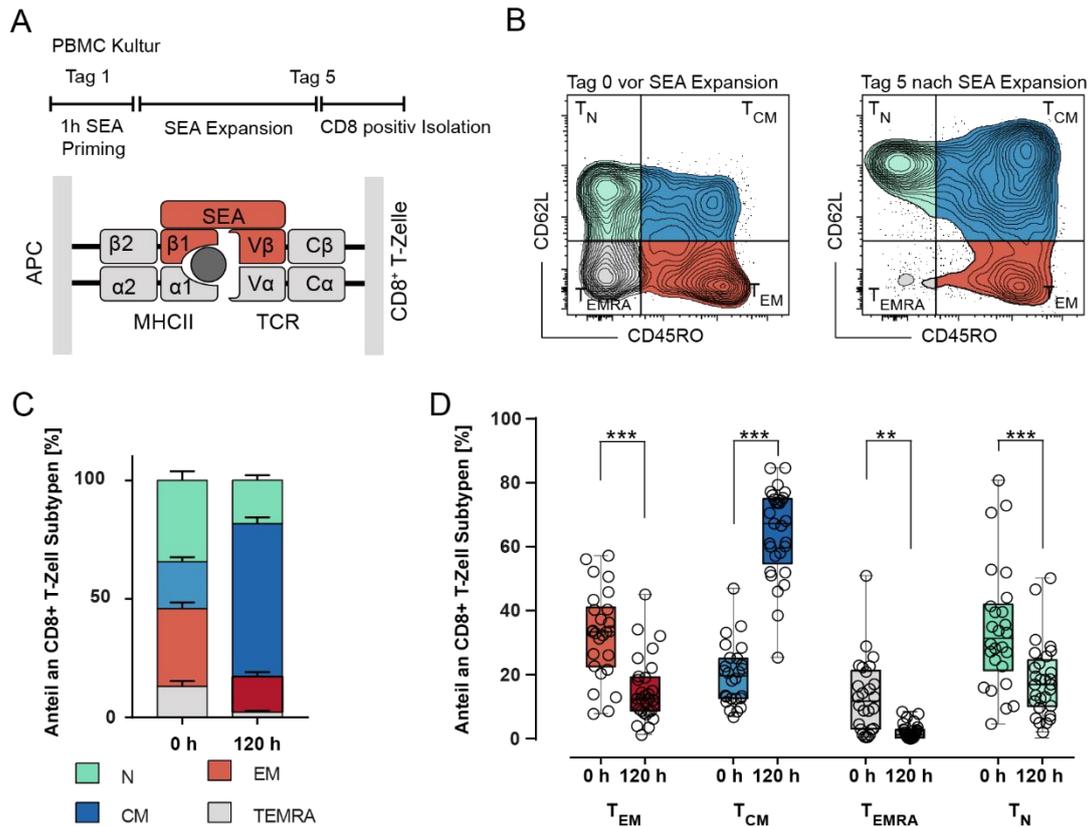


Abbildung 6: Die Expansion von CD8⁺ T-Zellen durch die Stimulation mit dem *Staphylokokken Enterotoxin A* (SEA) eignet sich für die Analyse von Subpopulationen. A) Ablauf der fünftägigen SEA-Stimulation und Übersicht der Kreuzverbindung von MHC-II und TCR über SEA (rot). B) Subtypengating eines repräsentativen Spenders an Tag 0 und Tag 5 der SEA Expansion. Die CD8⁺ Subpopulationen werden mittels CD45RO und CD62L in T_N (CD45RO⁻, CD62L⁺), T_{CM} (CD45RO⁺, CD62L⁺), T_{EM} (CD45RO⁺, CD62L⁻) und T_{EMRA} (CD45RO⁻, CD62L⁺) eingeteilt. C) Quantifizierung der CD8 Subtypenverteilung von 26-29 Spendern an Tag 0 und Tag 5 der SEA Expansion. D) Darstellung der Veränderung des Anteils der jeweiligen Subtypen durch die SEA-Expansion. Gestapelte Säulendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM, Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, 25-Median-75% Interquartilen dar. p-Werte wurden mit einer two-way ANOVA ermittelt. Tag 0 n=26, Tag 5 n=29.

3.2 Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen

In diesem Abschnitt sollen die Effektorfunktionen der SEA-stimulierten CD8⁺ Population charakterisiert werden. Die Analyse im Calcein-basierten Populations-Killing-Assay wird dazu mit durchflusszytometrischen Analysen kombiniert. Durch eine Charakterisierung der Verfügbarkeit von zytotoxischen Mechanismen und der funktionellen Analyse dieser Mechanismen in Zytotoxizitäts-Assays auf Populations- und Einzelzellebene soll das zytotoxische Potential von T_{EM} und T_{CM} in der SEA-stimulierten Mischpopulation bewertet werden.

3.2.1 Das zytotoxische Potential der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zell-Population

Wie bereits beschrieben sind SEA-Stimulierte CD8⁺ T-Zellen in der Lage Zielzellen zu lysieren, die das SEA Molekül mittels MHC-II präsentieren (Dohlsten *et al.*, 1990). Abbildung 7 A-C) zeigt die durchschnittliche Kinetik der Lyse von SEA beladenen Raji Zellen durch SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen. Bei einer E:T Ratio von 20:1 lysieren SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen durchschnittlich bis zu 100% der Zielzellen, ein Großteil der Lyse findet innerhalb der ersten zwei Stunden statt.

Ergebnisse

Nicht alle Zellen der SEA stimulierten $CD8^+$ Population exprimieren die SEA bindenden TCRV β Regionen (Kappler *et al.*, 1989). Folglich beruht die SEA vermittelte Zytotoxizität nur auf der Aktivität eines Teils der $CD8^+$ Population. Die lytische Aktivität dieses SEA spezifischen Anteils der $CD8^+$ T-Zellen kann durch einen Degranulations-Assay identifiziert und quantifiziert werden. Um eine Zielzelle zu lysieren, sezerniert eine T-Zelle lytische Granula. Dabei fusioniert die Membran der lytischen Granula mit der Plasmamembran der Zelle, was in der Oberflächenexpression von CD107a resultiert (Peters, 1991). In einem Degranulations-Assay werden aktivierte Zellen durch eine Oberflächenfärbung von CD107a markiert und so der Anteil aktivierter Zellen quantifiziert (Betts *et al.*, 2003). Abbildung 7 D und E zeigt, dass während der vierstündigen Lyse von SEA-beladenen Raji Zielzellen 20-70% der SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen degranulieren. Der unspezifische Stimulus PMA/Ionomycin aktiviert alle Zellen, löst bei der gesamten T-Zell-Population Degranulation aus und dient daher als Positivkontrolle. Der Vergleich von PMA und SEA (F & G) zeigt, dass durchschnittlich 46,5% der (unspezifisch aktivierbaren) T-Zellen eine Spezifität für SEA besitzen und SEA-beladene Zielzellen lysieren können.

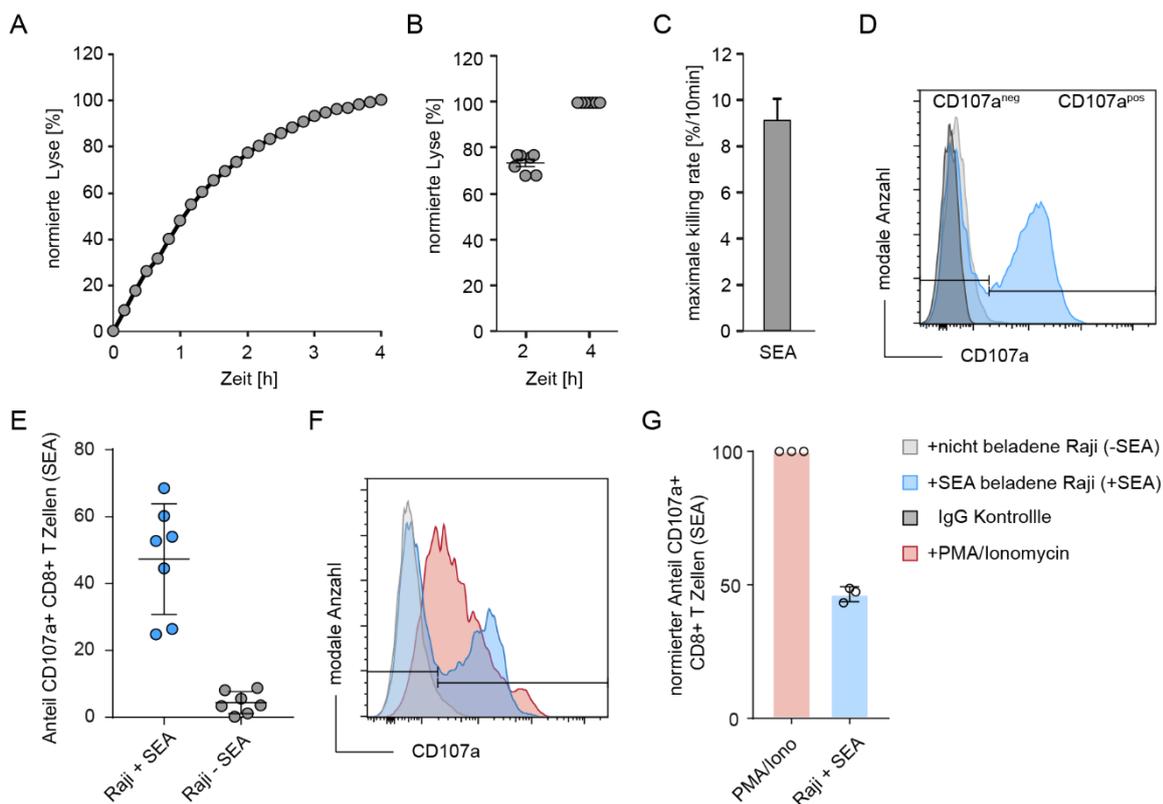


Abbildung 7: Zytotoxizität SEA-stimulierter $CD8^+$ T-Zellen. A) Normierte Kinetik der Lyse von SEA-beladenen Raji Zielzellen durch $CD8^+$ (SEA) Zellen eines repräsentativen Spenders über 4 h. E:T=20:1 B) Quantifizierung der normierten Lyse nach 2 h und 4 h (n=7). C) Darstellung der mittleren maximalen Killing Rate von $CD8^+$ (SEA) Zellen. D) Degranulation der $CD8^+$ (SEA) Zellen eines repräsentativen Spenders (blau) nach 4 h Koinkubation mit SEA-beladenen Raji Zielzellen. Die IgG Kontrolle ist in dunkelgrau gezeigt, die Degranulation ohne SEA-Stimulus ist hellgrau dargestellt. E) Quantifizierung der Degranulation von $CD8^+$ (SEA) bei der Lyse von Raji Zielzellen (+ SEA: blau, -SEA: grau). F) Vergleich der Degranulation während der SEA-abhängigen Zielzelllyse zu PMA/Ionomycin induzierter Degranulation. G) Quantifizierung des normierten Anteils degranulierender $CD8^+$ (SEA) Zellen durch der SEA abhängigen Zielzelllyse (blau) oder durch PMA/Ionomycin (rot). In A-E) dargestellte Daten sind aus Bhat *et al.*, 2016 modifiziert entnommen. Die Killing-Experimente der Abbildungen A-C) wurden von Cora Hoxha durchgeführt. A-E) n=7, F und G n= 3.

Ergebnisse

Die Analyse der Degranulation zeigt, dass in einem Killing-Assay durchschnittlich 46,5% der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen durch den Kontakt zu einer SEA-beladenen Zielzellen aktiviert werden. Daraus folgt, dass die nachweisbare Zielzellyse auf der Aktivität von durchschnittlich 46,5% der CD8⁺ T-Zellen beruht.

3.2.2 SEA-stimulierte CD8⁺ Memory- und Effektor-Subpopulationen exprimieren Perforin

Die Lyse von Zielzellen durch die Exozytose lytischer Granula ist von Perforin abhängig. Da die verfügbare Menge an Perforin entscheidenden Einfluss auf das zytotoxische Potential einer Population hat, wurde die Expression von Perforin in den CD8⁺ Subpopulationen analysiert. Anhand von zwei unterschiedlichen anti-humanen Perforin-Antikörper-Klonen können verschiedene Synthese-Stadien von Perforin quantifiziert werden. Der Antikörper-Klon δ G9 detektiert die Granula assoziierte Form von Perforin, die auch als „späte“ zur Exozytose bereitstehende Form bezeichnet wird. Der Antikörper-Klon B-D48 bindet multiple Formen von Perforin, wodurch ein Nachweis des gesamten Perforins, also der „frühen“, nicht vollständig prozessierten und der „späten“, granulären Form, stattfindet (Hersperger, Makedonas and Betts, 2008). Die parallele Färbung mit beiden Antikörperklonen ermöglicht die Quantifizierung des gesamten Perforin-Speichers und des „späten“, granulären Perforins, das zur direkten Zielzellyse in den lytischen Granula bereitsteht. Die Differenz zwischen gesamten und granulärem Perforin identifiziert aktivierte Zellen, die Perforin neu-synthetisieren und gibt gleichzeitig Aufschluss über die Menge des neu-synthetisierten Perforins.

Abbildung 8 A und B) zeigt das Gating zur Bestimmung des Perforingehalts von T_N⁻ (CCR7⁺, CD45RO⁻), T_{CM}⁻ (CCR7⁺, CD45RO⁺), T_{EM}⁻ (CCR7⁻, CD45RO⁺) und T_{EMRA}⁻ (CCR7⁻, CD45RO⁻) Subtypen der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zell-Population. T_N⁻ exprimieren kein Perforin. Wie in Abbildung B) - D) zu erkennen ist, liegt auch der Anteil an T_N⁻-Zellen mit gesamtem oder granulärem Perforin unter 5%. In T_{CM}⁻ (65 ± 8,9%), T_{EM}⁻ (70.2 ± 12%) und T_{EMRA}⁻ (86.3 ± 13,5%) ist ein Großteil der Zellen Perforin⁺ (gesamt). Dieser Anteil nimmt entsprechend in T_{EM}⁻ und T_{EMRA}⁻ tendenziell zu, im Vergleich zu T_{CM}⁻ liegt jedoch kein signifikanter Unterschied vor (Abbildung 8 C). Neben dem Anteil an Zellen die Perforin⁺ sind, ist auch die durchschnittliche Menge an Perforin in den Zellen eines Subtyps von Bedeutung, um das zytotoxische Potential bewerten zu können. Diese durchschnittliche Menge an Perforin pro Zelle wird durch die Perforin MFI-Ratio bestimmt (Abbildung 8 D). Die Intensität des granulären (MFI-Ratio=1,38) und des gesamten (MFI-Ratio=1,54) Perforin-Signals hebt sich bei T_N⁻ kaum von der Kontrolle ab. Die T_{CM}⁻-Population zeigt eine deutliche Expression von Perforin (MFI-Ratio_{(gesamt) und (LG)} = 6,6 und 4,6). In den Effektor-Subtypen T_{EM}⁻ (MFI-Ratio=13) und T_{EMRA}⁻ (MFI-Ratio=29) ist die Menge an Perforin um ein Vielfaches höher (Abbildung 8 D). Die T_{EMRA}⁻-Population verfügt im Vergleich zu den anderen Subtypen über eine jeweils signifikant erhöhte Menge an Perforin (T_{EMRA}⁻ vs T_{CM}⁻: B-D48 p=<0,0001 und δ G9 p=<0.0001; vs T_{EM}⁻: B-D48 p=0,002 und δ G9 p=<0,0024). Offensichtlich verfügen alle Zellen über mehr gesamtes als granuläres Perforin. In T_{EMRA}⁻ und T_{CM}⁻ ist

Ergebnisse

der Anteil an Zellen mit gesamtem Perforin nur geringfügig größer als der Anteil an Zellen mit granulärem Perforin. Für die T_{EM} -Population beträgt diese Differenz jedoch 25,12% und ist signifikant (C ; $p=0,013$). Dies deutet auf eine stärkere Aktivierung und effizientere Neusynthese von Perforin in T_{EM} hin.

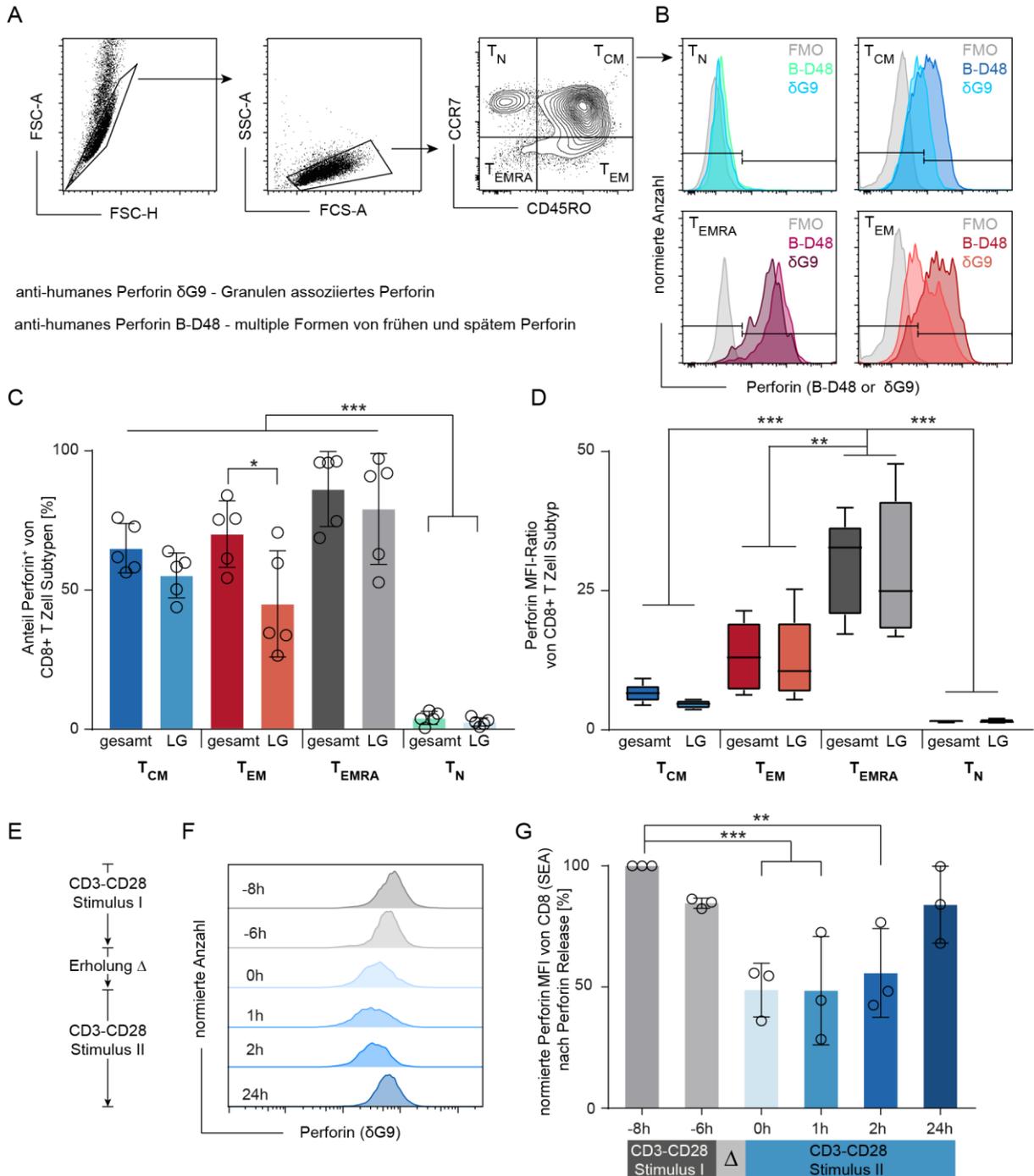


Abbildung 8: Analyse der Perforinspeicher von SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zell-Subpopulationen. A) Veranschaulichung der Gatingstrategie anhand eines repräsentativen Spenders. Nach dem Ausschluss von Dubletten und Partikeln außerhalb des Lymphozyten-Gates wird die $CD8^+$ T-Zell-Population mittels CD45RO und CCR7 in T_N (CCR7⁺, CD45RO⁻), T_{CM} (CCR7⁺, CD45RO⁺), T_{EM} (CCR7⁻, CD45RO⁺), T_{EMRA} (CCR7⁻, CD45RO⁻) eingeteilt und mit Hilfe der Antikörper Klone δ G9 und B-D48, entsprechend granuläres sowie gesamtes intrazelluläres Perforin, nachgewiesen (B). C) Die Quantifizierung des Anteils von Perforin⁺ (gesamt=B-D48; LG= δ G9 (granulär)) Zellen an T_N , T_{CM} , T_{EM} und T_{EMRA} -Subpopulationen. D) Ermittlung der Median Fluoreszenz Intensitätsratio (MFI Perforin⁺ Population/MFI FMO). E und F) Übersicht der Stimulations-Zeitreihe zur Analyse der

Ergebnisse

Ausschüttung und Reexpression von Perforin nach einem CD3/CD28-Stimulus. G) Quantifizierung des Perforingehalts SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen während der Stimulations-Zeitreihe. A n=5 Spender, Säulendiagramme stellen Mittelwerte \pm SD dar, Whisker-Box-Plots stellen Min - Max, 25-Median-75% Interquartilen dar. p-Werte wurden mittels Kruskal-Wallis Test bzw. two-way ANOVA ermittelt. In F) und G) dargestellte Daten stammen aus Bhat *et al.*, 2016.

In einer Stimulations-Zeitreihe kann die Freisetzung von granulärem Perforin nach einem Stimulus sowie die erneute Synthese nach einem weiteren Stimulus überprüft werden. Um den Einfluss einer Aktivierung auf das granuläre Perforin und die Synthese von neuem Perforin zu überprüfen, wurde mit SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen eine Stimulations-Zeitreihe durchgeführt (Abbildung 8 E-G). Nach einem zweistündigen, ersten anti-CD3/anti-CD28 Stimulus und einer vierstündigen Erholungsphase ist die Menge an granulärem Perforin auf 51% reduziert. Der zweite anti-CD3/anti-CD28 Stimulus zeigt innerhalb der ersten Stunde keinen Effekt. Nach 24 Stunden ist die Expression von granulärem Perforin wiederhergestellt.

Der Vergleich der Perforinexpression von CD8⁺ Subtypen zeigt, dass neben T_{EM} und T_{EMRA} auch ein Großteil der T_{CM} Population Perforin exprimiert. T_{EM} und T_{CM} zeigen keine signifikanten Unterschiede im Anteil Perforin⁺ Zellen. Da T_{EM} jedoch durchschnittlich die drei- bis vierfache Menge an Perforin pro Zelle enthalten und eine signifikant höhere Differenz von gesamtem und granulärem Perforin aufweisen, ist von T_{EM} eine effizientere Perforin vermittelte Lyse zu erwarten.

3.2.3 SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zell Memory-Subpopulationen exprimieren den TRAIL Liganden

Neben der Perforin vermittelten Lyse verfügen CD8⁺ T-Zellen über rezeptorvermittelte Mechanismen um Zielzellen zu lysieren. Um beurteilen zu können, ob CD8⁺ T-Zell-Subtypen in der Lage sind, Zielzellen über diese Signalwege zu lysieren, wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren FAS-L (CD178) und des TRAIL Liganden (TRAIL, CD253) untersucht. Da der durchflusszytometrische Nachweis von FAS-L technisch nicht reproduzierbar war, ist die Analyse der Expression von TRAIL dargestellt.

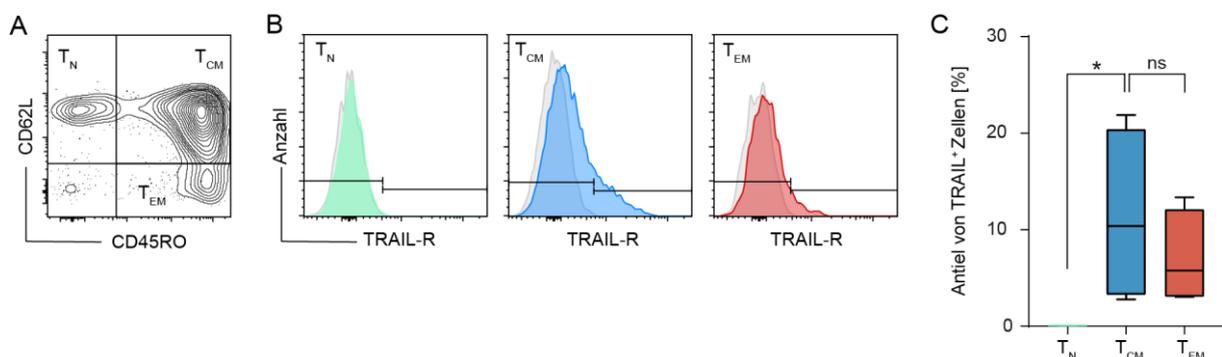


Abbildung 9: CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen exprimieren den Trail Liganden. A) Gating der Subpopulationen eines repräsentativen Spenders mittels CD45RO und CCR7 nach dem Ausschluss von Dupletten und von Zellen außerhalb des Lymphozytengates. B) Expression von TRAIL in T_N (CCR7⁺, CD45RO⁻), T_{CM} (CCR7⁺, CD45RO⁺), T_{EM} (CCR7⁻, CD45RO⁺). C) Quantifizierung des Anteils TRAIL⁺ Zellen in T_N, T_{CM} und T_{EM}-Subpopulationen. Whisker-Box-Plots stellen Min - Max, Median- 25 -75% Interquartilsabstand dar. n=4 Spender, p-Werte wurden mit einem Kruskal-Wallis Test ermittelt.

Ergebnisse

Abbildung 9 A und B) zeigen die Gatingstrategie zur Bestimmung der TRAIL-Expression von T_N , T_{CM} und T_{EM} . Die T_{EMRA} -Population wurde in dieser Analyse aufgrund des geringen Anteils an der $CD8^+$ Population ausgeschlossen. Im Gegensatz zu T_{CM} und T_{EM} exprimieren T_N kein TRAIL (Abbildung 9 B). Zwischen T_{CM} ($11,4 \pm 9,1\%$) und T_{EM} ($7 \pm 5\%$) liegt kein signifikanter Unterschied vor. Beide Subpopulationen sollten Zielzellen durch den TRAIL Signalweg zu lysieren können.

3.2.4 Die Population SEA-stimulierter $CD8^+$ T-Zellen enthält TC1 und TC17 Zellen

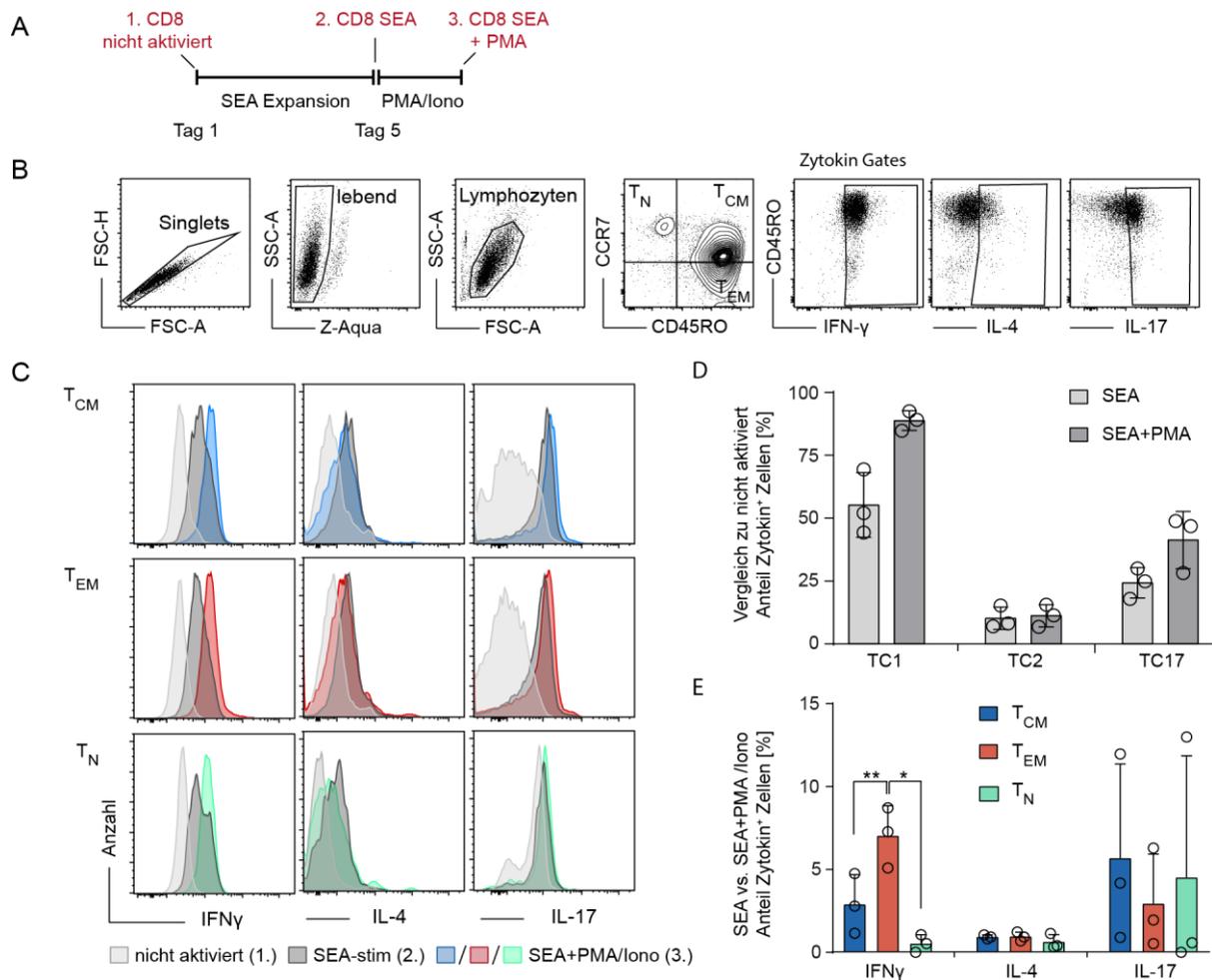


Abbildung 10: Nachweis von funktionellen Subpopulationen TC1, TC2 und TC17 in SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen mittels Zytokin-Induktionsassay. A) Schema der Stimulation von Proben die im Zytokin-Induktionsassay untersucht wurden. Es wurden nicht aktivierte (1.), SEA-stimulierte (2.) und für weitere 4 h mit PMA 5ng/ml und Iono 500ng/ml aktivierte Zellen (3.) untersucht. B) Nach dem Ausschluss von Dubletten, und toten Zellen mittels Zombie-Aqua erfolgt das Subtypen-Gating der unstimulierten oder SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen mittels CCR7 und CD45RO in T_N (CCR7 $^+$, CD45RO $^-$), T_{CM} (CCR7 $^+$, CD45RO $^+$), T_{EM} (CCR7 $^-$, CD45RO $^+$). Anschließend werden, anhand der unstimulierten oder der SEA-stimulierten Kontrolle (2.), Gates zur Bestimmung Zytokin $^+$ Zellen positioniert (Darstellung eines repräsentativen SEA-stimulierten Spenders). C) Übersicht der Zytokin Expression in T_N , T_{EM} und T_{CM} in unstimuliertem (1., hellgrau), SEA-stimuliertem (2., schwarz) oder SEA + PMA-Ionomycin (PMA 5ng/ml, Iono 500ng/ml) stimuliertem Zustand (3., T_{CM} blau; T_{EM} rot; T_N hellgrün). D und E) Quantifizierung des Anteils von TC1 (IFN- γ^+), TC2 (IL-4 $^+$) und TC17 (IL17 $^+$) -Zellen an der SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zell-Population. D) Vergleich der SEA-stimulierten Probe (2., hellgrau) oder der SEA-stimulierten und PMA/Ionomycin stimulierten Probe (3., dunkelgrau) mit der nicht aktivierten Probe (1., hellgrau) E) Vergleich des Anteils Zytokin-positiver Zellen innerhalb der Subpopulationen, T_N (CCR7 $^+$, CD45RO $^-$), T_{CM} (CCR7 $^+$, CD45RO $^+$), T_{EM} (CCR7 $^-$, CD45RO $^+$), zwischen der SEA-stimulierten Kontrolle (2.) und der SEA-stimulierten + PMA/Ionomycin stimulierten Probe (3.). N=3 Spender, die Säulendiagramme zeigen Mittelwerte \pm SD. p-Werte wurden mittels one-way ANOVA oder Kruskal-Wallis Test ermittelt.

Ergebnisse

Die Produktion von Zytokinen zählt zu den zentralen Funktionen der T-Zell-Population. Die CD4⁺ Population wird anhand ihrer Zytokinproduktion in verschiedene funktionale Subtypen unterteilt. Diese Unterteilung in funktionale Subtypen ist bei CD8⁺ T-Zellen weniger verbreitet, trotzdem ist eine Einteilung in IFN- γ produzierende (TC1), IL-4 produzierende (TC2) und IL-17 produzierende (TC17) Zellen möglich. Die Produktion und Freisetzung IFN- γ gilt als Aktivierungsmarker und ist neben den zytotoxischen Mechanismen ist auch eine Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen. Die Produktion dieser Zytokine kann mit einem Zytokin-Induktions-Assay nachgewiesen werden. Bei diesem wird die Produktion von Zytokinen über vier Stunden durch einen Stimulus (PMA/Ionomycin) induziert, während die Ausschüttung durch eine Behandlung mit GolgiStopTM inhibiert wird. So kommt es zu einer Anreicherung von Zytokinen in der Zelle, welche nach vier Stunden durchflusszytometrisch analysiert wird. In diesem Experiment wurde die verwendete CD8⁺ Population zu verschiedenen Zeitpunkten der Expansion untersucht (Abbildung 10A), um beurteilen zu können, wie das Zytokinprofil durch die SEA-Stimulation beeinflusst wird. Der Vergleich der nicht-stimulierten Probe (1.) und der SEA-stimulierten Probe (2.) zeigt, dass es durch die fünftägige SEA-Stimulation zu einer erhöhten Grundaktivität kommt. Auch ohne eine zusätzliche Aktivierung durch PMA/Ionomycin produzieren $55,28 \pm 12,9\%$ der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen IFN- γ (D). Erhält die SEA-stimulierte CD8⁺ Population den zusätzlichen Stimulus durch PMA/Ionomycin, steigt der Anteil IFN- γ produzierender Zellen auf $88,9 \pm 3,9\%$ an. Die SEA-stimulierte CD8⁺ Population weist somit einen TC1 Phänotyp auf. Eine deutliche Produktion von IL-4 kann weder durch die grundsätzliche Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen durch die SEA-Stimulation noch durch den zusätzlichen PMA/Ionomycin-Stimulus ausgelöst werden. Die Proben zeigen eine Aktivität von 10,2 beziehungsweise 11,2%. Der TC2-Phänotyp scheint somit nach der SEA-Stimulation nicht relevant zu sein. IL-17 wird von $24,3 \pm 6,0\%$, beziehungsweise $41,33 \pm 11,42\%$ (nach PMA/Ionomycin) der SEA-stimulierten CD8⁺ Zellen produziert. Durch die SEA-Stimulation kommt es zu einer Aktivierung von TC1- und TC17-Zellen.

Neben dem Zytokinprofil sollte auch die Aktivität der einzelnen Subtypen untersucht werden. Anhand der Oberflächenexpression von CCR7 und CD45RO wurde die SEA-stimulierte CD8⁺ Population in T_N (CCR7⁺, CD45RO⁻), T_{CM} (CCR7⁺, CD45RO⁺), T_{EM} (CCR7⁻, CD45RO⁺) unterteilt und die PMA/Ionomycin induzierte Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-17 analysiert. Der direkte Vergleich der SEA-stimulierten Kontrolle (2.) und der zusätzlich mit PMA/Ionomycin aktivierten Probe (3.) zeigt mit $7 \pm 1,8\%$ für T_{EM} die höchste Induktion der IFN- γ Produktion (T_{EM}:T_{CM} p=0.003; T_{EM}:T_N p=0.034). Kein Subtyp produziert IL-4. Die IL-17 Produktion hingegen ist in allen Subtypen nachweisbar, unterliegt aber großen spenderabhängigen Schwankungen.

Die SEA-Stimulation hat einen deutlichen Effekt auf das Zytokinprofil von CD8⁺ T-Zellen. Auch ohne einen zusätzlichen akuten Stimulus produziert ein großer Anteil der CD8⁺ Population IFN- γ und IL-17 und in geringem Maße auch IL-4. Die Aktivierung mit PMA/Ionomycin induziert die direkte Produktion von IFN- γ und IL-17, weshalb der Population Zellen mit TC1 und TC17 zugeordnet werden können.

Die im Vergleich zu T_{CM} und TN erhöhte IFN- γ Induktion bei TEM deutet auf eine hohe Aktivierung und eine gesteigerte Zytotoxizität dieser Population hin.

3.2.5 Funktionaler Nachweis der Perforin-vermittelten Zytotoxizität

Die bisherigen Untersuchungen haben eine deutliche Induktion der Produktion von Perforin und IFN- γ bei T_{EM} und T_{CM} Zellen in der SEA-stimulierten Population gezeigt. Darüber hinaus konnte eine SEA-vermittelte Zytotoxizität gegen MHC-II⁺ und mit SEA-beladene Zielzellen durch etwa 50% der Zellen der CD8⁺ Population nachgewiesen werden. Beide Subtypen verfügen über Perforin und TRAIL um Zielzellen zu lysieren. Von T_{EM} ist aufgrund der erhöhten Produktion von IFN- γ und der stärkeren Expression und Neusynthese von Perforin eine gesteigerte Zytotoxizität zu erwarten. Im Folgenden wird die Funktionalität der Perforin-vermittelten und der Todesrezeptor-vermittelten Zytotoxizität von SEA-stimulierten CTLs durch die Blockierung einzelner zytotoxischer Mechanismen untersucht.

Der spezifische Inhibitor der vakuolären Protonenpumpe Concanamycin A (CMA) inaktiviert Perforin durch eine Neutralisierung des sauren Milieus in lytischen Granula (Kataoka *et al.*, 1996). In einem real time Killing-Assay wurde überprüft, welche CMA-Konzentration die Perforin-vermittelte Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen inhibiert. Die Kinetik der Lysen von NALM-6 Zellen durch unbehandelte CTLs zeigt, dass bei einer Effektor zu Zielzell- (E:T) Ratio von 20:1 ein großer Anteil der Zielzellen bereits innerhalb der ersten zwei Stunden lysiert wird. Unter dem Einfluss von 10 nM CMA ist die Lyse nur teilweise inhibiert. Der initiale (0-2 h) Anteil lysierter Zellen ist deutlich reduziert, nach vier Stunden ist die Lyse jedoch mit der unbehandelten Probe vergleichbar. Durch die Behandlung mit 25, 50 oder 100 nM CMA ist die Lyse der Zielzellen innerhalb der ersten zwei Stunden komplett inhibiert und nach vier Stunden auf 30% reduziert (Abbildung 11 A -C). Dabei ist der Effekt ab einer Konzentration von 25nM nicht mehr konzentrationsabhängig. In weiteren Experimenten wurde eine Konzentration von 50nM CMA verwendet, um die Perforinspeicher in einer zweistündigen Präinkubation zu inaktivieren und auch während der Messung sicherzustellen, dass neu synthetisiertes Perforin inaktiv ist.

Um Todesrezeptor-vermittelte Lysen funktional nachzuweisen, wurden diese, durch blockierende Antikörper gegen den TRAIL- und den FAS-Liganden, inhibiert. Eine Reduktion, der im Populations-Assay gemessenen Lyse, würde so auf den Einfluss dieser Mechanismen schließen lassen. Abbildung 11 D - F) zeigt, dass die Behandlung mit 10 μ g/ml anti-FAS-L oder 5 μ g/ml anti-TRAIL Antikörper keinen Einfluss auf die Kinetik der Zielzelllyse hat. Trotz der Inhibierung erreichen diese Bedingungen eine normierte Lyse von 100%. Die Analyse im Populations-Killing Assay weist demnach keinen Einfluss der Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren auf die Lyse durch SEA-stimulierten CTLs nach. Im Vergleich dazu ist der Einfluss von Perforin-vermittelten nekrotischen Lysen mit dem Populationsassay eindeutig nachweisbar. Die Inhibierung der Lysen durch die Behandlung mit 50 nM

Ergebnisse

CMA ist gegenüber den anderen Bedingungen nach zwei Stunden ($p=0,003$ (anti-FAS-L), $p<0,0001$ (normal und anti-TRAIL) und nach vier Stunden ($p<0,0001$) signifikant.

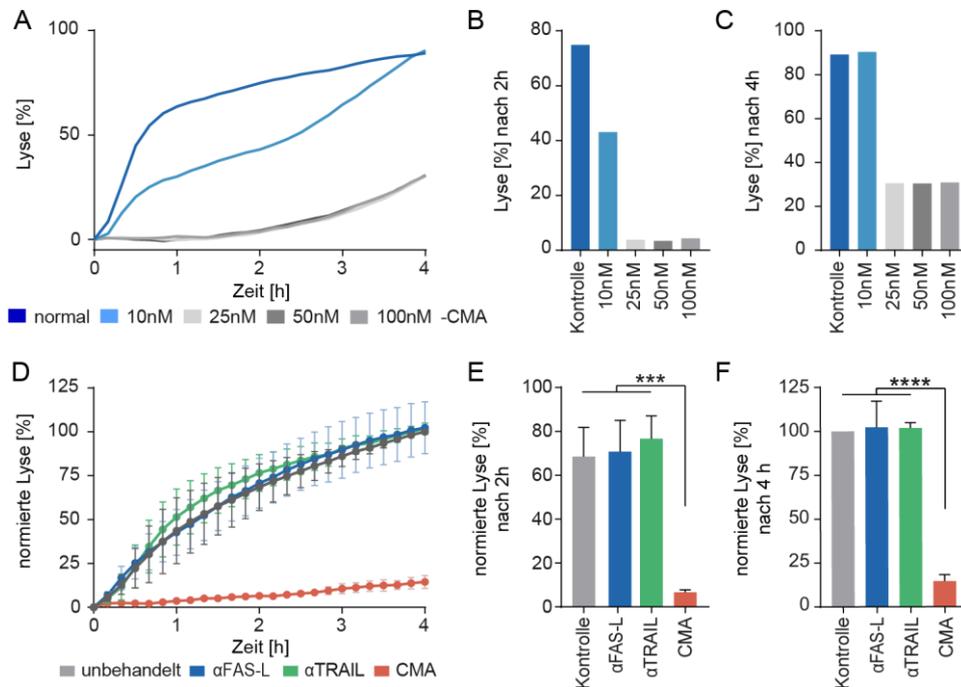


Abbildung 11: Inhibition der Zytotoxizität SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen A) Real-time Killing Kinetik der Lyse von NALM-6 Zellen durch SEA-stimulierte CD8⁺ Zellen (normal) (E:T=20:1) unter Einfluss von 10 nM, 25 nM, 50 nM und 100 nM CMA im Populations-Killing Assay ermittelt (n=1 Spender) B) Prozentuale Lyse unter Einfluss von CMA nach 2 h. C) Prozentuale Lyse unter Einfluss von CMA nach 4 h. D) Normierte Kinetik der Lyse (Lyse-SEA Kontrolle 4 h =100%) von NALM-6 Zellen durch SEA-stimulierte CD8⁺ Zellen (normal) (E:T=20:1) unter Einfluss von 25nM CMA (n=4 Spender), 10 µg/ml anti-FAS-L (n=2 Spender) oder 5 µg/ml anti-TRAIL (n=3 Spender). E) Quantifizierung der normierten Lyse nach 2 h. F) Quantifizierung der normierten Lyse nach 4 h. Säulendiagramme zeigen den Mittelwert ± SD. p-Werte wurden mittels one-way ANOVA bestimmt.

Um den Einfluss von TRAIL und FAS-L auf die Zytotoxizität der SEA-stimulierten CTLs zu untersuchen, reicht eine Analyse von nekrotischen Lysen über vier Stunden vermutlich nicht aus. Daher sollte mit Hilfe des pCasper-GR Apoptose-Sensors die nekrotische und die apoptotische Zielzelllyse über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Zur Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen wurde von Christian Backes und Carsten Kummerow ein Einzelzell-Zytotoxizitäts-Assay entwickelt. Dieser wurde in dieser Arbeit auf die Analyse der Zytotoxizität von CTLs übertragen.

3.2.6 NALM-6 Zellen als Zielzellsystem für SEA-vermittelte Zytotoxizität

Da mit dem Populations-Assay keine direkte Analyse von apoptotischen Lysen möglich ist, kann die Bedeutung der Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen für die Zytotoxizität von CTLs nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund sollte der für NK-Zellen etablierte Einzelzell-Assay für die Analyse von SEA-stimulierten CTLs umgestellt werden. Die Analyse von Apoptosen mit Hilfe des Apoptose-Sensors pCasper-GR setzt Zielzellen voraus, die das pCasper-GR Konstrukt exprimieren. Im Zeitraum dieser Arbeit gelang es nicht, die für den Populations-Assay etablierte Zielzelllinie Raji mit dem pCasper-GR Konstrukt stabil zu transfizieren. Durch Eva Schwarz, Susanne Renno und Dalia

Ergebnisse

Alansary konnte die pCaspE-GR exprimierende Prä-B Zelllinie NALM-6pCaspE hergestellt werden. Im Folgenden werden NALM-6 Zellen als Zielzellensystem für SEA-stimulierte CTLs verifiziert.

3.2.6.1 NALM-6 Zellen exprimieren HLA-DR auf der Zelloberfläche und können mit SEA-beladen werden

Im Zeitraum der Arbeit gelang es nicht, das pCaspE-GR Konstrukt stabil und homogen in die im Labor etablierte B-Zelllymphom Zelllinie Raji zu transfizieren. Daher sollte die Prä-B-Zelllinie NALM-6 für den mikroskopischen Einzelzell-Killing Assay verwendet werden. Wie bereits in 2.2.2 und 3.2.1 beschrieben setzt die Superantigen-vermittelte Zytotoxizität über SEA die Kreuzvernetzung von CTL und Zielzelle über einen TCR-V β - SEA - MHC-II Komplex voraus. Essentiell für die Interaktion von SEA-stimulierten CTLs mit einer Zielzelle ist daher die Präsentation des Superantigens SEA auf der Oberfläche der MHC-II⁺ Zielzelle. Aus diesem Grund wurde die Expression des MHC-II Moleküls HLA-DR auf der Oberfläche von NALM-6 Zellen untersucht und überprüft, ob diese Zellen SEA auf ihrer Oberfläche binden können. Die Zielzelllinien Raji und E6.1 dienen dabei als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

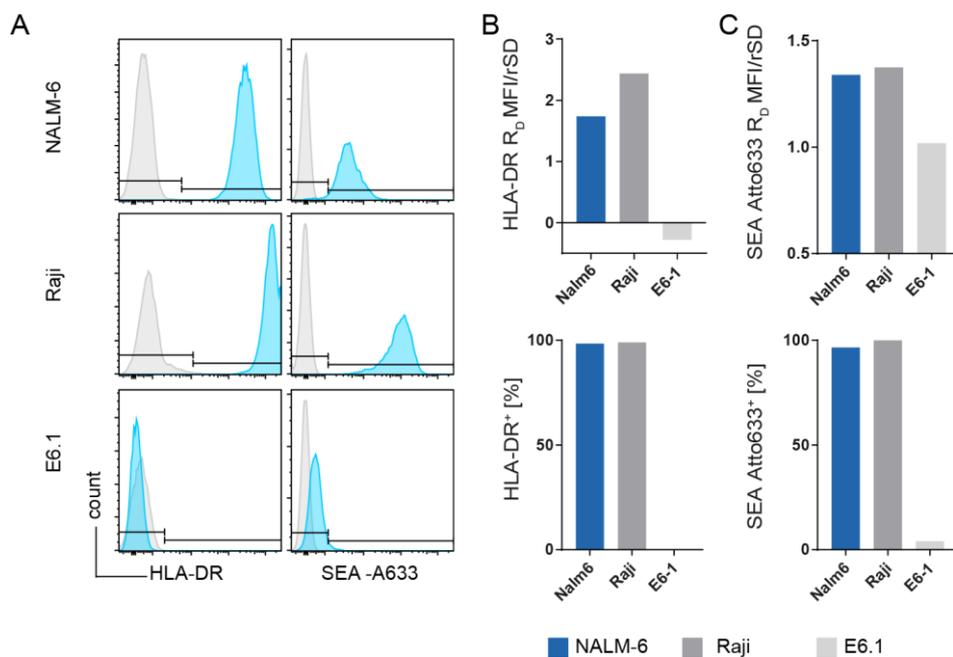


Abbildung 12: HLA-DR Expression und Präsentation von SEA auf der Oberfläche von NALM-6 Zellen. A) Durchflusszytometrische Analyse von HLA-DR und SEA (markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto-633, Beladung: 30 min 1 μ g/ml SEA) auf der Oberfläche von NALM-6, Raji und Jurkat E6.1 (Negativkontrolle). B) Quantifizierung der Expression von HLA-DR mittels R_D resolution metric ($MFI_{Probe} - MFI_{IgG-Kontrolle} / rSD_{Probe} + rSD_{IgG-Kontrolle}$) und des Anteils HLA-DR⁺ Zellen. C) Quantifizierung des auf der Zelloberfläche präsentierten SEA mittels RD und des Anteils SEA-Atto633⁺ Zellen. N=1 (Analyse von Duplikaten)

NALM-6 und Raji Zellen exprimieren HLA-DR homogen auf ihrer Oberfläche (Abbildung 12A-C). Durch den Vergleich der gefärbten Probe und einer IgG-Kontrolle kann die R_D (Resolution Metric) zur Darstellung der Expressionsstärke bestimmt werden. Raji (R_D=2,4) und NALM-6 (R_D=1,7) zeigen im Vergleich zu E6.1 Zellen (R_D= -0,28) eine deutliche Expression. Dementsprechend sind 99,1% der NALM-6 sowie 98,9% der Raji Zellen HLA-DR⁺. Ob die Zellen in der Lage sind, SEA auf ihrer

Ergebnisse

Oberfläche zu präsentieren, wurde mit Hilfe des markierten SEA-Atto633 kontrolliert. SEA ist auf 96,6% der NALM-6 Zellen nachweisbar. Die R_D von NALM-6 ($R_D=1,3$) und Raji Zellen ($R_D=1,4$) sind vergleichbar (Abbildung 12 C).

3.2.6.2 Die Zelllinie NALM-6 ist als *in vitro* System zur Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen geeignet

Neben dem Nachweis der Präsentation von SEA auf der Zelloberfläche von NALM-6 Zellen wurde auch funktional im Populations-Assay untersucht, ob SEA-stimulierte CTLs in der Lage sind, NALM-6 Zellen zu lysieren. Der Vergleich der Lyse-Kinetik von NALM-6 und Raji Zellen zeigt, dass NALM-6 Zellen vergleichbar zu Rajis von SEA-stimulierten CTLs lysiert werden können (Abbildung 13 A - D). Die maximale Killingrate, und die Lyse beider Zelllinien nach einer oder vier Stunden zeigen keine signifikanten Unterschiede für Raji oder NALM-6 Zellen. Die Zelllinie NALM-6 ist daher zur Analyse der Zytotoxizität von SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen geeignet und kann als vergleichbares Zielzellensystem zu Raji Zellen betrachtet werden.

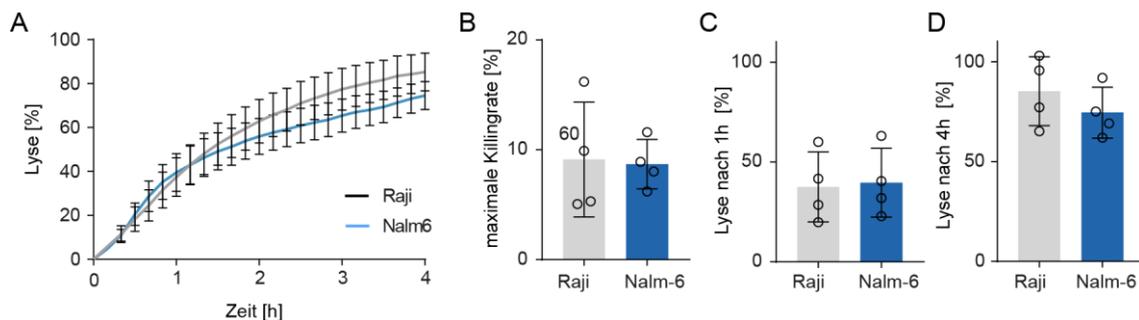


Abbildung 13: Zytotoxizität von SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen gegen NALM-6 Zellen NALM-6 und Raji Zellen wurden jeweils mit 1 $\mu\text{g/ml}$ SEA beladen, für 4 h mit SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen kokubiert und im Populations-Killing Assay analysiert (E:T Ratio=10:1). A) Kinetik der Lyse von Raji und NALM-6 Zellen. B) Quantifizierung der maximalen Killingrate (maximale prozentuale Lyse/ 10 min). C) Anteil lysierter Zielzellen nach 1 h. D) Anteil lysierter Zielzellen nach 4 h. n=4 Spender, Säulendiagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. p-Werte wurden mit einem gepaarten t-Test ermittelt.

3.2.6.3 NALM-6 Zellen exprimieren die Todesrezeptoren FAS-R und TRAIL-R

Um die NALM-6 Zellen als Zielzelle zur Analyse von apoptotische Lysen zu verifizieren, wurde auch die Expression der Todesrezeptoren FAS-R und der TRAIL-Rezeptoren untersucht. Eine Voraussetzung für die Induktion von Apoptosen mittels FAS-L oder TRAIL ist die Expression des FAS-Rezeptors oder der TRAIL Rezeptoren 1 oder 2 auf der Zielzelloberfläche. Neben den pro-apoptotischen Rezeptoren TRAIL R1 und R2 exprimieren manche Zelllinien die *Decoy*- (Köder) Rezeptoren TRAIL R3 und R4, die die Zielzelle vor TRAIL induzierter Apoptose schützen können. Die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren wurde neben NALM-6 Zellen auch für die Zielzellen Raji, K562 und E6.1 bestimmt.

Ergebnisse

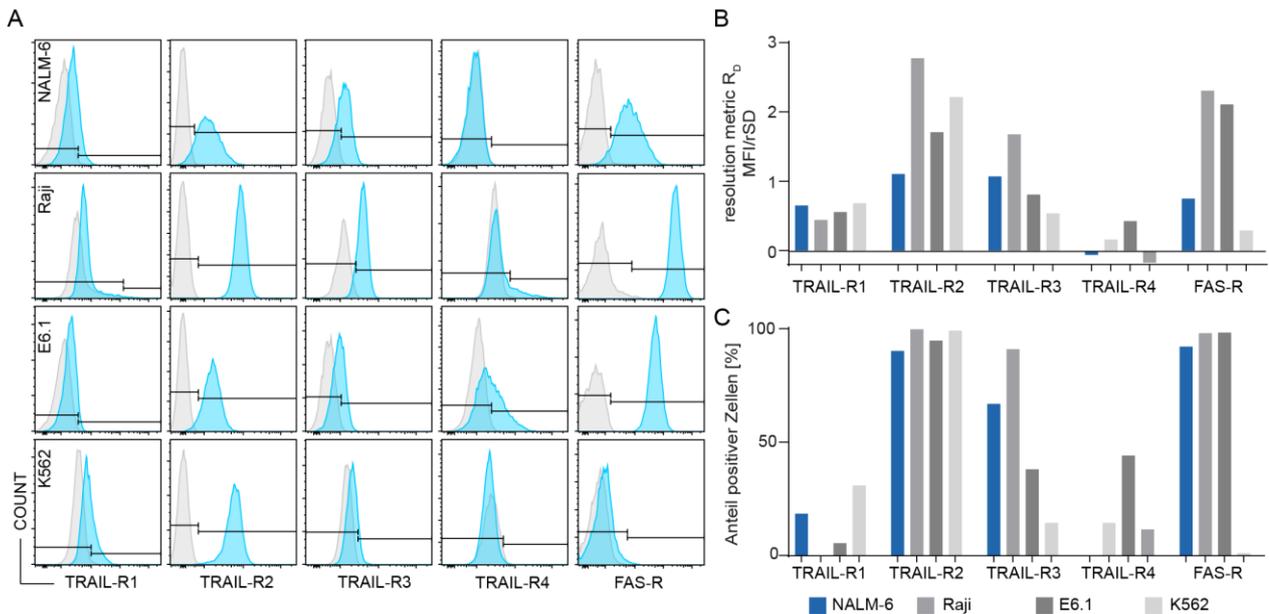


Abbildung 14: FAS-R und TRAIL-R Expression auf der Zelloberfläche von Zielzellen. A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von FAS-R sowie TRAIL-R1-R4. B) Quantifizierung der Expressionsstärke und Homogenität der Expression mittels R_D resolution metric ($MFI_{Probe} - MFI_{IgG-Kontrolle} / rSD_{Probe} + rSD_{IgG-Kontrolle}$). C) Anteil der FAS-R+, TRAIL-R1-R4+ Zellen. N=1 (Dubletten)

In Abbildung 14 A) zeigt die Oberflächenexpression FAS und TRAIL Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche von NALM-6, Raji, E6.1 und K562 Zellen. Im Gegensatz zu TRAIL R1 wird TRAIL R2 von allen untersuchten Zelllinien deutlich exprimiert. Ein Anteil von 90,3% der NALM-6 Zellen ist TRAIL R2⁺. Verglichen mit den anderen Zelllinien ist die Expression von TRAIL R2 aber schwächer ($R_D=1,1$) als auf Raji ($R_D=2,8$), E6.1 ($R_D=1,7$) oder K562 Zellen ($R_D=2,2$). Der *Decoy*-Rezeptor TRAIL-R3 ist auf NALM-6 (67%) und Raji (91%) stärker exprimiert als auf E6.1 und K562 Zellen. NALM-6 Zellen zeigen keine Expression von TRAIL-R4 ($R_D=-0,04$; 0,29% TRAIL-R4⁺), auf Raji (R_D 0,15; 14,4%) und E6.1 ($R_D=0,42$; 44,1%) ist eine geringe Expression nachweisbar.

NALM-6, Raji und E6.1 Zellen sind im Gegensatz zu K562 Zellen, die als Negativkontrolle für die FAS-R Färbung dienen, FAS-R⁺. Der FAS-R ist auf 92,2% der NALM-6 Zellen nachweisbar. Die Expression ($R_D=0,74$) ist aber schwächer als auf Raji ($R_D=2,3$; 98,1%) und E6.1 ($R_D=2,1$; 98,4%) Zellen. FAS-R defiziente K562 Zellen exprimieren den FAS-R nicht ($R_D=0,3$; 1,1%) (Abbildung 14 B und C).

Da sowohl FAS-R als auch TRAIL-R2 auf NALM-6 Zellen exprimiert ist, sollte es für SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen möglich sein, diese Zellen nicht nur mittels Perforin und Granzym sondern auch mit Hilfe der Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen zu lysieren. Die Expression von TRAIL-R2 und FAS-L ist jedoch auf E6.1 und Raji Zellen deutlich stärker, was bei Zytotoxizitätsanalysen berücksichtigt werden sollte.

3.2.6.4 Das pCasper-GR Konstrukt wird homogen von vitalen NALM-6 Zellen exprimiert

Um die stabile Expression des Apoptose Sensors pCasper-GR zu verifizieren und das Signal lebender Zellen zu erfassen wurde durchflusszytometrisch das GFP- und RFP-Signal und mikroskopisch das GFP- und das FRET-Signal gemessen (Abbildung 15). Die durchflusszytometrische Detektion des pCasper-GR Konstrukts in NALM-6p Casper Zellen zeigt, dass 98,7% GFP⁺ und RFP⁺ sind und das pCasper-GR Konstrukt homogen exprimieren (Abbildung 15 A und B). In Abbildung 15 C) ist ein Bildausschnitt von Nalm6 pCasper Zellen unter Zellkulturbedingungen zu sehen. Die Zellen zeigen ein deutliches FRET-Signal, nur in vereinzelt Zellen ist ein starkes GFP-Signal einer Apoptose zu erkennen. Nach acht Stunden sind 98,4% der Zellen lebend. Mittels automatisierter Detektion von GFP⁺ Zellen wurden alle Zellen im analysierten Bereich erfasst, um das Wachstum der Zellen unter Inkubationsbedingungen zu bestimmen. Dafür wurden die Zellzahlen zwischen vier und acht Stunden verglichen und ein Wachstum von 11% ermittelt. In Abbildung 15 D) ist das auf den ersten Zeitpunkt intensitätsnormierte (F/F_0) GFP und FRET Fluoreszenzintensitätssignal von 52 lebenden, manuell getrackten NALM-6 pCasper Zellen über acht Stunden dargestellt. Die daraus resultierende Donor-Ratio steigt in lebenden Zellen nur leicht und verläuft über acht Stunden konstant um einen Wert von 1 (Abbildung 15 E).

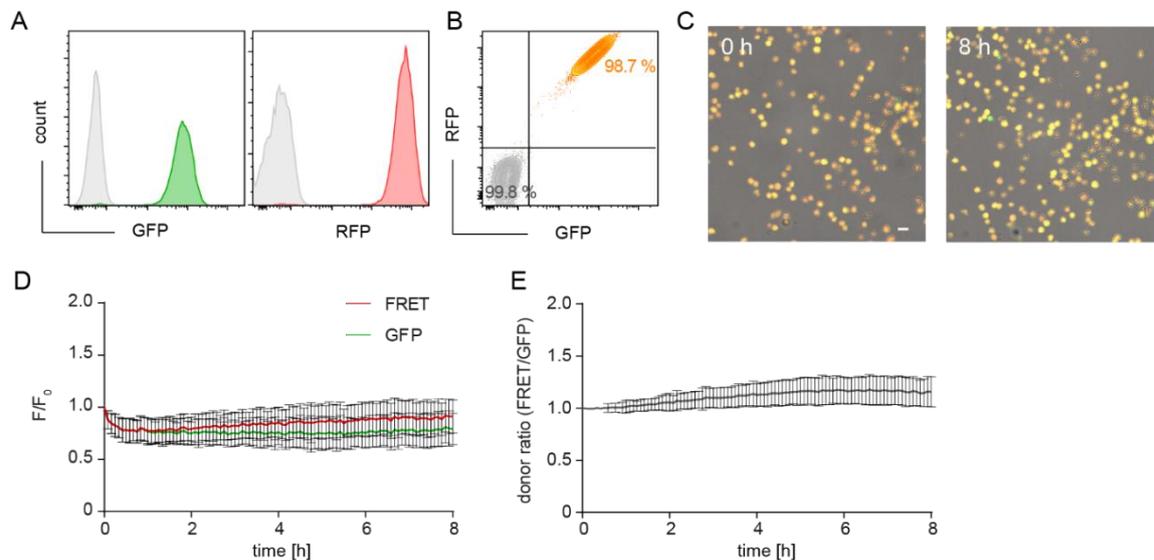


Abbildung 15: pCasper-GR wird homogen von vitalen NALM-6 Zellen exprimiert . A) Darstellung der GFP (grün) und RFP (rot) Fluoreszenz von NALM-6 pCasper Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten NALM-6 Zellen (grau). B) Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit GFP⁺/RFP⁺ NALM-6 pCasper Zellen. C) Vitalität der NALM-6 pCasper Zelllinie bei 37 °C, 5% CO₂ über 8 h; vitale Zellen erscheinen gelb/orange, apoptotische Zellen grün. Aufnahme von Durchlicht-, GFP- und FRET-Signal, 20x-Objektiv, Aufnahme-Intervall 5 min, Messbalken: 20 µm D) Zeitaufgelöste, F/F_0 intensitätsnormierte Darstellung des GFP und FRET Signals von lebenden Nalm6 pCasper Zielzellen (n=52) über 8 h (Mittelwert ± SD). E) Normierte Darstellung der Donor-Ratio (FRET/GFP) von lebenden Zellen (Mittelwert ± SD).

3.2.7 Detektion von Apoptosen und Nekrosen mittels pCasper-GR in NALM-6 Zielzellen

Der Calcein-basierte Populations-Killing-Assay detektiert die nekrotische Lyse von Zielzellen. Bei dieser schwillt die Zelle an und es kommt zu einem plötzlichen Verlust der Membranintegrität, wodurch der Zellinhalt, so auch das Calcein, in den extrazellulären Raum freigesetzt wird und umgebendes Medium zeitgleich in die Zelle einströmt (Vermes *et al.*, 1995; Berghe *et al.*, 2010). Nekrosen können in primäre und sekundäre Nekrosen unterteilt werden. Tritt die nekrotische Lyse der Zielzelle nach einer Apoptose auf, wird sie als sekundäre Nekrose bezeichnet. Ist die Zielzelle vor der Nekrose nicht apoptotisch, findet eine primäre Nekrose statt. Im Calcein-basierten Populations-killing Assay wird durch den Verlust der Calcein-Fluoreszenz eine Nekrose detektiert. Eine mögliche vorhergehende Apoptose der Zielzelle wird nicht erfasst, daher ist es nicht möglich, primäre von sekundären Nekrosen zu unterscheiden.

Die Apoptose einer Zelle kann anhand verschiedenster Parameter detektiert werden. Neben morphologischer Veränderungen, wie dem Auftreten von *Blebs* (Membranausbeulungen), dem Schrumpfen der Zelle, der Fragmentierung der DNA und der Kondensierung des Zytoplasmas (Taylor, Cullen and Martin, 2008; Zhang *et al.*, 2018) eignen sich auch molekulare Reporter zur Identifikation von Apoptosen. Dazu zählt beispielsweise der Nachweis von translozierten Phosphatidylserinen auf der Zelloberfläche mittels Annexin-V (Vermes *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu einer Nekrose ist die Apoptose auch durch eine Caspase-abhängige Signalphase definiert (Berghe *et al.*, 2010). Mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Caspase-Substraten kann eine Apoptose daher auch durch den Nachweis der Caspase-Aktivität detektiert werden (Liu *et al.*, 2002; Shcherbo *et al.*, 2009). Das pCasper-GR FRET-Konstrukt zählt zu diesen Caspase-Substrat-Sensoren, da es die Caspase-3 Erkennungssequenz DEVD enthält. Diese befindet sich im verbindenden Element zwischen den FRET-Fluorophoren GFP und RFP. In lebenden Zielzellen ist der Sensor intakt, was den Nachweis einer GFP-RFP-FRET Fluoreszenz ermöglicht. Während der Induktion einer Apoptose wird die DEVD-Sequenz durch die Caspase-3 geschnitten. Die Fluorophore entfernen sich voneinander wodurch die FRET-Fluoreszenz verloren geht und die Intensität des GFP-Signals zu nimmt. Bei der einzelnen Betrachtung von Zielzell-Killerzell Kontakten kann der Verlauf der Zielzellyse sowohl morphologisch als auch anhand der pCasper Fluoreszenzsignale analysiert und in primär nekrotische oder apoptotische und sekundär nekrotische Lyse klassifiziert werden (Backes *et al.*, 2018).

Abbildung 16 stellt die pCasper Fluoreszenz im Verlauf einer primären Nekrose (A und B), einer Apoptose (C und D) und einer sekundären Nekrose (E und F) dar. Die primär nekrotische Zielzelle zeigt nach der Formierung einer immunologischen Synapse typische morphologische Charakteristika einer Nekrose. Es kommt zum Verlust des Zytosols und der pCasper-GR Fluoreszenz (Abbildung 16 A). Die zeitlich aufgelöste, normierte und gemittelte Darstellung der GFP und FRET-Fluoreszenz sowie der Donor-Ratio von fünf Zellen zeigt einen synchronen Verlust von GFP- und FRET-Signal (B). Da das

Ergebnisse

GFP-Signal der primär nekrotischen Zellen nicht ansteigt, gibt es keine Anzeichen für eine Apoptose. Die Apoptose in Abbildung 16 C) ist durch den deutlichen Umschlag der Fluoreszenz von FRET-Signal auf GFP-Signal sowie dem Schrumpfen der Zielzelle zu erkennen. Durch den Verlust des FRET-Signals und dem zeitgleichen Anstieg der GFP-Fluoreszenz, kann die Spaltung der DEVD-Sequenz durch Caspase-3 und somit auch die Apoptose nachgewiesen werden (Abbildung 16 D). Bei einem Großteil der apoptotischen Zielzellen kann innerhalb von Minuten bis Stunden nach Induktion der Apoptose eine Vergrößerung des Volumens, sowie ein plötzliches Verschwinden der GFP Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 16 E&F). Dieser Vorgang beschreibt die sekundär nekrotische Lyse (Backes *et al.*, 2018).

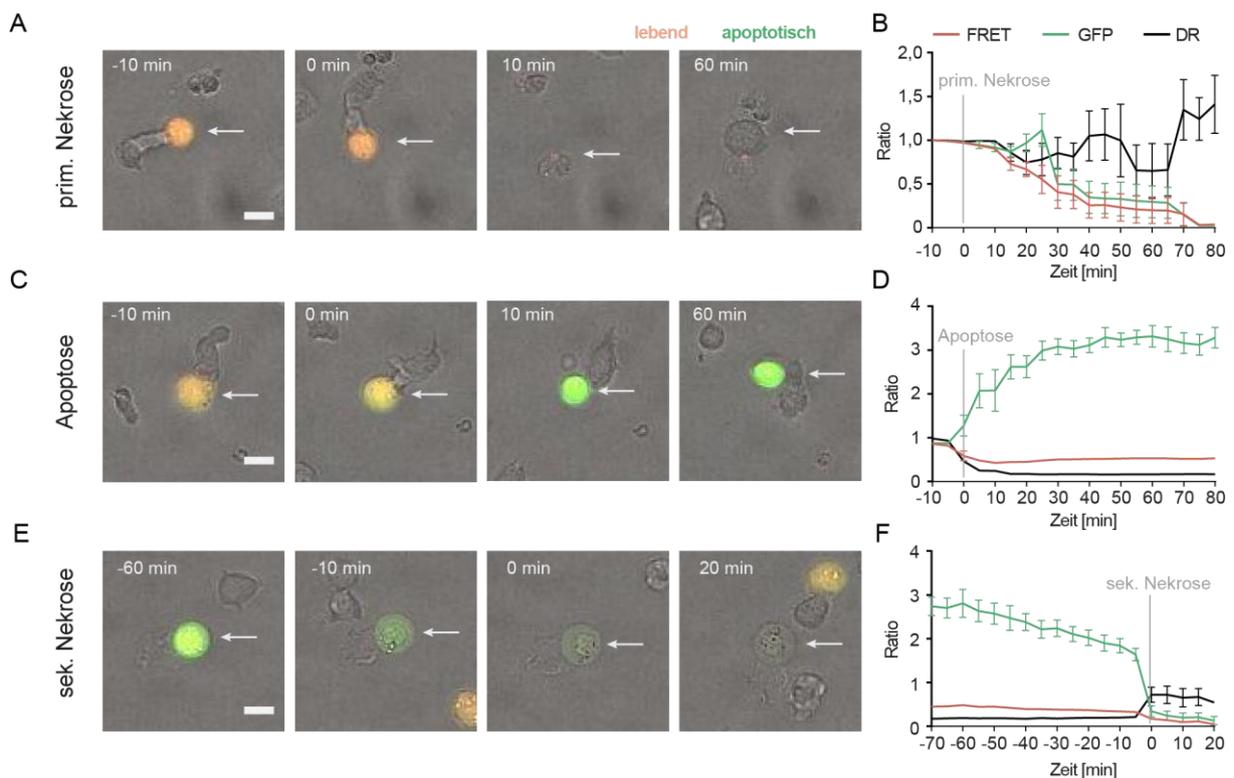


Abbildung 16: Identifikation von Arten des Zelltodes. Durch die Expression von pCaspaseR-GR in NALM-6 Zellen können primäre Nekrosen, Apoptosen und sekundäre Nekrosen unterschieden werden. Der Zeitpunkt -10 min zeigt die Formierung der immunologischen Synapse, zum Zeitpunkt 0 min wird die Zielzelle lysiert und es kommt zu einer Veränderung des pCaspaseR-Signals. A) Exemplarische Aufnahmen einer primär nekrotischen Zellyse, ohne Zunahme des GFP-Signals wird die Zielzelle (markiert durch einen weißen Pfeil) lysiert und verliert die pCaspaseR-Fluoreszenz. B) Zeitlich aufgelöste, normierte und gemittelte Darstellung der GFP- und FRET-Fluoreszenz sowie der FRET Donor-Ratio von 5 Zellen. C) Exemplarische Aufnahme der Induktion einer Apoptose. Das GFP-Signal nimmt zu und die Zelle zeigt weitere morphologische Veränderungen (Schrumpfen, Blebbing), die Fluoreszenz bleibt jedoch bis zur sekundären Nekrose erhalten. D) Zeitlich aufgelöste, normierte und gemittelte Darstellung der GFP- und FRET-Fluoreszenz sowie der FRET Donor-Ratio von 7 Zellen. E) Exemplarische Aufnahmen einer sekundär nekrotischen Zellyse, nach der initialen Zunahme des GFP-Signals, durch eine vorhergehende Apoptose, verliert die Zielzelle (markiert durch einen weißen Pfeil) die pCaspaseR-Fluoreszenz. Die Zeitpunkte -60 min bis -10 min veranschaulichen den langsamen Verlust der GFP-Fluoreszenz und die gleichzeitigen morphologischen Veränderungen (Anschwellen, Verlust des Zytosols). Die Zeitpunkte 0 min und 20 min zeigen die vollständig lysierte Zelle. F) Zeitlich aufgelöste, normierte und gemittelte Darstellung der GFP- und FRET-Fluoreszenz sowie der FRET Donor-Ratio von 7 Zellen. Der Zeitpunkt 0 min markiert in diesem Fall die sekundäre Nekrose. Prim. Nekrose (n=5), Apoptose (n=7), sek. Nekrose (n=7)

3.2.8 Staurosporin-, TRAIL- und FAS-L -induzierte Apoptosen können mittels pCasper in NALM-6 Zellen detektiert werden.

In Abschnitt 3.2.6.3 wurde gezeigt, dass NALM-6 Zellen die Todesrezeptoren TRAIL-R2 und FAS-R exprimieren. Um die Anfälligkeit von NALM-6 pCasper Zellen für Todesrezeptor-vermittelte Mechanismen funktional zu testen, wurden die Zellen mit rekombinanten TRAIL und Apoptose-induzierenden anti-FAS-R Antikörper behandelt. Die Funktionalität des pCasper-GR FRET-Apoptose-Sensors kann mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin verifiziert werden (Shcherbo *et al.*, 2009). Dieses wird als Positivkontrolle für die Aktivität von Caspase-3 vermittelten Apoptosen verwendet. Die in Abbildung 14 dargestellte Untersuchung wurde auf Einzelzellebene durchgeführt und automatisiert analysiert. Diese Analyse ist unter 2.2.10 genau beschrieben. Da die automatisierte Analyse von Einzelzell-Killing Assays in den folgenden Experimenten verwendet wurde, wird das Prinzip dieser Analyse kurz erklärt. Bei der semi-automatisierten Analyse werden alle Zielzellen über den Zeitraum der Zytotoxizitätsmessung zu jedem Zeitpunkt softwaregestützt automatisch detektiert und die Fluoreszenzintensitäten des GFP- sowie des FRET-Signals erfasst. Anhand der GFP-RFP-FRET-Fluoreszenz wird zu jedem Zeitpunkt ermittelt, ob eine erfasste Zielzelle lebend, apoptotisch oder nekrotisch ist. Kommt es in dem analysierten Bereich zu nekrotischem Killing, nimmt die Anzahl der detektierbaren Zellen im zeitlichen Verlauf der Messung ab, da nekrotische Zellen nach der Nekrose nicht mehr detektiert werden können. Diese Differenz zur initialen Zellzahl wird bei der automatisierten Analyse zusätzlich verwendet, um den Anteil nekrotischer Zellen zu bestimmen. Bei der automatisierten Analyse kann kein Tracking der Zellen durchgeführt werden. Es werden lediglich die Signale aller zum jeweiligen Zeitpunkt detektierbaren Zielzellen erfasst. Da so nicht zwischen primären und sekundären Nekrosen unterschieden werden kann, werden alle vollständig lysierten Zellen als Nekrosen zusammengefasst.

Ergebnisse

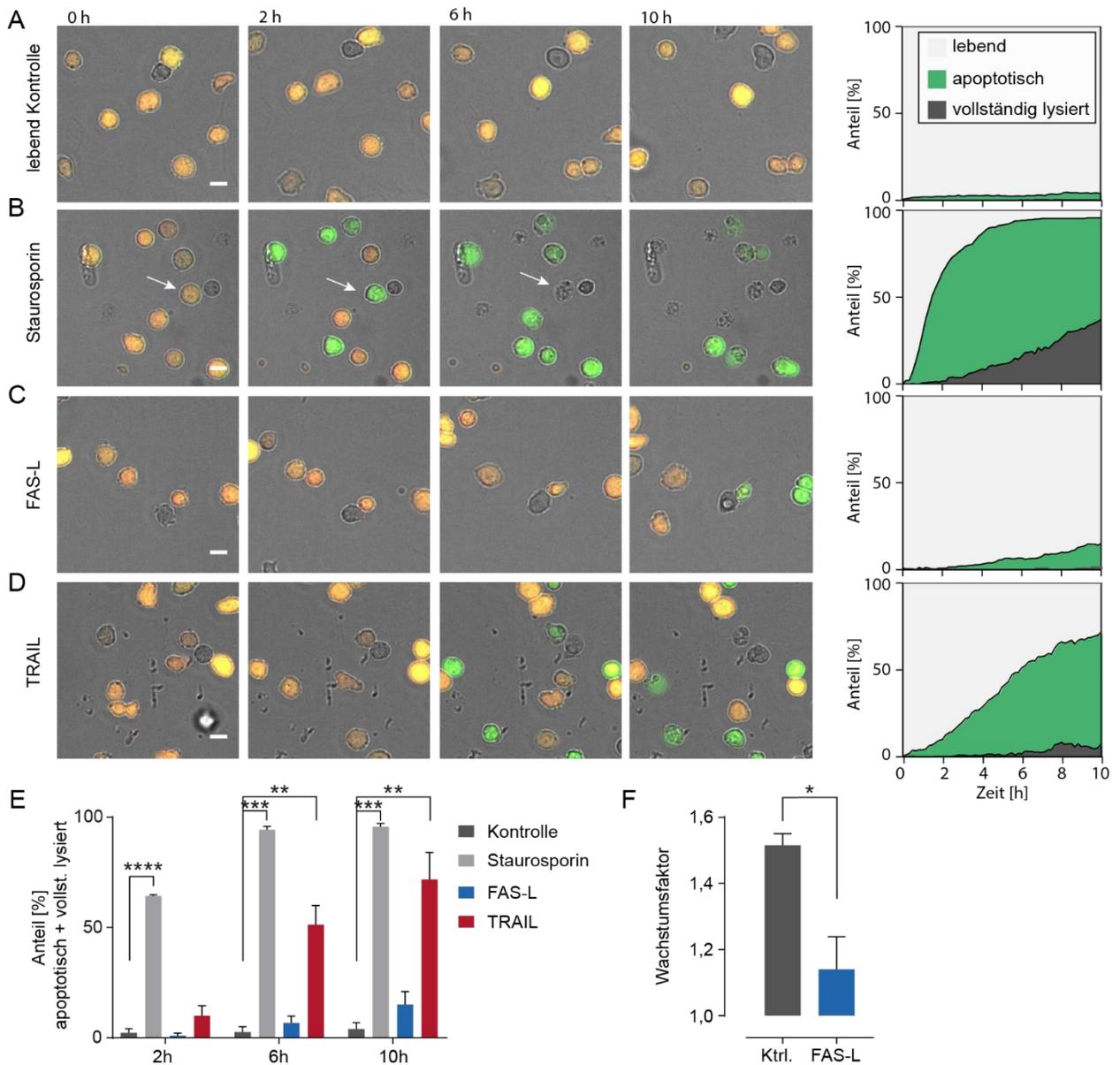


Abbildung 17: Detektion von Apoptosen in NALM-6 pCasp3 Zellen, induziert durch Staurosporin-, TRAIL- und FAS-L. A-D) Aufnahmen der Inkubation von NALM-6 pCasp3 Zellen (n=426 Zellen) (A) mit 20 μ M Staurosporin (n=283 Zellen) (B), 5 μ g/ml Apo1-1 (n=254 Zellen) (C) oder 5 μ g/ml rekombinanten TRAIL (n=405 Zellen) (D) über einen Zeitraum von 10 h im semi-automatisierten Einzelzell-Killing Assay. Die dazugehörigen Zelltod-Plot Diagramme veranschaulichen den Anteil lebender (hellgrau), apoptotischer (grün) und vollständig lysierter (dunkelgrau) Zellen über den Zeitraum von 10 h. Der weiße Pfeil in (B) markiert eine beispielhafte Zelle die zu Beginn der Messung lebt, nach 2 h apoptotisch und nach 6 h sekundär nekrotisch ist. E) Quantifizierung der Summe apoptotischer und vollständig lysierter Zellen zu den Zeitpunkten 2 h, 6 h und 10 h. F) Wachstum unbehandelter Zellen und in Gegenwart von 5 μ g/ml Apo1-1. p-Werte wurden mittels Friedman Test ermittelt. Messbalken= 10 μ m, 1 Spender, Doppelwerte 2 Bereiche pro Well

Der Vergleich der lebenden Kontrolle (Abbildung 17 A) und der Staurosporin-behandelten Bedingung (Abbildung 17 B) bestätigt, dass durch Staurosporin in NALM-6 pCasp3 Zellen Apoptosen induziert werden und diese mit Hilfe des pCasp3-GR FRET-Sensors detektiert und quantifiziert werden können. Nach zwei Stunden Inkubation in Gegenwart von 20 μ M Staurosporin kann bereits bei 64,7% der Zellen eine Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden ($p < 0.0001$) (B und E). Der zytotoxische Effekt des anti-FAS-R Antikörpers ist im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant, nach zehn Stunden sind

Ergebnisse

$15 \pm 5,8\%$ der Zellen apoptotisch (Abbildung 17 C und E). Auch wenn keine direkte Zytotoxizität nachgewiesen werden kann, ist das Zellwachstum unter dem Einfluss des anti-FAS-R Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 17 F). Die Inkubation mit $5 \mu\text{g/ml}$ rekombinatem TRAIL induziert Apoptosen in NALM-6 Zellen, der Anteil apoptotischer Zellen ist nach zwei jedoch noch nicht signifikant erhöht. Nach sechs Stunden sind $51,3 \pm 8,7\%$ der Zellen apoptotisch ($p=0,0011$), dieser Wert steigt nach zehn Stunden auf $71,8 \pm 12,3\%$ an ($p=0,0013$) (Abbildung 17D und E). Die Funktionalität des pCaspaseR-GR FRET-Apoptose-Sensors konnte zum einen durch Staurosporin bestätigt werden, zum anderen wurde die Anfälligkeit von NALM-6 Zellen gegenüber rekombinatem TRAIL funktional bestätigt. Die Inkubation mit löslichem Apo1-1 belegt keine Fas-R-vermittelte Induktion von Apoptosen. Die signifikante Reduktion des Zellwachstums deutet jedoch auf einen FAS-abhängigen zytotoxischen Effekt auf NALM-6 Zellen hin.

3.2.9 SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen benutzen Todesrezeptor-vermittelte Lyse-Mechanismen als langsamen Ersatz für Perforin-vermitteltes Killing

Mit Hilfe des charakterisierten NALM-6 pCaspaseR Zielzellsystems sollte die Zytotoxizität SEA-stimulierter CTLs auch im Einzelzell-Killing Assay analysiert werden. Diese Analyse ermöglicht die Quantifizierung von Apoptosen und Nekrosen. Der bisher verwendete Populations-Killing Assay detektiert entweichendes Calcein nach dem Verlust der Membranintegrität einer nekrotischen Zielzelle. So können ausschließlich nekrotische Zelllysen detektiert werden. Da die Membranintegrität einer apoptotischen Zelle noch intakt ist, wird sie als nicht lysiert detektiert. Die in 3.2.5 beschriebene CMA-induzierte Inhibition der Zielzellyse ist auf das Ausbleiben von schnellen Perforin-vermittelten nekrotischen Lysen zurückzuführen. Es ist jedoch unklar, ob Apoptosen induziert werden, die später zu einer sekundär nekrotischen Lyse führen. Mit Hilfe des automatisierten Einzelzell-Killing Assays wurde überprüft, ob trotz der Inaktivierung von Perforin bisher nicht detektierte Apoptosen induziert werden. Um den Einfluss der apoptotischen Killingmechanismen zu ermitteln, wurde der Effekt von inhibitorischen Antikörpern gegen FAS-L und TRAIL auf den Anteil apoptotischer Zielzellen getestet. Granzym-B kann nach geringer Perforinaktivität Apoptosen induzieren. Um zu überprüfen, ob trotz der CMA-Behandlung eine Restaktivität von Perforin vorliegt, wurde der Granzyme-B Inhibitor z-AAD-CMK verwendet. Sollte diese Restaktivität ausreichen um Granzym-vermittelte Apoptosen auszulösen, müssten diese nach der Behandlung mit z-AAD-CMK verschwinden. Zum Vergleich des Effekts der verschiedenen Bedingungen auf die Zytotoxizität der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen wird die Zielzellyse zu einem frühen Zeitpunkt (2 h), zu einem mittleren Zeitpunkt (4 h) und einem späten Zeitpunkt (8h) betrachtet. Diese Einteilung ermöglicht es, die verschiedenen Mechanismen in ein bestimmtes Wirkungszeitfenster einzuordnen.

CMA inhibiert Nekrosen und verzögert Apoptosen

Die Aufnahmen der Lyse von NALM-6 pCaspaseR Zellen durch SEA-stimulierte CTLs und das Zelltod-Plot Diagramm in Abbildung 18A) zeigen, dass in der unbehandelten Probe (E:T =2:1) bereits nach

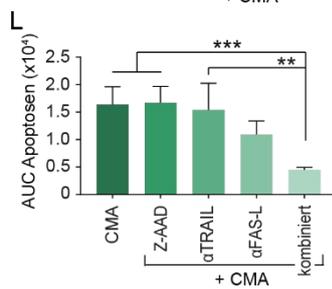
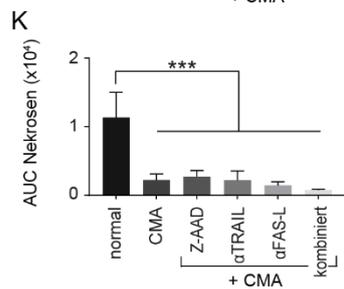
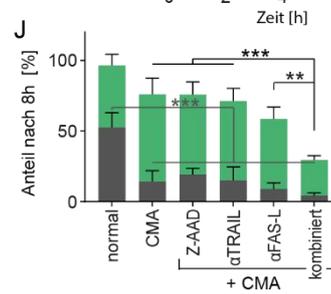
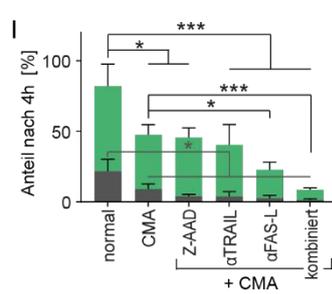
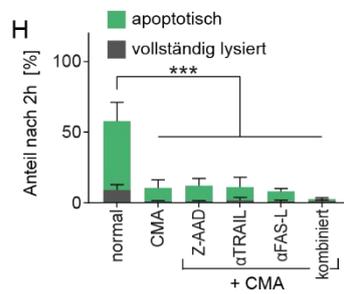
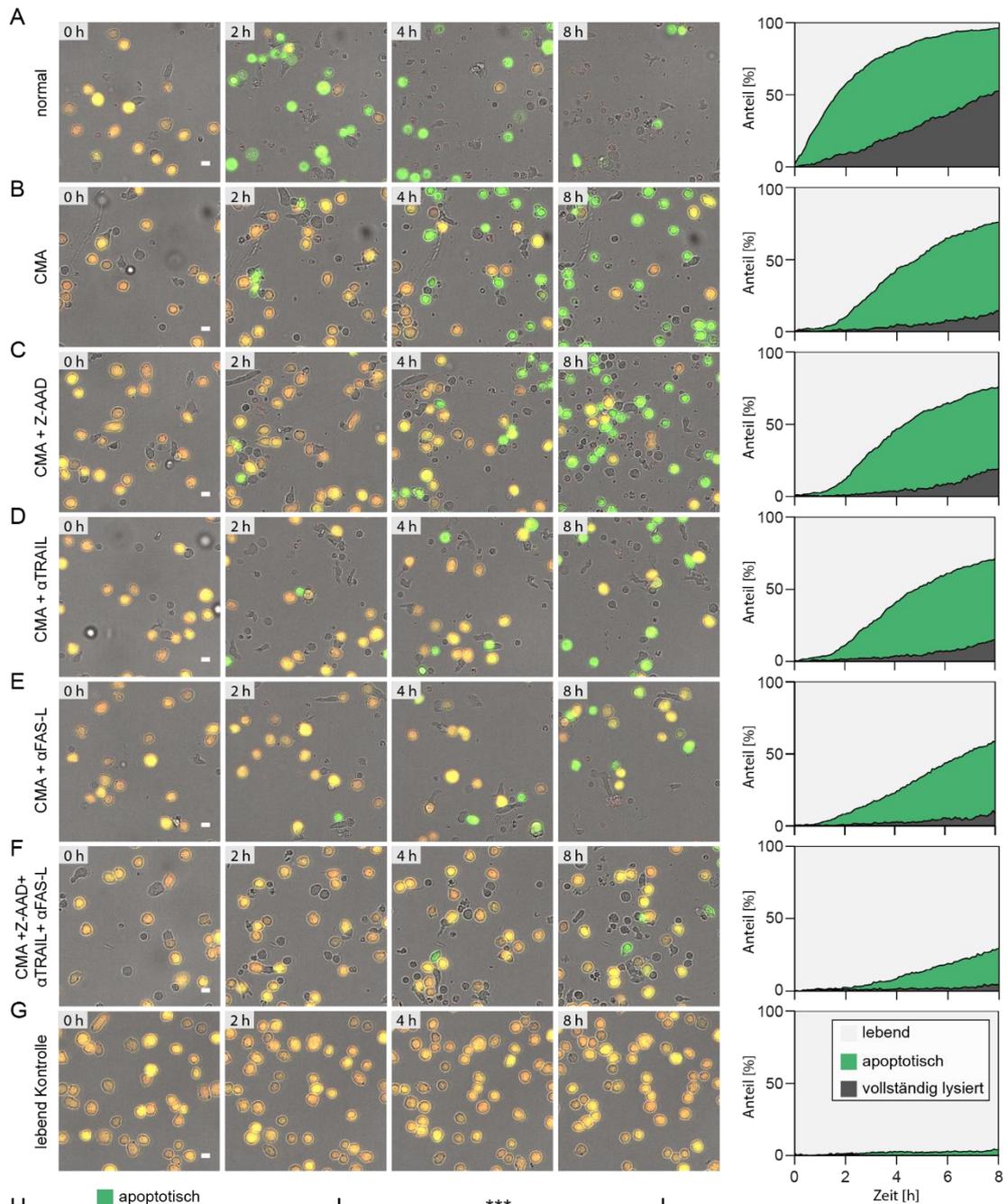
Ergebnisse

zwei Stunden $48,8 \pm 13,2\%$ der Zielzellen apoptotisch und $9 \pm 3,7\%$ nekrotisch sind. In allen anderen Bedingungen (Abbildung 18 B-F) ist die Perforin-vermittelte Lyse durch eine Behandlung mit 50 nM CMA inhibiert. Dadurch ist die Induktion von Apoptosen deutlich verzögert ($H, p < 0,0001$). Trotzdem sind SEA-stimulierte CTLs auch ohne aktives Perforin in der Lage, NALM-6 Zielzellen durch die Induktion von Apoptosen zu lysieren. So ist bereits zwischen dem frühen (2 h) und dem mittleren Zeitpunkt (4 h) ein Anstieg des Anteils apoptotischer Zielzellen zu erkennen (Abbildung 18 B und I). Innerhalb von acht Stunden induzieren CMA-behandelte CTLs in $61,8 \pm 11,6\%$ der Zielzellen Apoptosen, der Anteil an Nekrosen ist durch die CMA-Behandlung jedoch stark verringert (Abbildung 18 J; unbehandelt: $52,5 \pm 10,5\%$; CMA: $14,2 \pm 7,8\%$; $p < 0,0001$). Der Vergleich der $AUC_{(Nekro)}$ (area under the curve) des Anteils nekrotischer Zellen im Verlauf der Messung in Abbildung 18 K) zeigt ebenfalls signifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede zwischen der unbehandelten und den CMA-behandelten Bedingungen. Folglich inhibiert die Behandlung mit CMA Nekrosen und verzögert die Induktion von Apoptosen.

Granzym B ist nach Inaktivierung von Perforin nicht an der Induktion von Apoptosen beteiligt

Um zu überprüfen, ob Granzym B nach der Inaktivierung von Perforin noch an der Induktion von Apoptosen beteiligt ist, wurde der irreversible Granzym B Inhibitor z-AAD-CMK verwendet. Der Vergleich der CMA- (Abbildung 18 B) und CMA+z-AAD-behandelten (Abbildung 18 C) Bedingung zeigt weder nach vier noch nach acht Stunden einen Unterschied ($p_{sh} = 0,942$). Nach vier Stunden sind jeweils etwa 40% der Zielzellen apoptotisch (CMA= $38,6 \pm 7\%$ und CMA + z-AAD= $41,6 \pm 6,9\%$) (Abbildung 18 I), nach acht Stunden etwa 60% (CMA= $61,8 \pm 11,6\%$ und CMA + z-AAD= $56,8 \pm 9\%$) (Abbildung 18 J). Daraus folgt das Granzyme B nach der Inaktivierung von Perforin durch CMA keinen Einfluss auf die Induktion von Apoptosen hat.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 18: Todesrezeptor-vermittelte Lyse-Mechanismen dienen als langsamer Ersatz für Perforin-vermitteltes Killing. A)-G) Semi-automatisierte Analyse des Killings von NALM-6 pCaspase Zellen durch CD8⁺ T-Zellen eines repräsentativen Spenders und Diagramme zur Quantifizierung der Apoptosen und Nekrosen im Verlauf der 8 h Messung (unbehandelt A) in Gegenwart von 50 nM CMA (B) + 20 µM z-AAD-CMK (C), + 20 µg/ml anti-TRAIL (D), + 10 µg/ml anti-FAS-L (NOK-1 und NOK-2 jeweils 10 µg/ml) (E), alle Bedingungen kombiniert (F) oder Zielzellen im Medium aller kombinierten Bedingungen (lebend Kontrolle) (G). Genauere Informationen zur Methodik sind in Abschnitt 2.2.10 zu finden (5 min frames, FRET-GFP-TL). H)-J) Quantifizierung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zielzellen nach 2 h (H), 4 h (I) und 8 h (J). K) Darstellung der AUC (area under the curve) der Kinetik von Nekrosen im Verlauf der 8 h. L) Darstellung der AUC (area under the curve) der Kinetik von Apoptosen im Verlauf der 8 h. Gestapelte Säulendiagramme (H-J) und Säulendiagramme (K und L) zeigen den Mittelwert von Nekrosen (grau) und Apoptosen (grün) ± SD. n=2 Spender, je zwei Ausschnitte analysiert (Mittelwert von Mittelwerten). Auf statistische Signifikanz wurde mittels one-way (AUC) bzw. two-way ANOVA geprüft. Unbehandelt (A) n=916 Zellen; CMA (B) n=1180 Zellen; CMA+z-AAD n=1055 Zellen; CMA+anti-TRAIL (D) n=1508 Zellen; CMA+anti-FAS-L (E) n=1158 Zellen; CMA+ z-AAD+ anti-TRAIL+ anti-FAS-L (F) n=1040 Zellen, CMA+z-AAD+ anti-TRAIL+ anti-FAS-L Zielzell-Kontrolle (G) n=585 Zellen.

Todesrezeptor-vermittelte Lysen zeigen einen kompensatorischen Effekt

Sobald schnelle Perforin-vermittelte Lysen durch die Behandlung mit CMA inhibiert sind, ist es möglich den apoptotischen Effekt der Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen genauer zu untersuchen. Die einzelne Inhibierung von TRAIL (Abbildung 18 D) hat keinen direkten Effekt, während es durch die Inhibierung von FAS-L (Abbildung 18 E) zu einer Reduktion von Apoptosen kommt. Die Blockierung des TRAIL Mechanismus zeigt weder zum frühen (CMA: $9,5 \pm 5,8\%$; CMA+TRAIL: $9,4 \pm 7\%$ Apoptosen), zum mittleren (CMA: $38,6 \pm 7\%$; CMA+TRAIL: $36,5 \pm 14,5\%$ Apoptosen) noch zum späten (CMA: $61,8 \pm 11,6\%$; CMA+TRAIL: $56,3 \pm 9\%$ Apoptosen) Zeitpunkt Unterschiede zur CMA-behandelten Bedingung (Abbildung 18 H-J). In Gegenwart der inhibitorischen anti-FAS-L Antikörper NOK-1 und NOK-2 erscheint die apoptotische Lyse zum mittleren Zeitpunkt gehemmt (E). Nach vier Stunden ist der Anteil an apoptotischen Zellen um 18,5% verringert ($p=0,016$). Zum frühen Zeitpunkt (2 h) (CMA+ anti-FAS-L: $7,3 \pm 2\%$; $p=>0,9999$) und am Ende der Messung nach 8 Stunden (CMA+ anti-FAS-L: $49,7 \pm 8,4\%$) liegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur CMA-behandelten Kontrolle vor. Daher zeichnet sich zwischen zwei Stunden und vier Stunden möglicherweise ein Wirkungszeitfenster für die FAS-L-vermittelte Induktion von Apoptosen ab. Dass die Reduktion der Apoptosen durch die Inhibierung von FAS-L nach acht Stunden nicht mehr signifikant ist, kann verschiedene Gründe haben. Es ist erstens möglich, dass die Wirkung der Antikörper nachlässt und die FAS-L-vermittelte Lyse verzögert stattfindet. Zweitens könnte der verzögerte Anstieg der Apoptosen auch durch die Aktivität von TRAIL verursacht werden und somit ein kompensatorischer Mechanismus zu Grunde liegen. Der Vergleich der Zytotoxizität unter Einfluss von kombiniertem anti-TRAIL, anti-FAS-L, z-AAD und CMA (F) mit der CMA-behandelten Bedingung (B) zeigt eine signifikante Reduktion des Anteils apoptotischer Zielzellen nach vier Stunden auf $7,3 \pm 1,4\%$ ($p<0,0001$) und nach acht Stunden auf $25,3 \pm 3\%$ ($p<0,0001$) (Abbildung 18 F und H-J). Sind beide Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen inhibiert kommt es demnach zu einer signifikanten Reduktion der Apoptosen. Die einzelne Inhibierung von TRAIL (+CMA) (D) zeigt daher hauptsächlich die FAS-L-vermittelte Zytotoxizität. Im Vergleich ist der Anteil apoptotischer Zellen in der kombinierten Bedingung (F nach vier Stunden um 29,2% ($p<0,0001$) und nach acht Stunden um 31% ($p<0,0001$) reduziert. Folglich ist eine deutliche FAS-L-vermittelte Zytotoxizität zu sehen. Die einzelne Inhibierung von FAS-L (E)

Ergebnisse

lässt demnach auf den Einfluss TRAIL-vermittelter Lysen schließen. Der Unterschied zwischen der kombinierten Bedingung (F) und der einfachen Inhibierung von FAS-L (E) ist erst nach acht Stunden signifikant. In der kombinierten Bedingung sind 24,3% weniger Apoptosen detektierbar ($p=0,0013$). Folglich induzieren SEA-stimulierte-CTLs auch mittels TRAIL Apoptosen, wenn zusätzlich zu Perforin auch der FAS-L Mechanismus blockiert ist. Diese Kompensation erfolgt jedoch verzögert (keine Signifikanz nach vier Stunden, aber nach acht Stunden, wenn TRAIL ebenfalls blockiert ist). Die CMA+FAS-L Bedingung (E) zeigt daher eine für TRAIL-vermittelte Zytotoxizität typische Lyse-Kinetik. Umgekehrt zeigt die CMA+ anti-TRAIL Bedingung (D) eine für FAS-L typische Lyse-Kinetik. Demnach ist ein Großteil der Apoptosen nach Inaktivierung von Perforin durch FAS-L-vermittelte Zytotoxizität induziert. TRAIL-induzierte Apoptosen machen nur einen kleineren Anteil aus und finden im Vergleich zu FAS-L leicht verzögert statt.

Der Vergleich der $AUC_{(Apo)}$, (AUC des Anteils apoptotischer Zellen) kombiniert den Anteil als auch den zeitlichen Faktor in einem Wert. Auch diese Darstellung veranschaulicht den beschriebenen Effekt nach dem gleichen Muster (Abbildung 18 L). Die Behandlung mit anti-TRAIL+CMA oder anti-FAS-L+CMA hat keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur CMA-behandelten Kontrolle. Werden beide Mechanismen gemeinsam inhibiert, ist die $AUC_{(Apo)}$ in der kombinierten Bedingung im Vergleich zur CMA-behandelten Kontrolle signifikant reduziert ($p=0,0006$). Vergleicht man die inhibierte Lyse der kombinierten Bedingung mit den einzelnen Behandlungen, ist der Unterschied zu anti-TRAIL+CMA signifikant ($p=0,0015$). Zu anti-FAS-L+CMA liegt jedoch kein signifikanter Unterschied vor ($p=0,678$). Diese Beobachtung verdeutlicht ebenfalls, dass FAS-L-vermittelten Lysen eine größere Bedeutung zukommt.

Zusammenfassend können SEA-stimulierte CTLs auch ohne funktionelles Perforin Zielzellen lysieren. Die Induktion der Apoptosen tritt dabei um zwei Stunden verzögert auf, nach acht Stunden sind trotzdem etwa 60% der Zielzellen apoptotisch. Der Anteil vollständig lysierter, nekrotischer Zielzellen ist jedoch stark reduziert, weshalb es nicht möglich ist, die verbleibende langsamere apoptotische Zytotoxizität im Populations-Killing Assay nachzuweisen. Durch die Verwendung des Granzym B Inhibitors z-AAD-CMK konnte gezeigt werden, dass die Behandlung auch Perforin+Granzym B-vermittelte sekundäre Nekrosen inhibiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl der FAS-vermittelte als auch der TRAIL-vermittelte Mechanismus an der Induktion von Apoptosen beteiligt sind und beide Mechanismen in der Lage sind, einen Ausfall des anderen teilweise zu kompensieren. Die untersuchten zytotoxischen Mechanismen können durch die Einteilung in frühe, mittlere und späte Wirkungszeitfenster nach ihrer „Geschwindigkeit“ eingeteilt werden. Die Perforin-vermittelte Lyse findet innerhalb der ersten zwei Stunden statt. FAS-L ist vermutlich etwa nach zwei Stunden, TRAIL nach etwa vier Stunden aktiv. Nimmt man eine Rangeinordnung nach der Bedeutung der Mechanismen vor, entspricht diese der Geschwindigkeit: 1. Perforin induzierte primäre Nekrosen & Perforin/Granzym B induzierte Apoptosen, 2. FAS-L induzierte Apoptosen, 3. TRAIL induzierte Apoptosen.

3.3 Isolation von CD8⁺ T-Zell-Subtypen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass SEA-stimulierte CTLs durch SEA-beladene, MHC-II⁺ Zielzellen aktiviert werden und diese durch die Verwendung von Perforin-vermittelten und Topdesrezeptor-vermittelten Mechanismen lysieren können. Die SEA-stimulierte CTL-Population setzt sich aus den Subtypen T_{CM}, T_{EM} und T_N zusammen. Bei der durchflusszytometrischen deskriptiven Untersuchung war es möglich, die Verfügbarkeit von Effektormolekülen bereits für die einzelnen Subtypen zu bestimmen. Die funktionale Charakterisierung im Calcein-basierten Populations-Killing Assay und im pCaspaseR-basierten Einzelzell-Killing Assay konnte nur für die gesamte CTL Mischpopulation durchgeführt werden. Das zytotoxische Potential einzelner Subpopulation in diesen Killing-Assays ist somit noch nicht beschrieben.

Eine genaue Analyse der Zytotoxizität von CD8⁺ Subtypen ist nur durch die Isolation dieser möglich. In vorläufigen Experimenten wurden im Zeitraum dieser Arbeit Subtypen durch die Verwendung CCR7 und CD45RA gekoppelter Beads immun-magnetisch angereichert oder depletiert. In diesen Experimenten konnte ein erhöhtes zytotoxisches Potential von Effektor-Subtypen im Populations-Killing-Assay gezeigt werden (siehe Anhang, Poster: Defining highly cytotoxic CD8⁺ T cell subsets by flow cytometry and a real-time cytotoxicity assay).

Eine effizientere und reinere Methode zur Isolation von CD8⁺ Subtypen ist das durchflusszytometrische Sortieren. Abbildung 19 zeigt den schematischen Ablauf der Expansion und der anschließenden Isolationsschritte. Nach einer Positivisolation SEA-stimulierter CTLs, wird diese Population durchflusszytometrisch sortiert und innerhalb von 48 Stunden in verschiedenen Assays untersucht. So soll die Verfügbarkeit an Effektormolekülen auch auf mRNA-Ebene beschrieben werden, der Perforingehalt zum Zeitpunkt der funktionellen Analyse erneut bestimmt werden und die Verwendung der verschiedenen Killingmechanismen funktional in Killing Assays beschrieben werden. Die Entwicklung des Einzelzell Assays ermöglicht dabei eine detaillierte Analyse der Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM}. Der Subtypen-spezifische Nachweis von Effektormolekülen im Überstand nach der Lyse von Zielzellen ergänzt dabei die funktionelle Analyse und beschreibt zusätzliche Effektormoleküle, wie TNF- α , IFN- γ oder die lösliche Form des FAS-L.

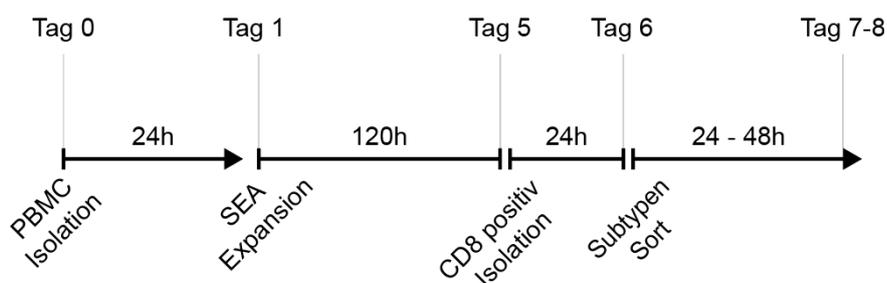


Abbildung 19: Schema der Generierung und Isolation von CD8⁺ T_{EM} und T_{CM} Subtypen

3.4 Durchflusszytometrische Sortierung von T_{EM} und T_{CM} aus der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zell-Population

Die funktionelle Charakterisierung von CD8⁺ T-Zell-Subtypen erfordert die Isolation von Zellen der jeweiligen Subpopulation. Bei der Verwendung vieler weiterführender Methoden, wie qPCR, CBA oder Killing Assays ist es nicht möglich, einzelne Zellen der CD8⁺ T-Zell-Population einem bestimmten Subtyp zuzuordnen. Um das zytotoxische Potential der einzelnen Subtypen funktional untersuchen zu können, wurden die T_{EM} und die T_{CM}-Subpopulation durchflusszytometrisch aus der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zell-Population sortiert. Abbildung 20 A-C) zeigt die Gating-Strategie zur Isolation von T_{EM} und T_{CM} Zellen (A und B), sowie zur Kontrolle der Reinheit nach einer Sortierung (C). T_{EM} (CD45RO⁺/CD62L⁻) und T_{CM} (CD45RO⁺/CD62L⁺) werden durch die Expression des Homing-Rezeptors CD62L voneinander unterschieden (Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, 1999). Obwohl beide Subpopulationen ein homogenes Zentrum zeigen, ist der Übergang zwischen den Populationen fließend. Um die Reinheit der sortierten Populationen zu optimieren, wurden die Gates weit voneinander entfernt platziert. Der Erfolg eines FACS-Experiments wird anhand verschiedener Parameter beurteilt (BD Biosciences Europe, 2012). Entscheidend für eine erfolgreiche Sortierung sind die Reinheit, die Vitalität und die relative Ausbeute. Diese Faktoren sind von der Qualität des Ausgangsmaterials und einer Optimierung der Abläufe vor, während und nach der Sortierung abhängig. Abbildung 20 D) zeigt die Reinheit der isolierten Subtypen. T_{EM} erreichen eine Reinheit von $87,7 \pm 7,5\%$, T_{CM} von $90,9 \pm 6\%$. Anhand der Recovery- oder Erholungsrate wird bestimmt, wie groß der Anteil der sortierten Zellen ist, die nach dem Sortieren in Kultur überführt werden können. Zellen, die während des Sortierungsvorgangs oder im Auffanggefäß sterben, gelten dabei als Verlust. Durchschnittlich können $82 \pm 9,5\%$ der sortierten T_{EM} und $92,7 \pm 10,6\%$ der sortierten T_{CM} in Kultur überführt werden. Die prozentuale Ausbeute vergleicht den Anteil der Zielpopulation in der unsortierten Probe mit der tatsächlichen Ausbeute nach dem Sortieren. Die Bestimmung der Ausbeute erfordert eine zusätzliche Zählung der Zellen unmittelbar vor und nach dem Sortieren. Dieser zusätzliche Schritt wurde in dieser Arbeit nur bei fünf bzw. vier Spendern durchgeführt. Die Ausbeute zeigt eine große Streuung für die verschiedenen Sortierungen, durchschnittlich liegt diese für T_{EM} bei $75,6 \pm 16,4\%$ und für T_{CM} bei $69 \pm 27,3\%$.

Ergebnisse

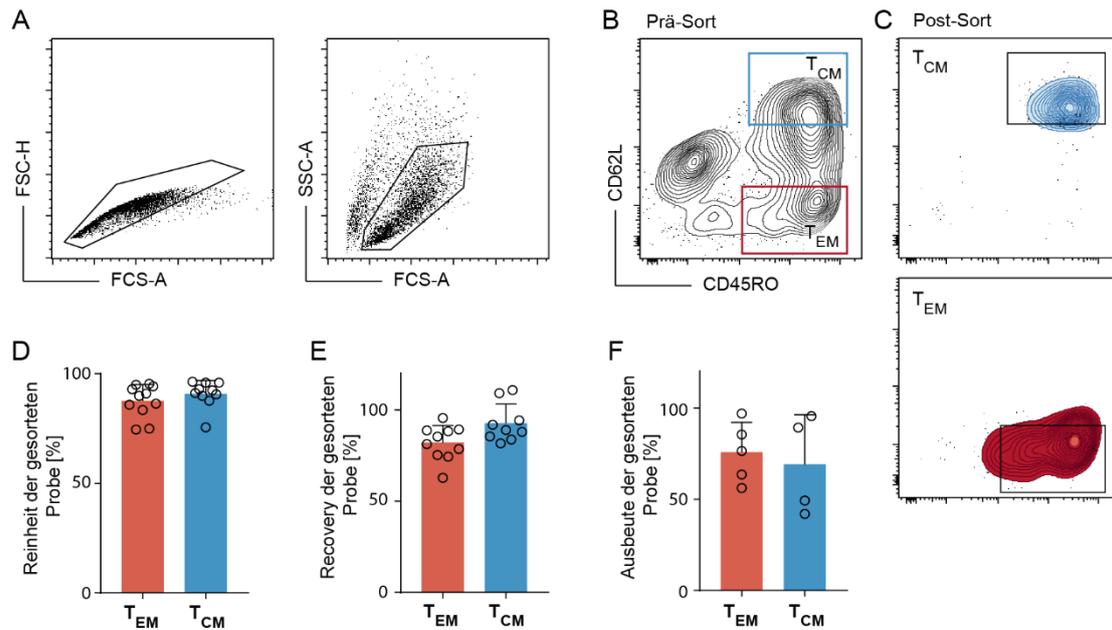


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Sortierung von T_{EM} und T_{CM} aus SEA-stimulierten $CD8^+$ T-Zellen. A) Darstellung der Gatingstrategie zum Ausschluss von Dubletten und toten Zellen mittels FSC und SSC anhand eines repräsentativen Spenders. B) Unterteilung der $CD8^+$ T-Zell-Population in T_{CM} ($CD45RO^+/CD62L^+$) und T_{EM} ($CD45RO^+/CD62L^-$) durch die veranschaulichten Sort-Gates. C) Darstellung der sortierten T_{CM} und T_{EM} -Subpopulationen. Darstellung der Reinheit (D), Recovery (Erholungsrate) (E) oder Ausbeute (F) von durchflusszytometrisch sortierten T_{CM} und T_{EM} Zellen. $n=4-11$ Spender, Säulendiagramme zeigen Mittelwerte \pm SD. p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

Das Protokoll zur Expansion und die etablierte Isolation durchflusszytometrischer Sortierung erzeugen reine und vitale Populationen an T_{EM} und T_{CM} . Im Folgenden ist die funktionale Charakterisierung dieser Subpopulationen dargestellt.

3.5 Calciumsignale der $CD8^+$ Subtypen T_{EM} und T_{CM}

In Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Expression von STIM und Orai durch $CD8^+$ Memory Subtypen mittels qRT-PCR untersucht und durch Calcium-Imaging die Calciumsignale dieser Subtypen nach der TG-Induzierten Speichorentleerung analysiert.

Nach der Bindung eines spezifischen Antigens an den TCR muss das Antigen-Signal von der Zelloberfläche zum Nukleus übertragen werden. Für diese Signaltransduktion ist der „Second-Messenger“ Calcium in Lymphozyten entscheidend für eine effiziente Immunantwort (Trebak and Kinet, 2019). Calciumsignale entstehen durch den Einstrom von Calcium in das Zytosol. Durch die Calcium-Pumpen in Plasmamembran (PMCA) und ER-Membran (SERCA) wird ein massives Konzentrationsgefälle zwischen Zytosol (50-100 nM) und Extrazellularraum (1-2 mM) beziehungsweise ER (300 μ M - 1 mM) erzeugt. Dieser ungefähr zehntausendfache Konzentrationsunterschied ermöglicht schnelle und direkte Calciumantworten. Die Aktivierung einer T-Zelle über den TCR löst eine Calcium-Signalkaskade aus. Durch die Aktivierung der Phospholipase C PLC γ 1 wird membranständiges PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in IP3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) gespalten. Durch die Bindung von IP3 an den IP3-Rezeptor des ER löst IP3 die

Ergebnisse

Ausschüttung von Calcium aus dem ER ins Zytosol aus. Dieser kurzfristige aus dem ER gespeiste Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration führt zu einem Calciumeinstrom durch die Plasmamembran. Dieser Mechanismus wird als speichergesteuerter Calciumeinstrom (SOCE; store operated calcium entry) bezeichnet und ermöglicht zum einen die Aufrechterhaltung eines Calciumeinstroms über einen längeren Zeitraum und zum anderen das Wiederauffüllen der Calciumspeicher der Zelle. Für diesen Einstrom durch die Plasmamembran ist der CRAC-Kanal (calcium release activated calcium) Orai verantwortlich. Durch die IP₃ induzierte Speicherentleerung des ERs kommt es zur Konformationsänderung und Oligomerisierung von STIM (stromal interaction molecule) Proteinen in der ER-Membran. Oligomerisierte STIMs binden an plasmamembran-ständiges Orai und lösen SOCE aus. SOCE ist von entscheidender Bedeutung für die T-Zell-vermittelte Immunantwort. In Abhängigkeit von Antigen-Affinität, Antigenpräsentation, Aktivierungsstatus und kostimulatorischen Signalen kommt es bei der TCR-Bindung zu unterschiedlichen kurzen, oszillierenden oder langfristigen Calciumsignalen. Ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration kann die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B aktivieren. Auf diese Weise beeinflussen Calcium-Signale sowohl die Aktivierung und Differenzierung als auch, durch direkte Signale, die Freisetzung von Perforin oder Zytokinen und die Oberflächen-Expression von Todesrezeptoren.

Die durchflusszytometrische Separation von T_{EM} und T_{CM} ermöglicht die Analyse einzelner Subtypen mit Hilfe unterschiedlicher physiologischer Methoden. Neben der Zytotoxizität wurden daher auch die Calciumsignale von CD8⁺ T-Zell-Subtypen untersucht. In dieser Arbeit wurde versucht die Calciumsignale einer T-Zelle während der Zielzellyse zu analysieren um beispielsweise zu untersuchen, ob ein starkes oder schwaches Calciumsignal einer bestimmten Zellart zugeordnet werden kann und ob T_{EM} und T_{CM} unterschiedliche Calciumsignale zeigen. Aufgrund der hohen Foto-Toxizität bei FURA-2 Messungen war dies jedoch nur in kurzen Zeiträumen von unter einer Stunde möglich, wodurch eine entsprechende Analyse der Calciumsignale parallel zur Zielzellyse im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar war.

Um zu überprüfen ob T_{EM} und T_{CM} Unterschiede im SOCE zeigen, wurde mit Hilfe des SERCA Inhibitors Thapsigargin eine passive Speicherentleerung ausgelöst und im Anschluss der Calciumeinstrom durch geöffnete Orai-Kanäle analysiert. In Abbildung 21 sind die SOCE-Profile von T_{EM}, T_{CM} und der SEA-stimulierten Kontrolle dargestellt und die Einstromrate, der Calcium-Peak und das Calcium-Plateau quantifiziert. Die SOCE Profile von T_{EM} und T_{CM} unterscheiden sich in allen untersuchten Parametern signifikant. So ist die Einstromrate gegenüber der SEA-stimulierten Kontrolle bei T_{CM} auf 123% erhöht und bei T_{EM} auf 53% verringert. Nach der Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin zeigen T_{CM} den höchsten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (112%). Im Gegensatz dazu ist der Anstieg des zytosolischen Calciums in T_{EM} auf 70% reduziert. Das Calciumplateau ist in T_{EM} ebenfalls auf 73% der Kontrolle reduziert, während die Plateau-Konzentration

Ergebnisse

in T_{CM} erhöht ist. Zusammenfassend zeigt sich ein erhöhtes speichergesteuertes Calcium-Signal für T_{CM} und ein reduziertes für T_{EM} .

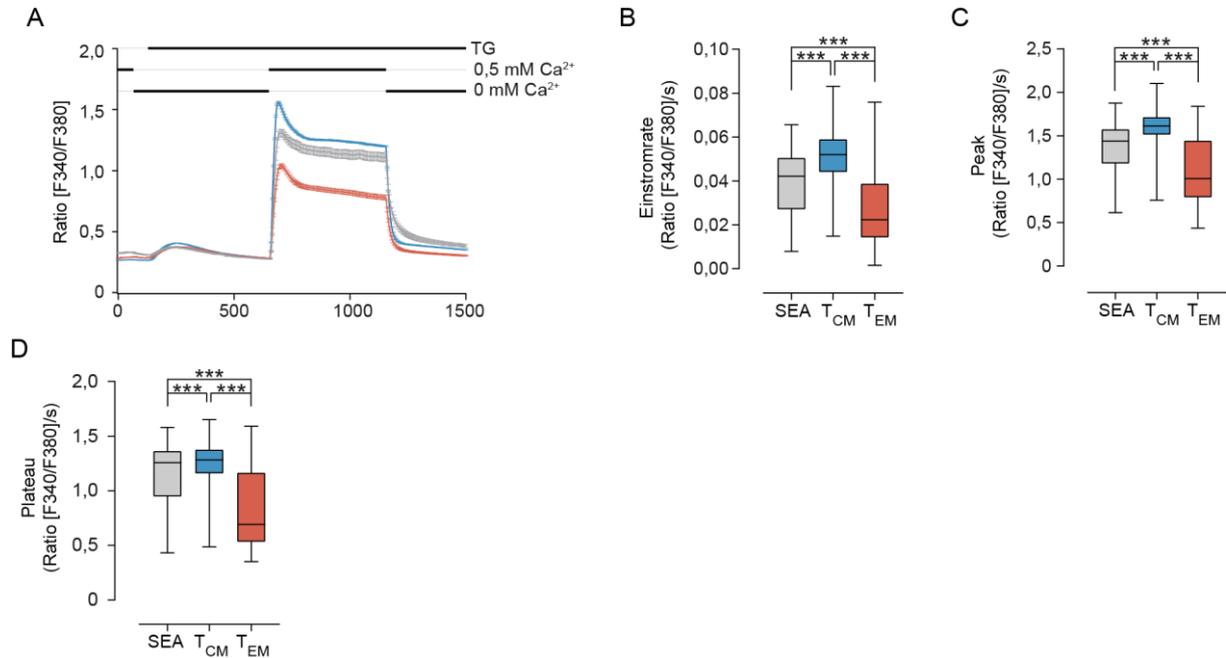


Abbildung 21: Calcium-Signale in CD8⁺ T-Zell-Subtypen. Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels FURA-2 AM zur Analyse des speichergesteuerten Calcium-Eintritts (SOCE) von sortierten T_{CM} und T_{EM} . Schwarze Linien in A) zeigen die Applikation von 0 mM Ca^{2+} -Lösung, 0,5 mM Ca^{2+} -Lösung und Thapsigargin (TG; 1 μ g/ml). Die rote (T_{EM}), blaue (T_{CM}) und graue (SEA) Linie zeigen den mittleren zeitlichen Verlauf der Ratio (F340/F380). Die Quantifizierung der daraus bestimmten Einstromrate (B), des Calcium-Peaks (C) und des Calcium-Plateaus (D) ist in Whisker-Box-Plot Diagrammen (Min-Max, Median- 25-75% Interquartilsabstand; Median) dargestellt. Auf statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA geprüft. SEA n=3 Spender, 441 Zellen; T_{EM} n=4 Spender, 603 Zellen; T_{CM} n=3 Spender, 970 Zellen

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede im speichergesteuerten Calciumeinstrom zwischen T_{EM} und T_{CM} durch Unterschiede in Expressionsleveln der SOCE-Gene erklärt werden können, wurde die Expression der STIM und Orai Isoformen auf mRNA-Ebene analysiert.

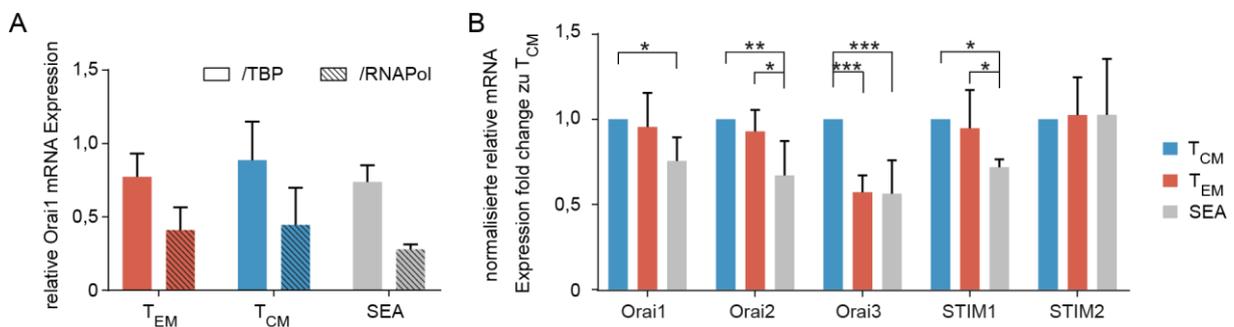


Abbildung 22: Expression von Stim und Orai auf mRNA-Ebene in Subtypen von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Mittels qPCR wurde die Expression auf mRNA-Ebene von Orai1-3, Stim1 und Stim2 in T_{EM} , T_{CM} Zellen sowie der SEA stimulierten Kontrollpopulation 48 h nach dem Sort bestimmt. In A) ist die relative mRNA-Expression von Orai1 exemplarisch dargestellt, um das gleichbleibende Verhältnis bei der Normierung auf eines der Referenzgene (TBP oder RNAPol) zu veranschaulichen. B) Auf T_{CM} normalisierte relative mRNA-Expression von Orai1-3 sowie Stim1 und Stim2. Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SD. p-Werte wurden mittels one-way ANOVA bestimmt. T_{EM} und T_{CM} n=4 Spender, SEA n=2 Spender (die RNA-Isolation und die qPCR wurden von Gertrud Schwär durchgeführt).

Ergebnisse

Die Expression der SOCE-Gene Stim1 und Stim2 sowie Orai1, 2 und 3 unterscheidet sich im direkten Vergleich von T_{EM} und T_{CM} lediglich für die Isoform Orai3 (Abbildung 22). Die Expression in T_{EM} ist gegenüber T_{CM} auf 57% reduziert (B). Beide Subtypen zeigen jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich zur SEA-Kontrolle. Aus den erhobenen Daten lassen sich ohne weitere Experimente noch keine präzisen Aussagen zur Ursache der unterschiedlichen Calcium-Profile von T_{EM} und T_{CM} machen. Eine Analyse der Expression der Calcium-Pumpen, sowie der mitochondrialen Calciumspeicher wäre hier sinnvoll. Ebenso sollte eine Untersuchung der Calciumsignale nach einem physiologischen Stimulus fortgesetzt werden. Die Analyse der Calciumsignale in den ersten 45 Minuten während der Zielzellyse, sowie Calcium-Imaging mit nicht-stimulierten Zellen und einem physiologischen Stimulus (anti-CD3/anti-CD28) deuten darauf hin, dass der TG-vermittelte Calciumeinstrom keine physiologischen Calciumsignale widerspiegelt. Eine Analyse mit Hilfe eines alternativen Calcium-Sensors wie Fura Red wäre sinnvoll (mit NK-Zellen getestet in der Masterarbeit von Lea Kaschek), um die Calcium-Profile von T-Zell-Subtypen nach einem physiologischen Stimulus in einem Einzelzell-Killing Assay zu analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Calcium-Abhängigkeit der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dazu wurde die Proliferation nach einem Stimulus durch anti-CD3/anti-CD28 unter Bedingungen mit einer erhöhten oder limitierten Konzentration von externem Calcium untersucht. Die Ergebnisse des CellTiter Blue Viabilitäts Assays (Abbildung 23) zeigen, dass die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen mit steigender Calciumkonzentration zunimmt, aber nicht wie die Zytotoxizität in einem bestimmten Konzentrations-Bereich (23 - 625 µM) ein Optimum aufweist (Zhou *et al.*, 2018).

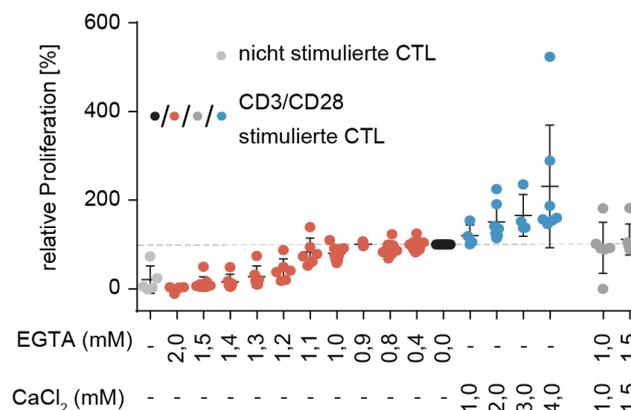


Abbildung 23: Die Calcium-abhängige Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. Die Proliferation von CD3/CD28 Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zellen wurde nach 72 h mit Hilfe eines CellTiterBlue-Assays bestimmt. Die Proliferation wurde mit EGTA (rot) oder CaCl₂ (blau) manipuliert. Nicht-behandelte Kontrollen (schwarz) wurden als 100% festgelegt. Punkte stellen Einzelwerte dar, Striche zeigen den Mittelwert ± SD von 2-9 Spendern.

3.6 Zytotoxizität von isolierten Subpopulationen

3.6.1 Die Subpopulation T_{EM} verfügt über ein gesteigertes zytotoxisches Potential

Die Auftrennung der CTL-Population in einzelne Subtypen ermöglicht die Analyse der Subtypenspezifischen Zytotoxizität. Die in 3.2 dargestellten Untersuchungen lassen bereits vermuten, dass T_{EM} ihre Zielzellen effizienter lysieren als T_{CM}. T_{CM}-Zellen bilden mit einem Anteil von etwa 65% in der SEA-stimulierten Population den dominierenden Subtyp. Es ist unklar, wie sich das zytotoxische Potential nach einer Anreicherung von T_{EM} verhält oder inwiefern die Lyse-Kinetik einer reinen T_{CM} Population verändert ist. Dies wurde 24 Stunden nach der Sortierung von T_{EM}, T_{CM} und T_N in einem Populations-Killing Assay untersucht. In Abbildung 24 A) ist zu erkennen, dass von T_N keine Zytotoxizität ausgeht. T_{EM} Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrollpopulation (SEA) oder zu T_{CM} und zu T_N eine gesteigerte Zytotoxizität. Diese zeigt sich durch eine gegenüber der SEA-Kontrolle um 30% gesteigerte relative Endpunktllyse (131%), sowie die signifikant beschleunigte Zielzelllyse innerhalb der ersten 120 Minuten (Abbildung 24 C und D). Die Maximale Killingrate (B) von T_{EM} ist im Vergleich zu T_{CM} verdreifacht (Mittelwert ± SD; T_{EM} 14,58 ± 6,68%; T_{CM} 5,35 ± 1,46%; T_{SEA} 8,25 ± 2,44%). Die T_{EM}-vermittelte Lyse ist somit vorallem innerhalb der ersten zwei Stunden effizienter. In der zweiten Hälfte des vierstündigen Assays zeigen T_{EM}, T_{CM} und die nicht sortierte Kontrollpopulation eine vergleichbare Effizienz (Abbildung 24E).

Da der in diesem Experiment verwendete Calcein-basierte Killing Assay die Lyse der Zielzelle nur detektieren kann, wenn die Membranintegrität dieser verloren geht und das Calcein aus der Zielzelle in den Überstand entweicht, ist davon auszugehen, dass apoptotische Zellen in diesem Assay nicht erkannt werden (siehe 3.2.5 und 3.2.9). Eine präzise Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischem Zellen ist daher nötig, um auch das genaue zytotoxische Potential nicht nekrotischer Lyse-Mechanismen bestimmen zu können.

Ergebnisse

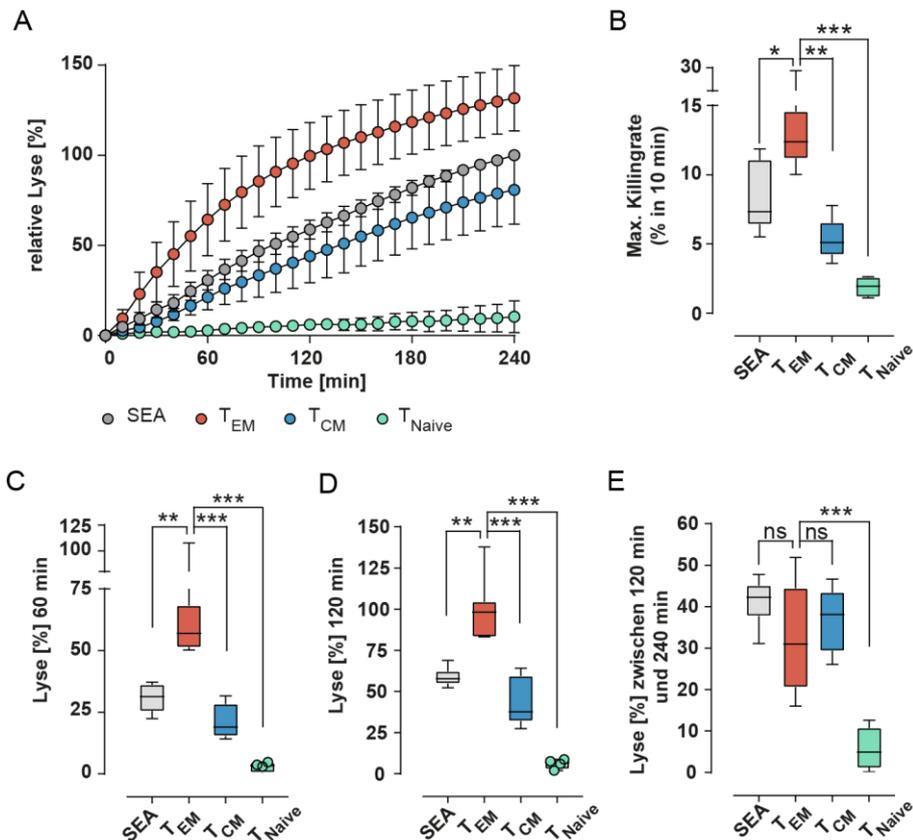


Abbildung 24: SEA-stimulierte CD8⁺ T_{EM} zeigen ein gesteigertes zytotoxisches Potential. A) Real-time Killing Kinetik der Lyse von Raji Zellen durch SEA-stimulierte, sortierte CD8⁺ T_{EM}, T_{CM}, T_N und die SEA-Kontrollpopulation (E:T 10:1). B) Darstellung der maximalen Killingrate (prozentuale Lyse pro 10 Minuten Intervall). C) Prozentuale Lyse nach 1 h und nach 2 h (D). E) zeigt den Anteil der Zielzellen, die in der zweiten Hälfte des Assays (120 min-240 min) lysiert wurden. Die Kinetik in A) zeigt auf die SEA-Kontrolle normierte Mittelwerte ± SD, Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, Median- 25-75% Interquartilsabstand dar. p-Werte wurden mit einer one-way ANOVA ermittelt. SEA n=9, T_{EM} n=8, T_{CM} n=7, T_N n=4

Sowohl isolierte T_{EM} als auch isolierte T_{CM} sind somit in der Lage Zielzellen zu lysieren. Das zytotoxische Potential von T_{EM} ist im Vergleich zu T_{CM} und zur nicht sortierten Kontrollpopulation aber deutlich gesteigert. Im Einklang damit ist das zytotoxische Potential von T_{CM} auch geringer als das der nicht sortierten Mischpopulation. In einer SEA-stimulierten CTL Mischpopulation sollte der Anteil an T_{EM} daher starken Einfluss auf die Zytotoxizität haben. Um das gesteigerte zytotoxische Potential von T_{EM} innerhalb der ersten zwei Stunden einem bestimmten Mechanismus zuordnen zu können wird auf molekularer Ebene anhand gesorteter Zellen die Expression von Effektormolekülen weiter untersucht. Darüberhinaus liefert der Populations-Killing Assay keine direkte Information über den Anteil apoptotischer Zellen. Die Induktion von langsamen Apoptosen könnte für T_{CM}-vermittelte Zytotoxizität von besonderer Bedeutung sein.

3.6.2 Die Expression von Effektormolekülen auf mRNA-Ebene ist in T_{EM} erhöht

Eine kombinierte Analyse der Expression von Effektormolekülen auf mRNA- und Protein-Ebene sowie der anschließende funktionelle Nachweis bestimmter Mechanismen in einem Killingexperiment ermöglichen es, den jeweiligen Subtypen bevorzugte Lysemachanismen zuzuordnen und geben

Ergebnisse

Rückschlüsse auf die Kinetik eines solchen Mechanismus. Neben der funktionellen Analyse von Effektormechanismen und der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Proteinexpression wurde mittels qRT-PCR die Expressionsstärke von den Effektormolekülen TNF- α , IFN- γ , Perforin, Granzyme B, FAS-L und TRAIL auf mRNA-Ebene in sortierten Subtypen quantifiziert. So sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Expression von Effektormolekülen auf mRNA-Ebene zwischen isolierten T_{EM} und T_{CM} gibt und ob bestimmte Mechanismen in einem Subtyp bevorzugt verwendet werden, um Zielzellen zu lysieren.

Die relative Expression der Effektormoleküle wurde im Vergleich zu den Referenzgenen TBP oder RNAPol in gesorteten T_{EM}, T_{CM} und einer Kontrollpopulation von nicht gesorteten SEA-stimulierten Zellen bestimmt. In Abbildung 25 A) ist anhand der relativen mRNA-Expression von TRAIL beispielhaft dargestellt, dass beide Referenzgene vergleichbare Tendenzen in allen untersuchten Proben liefern. Diese Beobachtung trifft für alle untersuchten Effektormoleküle zu. Abbildung 25 B zeigt die normierte relative mRNA Expression im Vergleich zur T_{CM} Population. Die Effektormoleküle TNF- α (3,6 fach, ns), IFN- γ (86,2 fach, p=0,013), Perforin (2,66 fach, p=0,0024), Granzyme B (16,5 fach, p=0,041) und FAS-L (4,98 fach, p=0,0001) sind auf mRNA Ebene in T_{EM} um ein Vielfaches stärker exprimiert als in T_{CM}. Die Quantifizierung der relativen mRNA von TRAIL zeigt als einziges Effektormolekül keine Unterschiede zwischen T_{CM}, T_{EM} und der SEA-stimulierten Kontrollpopulation. Im Gegensatz zu den anderen Effektormolekülen wird TRAIL auf mRNA-Ebene in T_{EM} und T_{CM} gleich stark exprimiert und steht somit erwartungsgemäß beiden CD8⁺ Subtypen in gleichem Maße zur Verfügung. Die Expression aller anderen Effektormoleküle ist auf mRNA-Ebene in T_{EM} signifikant höher als in T_{CM}.

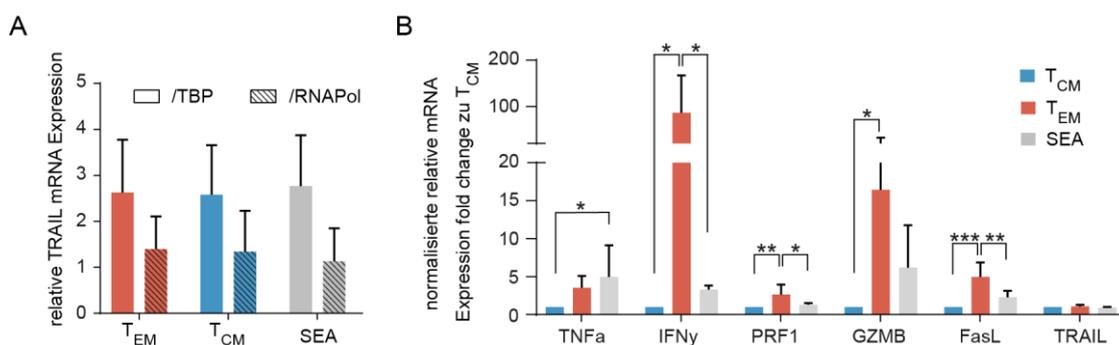


Abbildung 25: Subtypenabhängige Expression von Effektormolekülen auf mRNA-Ebene in SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Mittels qPCR wurde die mRNA-Expression von TNF- α , IFN- γ , PRF1, GZMB, FAS-L und TRAIL in T_{EM}, T_{CM} Zellen sowie der SEA stimulierten Kontrollpopulation 48 h nach dem Sort bestimmt. In A) ist die relative mRNA-Expression von ORA1 exemplarisch dargestellt um das gleichbleibende Verhältnis bei der Normierung auf eines der Referenzgene (TBP oder RNAPol) zu veranschaulichen. B) Auf T_{CM} normalisierte relative mRNA Expression der Effektormoleküle. Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SD. p-Werte wurden mittels eines Kruskal-Wallis-Tests bestimmt. T_{EM} und T_{CM} n=4 Spender, SEA n=2 Spender (die RNA-Isolation und die qPCR wurden von Gertrud Schwär durchgeführt).

3.6.3 Nachweis von Effektorproteinen nach der Zielzellyse

Durch die Verwendung eines zytometrischen Bead Arrays (cytometric bead array; CBA) ist es möglich, zu untersuchen, welche Effektormoleküle T_{EM} oder T_{CM} während eines Killing Assays sezernieren. So kann darauf geschlossen werden, welche Mechanismen bei der Lyse von Zielzellen verwendet wurden. Dazu wurden sortierte Subpopulationen für vier Stunden mit Raji Zielzellen ko-kultiviert, Überstände abgenommen und anschließend qualitativ und quantitativ untersucht, welche Effektormoleküle und Zytokine von CD8⁺ Memory-Subtypen freigesetzt werden.

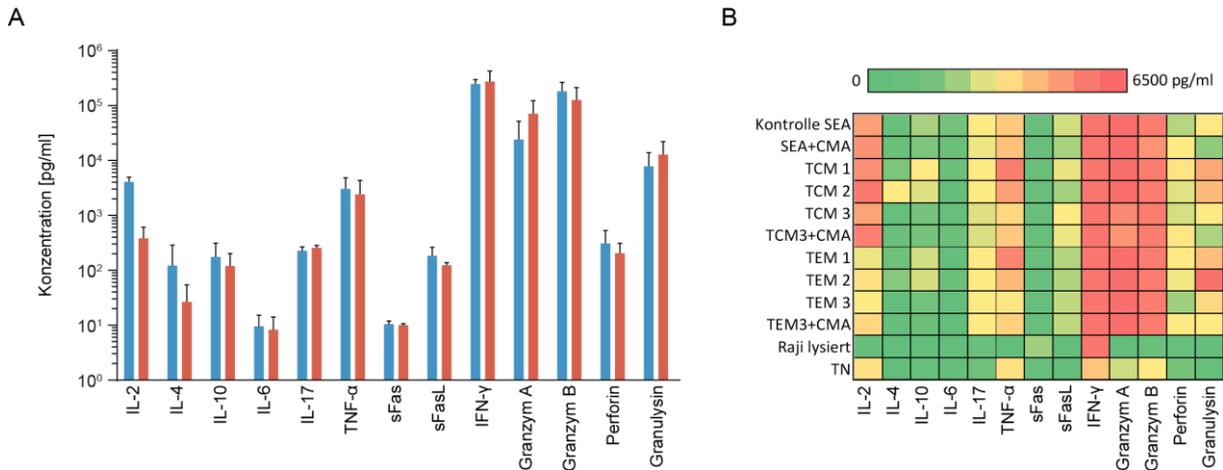


Abbildung 26: Sekretion von Effektormolekülen durch T_{EM} und T_{CM} bei der Zielzellyse. Mittels Legendplex CD8/NK 13plex Kit wurden die aufgeführten Proteine im Überstand eines Populations-Killing Assays (2,5x10⁴ Zielzellen, E:T 10:1) quantifiziert. A) Darstellung der mit Hilfe einer manuell bestimmten Standardkurve ermittelten Konzentration in pg/ml für T_{CM} (blau) und T_{EM} (rot) B) Heatmap der mit Hilfe einer automatisiert (Legendplex 8.0) bestimmten Standardkurve ermittelten Konzentration. Minimum: 0,1 pg/ml (grün) – Maximum: 6500 pg/ml (rot). Säulendiagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Auf statistische Signifikanz zwischen T_{EM} und T_{CM} wurde mit einem Wilcoxon-Test getestet. T_{EM} n=3, T_{CM} n=3, SEA n=1, T_N n=1, CMA n=1, Raji lysiert n=1

Abbildung 26 zeigt die im Überstand eines Killing Assays nachweisbaren Effektormoleküle für T_{EM} und T_{CM}. Dabei fällt auf, dass IL-6 kaum nachweisbar ist, während IL-4, IL-17 und IL-10 in geringen Konzentrationen von 20 – 250 pg/ml sezerniert werden. IL-2 wird durch T_{EM} (419 \pm 256 pg/ml) und T_{CM} (4752 \pm 1036 pg/ml) sezerniert, T_{CM} zeigt hier eine tendenziell stärkere Sekretion. Die Zytokine IFN- γ und TNF- α werden ebenfalls von beiden Subtypen während der Zielzellyse freigesetzt. Die Menge an IFN- γ ist mit 0,31 μ g/ml (T_{CM}) und 0,34 μ g/ml (T_{EM}) die höchste gemessene Konzentration. Die Effektormoleküle der zytotoxischen Mechanismen sind bis auf den inhibitorischen löslichen FAS-Rezeptor (sFAS) alle im Überstand nachweisbar. Perforin und FAS-L sind in einer vergleichsweise geringen Konzentration von 100-300 pg/ml nachweisbar. Die Granzyme A und B sowie Granulysin sind im Überstand deutlich höher konzentriert und wurden in Konzentrationen von 10-20 ng/ml freigesetzt. Der Vergleich von T_{EM} und T_{CM} zeigt für keins der untersuchten Proteine einen signifikanten Unterschied an. Abbildung 26 B) veranschaulicht durch die Darstellung einzelner Proben die spenderabhängige Varianz.

3.6.4 Perforingehalt von isolierten T_{EM}- und T_{CM}- Populationen

Wie bereits in Abbildung 8 beschrieben, exprimieren T_{EM} und T_{EMRA} nach einer SEA-Stimulation erhöhte Mengen an „frühem“ und granulärem Perforin. Die Perforin-vermittelte Lyse ist entscheidend für die Zytotoxizität der Subtypen (siehe 3.2.5 und 3.2.8) und vermutlich eine Ursache für die Unterschiede in der Subtypen-vermittelten Zytotoxizität (siehe 3.6.1). Daher wird die Expression von granulärem Perforin nach der Auftrennung der CTL-Population in T_{EM} und T_{CM} sowie T_N, als Negativkontrolle, parallel zum Killing Assay durchflusszytometrisch untersucht.

In Abbildung 27 ist neben der Perforin-Analyse auch die Reinheit der sortierten Subtypen 24 bis 48 Stunden nach dem Sort dargestellt. Mit Hilfe der Gatingstrategie zur Unterscheidung der Subtypen anhand von CCR7 und CD45RA (Abbildung 27 A und B) wurde die Reinheit der sortierten Populationen überprüft. Demnach ist die Population von sortierten T_N zu $95,5 \pm 0,5\%$ rein. Die Population gesorteter T_{EM} ist zu $81,4 \pm 4\%$ rein, wobei T_{CM} mit $17,2 \pm 4,3\%$ den Großteil der Verunreinigung ausmachen. Die Population aus gesorteten T_{CM} ist zu $78,63 \pm 10,6\%$ rein und setzt sich zusätzlich aus $17,83 \pm 11,2\%$ T_{EM}, $2,9 \pm 2,3\%$ T_N und $1,6 \pm 0,9\%$ T_{EMRA} zusammen. Die Subtypenzusammensetzung der SEA-Kontrollpopulation entspricht auch nach 24 bis 48 Stunden der von T_{CM} dominierten Zusammensetzung an Tag fünf (siehe Abbildung 6).

Die T_{EM}- und die T_{CM}-Population sowie die SEA-stimulierten Kontrolle zeigen alle eine deutliche Expression von Perforin (Abbildung 27 D). Der Anteil der Perforin⁺ Zellen liegt in der T_{EM}-Population bei $89,63 \pm 6,7\%$, in der T_{CM} bei $76,17 \pm 11,9\%$ und in der nicht sortierten SEA-Kontrollpopulation bei $79,75 \pm 9,44\%$. Im Gegensatz dazu exprimiert nur ein kleiner Anteil ($6,9 \pm 9,5\%$) der T_N Population Perforin (Abbildung 27 E). Der durchschnittliche Perforingehalt ist in T_{EM} höher als in T_{CM} ($p=0,0058$) oder der SEA Population ($p=0,0073$) (Abbildung 27 F). Bei einem ähnlichen Anteil Perforin⁺ Zellen zeigen T_{EM} (gemittelte MFI \pm SD: $840,7 \pm 206,4$) im Vergleich zu T_{CM} (gemittelte MFI \pm SD: $337,3 \pm 72$) oder der SEA-Kontrolle (gemittelte MFI \pm SD: $386,8 \pm 109,2$) eine zweifach höhere Expression von Perforin. Die Unterschiede in der Zytotoxizität aus Abschnitt 3.6.1 beruhen daher nicht auf der reinen Verfügbarkeit von Perforin⁺-CTLs, sondern auf der erhöhten Expression von Perforin. Dies korreliert mit der Perforinexpression auf mRNA-Ebene (siehe 3.6.2) und mit der effizienteren T_{EM}-vermittelten Lyse innerhalb der ersten zwei Stunden im Populations-Killing Assay (siehe 3.6). Um die Subtypen abhängige Verwendung von Lyse-Mechanismen besser beschreiben zu können, wurden im Folgenden mikroskopische Analysen von T-Zellen und Zielzellen auf Populations- und Einzelzell-Ebene durchgeführt.

Ergebnisse

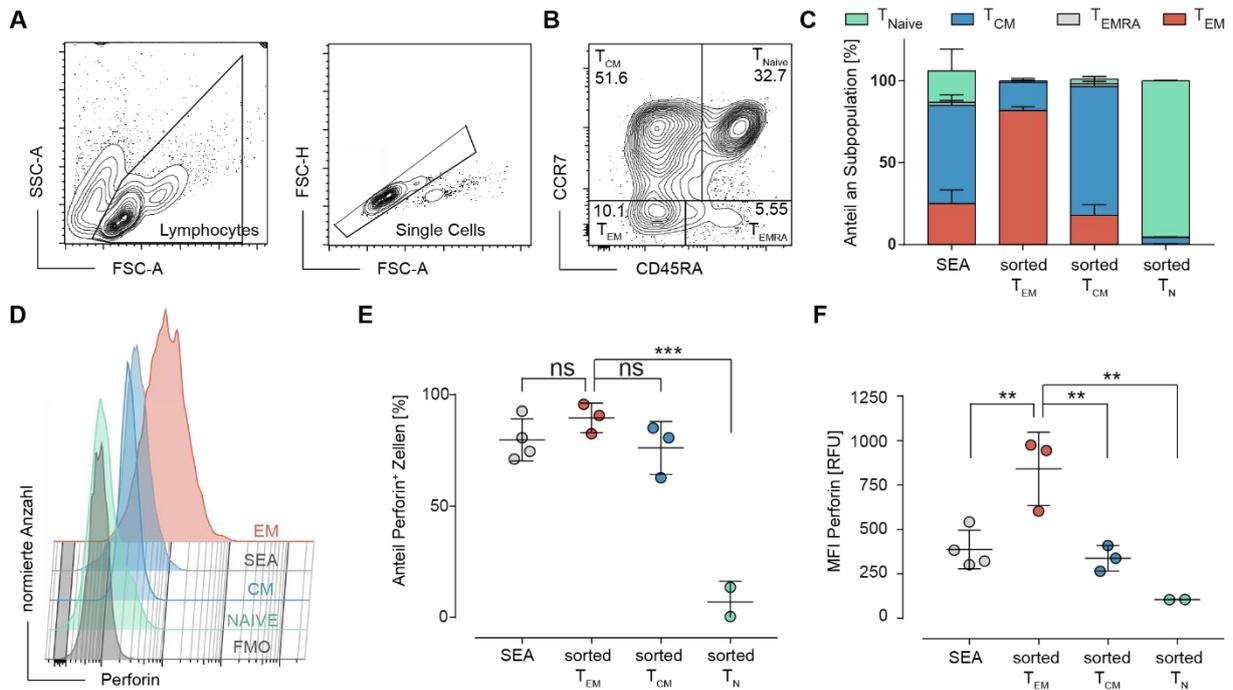


Abbildung 27: Expression von Perforin in gesorteten T_{EM} , T_{CM} und T_N . A) Veranschaulichung der Gatingstrategie anhand einer repräsentativen Probe der SEA-Kontrolle 24 h nach der Sortierung. Nach dem Ausschluss von Dubletten und Partikeln außerhalb des Lymphocyten-Gates wird die Reinheit der gesorteten Subpopulation mittels (CCR7 und CD45RA Färbung) überprüft (B). C) Darstellung der Subtypenverteilung in gesorteten Proben für T_{EM} , T_{CM} und T_N . D) Expression von Perforin in gesorteten Subpopulationen (Gating aus dem Singlet Gate). E) Anteil der Perforin⁺ Zellen in den gesorteten Subpopulationen. Das Gating der Perforin⁺ Zellen erfolgt mit Hilfe eines anhand der FMO Kontrolle positionierten Gates. F) Quantifizierung der Perforinexpression in gesorteten Subpopulationen. Zur Darstellung der Expressionsintensität wird die gemittelte MFI der gesorteten Populationen verwendet. Die Scatter-Plots zeigen Einzelwerte sowie Mittelwerte \pm SD. Auf statistische Signifikanz wurde mit einem one-way ANOVA getestet. SEA n=4, T_{EM} n=3, T_{CM} n=3, T_N n=3

3.7 Analyse der Subtypen-vermittelten Zytotoxizität im Einzelzell-Killing Assay

Die deskriptive, quantitative Analyse der Expression von Effektormolekülen lässt bereits eine Abschätzung der Rolle und Bedeutung einzelner Killingmechanismen für die Subtypen-vermittelte Zytotoxizität zu. So konnte mit der funktionellen Untersuchung der Perforin-vermittelten Zytotoxizität im Populations-Killing Assay gezeigt werden, dass Perforin für T_{EM} und T_{CM} von zentraler Bedeutung ist. Die deskriptiv nachgewiesenen Unterschiede in der Perforinexpression sind ebenfalls in der Kinetik der nekrotischen Zielzellyse im Populations-Killing Assay zuerkennen (siehe 3.6.1). Eine mechanistische Unterscheidung zwischen primären und sekundären Nekrosen ist in diesem Assay jedoch nicht möglich. Durch die automatisierte Populationsanalyse in Abschnitt 3.2.9 konnte darüber hinaus die Beteiligung langsamer Todesrezeptor-vermittelter Apoptosen an der Zytotoxizität der CTL-Gesamtpopulation gezeigt werden. Um zu verstehen, wie stark T_{EM} und T_{CM} zur Verwendung apoptotischer und nekrotischer Mechanismen neigen, werden die sortierten Subtypen in einen pCaspaseR basierten Einzelzell-Killing Assay manuell untersucht. Bei der manuellen Analyse wird jede Zielzelle über den gesamten Zeitraum der Messung manuell getrackt (englisch Tracking: Verfolgung der Spurbildung). Im Gegensatz zur automatisierten Methode ermöglicht diese aufwändigere Analyse so auch die Detektion des pCaspaseR-Signals jeder einzelnen Zielzelle über alle Zeitpunkte der Messung.

Ergebnisse

Wie in Abschnitt 3.2.7 dargestellt können anhand dieser Einzelzellkinetik primäre Nekrosen von Apoptosen und sekundären Nekrosen unterschieden werden. So soll zum einen das Tempo der Lyse-Mechanismen bestimmt, zum anderen die Unterschiede der Subtypen-vermittelten Lyse untersucht werden.

3.7.1 Manuelle Analyse der Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzell-Ebene

Die Diagramme in Abbildung 28 veranschaulichen die Kinetik der Lyse von NALM-6 pCaspaseR durch T_{EM} und T_{CM} . Wie die Aufnahmen (A) und Zelltod-Plots (B) zeigen induzieren beide Subtypen Nekrosen und Apoptosen. Im Vergleich ist die Induktion von Apoptosen bei T_{CM} verzögert und der Anteil an Nekrosen reduziert. Die Quantifizierung der in den Zelltod-Plot Diagrammen dargestellten Daten wurde in drei Abschnitte unterteilt und ist in den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 29-31) gezeigt. Im ersten Abschnitt wird die Zytotoxizität unbehandelter T_{EM} und T_{CM} verglichen. Der zweite Abschnitt zeigt die Quantifizierung Perforin-vermittelter Lysen und der dritte Abschnitt behandelt die Rolle von FAS-L induzierten Apoptosen für die Zytotoxizität von T_{EM} oder T_{CM} .

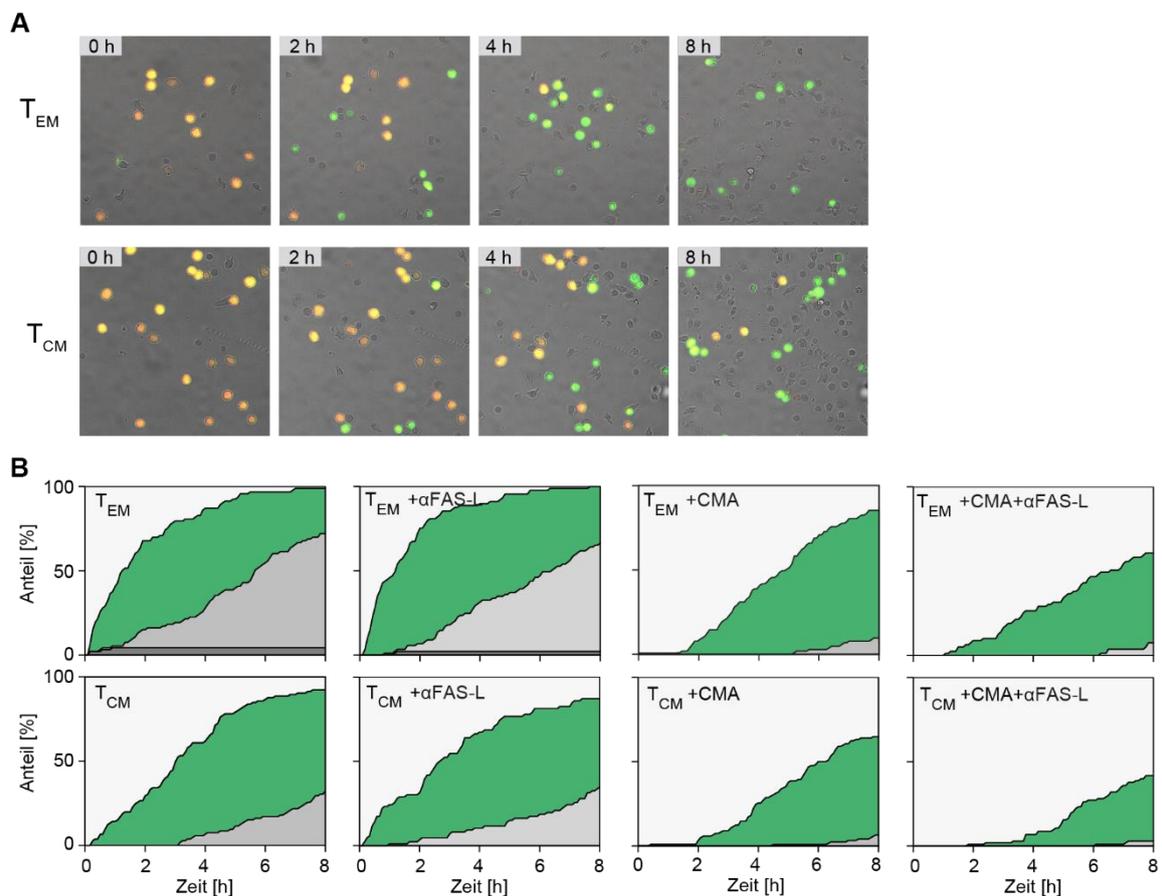


Abbildung 28: Zelltod-Plots der Subtypen-vermittelten Lyse. Sortierte T_{EM} und T_{CM} wurden 8 h mit SEA-beladenen NALM-6 pCaspaseR Zellen für einen Einzelzell-Killing Assay koinkubiert (E:T=2:1). A) Aufnahmen der Koinkubation von sortierten T_{EM} und T_{CM} mit NALM-6 pCaspaseR Zielzellen. B) Die manuelle Analyse der FRET-Fluoreszenz von jeweils ca. 100 Zielzellen ist in Zelltod-Plots im Einzelzell-Killing Assay dargestellt. T_{EM} und T_{CM} Zellen wurden mit anti-FAS-L Antikörpern (NOK1 und NOK2/je 10 µg/ml), CMA (50 nM) oder anti-FAS-L+CMA behandelt.

T_{EM} können primäre Nekrosen induzieren

Durch den Vergleich der T_{EM}- und T_{CM}-vermittelten Zytotoxizität soll untersucht werden ob die Unterschiede im zytotoxischen Potential der Subtypen im Einzelzell-Killing Assay bestätigt werden können. Des Weiteren soll überprüft werden, ob die Zytotoxizität von T_{EM} oder T_{CM} auf apoptotische Lysen beschränkt ist oder ein Subtyp zur Verwendung apoptotischer oder nekrotischer Mechanismen tendiert.

Die manuelle Analyse der Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzellebene zeigt, dass T_{EM} $3,8 \pm 3,4\%$ der Zielzellen durch primäre Nekrosen lysieren, während unter den 400 analysierten T_{CM}-vermittelten Lysen keine primären Nekrosen detektiert werden konnten. Alle primären Nekrosen treten innerhalb der ersten 60 Minuten der Messung auf (Abbildung 29 und 22 A). Primäre Nekrosen werden demnach nur von T_{EM} induziert und finden sehr schnell statt, tragen aber nur geringfügig zur gesamten Zielzelllyse bei. Ein Großteil der Zielzellen wird durch die Induktion von Apoptosen und anschließende sekundäre Nekrosen lysiert. Die erhöhte Effizienz der T_{EM}-vermittelten Lysen zeigt sich nicht nur bei der Induktion primärer Nekrosen (Abbildung 29). Auch der Anteil apoptotischer Zielzellen ist nach zwei Stunden bei T_{EM} ($52 \pm 16,35\%$) gegenüber T_{CM} signifikant erhöht (Abbildung 29 A, $p=0,0007$). Zusätzlich führen die durch T_{EM} induzierten Apoptosen bereits innerhalb der initialen zwei Stunden in $8,1 \pm 9,7\%$ der Zielzellen zu sekundären Nekrosen, während T_{CM} innerhalb der initialen zwei Stunden keine Nekrosen auslösen können. Nach vier Stunden sind auch durch T_{CM} induzierte sekundäre Nekrosen nachweisbar und der Anteil apoptotischer Zielzellen zeigt zwischen T_{CM} ($58,9 \pm 22,5\%$) und T_{EM} ($65,3 \pm 22,46$) keinen signifikanten Unterschied mehr (Abbildung 29 B). Nach acht Stunden sind 99% der Zielzellen von T_{EM} und 95% der Zielzellen von T_{CM} apoptotisch oder nekrotisch, beide Populationen zeigen daher am Endpunkt der Messung ein ähnliches Vermögen, ihre Zielzellen zu töten. Der Vergleich des Anteils von Nekrosen und Apoptosen zeigt jedoch, dass bei T_{EM} vermittelten Lysen ein signifikant erhöhter Anteil der Zielzellen von einer Apoptose in eine sekundäre Nekrose übergegangen ist (Abbildung 29 C, $p=<0,0001$). Die Unterschiede in der Kinetik von T_{EM} und T_{CM} beruhen daher einerseits auf dem Potential, Apoptosen zu induzieren und andererseits in der verringerten Latenz von T_{EM} induzierten Apoptosen. Ersteres zeigt auch der Vergleich der Zeit bis zur Induktion einer Apoptose oder Nekrose für jede einzelne Zelle in Abbildung 29 D). Die mittlere Zeit $\Delta t_{Apo\ ind}$ für T_{EM} liegt bei 108,9 Minuten (Median 70 Minuten), die mittlere $\Delta t_{Apo\ ind}$ für T_{CM} liegt bei 201,7 (Median 180 Minuten) ($p=<0,0001$). Außerdem ist die Latenz von einer Apoptose zu einer sekundären Nekrose bei T_{EM}-vermittelten Lysen signifikant schneller (Abbildung 29 E). Da ein Großteil der T_{CM}-vermittelten Lysen am Ende der Messung noch nicht nekrotisch ist, kann keine genaue Zeit für diese Latenz bestimmt werden. Abbildung 29 F) zeigt die Apoptosedauer nach Ausschluss aller Zellen die nach acht Stunden nicht sekundär nekrotisch sind. Der Median der Apoptosedauer liegt für T_{EM} bei 185 min, für T_{CM} bei 255 min. Da in F) 60% der analysierten T_{CM} ausgeschlossen sind und die Analyse nur mit den 35% der effizientesten

Ergebnisse

T_{CM} vermittelten Lyse durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass der Unterschied zwischen T_{EM} und T_{CM} ($p=0,0061$) in dieser Darstellung unterschätzt wird.

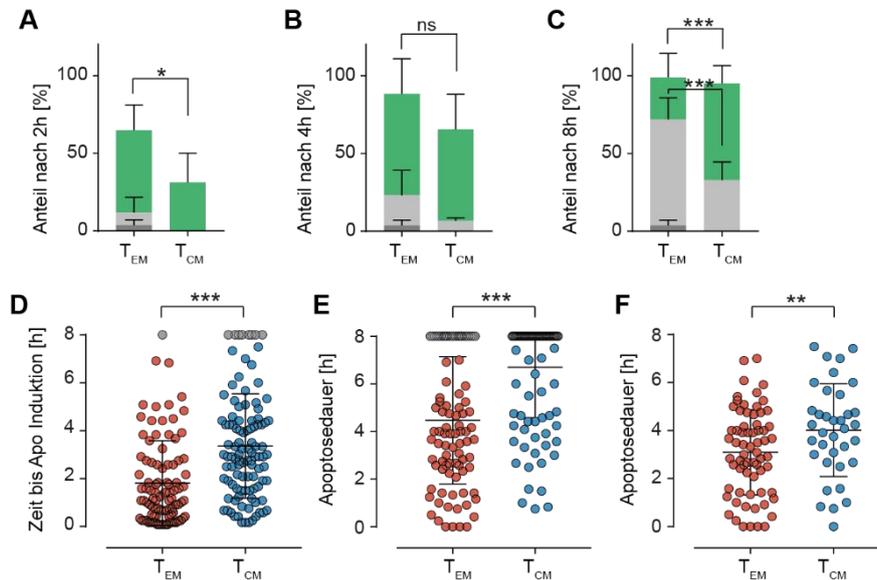


Abbildung 29: Manuelle Analyse Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzellebene. T_{EM} sind in der Lage, Zielzellen durch eine direkte primäre Nekrose zu lysieren und induzieren effizientere sekundäre Nekrosen als T_{CM} . Quantifizierung des Anteils prim. nekrotischer (dunkelgrau), apoptotischer (grün) und sek. nekrotischer (hellgrau) Zielzellen T_{EM} und T_{CM} nach 2 h (A), 4 h (B) und 8 h (C). D) Einzelzellendarstellung des Zeitraums bis zur Induktion der Zielzelllyse (Apoptose oder prim. Nekrose) durch T_{EM} oder T_{CM} . Zielzellen, in denen keine Apoptose induziert wurde, sind in grau dargestellt. E) Darstellung des Zeitraums Δt von Beginn der Apoptose bis Eintritt der sek. Nekrose. Nicht abgeschlossene Apoptosen sind in grau dargestellt. F) Alternative Darstellung der Apoptosedauer aus (E) unter Ausschluss nicht abgeschlossener Apoptosen. Gestapelte Säulendiagramme (A-C) zeigen den Mittelwert von Nekrosen und Apoptosen \pm SD. $n=4$ Spender, auf statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA Tests geprüft. Scatter-Plots zeigen den Mittelwert \pm SD. Jeder einzelne Punkt stellt eine einzelne Zelle der gepoolten Gesamtheit von 4 Spendern dar. T_{EM} $n=94$, T_{CM} $n=105$

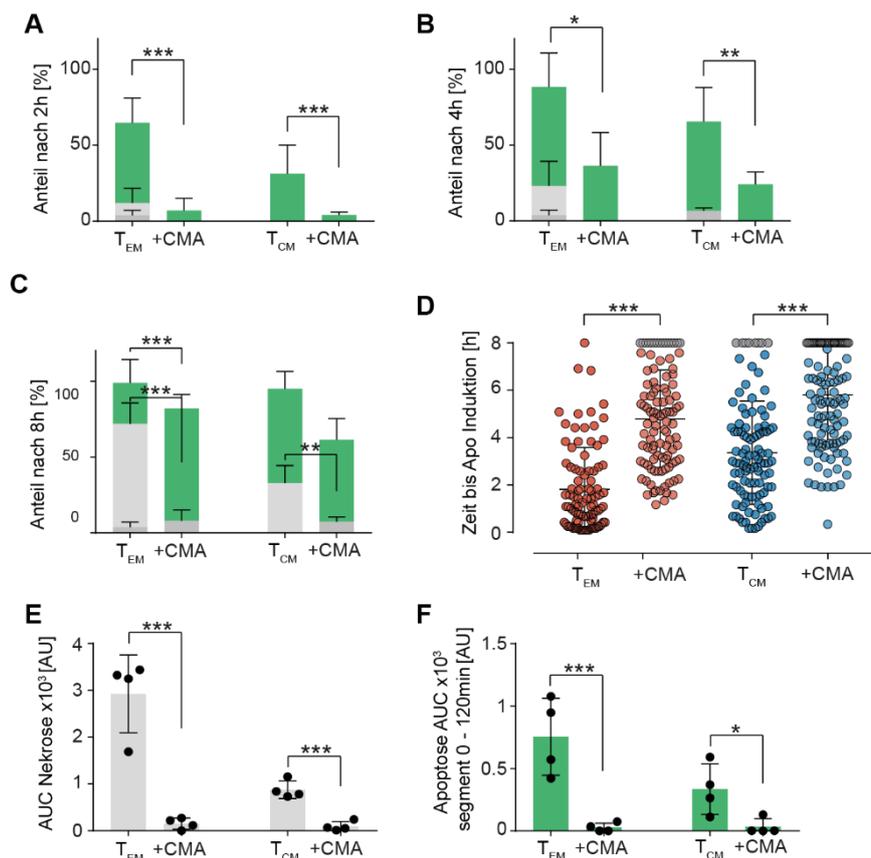
Durch die manuelle Analyse der im Einzelzell-Killing Assay gewonnenen Daten ist es möglich, dass mittels Populations-Killing Assay beschriebene erhöhte zytotoxische Potential von T_{EM} (siehe 3.6.1) in verschiedene Unterschiede bei der Zielzelllyse aufzuschlüsseln. Erstens sind T_{EM} in der Lage, einen kleinen Anteil der Zielzellen innerhalb weniger Minuten durch primäre Nekrosen zu lysieren. Auch wenn dieser Anteil mit etwa 4% gering ist, trägt er zu einer effizienteren Lyse durch T_{EM} bei. Zweitens induzieren T_{EM} schneller Apoptosen als T_{CM} und drittens resultieren diese Apoptosen schneller in sekundären Nekrosen.

Primäre und sekundäre Nekrosen sind von Perforin abhängig

Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Unterschiede der T_{EM} - und T_{CM} -vermittelten Zielzelllyse durch die erhöhte Verfügbarkeit von Perforin in T_{EM} erklärt werden können, wurde der Effekt von CMA auf die Lysekinetik von T_{EM} und T_{CM} analysiert. Durch die CMA-abhängige Inhibierung von Perforin können keine primären Nekrosen mehr induziert werden (Abbildung 30 A). Der Anteil apoptotischer Zielzellen nach zwei Stunden und nach vier Stunden ist signifikant reduziert (Abbildung 30 A und B),

Ergebnisse

erst nach über zwei können erste Apoptosen detektiert werden (siehe Zelltod-Plot, Abbildung 28), wodurch es bei T_{EM} (von 70min \rightarrow 290min, $p < 0,0001$) und T_{CM} (180min \rightarrow 365min, $p < 0,0001$) zu einer signifikanten Verlängerung der Zeitspanne bis zur Induktion einer Apoptose kommt (Abbildung 30 D). Somit sind auch nach der Inhibierung von Perforin T_{EM} effizienter bei der Induktion von Apoptosen und töten ihre Zielzellen im Schnitt 60 Minuten früher als T_{CM} (Abbildung 30 F, $p = 0,0051$). Folglich können sekundäre Nekrosen erst nach über vier Stunden detektiert werden und sind auch nach acht Stunden bei T_{EM} und T_{CM} in unter 8% der Zielzellen detektierbar (Abbildung 30 C, T_{EM} $p < 0,0001$, T_{CM} $p = 0,0076$). Die AUC der sekundären Nekrosen veranschaulicht die Bedeutung von Perforin für die Zielzellyse durch die zeitliche Darstellung des zeitlich verzögerten Auftretens und der Reduktion des Anteils nekrotischer Zellen (Abbildung 30 E, $p < 0,0001$). Die Darstellung der AUC von Apoptosen in F zeigt, dass Perforin auch für die Induktion von Apoptosen innerhalb der ersten zwei Stunden essentiell ist. Auch wenn CTLs innerhalb von acht Stunden in der Lage sind, einen Großteil der Zielzellen mit Hilfe anderer Mechanismen in Apoptose zu versetzen, ist die initiale Lyse innerhalb der ersten zwei Stunden vollkommen von Perforin abhängig (Abbildung 30 F, T_{EM} $p = 0,0007$; T_{CM} $p = 0,0295$).



Ergebnisse

Abbildung 30: Primäre und sekundäre Nekrosen sind von Perforin abhängig. Quantifizierung der manuellen Analyse zum Vergleich der Zytotoxizität unter Einfluss von CMA von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzellebene. A-C) Quantifizierung des Anteils prim. nekrotischer (dunkelgrau), apoptotischer (grün) und sek. nekrotischer (hellgrau) Zielzellen von CMA behandelten T_{EM} und T_{CM} nach 2 h (A), 4 h (B) und 8 h (C) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. D) Einzelzelldarstellung des Zeitraums bis zur Induktion der Zielzellyse (Apoptose oder prim. Nekrose) durch T_{EM} oder T_{CM} unter Einfluss von CMA. Zielzellen, in denen keine Apoptose induziert wurde sind grau dargestellt. E) Darstellung der AUC (area under the curve) der Kinetik von Nekrosen im Verlauf der 8 h Messung. F) Darstellung der AUC der Kinetik von Apoptosen im Verlauf innerhalb der ersten 120min. n=4 Spender, auf statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA Tests geprüft. Scatter-Plots zeigen den Mittelwert \pm SD, Jeder einzelne Punkt stellt eine einzelne Zelle der gepoolten Gesamtheit von 4 Spendern dar. T_{EM} n=94, $T_{EM}+CMA$ n=103, T_{CM} n= 105, $T_{CM}+CMA=122$. In G) & H) stellen einzelne Punkte die Mittelwerte der 4 untersuchten Spender dar.

Die Inhibierung von Perforin verdeutlicht zum einen, dass die Zytotoxizität beider Subtypen in erster Linie von Perforin abhängig ist. Zum anderen zeigt sie auch, dass die höhere Effizienz der T_{EM} -vermittelten Lyse hauptsächlich auf Perforin-vermittelten Mechanismen beruht. Die Behandlung mit CMA reduziert die Zytotoxizität in beiden Subtypen auf ein vergleichbares Level. Im direkten Vergleich von CMA-behandelten T_{EM} und T_{CM} sind weder der Anteil apoptotischer noch der Anteil sekundär nekrotischer Zellen signifikant unterschiedlich. Da die stark verlängerte Zeitspanne bis zur Induktion von Apoptosen auch ohne Perforin bei T_{EM} etwa 60 min kürzer ist als bei T_{CM} (D, $p= 0,0051$), ist davon auszugehen, dass auch Unterschiede vorliegen, die nicht von Perforin abhängig sind.

Die Subpopulationen T_{EM} und T_{CM} können mittels FAS-L-abhängiger Zytotoxizität Apoptosen induzieren

Trotz der starken Reduktion von sekundären Nekrosen durch die Inhibierung von Perforin durch CMA, können T_{EM} und T_{CM} bis zum Ende der Messung in 80% bzw. 60% der Zielzellen Apoptosen induzieren. Um zu untersuchen, ob diese apoptotischen Lysen vom rezeptorvermittelten FAS-Mechanismus abhängig sind und ob bei FAS-vermittelten Lysen eine Subtypen-abhängigkeit vorliegt, wurde der Einfluss von inhibitorischen anti-FAS-L Antikörpern auf die Zytotoxizität untersucht. Die Behandlung mit anti-FAS-L Antikörpern hat keinen Effekt, solange eine Perforin-vermittelte Lyse möglich ist (Abbildung 28 und Abbildung 31 A-C und E-G). Werden die anti-FAS-L Antikörper mit CMA kombiniert, um die FAS- und Perforin-vermittelten Mechanismen gleichzeitig zu inhibieren, führt dies in der späten Phase der Messung (nach 8 h) zu einer signifikanten Reduktion des Anteils apoptotischer Zellen um 28,4% bei T_{EM} beziehungsweise 23% bei T_{CM} (Abbildung 31 C und G). Anhand der Zeitspanne bis zur Induktion von Apoptosen in Abbildung 31 D und F) ist ebenfalls zu erkennen, dass die alleinige Behandlung mit anti-FAS-L Antikörpern keinen Einfluss auf das Tempo der Induktion von Apoptosen hat. Die Behandlung mit der kombinierten Bedingung (CMA + anti-FAS-L) bewirkt im Vergleich zu der CMA-behandelten Bedingung eine Verzögerung der Induktion von Apoptosen um 62,2 min für T_{EM} bzw. 65,3 min für T_{CM} . Mit Hilfe der AUC von Apoptosen und sekundären Nekrosen ist in D) veranschaulicht, welcher Anteil der Apoptosen über FAS induziert wird. Prozentual verringert sich der Anteil apoptotischer Zellen durch die zusätzliche Inhibierung von FAS-L bei T_{EM} um 35,3% sowie um 59,2% bei T_{CM} .

Ergebnisse

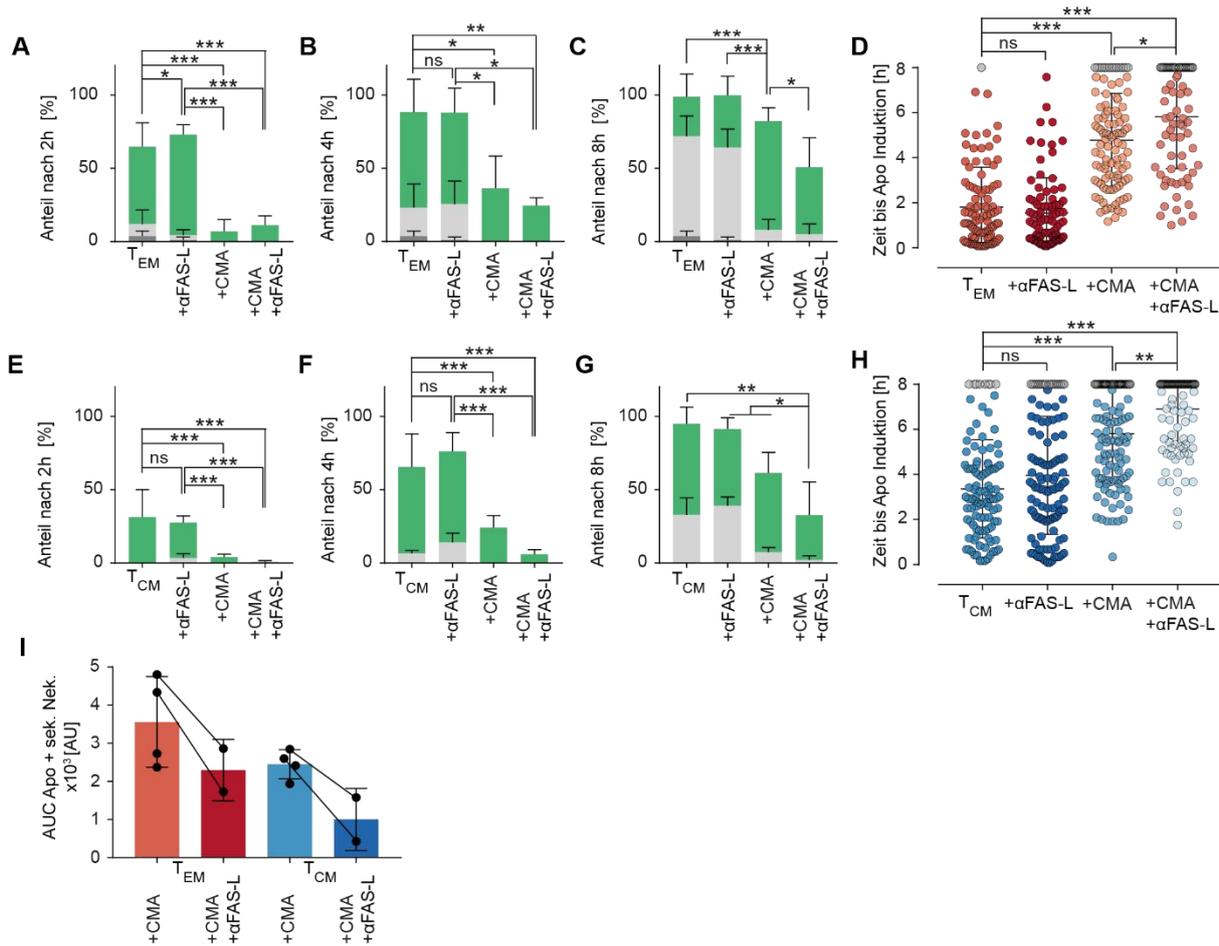


Abbildung 31: T_{EM} und T_{CM} induzieren mittels FAS-L Apoptosen. Manuelle Analyse der FAS-L abhängigen Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzellebene. Quantifizierung der manuellen Analyse von T_{EM} und T_{CM} induzierten primären Nekrosen, Apoptosen und sekundären Nekrosen im Verlauf der 8 h Messung unter Einfluss von anti-FAS-L (NOK-1 und NOK-2 jeweils 10 µg/ml) oder anti-FAS-L und 50 nM CMA . A-C) und E-G) Quantifizierung des Anteils prim. nekrotischer (dunkelgrau), apoptotischer (grün) und sek. nekrotischer (hellgrau) Zielzellen T_{EM} und T_{CM} nach 2 h (E), 4 h (F) und 8 h (G). D & H) Einzelzellendarstellung des Zeitraums bis zur Induktion der Zielzellyse (Apoptose oder prim. Nekrose) durch T_{EM} (D) oder T_{CM} (H) unter Einfluss von CMA und FAS-L. Zielzellen, in denen keine Apoptose induziert wurde, sind grau dargestellt. I) Darstellung der AUC der Summe von Apoptosen und sek. Nekrosen. n=4 Spender (CMA) und n=2 Spender (CMA + anti-FAS-L). Auf statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA Tests geprüft. Eindimensionale Scatter-Plots zeigen den Mittelwert \pm SD, Jeder einzelne Punkt stellt eine einzelne Zelle gepoolten Gesamtheit von 2-4 Spendern dar. In I) stellen einzelne Punkte die Mittelwerte der 2-4 untersuchten Spender dar, Linien verbinden gepaarte Werte. T_{EM} anti-FAS-L n=92, T_{EM} CMA + anti-FAS-L n=80, T_{CM} anti-FAS-L n=124, T_{CM} CMA + anti-FAS-L n=103

FAS-vermittelte Lysen sind daher gegenüber Perforin von untergeordneter Bedeutung. Nach der Inhibierung von Perforin wird jedoch ein großer Teil der Apoptosen durch die Interaktion von FAS-L mit dem FAS-Rezeptor der Zielzellen induziert.

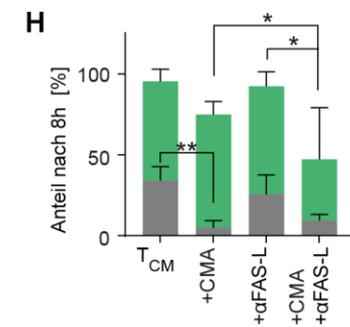
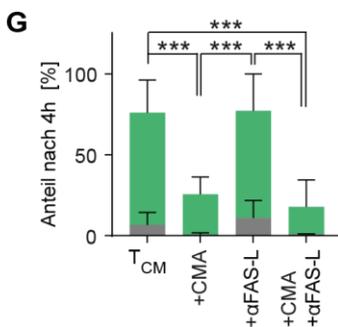
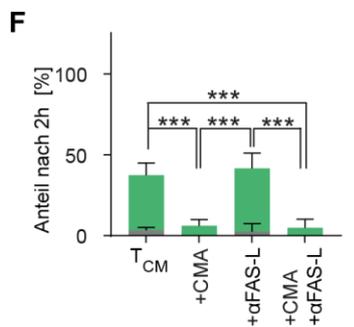
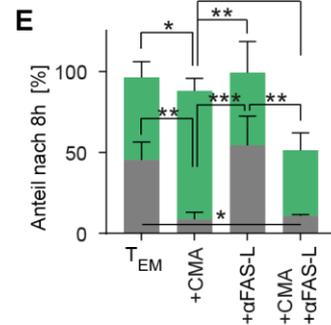
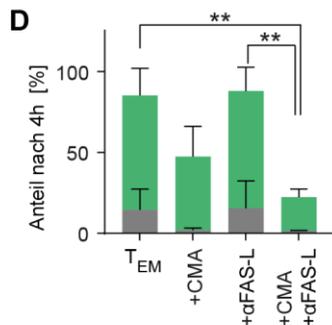
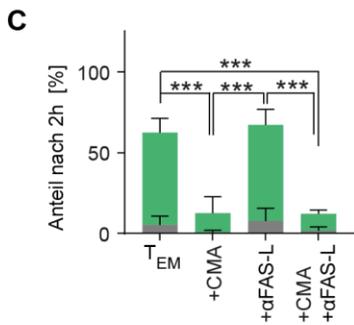
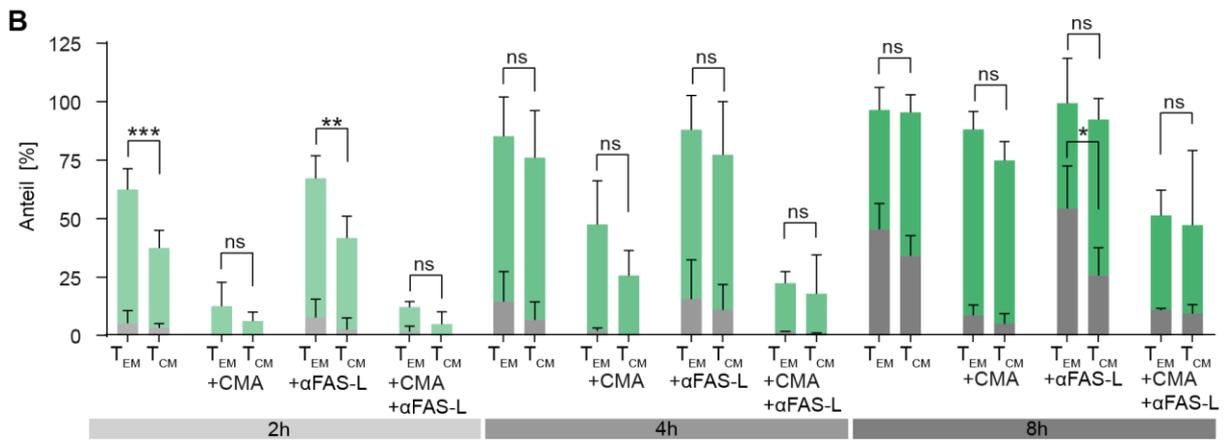
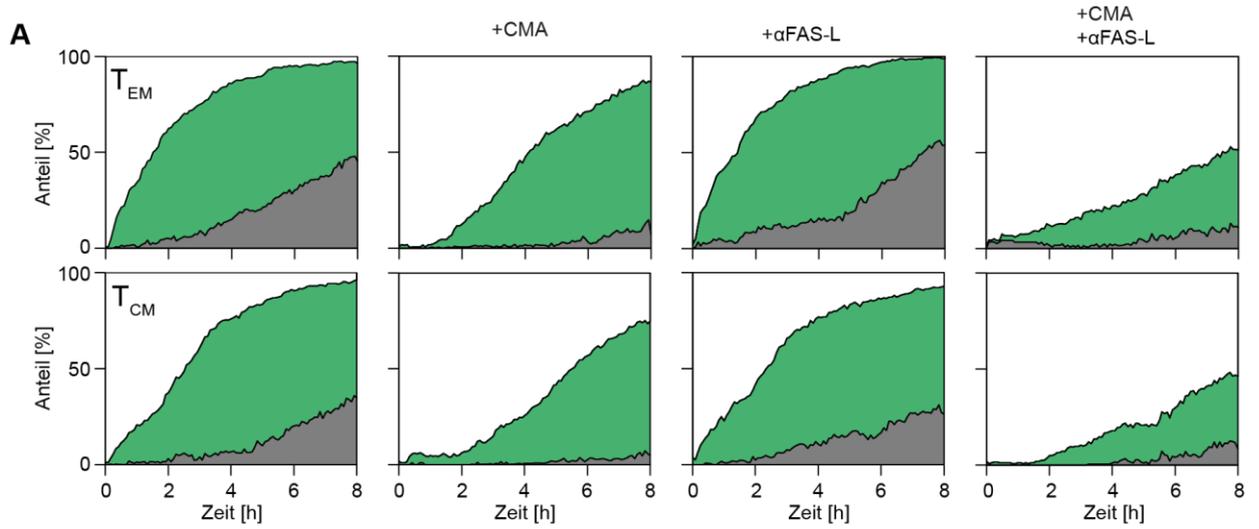
3.7.2 Die semi-automatisierte Detektion von Apoptosen auf Einzelzellebene

Durch die manuelle Analyse der im Einzelzell-Killing Assay gewonnenen Daten konnte die Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} weiter charakterisiert werden. Die funktionellen Daten zeigen ein Zytotoxizitätsprofil, das den quantitativen Daten aus Abschnitt 3.6 entspricht. So korreliert beispielsweise die erhöhte Perforinexpression in T_{EM} mit dem Auftreten von primären Nekrosen und der schnellen Induktion von sekundären Nekrosen. Bei einer manuellen Analyse kann eine unbeabsichtigte

Ergebnisse

Verfälschung durch subjektive Faktoren (Auswahl von Zielzellen entsprechend einer Erwartung, Fehler beim Tracking) nicht ausgeschlossen werden. Um die gezeigten Effekte der Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} Subtypen durch ein möglichst objektives System zu verifizieren, wurde die bereits in Abschnitt 3.2.8 und 3.2.9 verwendete automatisierte Analyse auch auf diesen Datensatz angewendet. Bei der automatisierten Analyse werden Zielzellen anhand ihrer GFP-Fluoreszenz durch die Software IMARIS (Bitplane) detektiert und die Anzahl sowie das FRET-Signal jeder detektierbaren Zelle für jeden jeweiligen Zeitpunkt erfasst. Daraus wird für jeden Zeitpunkt der Anteil lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt (Backes *et al.*, 2018). Mit dieser automatisierten Analyse können primäre und sekundäre Nekrosen nicht unterschieden werden, es wird lediglich die Summe aller Nekrosen erfasst. Die automatisierte Analyse kann das Auftreten primärer Nekrosen bei der T_{EM}-vermittelten Lyse daher nicht bestätigen. Die Zelltod-Plots (Abbildung 32 A) und die Quantifizierung der Zielzellyse (Abbildung 32 B-H) nach der automatisierten Analyse bestätigen die Kernaussagen der manuellen Analyse. Beide Subtypen zeigen eine hauptsächlich apoptotische Lyse der Zielzellen und lysieren in acht Stunden 100% beziehungsweise 90% der Zielzellen. Das erhöhte zytotoxische Potential von T_{EM} wird auch in der automatisierten Analyse durch die erhöhte Induktion von Apoptosen innerhalb der ersten zwei Stunden nachgewiesen (Abbildung 32 B, p=0.0003). Die Behandlung mit CMA hat auch hier einen signifikanten Effekt und bestätigt, dass die Induktion schneller Apoptosen und Nekrosen von Perforin abhängig ist (Abbildung 32 C und D, jeweils p<0,0001). Während der Anteil an Apoptosen bis zum Ende der Messung auf 80% bzw. 70% ansteigt (Abbildung 32 C-E und F-G), ist der Anteil sekundärer Nekrosen auch nach acht Stunden für T_{EM} um 36,6% (Abbildung 32 E; p=0,0069) und für T_{CM} um 29,1% (Abbildung 32 H; p=0,0057) reduziert. Die FAS-L-vermittelte Zytotoxizität kann auch automatisiert nach der Inhibierung von Perforin nachgewiesen werden. So ist der Anteil an Apoptosen zwischen CMA und CMA + anti-FAS-L behandelter Bedingung, durch die zusätzliche Inhibierung FAS-L-vermittelter Lysen, für beide Subpopulationen signifikant verringert (T_{EM}: p=0,011; T_{CM}: p=0,013). Nach der Inhibierung von FAS-L- und Perforin- vermittelten Mechanismen zeigen T_{EM} und T_{CM} noch eine Restaktivität, es liegen aber keine signifikanten Unterschiede mehr vor (Abbildung 32 B).

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 32: Die Lyse-Mechanismen von T_{EM} und T_{CM} sind Perforin vermittelt, können aber durch FAS-L vermittelte Lyse kompensiert werden. A) Mittels semi-automatisierter Analyse generierte Zelltod-Plot Diagramme zur Quantifizierung der durch T_{EM} oder T_{CM} induzierten Apoptosen und Nekrosen im Verlauf der 8 h Messung. B) Es wird die Quantifizierung von unbehandelten, mit anti-FAS-L (NOK-1 und NOK-2 jeweils 10 µg/ml), mit 50 nM CMA oder mit CMA und anti-FAS-L behandelten T_{EM} und T_{CM} gezeigt. C-E) Quantifizierung des Anteils apoptotischer (grün) und nekrotischer (grau) Zielzellen von T_{EM} nach 2 h (C), 4 h (D) und 8 h (E). F-H) Quantifizierung des Anteils apoptotischer (grün) und nekrotischer (grau) Zielzellen von T_{CM} nach 2 h (F), 4 h (G) und 8 h (H). Gestapelte Säulendiagramme (B-H) zeigen den Mittelwert von Nekrosen und Apoptosen ± SD. n=4 Spender (CMA + anti-FAS-L n=2 Spender), auf statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA Tests geprüft.

3.7.3 Die semi-automatisierte und die manuelle Analyse zeigen im direkten Vergleich keine Unterschiede

Der direkte Vergleich der software-gestützten automatisierten Analyse und der manuellen Analyse dient zum einen der gegenseitigen Verifizierung der Verfahren und hilft bei der Erkennung von Analyseartefakten. Zum anderen kann bei der manuellen Analyse kein objektives Ergebnis garantiert werden, der subjektive Einfluss des Experimentators kann jedoch anhand der automatisierten Analyse ausgeschlossen werden. Abbildung 33 A) zeigt die direkte Gegenüberstellung von automatisierter und manueller Analyse. Der direkte Vergleich zeigt zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Analyseverfahren. Tendenziell wird mit dem manuellen Verfahren ein größerer Anteil Nekrosen nachgewiesen. In Abbildung 33 B) ist die Korrelation von automatisiert und manuell gewonnenen Daten veranschaulicht ($r^2=0,9113$, $p<0,0001$). Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse und können entsprechend der Fragestellung auch einzeln verwendet werden. Eine semi-automatisierte Analyse liefert weniger Informationen, ist aber auch um ein Vielfaches weniger zeitaufwändig als das manuelle Verfolgen hunderter Zielzellen über alle gemessenen Zeitpunkte hinweg.

Ergebnisse

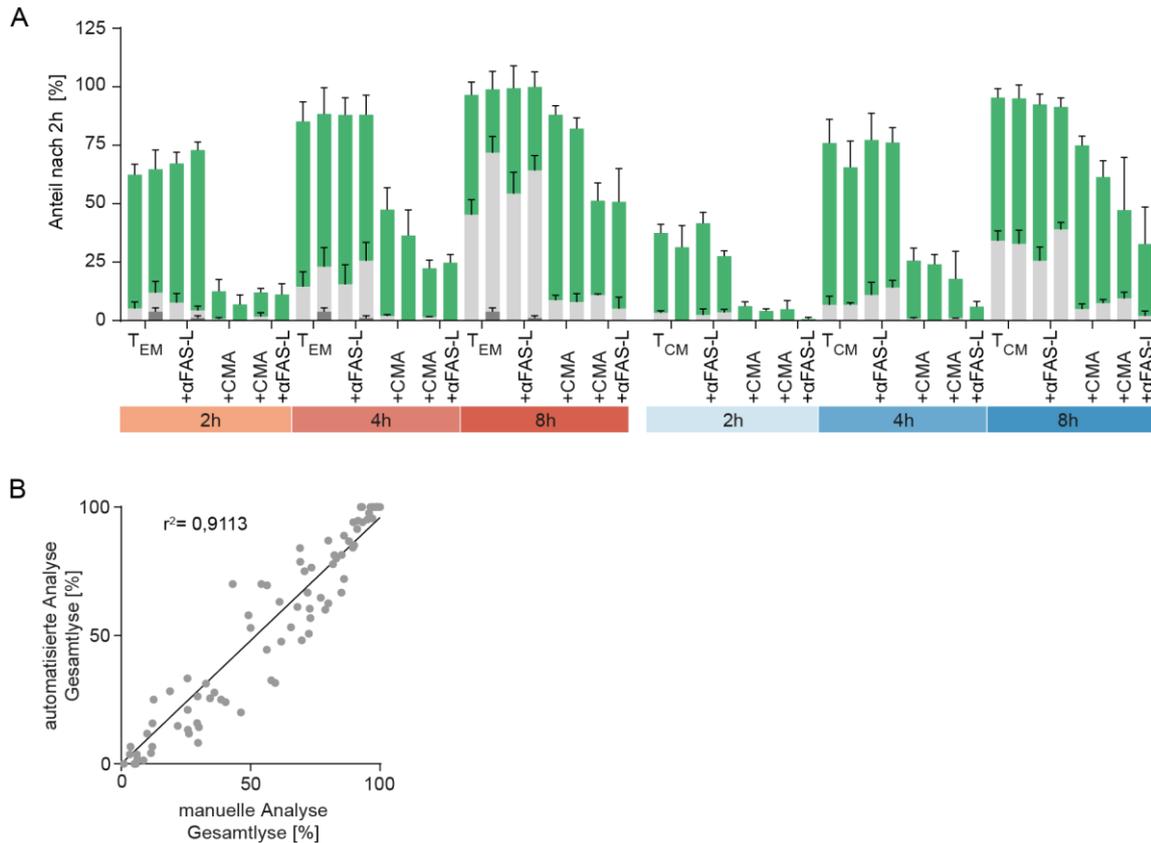


Abbildung 33: Der direkte Vergleich der automatisierten und der manuellen Analyse zeigt keine signifikanten Unterschiede. A) Gegenüberstellung der automatisierten und manuellen Analyse nekrotischer oder apoptotischer Zielzellen für unbehandelte oder mit anti-FAS-L und/oder CMA behandelten T_{EM} oder T_{CM} nach 2 h, 4 h oder 8 h. Das linke Säulendiagramm eines Paares zeigt immer die automatisierte Analyse, der rechte Teil zeigt die manuelle Analyse. B) Korrelation der Gesamtllyse (Apoptosen + sek. Nekrosen + prim. Nekrosen zu einem bestimmten Zeitpunkt) von 83 automatisch (Y-Achse) und manuell (X-Achse) analysierten Datenpunkten (n=4 Spender).

3.7.4 Manuelles Tracking der CTL Interaktion

Der Nachweis von Zytotoxizität erfolgt im Allgemeinen durch die Beobachtung eines Reporters auf Seite der Zielzelle. Im Calcein-basierten Populations-Killing Assay wird die Zytotoxizität durch die kinetische Messung der Calcein-Fluoreszenz quantifiziert, im pCaspaseR-basierten Einzelzell Assay erfolgt der Nachweis der Zytotoxizität anhand des FRET-Signals des pCaspaseR-GR Konstrukts. Durch die zusätzliche manuelle Beobachtung der T-Zell Aktivität können darüber hinaus zusätzliche Informationen gewonnen werden, die hilfreich sind, um die Analyse der Subtypen-vermittelten Zytotoxizität zu präzisieren. So kann durch eine Analyse der T-Zell-Aktivität im Durchlichtbild erfasst werden, wie schnell es zum ersten Kontakt zwischen Zielzelle und T-Zelle kommt, wie lange die IS erhalten bleibt und wie schnell es nach der Ausbildung einer IS zur Induktion von Apoptosen kommt. Diese Abschnitte der Zielzelllyse sind im Schaubild in Abbildung 34 A) zu sehen.

Ergebnisse

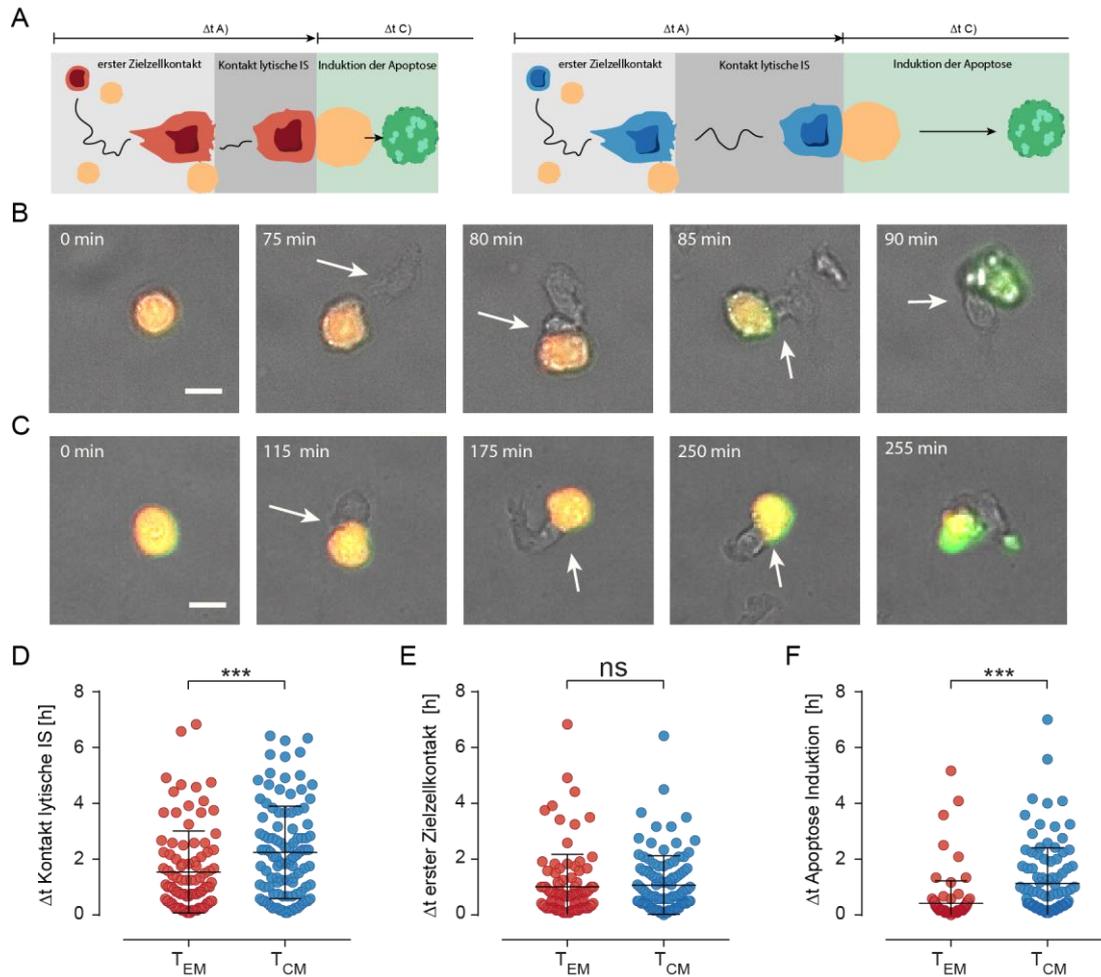


Abbildung 34: T_{EM} bilden effizienter immunologische Synapsen. Vergleich der T-Zell Aktivität von T_{EM} und T_{CM} durch manuelles Tracking von T-Zell-Zielzell Kontakten. A) Schematische Darstellung der Abschnitte einer Synapse. B und C) Lyse einer NALM-6 pCasperR Zelle durch T_{EM} (B) oder T_{CM} (C). D) Darstellung des Zeitraums Δt vom Beginn der Messung bis zur Bildung einer IS, die in der Lyse der Zielzelle resultiert. E) Darstellung des Zeitraums Δt vom Beginn der Messung bis zum ersten Kontakt mit einer Zielzelle. F) Darstellung des Zeitraum Δt von der Bildung einer IS bis zum Eintreten der Apoptose der Zielzelle.

Abbildung 34 veranschaulicht die Ergebnisse der Analyse der T-Zell-Aktivität von T_{EM} (Beispiel in B) und T_{CM} (Beispiel in C). In Abbildung 34 D) ist zu erkennen, dass T_{EM} effizienter lytische IS mit Zielzellen bilden ($p=0,0008$). Nach durchschnittlich 93 Minuten (Median 60 Minuten) bilden T_{EM} einen Zielzellkontakt aus, der in der Induktion einer Apoptose oder Nekrose resultiert. Dieser Zeitraum liegt für T_{CM} durchschnittlich bei 135 Minuten (Median 125 Minuten). Da nicht jeder Zielzellkontakt in der Lyse dieser Zelle resultiert, wurde überprüft, ob die Subtypen unterschiedlich schnell Kontakt zu ihren Zielzellen herstellen. Im Gegensatz zum Zeitraum bis zur Ausbildung einer lytischen IS ist der in Abbildung 34 E) dargestellte durchschnittliche Zeitraum bis zum ersten Kontakt zur einer Zielzelle für T_{EM} und T_{CM} vergleichbar (T_{EM} : 60,7 Minuten; T_{CM} 64,4 Minuten). Der Zeitraum zwischen der Ausbildung einer IS und der Induktion der Apoptose in der Zielzelle ist in Abbildung 34 F) dargestellt. T_{CM} benötigen $81,1 \pm 78,9$ Minuten vom Kontakt zur Zielzelle bis zur Induktion der Apoptose. Dieser

Ergebnisse

Zeitraum ist bei T_{EM} kürzer ($p < 0,0001$), sie induzieren die Apoptose binnen weniger Minuten ($25,7 \pm 43,05$ Minuten).

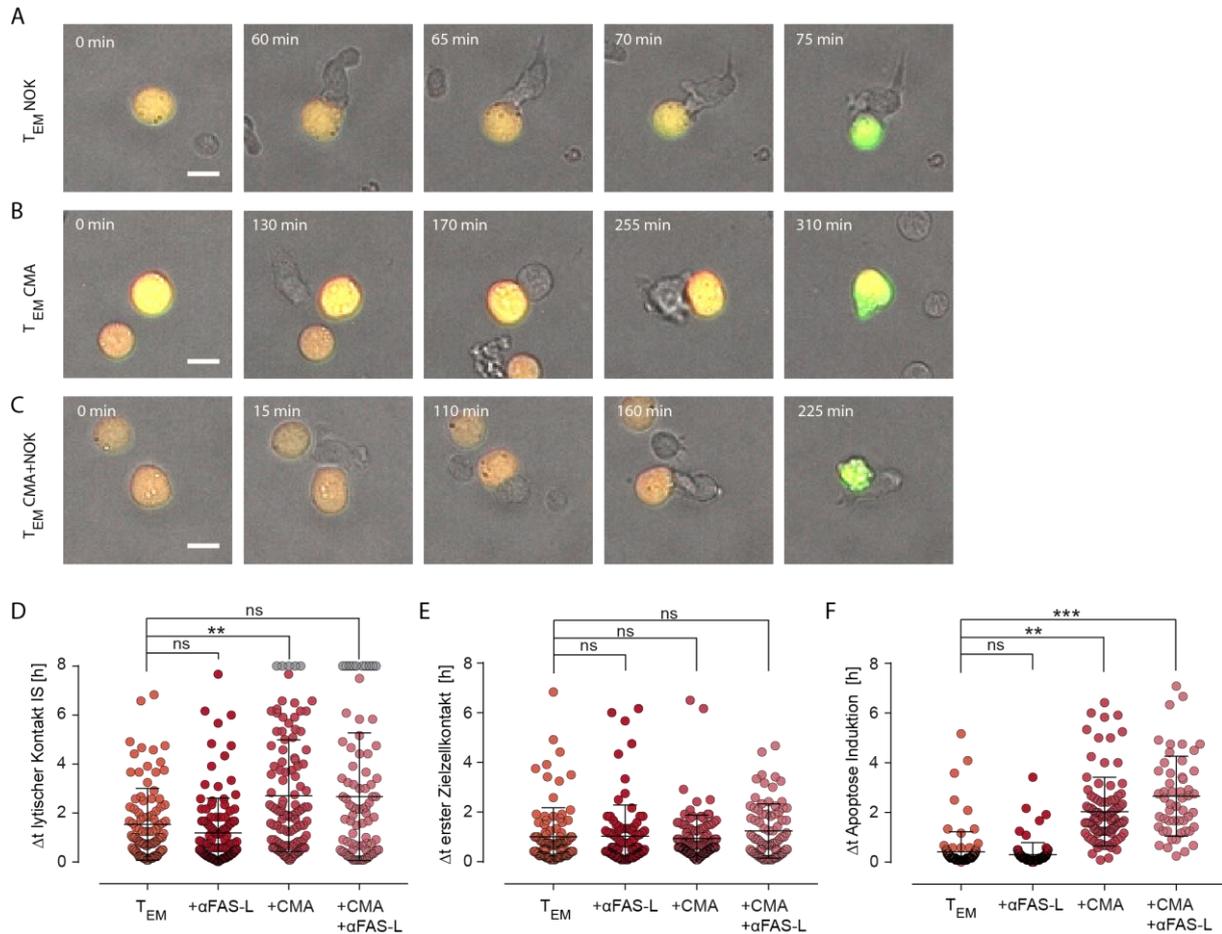


Abbildung 35: Die Behandlung mit CMA verzögert die Bildung von lytischen IS. Vergleich der T-Zell-Aktivität durch manuelles Tracking von T_{EM} -Zielzell-Kontakten unter Einfluss von anti-FAS-L und/oder CMA. A-C) Aufnahmen von repräsentativen T_{EM} -Zielzell-Interaktionen unter Einfluss von anti-FAS-L (A), CMA (B) und CMA + anti-FAS-L (C). D) Darstellung des Zeitraums Δt vom Beginn der Messung bis zur Bildung einer IS die in der Lyse der Zielzelle resultiert. E) Darstellung des Zeitraums Δt vom Beginn der Messung bis zum ersten Kontakt mit einer Zielzelle. F) Darstellung des Zeitraum Δt von der Bildung einer IS bis zum Eintreten der Apoptose der Zielzelle.

Am Beispiel isolierter T_{EM} wird in Abbildung 35 der Einfluss von anti-FAS-L und/oder CMA auf die T-Zellaktivität dargestellt. Es zeigt sich, dass anti-FAS-L keinen signifikanten Einfluss auf den Zeitraum bis zur ersten lytischen IS hat. Tendenziell erscheint dieser sogar verkürzt. Die Behandlung mit CMA (162,4 min) oder mit CMA + anti-FAS-L (160,1 min) verlängert den Zeitraum bis zur Formierung einer lytischen IS um über 1h (CMA $p = 0,0028$; CMA + NOK $p = 0,155$). Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Anteil an Zellen die trotz Kontakt gar nicht lysiert wurden (in grau dargestellt) nach der Behandlung mit CMA + NOK auf 12,5% zunimmt (D). Unabhängig von der Behandlung mit anti-FAS-L und/oder CMA kommt es in allen Bedingungen nach durchschnittlich 60 min zum ersten Kontakt mit einer Zielzelle (E). In F) ist eine signifikante Verlängerung der Apoptose Induktionszeit nach der Inhibierung von Perforin auf 124,6 min bzw. 157,3 min zu erkennen (CMA $p < 0,0001$; CMA + anti-FAS-L $p < 0,0001$). Somit zeigt die manuelle Analyse der T-Zell-Aktivität, dass die Fähigkeit

Ergebnisse

eine Zielzelle zu finden, nicht durch die Behandlung eingeschränkt wird (E). Die Behandlung mit CMA beeinflusst vielmehr die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kontakt zu einer Zielzelle auch in einer erfolgreichen Lyse resultiert. Gelingt es der T-Zelle nicht innerhalb kurzer Zeit, ihre Zielzelle apoptotisch oder nekrotisch zu lysieren, wird der Kontakt zur Zielzelle unterbrochen und die CTL sucht nach einem neuen Ziel.

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Ablauf einer Zielzellyse, stark durch die Effizienz bei der Formierung lytischer Synapsen und bei der Induktion von Apoptosen, beeinflusst wird. Diese Faktoren tragen dazu bei, das gesteigerte zytotoxische Potential von T_{EM} zu erklären.

4 Diskussion

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde das zytotoxische Potenzial von CD8⁺ T-Zell Memory-Subtypen untersucht und eine Spezialisierung in der Verwendung zytotoxischer Mechanismen durch diese Memory-Subtypen beschrieben. Bisher wurden wenig funktionale Untersuchungen zur Verwendung des zytotoxischen Repertoires an Todesrezeptor- oder Perforin-vermittelten Mechanismen durch Memory-Subtypen vorgenommen, obwohl die Signalwege der zytotoxischen Mechanismen bei der Lyse von Zielzellen aufgeklärt und Unterschiede in Ausprägung oder Effizienz der Zytotoxizität von Effektorzellen, Memoryzellen und naiven Zellen seit einigen Jahren in Grundzügen verstanden sind. Im Gegensatz zu den umfassenden durchflusszytometrischen, rein deskriptiven Analysen von T-Zell-Subtypen, ist die funktionale *in vitro* Analyse der Zytotoxizität humaner CTL Subtypen auf keinem vergleichbaren Stand. Daher wurde ein von unserer Arbeitsgruppe im Zeitraum dieser Arbeit entwickelter, mikroskopischer Einzelzell-Killing Assay verwendet, um die zytolytischen Interaktionen von CTL-Subtypen mit Tumorzielzellen durch den FRET-basierten Apoptose-Sensor pCaspaseR-GR zu quantifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte so das zytotoxische Potenzial von T_{EM} und T_{CM} Subtypen charakterisiert werden und die Geschwindigkeit, die Art des Zielzelltodes und die Verwendung zytotoxischer Mechanismen in einem Lyseprofil für beide Subtypen beschrieben werden. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Subtypen in der Lage sind, durch Bindung an die Todesrezeptoren TRAIL und FAS zu töten, der Hauptmechanismus der Zielzelllyse für beide Subtypen jedoch die Perforin-vermittelte Lyse durch die Freisetzung lytischer Granula ist. In Abhängigkeit von der Perforinexpression konnten so durch einen Vergleich der T_{EM} und T_{CM} vermittelten Lyse mechanistische und kinetische Unterschiede nachgewiesen werden. So sind T_{EM} in der Lage, Perforin-vermittelte primäre Nekrosen zu induzieren, während die Zielzellen von T_{CM} ausschließlich apoptotisch lysiert werden. Zur Etablierung des mikroskopischen Einzelzell-Killing Assays wurde ein alternatives Zielzellsystem für SEA-stimulierte CTLs etabliert und die Einzelzell-Killing Analyse CTL-vermittelter Lysen mit funktionalen Analysen auf Populationsebene sowie einer deskriptiven Charakterisierung der Expression von Effektormolekülen kombiniert. Da moderne Tumortherapieansätze, wie der adoptive Zelltransfer und die Therapie mit CAR-T-Zellen, auf der zytotoxischen anti-Tumor Funktion von CD8⁺ T-Zell-Subtypen basieren, ist eine detaillierte Untersuchung des Zusammenspiels und der Regulation zytotoxischer Mechanismen, sowie Optimierung von Analyseverfahren, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Einzelzell-Killing Assays, von großer Bedeutung für die Optimierung dieser Therapiemethoden.

Um die Subtypen-vermittelte Zytotoxizität auf Einzelzellebene analysieren zu können, wurden im ersten Teil der Arbeit verschiedene Arbeitsschritte für die Analyse CTL-vermittelter Lysen erarbeitet. Diese Arbeitsschritte werden im Folgenden diskutiert. Die tatsächliche Untersuchung der Zytotoxizität vereinzelter CTL Memory-Subtypen ist im zweiten Abschnitt der experimentellen Arbeit dargestellt und wird im Anschluss diskutiert.

4.1 Generierung von CD8⁺ Subpopulationen

Das Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit war die Generierung einer aktivierten CD8⁺ T-Zell-Population aus eindeutig identifizierbaren, klar abgegrenzten Subtypen. Diese Subtypen sollte in ausreichender Qualität und Quantität aus dem gewählten Ausgangsmaterial (LRSC) isoliert werden. Um diese Anforderungen zu erfüllen wurden LRSC als Quelle für PBMC verwendet. Die aus LRSC aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen zeigen eine vergleichbare Qualität zu CD8⁺ T-Zellen aus frischem Vollblut (siehe 3.1.1). Gleichzeitig führt die Isolation aus LRSC zu einer deutlich höheren Ausbeute, da die in LRSC vorhandene Zellmenge an PBMCs gegenüber einem vergleichbaren Volumen von Vollblut deutlich erhöht ist (Knörck *et al.*, 2018). In Abschnitt 3.1.2 wurde darüber hinaus die immunmagnetische positive Isolationsmethode aufgrund der höchsten Reinheit sowie zeitlicher und ökonomischer Vorteile für dieses Projekt ausgewählt. Die gewählte positive Isolation von CD8⁺ Zellen ist speziell aufgrund der hohen Reinheit und Effizienz bei der Isolation von Populationen mit geringem Anteil an einer Gesamtpopulation mit großer Zellzahl geeignet (Invitrogen, 2010; Klebanoff, Christopher, Gattoni, Luca, Restifo, 2013; Schwarz *et al.*, 2016). Die Expansion der CD8⁺ T-Zell-Population durch die unspezifische Stimulation mit dem Staphylokokken Enterotoxin A findet vor der Positiv-Isolation statt. Eine unbeabsichtigte Aktivierung der Zellen durch die Isolation über das CD8-Molekül ist daher nicht relevant.

Stimulation und Isolation von CD8⁺ Subpopulationen

Bei der Auswahl der Stimulationsmethode mussten ebenfalls bestimmte Anforderungen, wie eine deutliche Differenzierung von Subtypen, eine Expansion der Zellzahl und eine Aktivierung, die zur Analyse von Zytotoxizität geeignet ist, berücksichtigt werden. Die SEA-Stimulation (Abschnitt 3.1.3) ermöglicht die Analyse der SEA-vermittelten Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen gegen SEA-beladene, MHCII⁺ Zielzellen (Dohlsten *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). Darüber hinaus kommt es während der fünftägigen Expansion zu einer Verschiebung der Subtypenverteilung und starkem Wachstum der T_{CM} Population. Aufgrund der Verfügbarkeit von T_{EM} und T_{CM} nach der unspezifischen SEA-Stimulation von CD8⁺ T-Zellen und der Möglichkeit die Zytotoxizität im SEA-vermittelten System zu analysieren, ist die SEA-Stimulation für die Untersuchung der Zytotoxizität von Memory-Subtypen geeignet.

Die Isolation von Lymphozyten-Subpopulationen aus Überresten der Hämapherese gilt in der Literatur als etabliert (Moog, 2004; Dietz *et al.*, 2006; Néron *et al.*, 2007; Strasser *et al.*, 2007) Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben der Gewinnung von PBMCs aus Buffy-Coats oder LRSCs auch Kompartimente des AMICUS-Systems für die Aufreinigung von PBMC und deren Subpopulationen geeignet sind (Knörck *et al.*, 2018). Die in Abschnitt 3.1.1 zu erkennenden Schwankungen der Anteile von CD8⁺ Zellen aus Kompartimenten des AMICUS Systems verdeutlichen zum einen die große spenderabhängige Varianz des untersuchten Materials. Zum anderen wird durch

Diskussion

die Schwankungen verdeutlicht wie anfällig CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu anderen Subpopulationen sind (De Paoli *et al.*, 1984; Appay *et al.*, 2006). Auch bei dem Vergleich verschiedener Isolationsmethoden in 3.1.2 deuten die größeren Schwankungen der Anteile der CD8⁺ Population auf einen Viabilitätsverlust der CD8⁺ T-Zellen durch die Aufbereitung hin. Eine sorgfältige Auswahl möglichst schonender Arbeitsschritte zur Aufreinigung von CD8⁺ T-Zellen ist daher von besonderer Bedeutung. Geginat *et al.* beschreiben 2003 bei einer Untersuchung des proliferativen Potenzials die Anteile von T_N, T_{CM}, T_{EM} und T_{EMRA} Subtypen am CD8⁺ T-Zell Pool von zehn Spendern. Die angegebenen Werte entsprechen den in dieser Arbeit anhand von 23 Spendern bestimmten Anteilen der CD8⁺ Memory-Subtypen. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Anonymität der gesunden Blutspender keinen Einblick in die Krankheitsgeschichte dieser zulässt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sowohl kurzfristig abgewehrte als auch persistente Infektionen dieser Spender Einfluss auf die Beschaffenheit und Funktion der isolierten Memory-Zellen nehmen (Appay *et al.*, 2002).

Die SEA-Stimulation gilt als Positiv-Kontrolle zur Aktivierung von T-Zellen und erzeugt eine antigen-unspezifische aber dennoch physiologische Aktivierung und Expansion durch Zellkontakte zu autologen antigenpräsentierenden Zellen innerhalb der PBMC-Population (Dohlsten *et al.*, 1990). Die SEA-Stimulation begünstigt die Anreicherung von T_{CM} Zellen, trotzdem finden sich durchschnittlich noch über 10% klar definierter T_{EM} und T_N innerhalb der aktivierten Probe (siehe Abbildung 6). Der Anteil terminal differenzierter T_{EMRA} nimmt durch die SEA-Stimulation deutlich ab. Aus diesem Grund werden T_{EMRA} weitestgehend von Analysen und der Sortierung ausgeschlossen und lediglich in einzelnen Experimenten zum internen Vergleich hinzugezogen. Im Gegensatz zur alternativen Expansion der CD8⁺ T-Zell-Population durch anti-CD3/anti-CD28 beladende Aktivator-Beads ist die SEA-Stimulation physiologischer und ermöglicht eine größere Heterogenität definierter differenzierter Subtypen (siehe Anhang, Poster: Defining highly cytotoxic CD8⁺ T cell subsets by flow cytometry and a real-time cytotoxicity assay). Die physiologischste Form der *in vitro* Expansion CD8⁺ T-Zellen ist die klonale Expansion von antigenspezifischen naiven Zellen. Abhängig vom viralen Peptid differenziert die T-Zell-Population jedoch auch bei dieser Stimulation zu verschiedenen Memory-Subtypen, innerhalb einer Expansion ist die Ausbildung eines Subtyps jedoch homogen und zeigt kein Spektrum verschiedener Subtypen wie die polyklonale Stimulation mit SEA. Die Identifizierung der CD8⁺ Memory-Subtypen T_{EM} und T_{CM} anhand des Homingmoleküls CD62L und des Memory-Markers CD45RO ist im Vergleich zu modernen Ansätzen zur Identifikation diverser Subtypen mit über 15 Markern simpel (Mahnke, Beddall and Roederer, 2012; Wingender and Kronenberg, 2015; Staser *et al.*, 2018). Die in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer sind jedoch aufgrund ihrer Konfiguration auf acht Fluoreszenz-Parameter limitiert. Demnach erlaubt die Verwendung weniger Identifikationsmarker eine parallele Analyse von Effektormolekülen oder eine Identifikation mit alternativen Fluorochromen oder Markern der Subtypen, um beispielsweise die Reinheit nach einem Sortierungsexperiment erneut überprüfen zu können. Anhand der im ersten Abschnitt dargestellten Ergebnisse konnte das LRSC-System als Quelle für PBMCs ausreichender Quantität und Qualität bestätigt werden, und das bereits bestehende Protokoll

der SEA-Stimulation und der immunmagnetischen positiv-Isolation auch für die *in vitro* Expansion von klar identifizierbaren heterogenen CD8⁺ Memory-Subtypen verwendet werden.

4.2 Charakterisierung des zytotoxischen Potenzials der SEA-stimulierten CTL Population

Identifikation SEA-spezifischer CTLs

Nach der Isolation von expandierten CD8⁺ Subtypen aus der SEA-stimulierten PBMC-Population, wurden diese deskriptiv und funktional charakterisiert. Die ermittelte maximale Killingrate von 10%/Intervall bei einer E:T Ratio von 20:1 ist im Vergleich zu NK-Zellen oder antigenspezifischen T-Zellklonen, die in ähnlichen Assays untersucht wurden gering. NK-Zellen oder T-Zellklone erreichen bei deutlich geringeren E:T Ratios (2:1 bis 10:1) höhere maximale Killingraten (Zhou *et al.*, 2018 und Dissertation von Kim Friedmann). Dies ist zum einen durch das hohe zytotoxische Potential dieser Zellen, zum anderen aber auch durch eine hohe Spezifität und Reaktivität gegenüber ihren Zielzellen zu erklären. Bei der Formierung einer IS kommt es zu einer antigenspezifischen Aktivierung der T-Zelle, welche in der Freisetzung von lytischen Granula, von Zytokinen oder in der Oberflächenexpression von Todesrezeptoren resultiert. Die Freisetzung dieser zytotoxischen Moleküle korreliert mit der Oberflächenexpression des Degranulations-Markers CD107a. Durch den parallelen Nachweis SEA-vermittelter Zytotoxizität und der zeitgleichen Hochregulation von CD107 können so aktive CTLs identifiziert werden, die mit SEA-beladenen Zielzellen interagieren (Betts *et al.*, 2003; Alter, Malenfant and Altfeld, 2004; Zaritskaya *et al.*, 2010). So veranschaulicht Abbildung 7 das von unserer Gruppe publizierte lytische Potenzial der SEA-stimulierten CD8⁺ Gesamtpopulation (Bhat *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018) und zeigt mit Hilfe des Degranulations- und Zytotoxizitätsmarkers CD107a, dass etwa 50% der CTLs innerhalb der stimulierten Probe durch den Kontakt zu SEA-beladenen Zielzellen aktiviert werden können. Dieser ursprüngliche Anteil SEA-reaktiver CTLs unterliegt entsprechend der TCR-V β Expression einer spenderabhängigen Varianz (Thomas *et al.*, 2009). Durch die Expansion mit SEA wird nach fünf Tagen eine „Antigen“-Reaktivität von 50% der CD8⁺ T-Zellen erreicht. Dies erreichen aufwändigere antigen-spezifische Stimulationsprotokolle erst nach ungefähr zehn Tagen (Wölfl and Greenberg, 2014).

Expression von Effektormolekülen: Perforin

Die Analyse der Expression von Effektormolekülen wie Perforin oder TRAIL in Memory-Subtypen der stimulierten CTL-Population lässt bereits auf die Zytotoxizität der einzelnen Subtypen schließen. In der Literatur sind T_{CM} und T_{EM} als zytotoxische Zellen mit einer heterogenen Expression von Effektormolekülen beschrieben (Appay *et al.*, 2008; Mahnke *et al.*, 2013; Bengsch *et al.*, 2016; van Aalderen *et al.*, 2017). Der Hintergrund der Generierung sowie die experimentell angewandte Identifikation der Subtypen nimmt dabei Einfluss auf das ermittelte zytotoxische Potential der Subtypen (Iancu *et al.*, 2010). In dieser Arbeit bestätigen sich die in der Literatur formulierten Erwartungen der

Diskussion

Expression von Effektormolekülen in T_{CM} und einer erhöhten Verfügbarkeit von zytotoxischen Molekülen in T_{EM} . Die Subtypen zeigen entsprechend ihres Differenzierungsstatus die höchste Expression von Perforin in terminal differenzierten Effektorzellen (T_{EMRA}). Auch die weniger differenzierten und als schwach zytotoxisch geltenden T_{CM} exprimieren Perforin und tragen ebenfalls zur Zytotoxizität der SEA-stimulierten CTLs bei. Durch die Analyse des Perforingehalts mit zwei anti-Perforin Antikörpern mit Spezifitäten gegen „spätes“ granuläres oder „gesamtes“ Perforin ergibt sich zwischen den Färbungen mit beiden Antikörpern eine zu erwartende Differenz (Hersperger, Makedonas and Betts, 2008). Diese lässt Rückschlüsse auf die Menge an neu synthetisiertem Perforin zu, das noch nicht in lytischen Granula gespeichert ist. Die signifikante Erhöhung dieses neu synthetisierten Anteils in T_{EM} gegenüber T_{CM} lässt zusätzlich zum erhöhten Perforingehalt auf eine stärkere Aktivierung und effizientere Synthese von neuem Perforin schließen. Speziell der Nachschub an neu produziertem Perforin wird als entscheidender Faktor für serielles Killing betrachtet, da er der CTLs über viele Stunden ermöglicht, Zielzellen durch die Freisetzung lytischer Granula über den Perforin-Granzym B-vermittelten Mechanismus zu töten (Hersperger, Makedonas and Betts, 2008; Lopez, Jenkins, Rudd-Schmidt, *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2017). Eine geringere Nachproduktion von Perforin, hätte nur einen geringen Einfluss auf die initiale Zytotoxizität. Nach der initialen Perforin-vermittelten Lyse würde die Zytotoxizität aber rapide abnehmen, da die CTL auf weniger effiziente Lyse-Mechanismen ausweichen müsste. Dieser initiale Verlust von Perforin durch die Freisetzung lytischer Granula und die anschließende Neusynthese durch die aktivierten Zellen wurde in der Perforin-Freisetzungs-Zeitreihe in Abbildung 7 E-G untersucht. Sowohl die Freisetzung als auch die Neusynthese binnen 24 Stunden konnten für die SEA-stimulierte CTL-Gesamtpopulation nachgewiesen werden. Eine Untersuchung in kürzeren Zeitintervallen und in Abhängigkeit einzelner Subtypen wäre bei diesem Experiment interessant.

Expression von Effektormolekülen: Todesrezeptoren

Beide Todesrezeptor-vermittelten Mechanismen haben sowohl eine immunsuppressive und regulatorische Funktion in der Homöostase von T-Zellen als auch eine anti-virale und anti-tumor Funktion bei der Abwehr von Pathogenen (Ashkenazi, Holland and Eckhardt, 2008; Chyuan *et al.*, 2018; Staniek *et al.*, 2019). Abhängig von der Expression von TRAIL kann so auch der Verlauf von Autoimmunerkrankungen beeinflusst werden. Der Verlauf von Autoimmunkrankheiten wie Diabetes (Typ I) oder Arthritis ist so beispielsweise in TRAIL^{-/-} KO-Mäusen oder nach einer Blockierung der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, verstärkt (Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 2003; Falschlehner, Schaefer and Walczak, 2009).

Die Expression von TRAIL auf Memory-Subtypen nach der *in vitro* Stimulation mit SEA könnte sowohl der Abwehr infizierter Zellen dienen, als auch immunmodulatorischer Natur sein. Die Oberflächenexpression des TRAIL-Liganden ist bei T_{EM} und T_{CM} im Gegensatz zu Perforin eher gering. Es ist daher davon auszugehen, dass die TRAIL-vermittelte Zytotoxizität für beide Subtypen eine

Diskussion

untergeordnete Rolle spielt. Da die Populationen beider Subtypen TRAIL⁺ Zellen enthalten, sollten sie prinzipiell TRAIL-Rezeptor exprimierende Zielzellen lysieren können.

Der durchflusszytometrische Nachweis von FAS-L auf der Oberfläche von CTLs konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den verwendeten Antikörpern nicht reproduzierbar durchgeführt werden. Es finden sich wenige Publikationen, in denen es gelang eine schwache Expression von endogenem FAS-L durchflusszytometrisch auf T-Zellen zu detektieren (Bossi and Griffiths, 1999; Voss *et al.*, 2008; Mazar *et al.*, 2009). Daher wird die Expression von FAS-L in humanen Zellen durch eine Kombination verschiedener Methoden wie Mikroskopie, qPCR, CBA (cytometric bead array) oder Westernblot bestimmt. Zusammen mit funktionalen Daten zum zytotoxischen Effekt kann die FAS-L vermittelte Zytotoxizität so auch ohne durchflusszytometrischen Nachweis durchgeführt werden. Kürzlich konnte auf CD107a⁺ NK-Zellen eine Zunahme der Oberflächenexpression von FAS-L nach Kontakt mit Zielzellen nachgewiesen werden (Prager *et al.*, 2019). Die Induktion der Oberflächenexpression von FAS-L könnte den Nachweis auch bei CTLs erleichtern. In der Literatur wird die Anfälligkeit von T-Zell-Subtypen gegenüber FAS-vermittelter Lyse durch andere Immunzellen oder Tumorzellen stärker diskutiert als die Expression von FAS-L auf der Oberfläche aktivierter T-Zell-Subtypen (Na *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2019).

Expression von Effektormolekülen: Zytokine

Die Analyse der Produktion von Zytokinen ist bei der Untersuchung von T-Zell Funktionen von zentraler Bedeutung. So wird anhand der Zytokinproduktion nicht nur der Aktivierungsstatus oder die Spezifität und Intensität einer Immunantwort von CD4⁺ T-Zellen bestimmt, sondern die CD4⁺ Population wird auch anhand von subtypenspezifischen Signaturzytokinen wie IFN, IL-4 oder in IL-17 in die funktionalen Subtypen TH1, TH2 und TH17 unterteilt (Mosmann and Coffman, 1987; Park *et al.*, 2005). Auch wenn CD8⁺ T-Zellen ursprünglich durch ihren Differenzierungsstatus in Subtypen unterteilt werden, kann die Einteilung anhand von Signaturzytokinen auch für die CD8⁺ Population angewendet werden. CD8⁺ T-Zellen mit zytotoxischer Funktion, die IFN- γ und TNF- α produzieren und intrazelluläre Pathogene bekämpfen, werden als TC1-Zellen bezeichnet (Geginat, Lanzavecchia and Sallusto, 2003; Mittrücker, Visekruna and Huber, 2014). Alternative CD8⁺ Subtypen wie TC2 oder TC17 zeigen eine reduzierte Zytotoxizität und werden auch mit pathogenen Funktionen wie Allergien oder der Förderung des Tumorwachstums in Verbindung gebracht (Geginat, Lanzavecchia and Sallusto, 2003; Huber *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012). Der Nachweis der Produktion von IFN- γ bestätigt den TC1 Phänotyp der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zell-Population, darüber hinaus zeigt die Produktion von IFN- γ , dass die Zellen aktiviert und funktional sind. Die Zytokinproduktion von naiven Zellen zeigt, dass der Phänotyp naiver Zellen nach fünf Tagen im Milieu der SEA-Stimulation vermutlich eine unspezifische Aktivierung durch IL-2 und andere Zytokine im Medium bewirkt. Aufgrund der fünftägigen Aktivierung zeigen alle Zellen eine starke Grundaktivierung, die die Analyse der

Zytokinproduktion nach einem kurzfristigen PMA/Ionomycin Stimulus erschwert. Eine Optimierung der Färbung und der Stimulationsbedingungen sind in einem weiterführenden Experiment erforderlich.

Funktionale Charakterisierung der Zytotoxizität

Die funktionale Charakterisierung der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen in dieser Arbeit erfolgte anfangs mit einem Populations-Killing Assay. Ursprünglich begann der Nachweis von Zytotoxizität in den 1960er Jahren mit dem mikroskopischen Nachweis von Apoptosen oder morphologischen Schädigungen von Zielzellen. Erste Ansätze zur Quantifizierung gelangen durch die Verwendung von Radioisotopen wie ³²P-enthaltende Orthophosphate, ¹⁴C-markierten Aminosäuren oder schließlich durch den ⁵¹Cr-release (Freisetzungs-) Assay (Perlmann, Ph and Broberger, 1963; Brunner *et al.*, 1968). In diesen Assays wurden Zielzellen mit dem entsprechenden Radioisotop beladen, um am Ende der Messung die Freisetzung aus getöteten Zellen zu quantifizieren. Der ⁵¹Cr-release Assay wird bis heute als Standardmethode zum Nachweis von CTL-vermittelter Zytotoxizität verwendet (Monel *et al.*, 2019). Aufgrund des großen Nachteils von radioaktiven Proben, wurde der Assay durch Alternativen, wie den LDH-Killing Assay oder durchflusszytometrische Analysen der Aufnahme von PI (Propidiumiodid) und der Lokalisation von Annexin V auf der Zelloberfläche ersetzt (Rae, 1977; Vanden Berghe *et al.*, 2013; Hollville and Martin, 2016). Der von Kummerow *et al.* etablierte Calcein-basierte Populations-Killing Assay ermöglicht im Gegensatz zu den genannten Endpunkt-Assays die Analyse der Zytotoxizität in einer Kinetik. Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung ist es so möglich, die Effizienz der Zielzelllysen in bestimmten Phasen des Killing Assays zu bewerten und langsamere oder schnellere Killer zu identifizieren. Die Analyse von zeitabhängigen Parametern, wie der maximalen Killingrate, ermöglichen die Detektion von Unterschieden, die bei der Betrachtung der Endpunktyse nicht detektiert werden (Kummerow *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Zytotoxizität unter Einfluss verschiedener CMA-Konzentrationen in Abbildung 11A-C zeigt ebenfalls eine partielle Inhibierung durch 10 nM CMA, die bei einer Endpunkt-Analyse nicht detektiert worden wäre.

Populations-Killing Assay: Funktionale Charakterisierung einzelner zytotoxischer Mechanismen

Durch den Populations-Killing Assay konnte in dieser Arbeit die Zytotoxizität der SEA-stimulierten Mischpopulation (aus T_{EM}, T_{CM} und T_N-Subtypen), wie bereits publiziert, bestätigt werden (Bhat *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). Die von Kataoka beschriebene Inhibierung von Perforin wurde bereits mit einer Konzentration von 25 nM CMA erreicht. Um die Lyse durch SEA-stimulierte CTLs zu inhibieren, kann entweder eine Präinkubation mit einer deutlich höheren CMA Konzentration durchgeführt werden, oder eine sanftere Behandlung mit CMA während der Präinkubation und des Assays angewendet werden (Kataoka *et al.*, 1996, 1997; Togashi, Kataoka and Nagai, 1997; Backes *et al.*, 2018). Um die verwendete Konzentration möglichst gering zu halten, aber gleichzeitig sicherstellen zu können, dass auch neu

Diskussion

synthetisiertes Perforin über den Zeitraum der Messung inaktiv bleibt, wurde eine Konzentration von 50 nM CMA während des Assays und zusätzlich in einer zweistündigen Präinkubation appliziert. Kataoka et al. zeigten 1996, dass die CMA-resistente Zytotoxizität von CTLs durch die Applikation mit löslichem sFAS in einem vierstündigen ⁵¹Cr-release Assay inhibiert werden konnte. Somit ist davon auszugehen, dass nach der Inhibierung von Perforin, Todesrezeptor-vermittelte Mechanismen detektiert werden können. Todesrezeptor-vermittelte Lysen können auch durch eine spezifische Inhibierung mittels kompetitiv agierender inhibitorischer Antikörper gegen FAS-L oder TRAIL nachgewiesen werden (Kayagaki, 1996; Ni *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2016). In Abschnitt 3.2.5 gelang dies weder durch die Behandlung mit CMA noch durch eine Inhibierung der Zytotoxizität mittels inhibitorischer Antikörper gegen TRAIL und FAS-L. Somit konnte der Einfluss Todesrezeptor-vermittelter Lysen auf die Gesamtzytotoxizität von CTLs mit Hilfe des Populations-Killing Assays nicht nachgewiesen werden. Verschiedene biologische oder technische Ursachen liefern hierfür eine mögliche Erklärung: Zum einen ist es möglich, dass es zwischen CTL und Zielzelle zu keiner Interaktion von FAS-L und FAS-Rezeptor oder TRAIL und TRAIL-Rezeptor kommt. Eine Mutation der apoptotischen Signalwege und somit eine intrinsische Inhibierung Todesrezeptor-vermittelter Apoptosen ist ebenfalls möglich, auch wenn Raji-Zellen als FAS⁺ beschrieben sind (siehe Abbildung 13) (Nilsson, Ingvarsson and Borrebaeck, 2000; Matou-Nasri *et al.*, 2017). Darüber hinaus ist nicht eindeutig beschrieben, wie effizient die Blockierung der funktionellen Domänen von FAS-L und TRAIL durch die inhibitorischen Antikörper ist. Es besteht also die Möglichkeit einer Restaktivität der blockierten Mechanismen, die verhindert, dass es nach der Behandlung mit inhibitorischen Antikörpern zu einer detektierbaren Abnahme der Zytotoxizität kommt (siehe Abbildung 11 D - F). Am wahrscheinlichsten ist, dass langsame Apoptosen in dem Calcein-basierten Populations-Killing Assay nicht identifiziert werden können. Eine hohe Effektor:Target Ratio von 20:1 oder 10:1 begünstigt in diesen Experimenten die Zielzelllyse durch primäre oder sekundäre Nekrosen, solange Perforin aktiv ist (Kummerow *et al.*, 2014; Backes *et al.*, 2018). Durch die Inhibierung von Perforin ist der Plasmamembran-schädigende Mechanismus ausgeschaltet, wodurch das Auftreten nekrotischer Lysen ausbleibt, während apoptotische Lysen stattfinden sollten. Hassin et al. (2011) beschreiben das Auftreten FAS-induzierter Apoptosen zwei Stunden nach Konjugation von CTL und Zielzelle. In diesen Experimenten wurden Perforin^{-/-} Mäuse und FAS-Rezeptor überexprimierende Zielzellen verwendet, um FAS-vermittelte Lysen nachzuweisen (Hassin *et al.*, 2011). Auch Li *et al.* (2014) und Vrazo *et al.* (2015) können durch einen Lumineszenz-basierten Apoptosereporter, Todesrezeptor-induzierte Apoptosen detektieren und diesen Lysen ein Zeitfenster von 90-120 Minuten zuordnen. Mit Hilfe von inhibitorischen Antikörpern können sie FAS-L vermittelte Lysen darüber hinaus blockieren (Vrazo *et al.*, 2015). Es ist daher davon auszugehen, dass der Calcein-basierte Populations-Killing Assay unter den gewählten Bedingungen keine apoptotischen Lysen detektieren kann. Eine längere Messdauer würde möglicherweise sekundäre Nekrosen detektieren, Calcein-basierte Messungen von über vier Stunden unterliegen aber weiteren

Limitierungen wie dem Verlust der Calcein-Fluoreszenz durch Bleaching oder den aktiven Transport des Farbstoffes aus den Zielzellen.

4.3 Unterscheidung von Nekrosen und Apoptosen

Die Analyse des apoptotischen Zielzelltodes und speziell die Detektion von Apoptosen vor dem Auftreten sekundärer Nekrosen ist für die Untersuchung Subtypen-vermittelter Zytotoxizität durch langsame nicht Perforin-abhängige Mechanismen von großer Bedeutung. Im Rahmen der Arbeit sollte daher ein FRET-basiertes Caspase-3 Reportersystem zum Nachweis von Apoptosen in verschiedenen Zielzellen stabil exprimiert werden. Dies gelang nicht in der für Killing Assays bereits etablierten B-Zell Lymphoma Zielzelllinie Raji. Alternativ wurde die Prä-B Zelllinie NALM-6 mit dem pCaspaseR-Konstrukt transfiziert und in Abschnitt 3.2.6 als Zielzelle für SEA-stimulierte CTLs in Populations- und Einzelzell-Killing Assays etabliert.

4.3.1 Die Analyse von Arten des Zelltodes mit Hilfe des pCaspaseR-basierten Einzelzell-Killing Assays

Bei Populations-basierten Zytotoxizitäts-Assays wie dem ^{51}Cr -release Assay, dem LDH- oder dem Calcein-release Assay (Kummerow *et al.*, 2014) erfolgt die Detektion des Zelltodes in Abhängigkeit von der nekrotischen Zerstörung der Plasmamembran und dem daraus resultierenden Entweichen von ^{51}Cr , LDH oder Calcein aus dem Zellinneren. Weiterentwicklungen dieser Zytotoxizitäts-Assays beruhen auf der zeitlich aufgelösten Detektion von Apoptosen durch den Nachweis der Proteaseaktivität während der Caspase-abhängigen Signalfase in der Zielzelle. Gängige Apoptose-Sensoren setzen sich aus einem fluoreszierenden Reportermolekül und einer Granzym oder Caspase Zielsequenz zusammen. Der in dieser Arbeit verwendete Apoptose-Sensor enthält die Sequenz DEVD und ist somit ein Substrat der Caspasen 3 und 7 (Walsh *et al.*, 2008; Shcherbo *et al.*, 2009). Im Fall einer Proteaseaktivität wird die Bindesequenz geschnitten und es kommt zum Verlust der FRET-Fluoreszenz (siehe 3.2.7). Alternativ zum Nachweis von Apoptosen durch FRET-Reporter Konstrukte (Choi and Mitchison, 2013; Backes *et al.*, 2018) wurde eine Reihe von Proteaseaktivität-Reporter-Systemen entwickelt, die die Detektion von Apoptosen durch zyklische Luciferase, Quenching (Abschrecken, Unterdrückung von Fluoreszenz) oder Änderungen der subzellulären Lokalisation von Fluorophoren ermöglichen (Li *et al.*, 2014; Packard *et al.*, 2014; Liesche *et al.*, 2018).

Durch Umsetzung des Einzelzell-Killing Assays (Backes *et al.*, 2018) können in dieser Arbeit nun auch bei CTL-induzierten Zielzelltoden Apoptosen und Nekrosen unterschieden werden. Wie in 3.2.7 beschrieben, werden Apoptosen durch einen Anstieg der GFP-FRET-Fluoreszenz sowie den Abfall der normierten FRET-Donor-Ratio (FRET/GFP) unter einen Schwellenwert von 0,75 erfasst. Nekrosen werden durch den Verlust jeglicher Fluoreszenz sowie morphologische Merkmale einer Nekrose identifiziert und wie in Abbildung 16 dargestellt, in primäre und sekundäre Nekrosen unterschieden. Mischformen von Apoptose und Nekrose, wie die Nekroptose, wurden in der angewendeten Analyse

nicht berücksichtigt (Zhang *et al.*, 2018). Beobachtungen der zeitgleichen Induktion einer Apoptose und einer primären Nekrose konnten aufgrund der verhältnismäßig niedrigen Zeitauflösung von fünf Minuten und der im Vergleich zu stimulierten NK-Zellen verringerten Zytotoxizität nicht beobachtet werden. Um nekroptotische Mischformen zu detektieren, sollte ein zusätzlicher Marker für Nekrosen, wie beispielsweise PI, verwendet werden. Bisher gibt es keine Daten, die die Sensitivität gegenüber der Caspase-Aktivität des verwendeten FRET-Konstruktes beschreiben. Sowohl eine Abschwächung der Caspase-Aktivität, durch den als Substrat agierenden FRET-Sensor, als auch eine verzögerte Detektion der Caspaseaktivität sind möglich. Es ist davon auszugehen, dass der Umschlag des FRET-Sensors eine höhere Caspase-Aktivität erfordert als Proteine, die als Substrat der Caspase 3 die Apoptose der Zielzelle bewirken. Bei der Detektion von Nekrosen ist ebenfalls mit einer leichten Verzögerung bei der Detektion zu rechnen, da das pCaspaseR FRET-Konstrukt aufgrund seiner Größe langsamer als kleine Moleküle des Zytosols aus der nekrotischen Zielzelle diffundieren. Unsere Gruppe konnte diesbezüglich zeigen, dass Annexin V oder PI schneller in eine nekrotische Zielzelle diffundieren, als das pCaspaseR FRET-Konstrukt diese verlässt (Doktorarbeit Kim Friedmann, Backes *et al.*, 2018). Um den Zeitpunkt des Eintretens einer Nekrose genauer bestimmen zu können, sollte die zeitliche Auflösung verbessert werden und ein zusätzlicher Marker zur Detektion von Nekrosen, wie PI oder FURA-2AM, verwendet werden.

4.3.2 Etablierung von NALM-6 als CTL Zielzellensystem

Die detaillierte Analyse der CTL-vermittelten Zytotoxizität erfordert nicht nur die stabile Expression des pCaspaseR-GR Konstrukts, sondern setzt auch voraus, dass CTLs mit den Zielzellen interagieren können. In Abschnitt 3.2.6 wurde bestätigt, dass NALM-6 Zellen MHC-II exprimieren, mit SEA beladen werden können, im Populations-Killing Assay vergleichbar zu Raji lysiert werden und die Todesrezeptoren FAS-R sowie TRAIL-R2 exprimieren (DSMZ, ACC 128). Der Vergleich von NALM-6 und Raji Zellen als Zielzellen im SEA-vermittelten Killing Assay zeigt trotz der spenderabhängigen Streuung der Zytotoxizität leichte tendenzielle Unterschiede (Abbildung 13 A und D). Diese könnten auf Unterschieden der Expression von Todesrezeptoren beruhen oder durch verschiedene Zellgrößen und damit verbundene Unterschiede in der Beladung mit Calcein ausgelöst werden. Folglich können SEA-stimulierte CTLs NALM-6 als Zielzellen erkennen und sollten sie sowohl FAS- als auch TRAIL-vermittelt lysieren können. In der Literatur wird die Sensitivität von NALM-6 Zellen gegenüber Todesrezeptor-vermittelten Apoptosen kontrovers behandelt. NALM-6 werden als CD95⁻ oder als resistent gegenüber FAS-vermittelten Apoptosen beschrieben (Posovszky *et al.*, 1999; Vassilev *et al.*, 1999; Nilsson, Ingvarsson and Borrebaeck, 2000; Dörrie *et al.*, 2001). Sofern die Induktion der Apoptose untersucht wird, bleibt es in diesen Studien jedoch bei der Induktion durch rekombinanten Apo1-1 Antikörper. Diese entspricht einer Behandlung mit sFAS-L (löslichem FAS-L) und hat vermutlich einen schwächeren zytotoxischen Effekt als trimerisierter, membrangebundener FAS-L (Chávez-Galán *et al.*, 2009). Die Induktion von Apoptosen bei NALM-6 Zellen durch rekombinanten

anti-FAS-L Antikörper ist auch in dieser Arbeit in Abschnitt 3.2.8 kaum nachweisbar. Die spätere funktionale Analyse der Zytotoxizität (Abschnitt 3.3.4) deutet jedoch darauf hin, dass CTLs in der Lage sind NALM-6 Zellen Todesrezeptor-vermittelt zu lysieren.

Etablierung von NALM-6 pCaspER

Die Funktionalität von pCaspER-GR als Apoptose-sensor in NALM-6 Zellen wurde zum einen mit Apoptose-induzierenden Substanzen und zum anderen mit CTLs überprüft. Die Behandlung mit Staurosporin dient als Positivkontrolle, da dieses Caspase-3-vermittelte Apoptosen induziert (Chae *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen verwendeten Konzentration von Staurosporin (20 μ M) treten die Apoptosen schon nach wenigen Stunden auf. Die Detektion der sekundären Nekrose oder abgeschlossenen Lyse der Zielzellen wird durch das Aufplatzen der Zelle und den Verlust der pCaspER-GFP-Fluoreszenz detektiert.

Rekombinantes TRAIL induziert Apoptosen in TRAIL-R1⁺ und R2⁺ Zielzellen und hat bereits vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien gezeigt (Wiley *et al.*, 1995; Trivedi and Mishra, 2015). Die in Abschnitt 3.2.8 verwendete Konzentration von rekombinantem TRAIL (5 μ g/ml) zur Induktion von Apoptosen bei NALM-6 pCaspER Zellen ist höher als die in präklinischen Studien verwendete Konzentrationen von 100 ng/ml - 400 ng/ml oder 30 mg/kg (Jo *et al.*, 2000; Ashkenazi, Holland and Eckhardt, 2008). Da die Behandlung mit rekombinantem TRAIL lediglich dem qualitativen Nachweis der Induktion von Apoptosen bei TRAIL-R2⁺ NALM-6 Zellen dient, erscheint es nicht notwendig, das Experiment mit einer geringeren Konzentration zu wiederholen. Ähnlich wie aufgereinigtes oder rekombinantes TRAIL wurden auch Apoptose-induzierende anti-FAS-R Antikörper bei der Aufklärung des FAS-Signalwege verwendet, um Tumorzellen FAS-vermittelt zu töten (Scaffidi *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Hollville and Martin, 2016). Obwohl eine erhöhte Konzentration des Antikörpers Apo1-1 verwendet wurde, um FAS-vermittelte Apoptosen auszulösen, ist keine signifikante Lyse der verwendeten NALM-6 Zellen detektierbar. Wie bereits diskutiert, zeigen NALM-6 Zellen eine reduzierte Sensibilität gegenüber anti-FAS-R Antikörpern. Trotzdem konnte durch die Messung der Proliferation gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem anti-FAS-R Antikörper das Zellwachstum signifikant reduziert hat. Das deutet darauf hin, dass NALM-6 pCaspER Zellen über einen FAS-vermittelten Mechanismus lysiert werden können. Diese Hypothese konnte in der Analyse der CTL-vermittelten Zytotoxizität nach der Inhibierung von Perforin bestätigt werden. Die signifikante Reduktion von Apoptosen nach vier Stunden durch die Blockierung von FAS-L (Abbildung 18) zeigt, dass ein Teil der CTL-vermittelten Lysen über eine Interaktion von FAS-L - FAS induziert werden. Huang *et al.* beschrieben 1999 eine Verstärkung der Apoptose-induzierenden Wirkung von anti-FAS-R Antikörpern durch eine Aggregation mittels anti-FLAG oder eine Kreuzvernetzung der Antikörper durch Protein A. Vermutlich ist so, ähnlich wie bei membrangebundenem FAS-L, die Trimerisierung des FAS-R und die Formierung des DISC begünstigt.

4.4 Quantifizierung der Zytotoxizität von SEA-stimulierten CTLs im Einzelzell-Killing Assay

Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten NALM-6 pCaspaseR Zielzellensystems für SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen konnte der bisher nicht detektierbare Anteil apoptotischer Lysen untersucht werden. Um aufzuklären ob alle zytotoxischen Mechanismen an der Zielzellyse beteiligt sind, wurden spezifische Inhibitoren dieser Mechanismen verwendet und ihr Effekt dieser auf die Zielzellyse untersucht (3.2.9). So konnte nachgewiesen werden, dass Perforin-vermittelte Lysen den Großteil der Gesamtlysen ausmachen und, aufgrund der schnelleren Lyse-Kinetik, den möglichen zytotoxischen Effekt langsamerer Mechanismen maskieren. Da die Lysekinetiken einzelner zytotoxischer Mechanismen humaner Memory-Subpopulationen bisher nicht beschrieben sind, wurde in dieser Arbeit eine CMA Konzentration von 50 nM verwendet, um Perforin zu inhibieren. Die Analyse im Einzelzell-Killing Assay weist im Gegensatz zu dem Calcein-basierten Populations-Killing Assay, trotz einer drastisch verringerten E:T Ratio, bereits nach vier Stunden in 39 % der Zielzellen Apoptosen nach. Durch eine Kombination von CMA und den jeweiligen Inhibitoren gegen Granzym B, FAS-L und TRAIL wurde der Einfluss der Mechanismen auf die Zytotoxizität SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen untersucht. Durch die Verwendung des spezifischen Granzym B Inhibitors z-AAD-CMK (Gorak-Stolinska *et al.*, 2001) konnte so ausgeschlossen werden, dass nach der Behandlung mit CMA noch eine Restaktivität von Perforin vorliegt, die Granzym B ermöglicht in die Zielzellen einzudringen. So ist davon auszugehen, dass der Mechanismus der lytischen Granula nach der Behandlung mit CMA nicht mehr zur Lyse der Zielzellen beiträgt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der inhibitorischen Antikörper anti-TRAIL und anti-FAS-L die parallele Verwendung von TRAIL- und FAS-Mechanismen nachgewiesen werden. Dies ergänzt Beobachtungen in der Literatur zum Zusammenspiel von Perforin sowie FAS- und TRAIL-vermittelten Lysen (Janssen *et al.*, 2010; Hassin *et al.*, 2011). Die durch TRAIL- oder FAS-Liganden Bindung ausgelösten apoptotischen Signalkaskaden beruhen beide auf der Formierung von DISC und der Aktivierung von Caspase 8 (Prager and Watzl, 2019). Daher ist es schwierig, einzelne Reporter für TRAIL oder FAS- vermittelte Lysen zu entwickeln. Die durchgeführte Inhibierung von zytotoxischen Mechanismen in verschiedenen Kombinationen ist daher ein valider Ansatz, um TRAIL und FAS-vermittelte Lysen nachzuweisen. Die gleichzeitige Kombination aller Inhibitoren verzögert und reduziert die Zytotoxizität zwar drastisch, trotzdem lysieren die behandelten CTLs noch 25% der Zielzellen. Diese verbleibende Restaktivität kann zum einen durch weitere potentielle, nicht näher beschriebene zytotoxischen Mechanismen erklärt werden, zum anderen kann nur schwer bewertet werden, mit welcher Effizienz die Blockierung durch anti-TRAIL und anti-FAS-L Antikörper die jeweiligen zytotoxischen Mechanismen inhibiert. Es ist davon auszugehen, dass die Blockierung durch inhibitorische Antikörper nicht zu einhundert Prozent erfolgt und so eine schwache Restaktivität von TRAIL und FAS-L möglich ist.

4.5 Separation von CD8⁺ Memory Subtypen

In der zweiten Hälfte der experimentellen Arbeit wurde das etablierte System zur Analyse von SEA-vermittelter Zytotoxizität verwendet, um das zytotoxische Potenzial, die Verwendung von zytotoxischen Mechanismen, sowie Geschwindigkeit und Art von CD8⁺ Memory Subtypen zu analysieren. Dazu wurden die Memory Subtypen innerhalb der SEA-stimulierten Mischpopulation durchflusszytometrisch anhand der Marker CD62L und CD45RO in T_{EM} und T_{CM} Populationen sortiert. In weiteren Experimenten wäre die Sortierung spezialisierter Subtypen wie T_{EMRA}, T_{SCM}, T_{RM} sehr interessant. Diese könnten mit Hilfe weniger, zusätzlicher Marker identifiziert und sortiert werden und würden die Untersuchung von Zellen mit stärker polarisierten Phänotypen ermöglichen. Darüber hinaus wäre so die Charakterisierung „neuer“ Subtypen anhand von zusätzlichen Oberflächenmolekülen wie in Gerlach *et al.* (2016) möglich. Eine Analyse dieser Subtypen würde jedoch eine andere Aktivierung und Expansion der Zellen voraussetzen. Da die Analyse der SEA-vermittelten Zytotoxizität für diese Arbeit von großer Bedeutung ist, wurden lediglich die nach der SEA-Stimulation ausreichend verfügbaren T_{EM} und T_{CM} Zellen charakterisiert.

Die sortierten Zellen werden 24 bis 48 Stunden nach der Sortierung verwendet. Die in Abbildung 27 dargestellte Reinheit der vereinzelt Subtypen nach 36 Stunden zeigt, dass es in T_{EM} und T_{CM} zu leichten Verunreinigungen von ungefähr 10% durch den jeweils anderen Subtyp kommt. Auch wenn die Gates für die Sortierung so strikt wie möglich platziert wurden, und die Proben bei einer Kontrolle der Reinheit keine anderen Subtypen enthielten kommt es innerhalb der 48 Stunden nach dem Sort zu einem Zuwachs des jeweils anderen Subtyps. Es scheint als sei für einen kleinen Teil der Zellen im Grenzbereich zwischen T_{EM} und T_{CM} eine Differenzierung in Richtung T_{EM} oder T_{CM} möglich. Eine weitere Erklärung könnten einzelne Fehlsortierungen bei Millionen von einzeln sortierten Zellen sein, die binnen 48 Stunden zu einer detektierbaren Populationsgröße zu differenzieren.

4.6 Analyse der Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} auf Einzelzellebene

Die Charakterisierung und funktionale Analyse der Zytotoxizität der sortierten Subtypen beantwortet der Hauptfragestellung dieser Arbeit. Durch Experimente mit der SEA-stimulierten Mischpopulation konnte funktional nachgewiesen werden, dass sowohl Perforin, Granzyme, Fas-L als auch TRAIL von CD8⁺ Memory-Subtypen verwendet werden und zur Gesamtlyse beitragen. Es war bisher ebenfalls unbekannt, ob die Verwendung einzelner Mechanismen für bestimmte Subtypen spezifisch ist oder inwiefern sich die Zytotoxizität von T_{EM} und T_{CM} bei der Verwendung identischer Mechanismen unterscheidet. Um beispielsweise auszuschließen, dass die Zytotoxizität der Mischpopulation beider Subtypen lediglich auf dem hohen zytotoxischen Potential einzelner T_{EM} beruht, sollten diese Fragestellungen mit der nun zur Verfügung stehenden Einzelzell-Killing Analyse von sortierten T_{EM} und T_{CM} beantwortet werden.

Diskussion

Zusammenfassend bestätigt die deskriptive Charakterisierung der CD8⁺ Population und ihrer Subtypen in den Abschnitten 3.2 und 3.6, dass beide Subtypen ein ausreichendes Repertoire an zytotoxischen Effektormolekülen exprimieren, um Zielzellen töten zu können. Der direkte Vergleich zeigt jedoch, dass T_{EM} sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene eine größere Menge der Effektormoleküle exprimieren. Diese erhöhte Expression an Perforin und Todesrezeptoren erklärt sowohl die höhere Effizienz der Zielzelllyse durch T_{EM} über den Perforin-vermittelten Mechanismus als auch die effizientere Lyse nach der Inhibierung von Perforin.

Lopez *et al.* (2013) und Backes *et al.* (2018) beschreiben den Zusammenhang zwischen der Menge an Perforin und dem Schweregrad der Schädigung der Zielzellmembran. Große Mengen Perforin schädigen die Membran der Zielzelle unmittelbar schwer und induzieren so eine primäre Nekrose, bevor entsprechende Schutz- oder Reparaturmechanismen der Zielzelle einsetzen können, um Schäden in der Zellmembran zu reparieren. Geringe Mengen von Perforin hingegen verursachen nur kurzfristige Läsionen, die Granzymen und Granulysin ermöglichen in die Zielzelle einzudringen. In der Literatur wurde der Einfluss von Perforin auf die Geschwindigkeit einer Zielzelllyse speziell anhand von aktivierten und nicht-aktivierten NK-Zellen beobachtet. Verschiedene Publikationen beschreiben, dass besonders zu Beginn einer *in vitro* Messung schnelle direkt nekrotische Lysen durch Effektorzellen mit großem Perforingehalt ausgelöst werden (Vanherberghen *et al.*, 2013; Prager *et al.*, 2019). Prager *et al.* (2019) weisen darüber hinaus nach der initialen Lyse einer Zielzelle einen Wechsel auf langsamere Mechanismen, Perforin- und Granzym-vermittelte Apoptosen und später Todesrezeptor-vermittelte Apoptosen nach. Die in dieser Arbeit aufgestellte Gliederung des Auftretens und der Geschwindigkeit der zytotoxischen Mechanismen stimmt mit diesen Beschreibungen der Literatur überein (Meiraz *et al.*, 2009; Hassin *et al.*, 2011; Vanherberghen *et al.*, 2013; Prager *et al.*, 2019). T_{EM} und T_{CM} zeigen deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke von Perforin und eignen sich daher als System zur Analyse dieser Fragestellung. Dabei sollte jedoch immer berücksichtigt werden, dass auch die Eigenschaften der Zielzelle großen Einfluss auf die Geschwindigkeit und Art der Zielzelllyse nehmen kann.

Durch den Vergleich der Zytotoxizität beider Subtypen im Populations-Killing und im Einzelzell-Killing Assay, konnte die signifikant erhöhte Zytotoxizität von T_{EM} bestätigt werden (siehe 3.6.1 und 3.7.1). Diese Aussage stimmt mit der Literatur und dem Ergebnis der deskriptiven Quantifizierung von Effektormolekülen auf mRNA- und Protein-Ebene überein. Im Populations-Killing Assay wird speziell innerhalb der ersten 120 Minuten ein Unterschied der Lysekinetiken detektiert (Abbildung 24C und D), dieser beruht höchstwahrscheinlich auf der signifikant erhöhten Expression von Perforin. Bei einer E:T Ratio von 10:1 sind mehrere Effektorzellen in Kontakt mit einer Zielzelle. Wie sich der gleichzeitige Kontakt mehrerer Zielzellen genau auf die Lyse auswirkt ist unklar. Im *in vitro* Kontext dieser Arbeit ist aber davon auszugehen, dass die von mehreren Effektorzellen ausgeschüttete Menge Perforin die Membran der Zielzelle so schwer schädigen sollte, dass es häufiger zu Nekrosen kommt und der zu beobachtende Effekt verstärkt wird.

Diskussion

Die Einzelzell-Killing Analyse der Zytotoxizität von T_{EM} zeigte außerdem, dass diese auch bei einer deutlich reduzierten E:T Ratio (=2:1) in der Lage sind, einen Teil ihrer Zielzellen sehr schnell und effizient durch primäre Nekrosen oder schnelle sekundäre Nekrosen zu lysieren. Sowohl zu der primären nekrotischen Zielzellyse durch CTLs als auch der physiologischen Funktion dieses Lyse-Mechanismus ist bisher wenig bekannt. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob primäre und sekundär nekrotische Lysen, wie sie *in vitro* beschrieben werden, *in vivo* von Bedeutung sind. Es ist davon auszugehen, dass die Detektion dieser Lyseformen *in vitro* stark durch Faktoren wie die Membranbeschaffenheit der Zielzelllinie, den Einfluss von Zytokinen, mechanische Belastung durch andere Zellen u.v.m. beeinflusst werden kann. Theoretisch steigt bei einer sekundären Nekrose mit langer Latenz zwischen Induktion der Apoptose und sekundärer Nekrose die Wahrscheinlichkeit für eine Beseitigung der apoptotischen Zielzelle durch Phagozyten, bevor es zur Freisetzung des Zellinneren durch die Nekrose kommt. Bei viralen Infektionen wäre diese Form der Beseitigung von Zielzellen daher von Vorteil. Im Falle der Bekämpfung von entarteten Zellen oder Tumoren hingegen kann die mögliche Freisetzung immunmodulatorischer Signale, speziell bei der initialen Bekämpfung von entstehenden Tumoren vorteilhaft sein (Berghe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018). Bei der Analyse der Überstände von Killing Assays konnten hohe Mengen IFN- γ nachgewiesen werden, das eine apoptotische Lyse begünstigen soll. Proinflammatorische Zytokine wie IL-6 konnten nach der Zielzellyse nur in sehr geringen Konzentrationen, lediglich an der Nachweisgrenze, detektiert werden. Das spricht dafür, dass CTL-vermittelte primäre Nekrosen als Ausnahme zu betrachten sind und keine besondere physiologische Bedeutung haben. Eine einheitliche Definition von zytotoxischen Lysen inklusive von Mischformen wie Nekroptosen wäre darüber hinaus wichtig, um die Ergebnisse einzelner Studien besser vergleichen zu können und die Bedeutung primärer Nekrosen gänzlich aufzuklären. Der Einfluss anderer zytotoxischer Mechanismen ist schwer zu bewerten, da durch Todesrezeptor-, TNF- α oder IFN- γ induzierte Lysen frühestens nach zwei Stunden detektierbar sein sollten und in dieser Zeitspanne keine signifikanten Unterschiede nachweisbar sind.

Zusammenfassung der Analyse in einem Lyseprofil

Die Verwendung des FRET-basierten Apoptose Sensors pCaspaseR-GR ermöglicht, durch die Detektion von Caspaseaktivität, die Identifikation von Apoptosen. Zusätzlich dient das FRET-Konstrukt auch dem Nachweis von primären oder sekundären Nekrosen, die durch den Verlust von beiden FRET-Fluoreszenzen identifiziert werden. So konnte durch die Analyse der pCaspaseR-GR Fluoreszenz beispielsweise ermittelt werden, wie lange die Induktion von Apoptosen oder sekundären Nekrosen (Apoptosedauer) durchschnittlich dauert (siehe Abbildung 31). Die zusätzliche manuelle Analyse der CTL-Zielzell Interaktion (3.7.4) ermöglicht eine detaillierte Quantifizierung der gesamten Zielzellyse. Dieser Zeitraum der Zielzellyse kann in einzelne Abschnitte unterteilt werden. In Abbildung 36 sind diese schematisch dargestellt.

Diskussion

Die Bestimmung der Dauer dieser Abschnitte fasst die Ergebnisse der funktionalen Charakterisierung von T_{EM} und T_{CM} -vermittelten Zielzellysen zusammen. Als erster Abschnitt der Zielzellyse wurde der Zeitraum, bis es zum Kontakt von CTL und Zielzelle und somit auch zur IS Formierung kommt, definiert. Dieser als Screening bezeichnete Zeitabschnitt (Δt Screening) ist durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Das E:T Verhältnis, das Migrationsverhalten der CTLs sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen können Einfluss auf das Suchverhalten der CTLs nehmen und entscheidend zu der Formierung einer lytischen Synapse beitragen. Da bei der Analyse auch erste Kontakte beobachtet wurden, die nicht zur Formierung einer IS oder einer erfolgreichen Zielzellyse führten, wird zwischen erstem Zellkontakt und Formierung einer lytischen IS unterschieden. Der Zeitraum zwischen der Formation der IS und dem Umschlag des pCaspase-3GR Apoptose Sensors beschreibt den zweiten Abschnitt der Interaktion. Diese Latenz der Apoptose Induktion wird als Δt Apo-Indu bezeichnet und ist ebenfalls von verschiedenen Faktoren abhängig. Der bestimmende Faktor für die Latenz der Apoptose Induktion ist der zytotoxische Mechanismus. Die Konstitution der Zielzelllinie könnte aber ebenfalls Einfluss darauf nehmen, wie schnell in der Zielzelle eine Apoptose induziert werden kann. Die Detektion der Aktivität der terminalen Caspase 3 ist ein spätes Ereignis im molekularen Signalweg der Apoptose. Es findet im Signalweg jedoch trotzdem vor morphologisch sichtbaren Ereignissen wie „Blebbing“, Anschwellen der Zelle und Abschnürung des Kerns, statt. Die Latenz vom Auftreten der Apoptose bis zum Kollaps der Zielzellmembran, der sekundären Nekrose, beschreibt den finalen Abschnitt der Zielzellyse (Δt Apo Latenz). Die physiologische Bedeutung dieser Phase, des „Auflösens“ einer apoptotischen Zelle, sodass zytosolische Bestandteile in den Überstand entweichen können, ist nicht geklärt. Daher ist es schwer, die entscheidenden mechanistischen und physiologischen Faktoren der sekundären Nekrose einzuordnen, die die Dauer dieser Phase bestimmen. Der Grad der Beschädigung der Zielzellmembran durch Perforin und eine mögliche zusätzliche mechanische Belastung durch die CTL oder auch umgebende Zellen zählen vermutlich zu den Faktoren, die Einfluss auf die Latenz sekundärer Nekrosen nehmen.

Diskussion

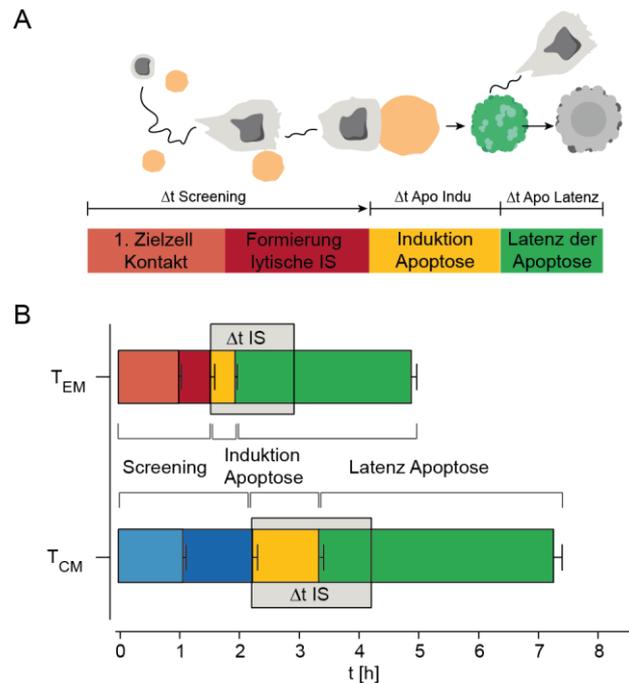


Abbildung 36: Lyseprofil von CD8⁺ T-Zell Memory Subtypen T_{EM} und T_{CM}. A) Darstellung der Abschnitte der Zielzelllyse. B) Übersicht der manuell analysierten Ergebnisse der Zytophagozytose von T_{EM} und T_{CM} gegen NALM-6 pCaspaseR im Einzelzell-Killing Assay. Gestapelte Balkendiagramme stellen die Mittelwerte ± SEM der Dauer eines jeweiligen Abschnitts dar. Δt Screening bis zum ersten Kontakt mit einer Zielzelle für T_{EM} (hellrot) und T_{CM} (hellblau). Δt Screening bis zur Formierung einer lytischen IS für T_{EM} (hell- und dunkelrot) und T_{CM} (hell- und dunkelblau). Δt Apo Indu (gelb) und Δt (siehe A).

Der erste Abschnitt der Zielzelllyse: Screening und IS-Formierung

Aus der Darstellungsform des Lyseprofils in Abbildung 36 wird ersichtlich, wie stark einzelne Abschnitte der Zielzelllyse zu der effizienteren Lyse durch T_{EM} Zellen beitragen. So ist deutlich zu erkennen, dass viele Faktoren zu der langsameren Lyse durch T_{CM} beitragen. Allein im ersten Abschnitt löst die weniger effiziente Formierung von lytischen Synapsen eine Verzögerung der Lysen von durchschnittlich 45 Minuten aus (siehe auch Abbildung 34). Obwohl beide Subtypen nach durchschnittlich eine Stunde in Kontakt zu einer Zielzelle gelangen, bilden T_{CM} mit diesen ersten Zielzellen deutlich weniger lytische Synapsen aus. T_{CM} tendieren dazu, keine stabilen Synapsen mit diesen Zielzellen zu bilden oder nach Minuten bis Stunden erfolglos den Kontakt zur Zielzelle aufzulösen und nach einem neuen Ziel zu suchen. Somit ist nicht das Migrationsverhalten, sondern eher die Formierung von IS eine Ursache für die schnellere Ausbildung lytischer Kontakte durch T_{EM}. Zum einen ist die Ausbildung von IS durch T_{CM} möglicherweise in Abhängigkeit Adhäsionsmolekülen und Zytoskelett-Komponenten, weniger effizient. Zum anderen könnte die schwächere Expression von Effektormolekülen dazu beitragen, dass ein größerer Anteil der ersten Synapsen nicht zur Lyse der Zielzelle führt. Ist eine T_{CM} beispielsweise nicht in der Lage, ihre Zielzelle direkt Perforin-vermittelt zu lysieren, können Stunden vergehen bis FAS-L auf der Oberfläche exprimiert ist und eine ohnehin langsamere Todesrezeptor-vermittelte Lyse induziert werden kann. Ähnliche Beobachtungen machen beispielsweise Prager *et al.* (2019) mit Perforin-defizienten NK-Zellen.

Der zweite Abschnitt der Zielzellyse: Induktion der Apoptose

Auch wenn durch die Behandlung mit CMA gezeigt werden konnte, dass beide Subtypen primär Perforin-vermittelte Lysen verwenden, um Zielzellen zu lysieren, gibt es große Unterschiede in der Effizienz dieser Lysen. So sind auch die Induktion von Apoptosen und die Latenz bis zur sekundären Nekrose bei T_{CM} -vermittelten Lysen gegenüber T_{EM} deutlich verzögert. Auch dieser Unterschied kann durch die schwächere Expression von zytotoxischen Effektormolekülen, primär Perforin, erklärt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Menge an Perforin nicht nur für serielles Killing entscheidend ist, sondern auch starken Einfluss auf den Verlauf einer einzelnen Lyse nimmt. Die Inhibierung der porenformenden Funktion von Perforin durch CMA bestätigt die Notwendigkeit von Perforin für primäre Nekrosen und das Auftreten schneller sekundärer Nekrosen (Abbildung 30 und Abbildung 34). Ungeklärt bleibt, ob primäre Nekrosen nur durch die Freisetzung einer außergewöhnlich großen Menge an Perforin induziert werden, oder ob das Zusammenspiel mit anderen Faktoren, hoch effizienten Killerzellen wie T_{EM} und NK, ermöglicht, primäre Nekrosen zu induzieren oder das Auftreten sekundärer Nekrosen zu beschleunigen. Denkbar wäre beispielsweise der mechanistische Einfluss von unterschiedlich exprimierten Adhäsionsrezeptoren und Komponenten des Zytoskeletts, die die membranzerstörende Wirkung von Perforin auf mechanische Weise potenzieren (Basu *et al.*, 2016). Alternativ könnte auch die Wirkung von Zytokinen den Resistenzmechanismen gegen Perforin-vermittelte Lysen abschwächen. Aufgrund des direkten Auftretens von primären Nekrosen nach der IS Formierung erscheint jedoch zumindest *in vitro* eine Einwirkung langsamerer Mechanismen wie $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ unwahrscheinlich.

Die verringerte Verfügbarkeit von Perforin ist bei der T_{CM} -vermittelten Lyse in allen Abschnitten zu erkennen. Obwohl auch T_{CM} ihre Zielzellen in erster Linie Perforin-vermittelt lysieren zeigt die T_{CM} vermittelte Lyse eine andere, weniger effiziente Kinetik. Dieser Effekt scheint sich über die Abschnitte der Zielzellyse zu potenzieren, da die Formierung einer nicht lytischen IS begünstigt ist, wenn auch die Induktion der Apoptose länger dauert. Die Darstellung des Effektes von CMA auf die „Screening“-Dauer von T_{EM} in Abbildung 35 verdeutlicht dies. Wie bereits diskutiert ist die Bedeutung von sekundären Nekrosen unklar, die durchgeführten Experimente verdeutlichen jedoch deutlich, dass ihr Auftreten an Perforin-vermittelte Lysen gebunden ist.

Mechanistische Unterscheidung von Zielzelllysen

Aufgrund der dominanten Rolle Perforin-vermittelter Nekrosen und Apoptosen an der Memory-Subtypen-vermittelten Gesamtlyse ist davon auszugehen, dass Todesrezeptor-vermittelte Mechanismen nur geringfügig zur schnelleren Lyse Kinetik von T_{EM} beitragen. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert (siehe Abschnitt 4.4), konnte durch die Kombination von spezifischen Inhibitoren einzelner zytotoxischer Mechanismen gezeigt werden, dass sowohl FAS-L- als auch TRAIL-vermittelte Lysen von Relevanz sind, sofern der deutlich schnellere Perforin-basierte Mechanismus ausgeschaltet ist. Die

Diskussion

Literatur beschreibt mit anderen Assays ein ähnliches Zeitfenster von zwei bis drei Stunden für die Latenz der Induktion von Apoptosen durch Todesrezeptor-vermittelte Mechanismen (Meiraz *et al.*, 2009; Vrazo *et al.*, 2015; Prager and Watzl, 2019).

Eine komplette Analyse der CTL-Zielzellinteraktion und Untersuchung von seriellem Killing oder der Gesamtzahl an Zielzellen einer Effektorzelle wie in (Vanherberghen *et al.*, 2013; Prager *et al.*, 2019) war in den Experimenten dieser Arbeit mit einem Zeitintervall von fünf Minuten nicht möglich. In Abhängigkeit von der Anzahl zu untersuchender Bedingungen und Fluoreszenzkanäle kann dieser Zeitraum jedoch bei der Untersuchung weniger Bedingungen auf zwei bis drei Minuten reduziert werden, um ein vollständiges Tracking der Effektorzellen durchführen zu können. Im Vergleich lassen sich bei diesen Studien der Zytotoxizität von NK-Zellen dennoch Parallelen in der Reihenfolge der Verwendung von zytotoxischen Mechanismen erkennen. So ist beispielsweise ein entscheidendes Merkmal von effizienten seriellen Killern die initiale Perforin-vermittelte als „nonapoptosis-like“-bezeichnete primäre Lyse von Zielzellen, der Granzym B-vermittelte und schlussendlich Todesrezeptor-vermittelte Apoptosen folgen. Diese Abfolge konnte in dieser Arbeit auch für Memory-Subtypen-vermittelte Lysen beschrieben werden (3.2.9 und 3.7.1). Darüber hinaus beobachten auch Prager *et al.* (2019), dass FAS-L vermittelte Lysen langsamer ablaufen, und es zu keinen weiteren seriellen Kontakten zu anderen Zielzellen kommt. Die in dieser Arbeit ermittelte Kinetik von Todesrezeptor-vermittelten Lysen passt zu dieser Beobachtung. Denn es kommt nach der für Todesrezeptor-vermittelte Lysen typische Verzögerung zu einer deutlich langsameren Zunahme apoptotischer Zielzellen. Der Vergleich der Kinetik von unbehandelten und CMA-behandelten Zellen in Abbildung 29 verdeutlicht dies.

Unklar bleibt der Einfluss von Granulysin, das von beiden Subtypen bei der Interaktion mit Zielzellen produziert und freigesetzt wird (Abbildung 26). Neben der antimikrobiellen Wirkung beschreiben verschiedene Publikationen auch eine membranschädigende und Apoptose induzierenden Funktion von Granulysin gegenüber Tumorzellen (Saini *et al.*, 2011; Martinez-Lostao *et al.*, 2015). Durch das Kontrollexperiment mit z-AAD-CMK (siehe Abbildung 18) kann jedoch ausgeschlossen werden, dass diese membranschädigende Funktion von Granulysin, nach der Behandlung mit CMA, Perforin ersetzt und Granzymen erlaubt, in die Zielzellen einzudringen.

4.7 Vergleich der semi-automatisierten und manuellen Analyse von Zytotoxizität

Der mikroskopische Nachweis von CTL- oder NK-Zell-induzierter Zytotoxizität wird in einer zeitlich aufgelösten Messung mit Hilfe von Sensoren für Nekrosen (PI-Aufnahme oder Calcein-Verlust) und Apoptosen (fluoreszente Sensoren der Caspaseaktivität) durchgeführt. Diese fluoreszenzbasierte mikroskopische Analyse der Zytotoxizität erfordert ein Tracking (Verfolgen der Spur eine Zelle/Spurbildung) von CTLs und/oder Zielzellen. Es ist möglich, diese Interaktion entweder manuell zu analysieren oder ein automatisiertes softwaregestütztes Tracking durchzuführen. Das automatisierte,

Diskussion

softwaregestützte Tracking unterliegt besonderen Einschränkungen, um fehlerfrei angewendet zu werden. So müssen experimentelle Faktoren wie beispielsweise die verwendete Zelldichte und die zeitliche Auflösung speziell angepasst werden, um die Analyse vollständig automatisiert durchführen zu können. Bei einer zu hohen Zelldichte oder zu geringen zeitlichen Auflösung ist das Tracking der Spuren einzelner Zellen fehlerhaft oder gänzlich unmöglich, da einzelne Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden oder sich die Migrationspfade einzelner Zellen bei Zellkontakten überkreuzen. Ein Mittelmaß an experimentellen Einschränkungen und enormen Aufwand einer manuellen Analyse kann durch ein automatisiertes Tracking mit einer manuellen Korrektur, wie der in dieser Arbeit durchgeführten semi-automatisierten Analyse, erreicht werden. Auch wenn ein automatisiertes Tracking ohne manuelle Korrektur wünschenswert wäre, gelingt eine vollautomatisierte Analyse nur, sofern diese experimentellen Bedingungen berücksichtigt werden, wie beispielsweise bei der Analyse von vereinzelt Zellen in Micro- oder Nanowells, oder auf speziell angefertigten Chips (Hassin *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011; Packard *et al.*, 2014; Vasconcelos *et al.*, 2015).

In den letzten Jahren konnten mechanistische Details zu Wirkweise oder Resistenzen der Perforin-Granzym B-vermittelten Zytotoxizität durch den PI-vermittelten Nachweis der Zielzellyse beschrieben werden (Lopez, Jenkins, Rudd-Schmidt, *et al.*, 2013; Lopez, Jenkins, Whisstock, *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2015; Khazen *et al.*, 2016). In diesen Arbeiten werden CTL-Zielzell-Interaktionen manuell getrackt und beispielsweise der Zeitpunkt des PI-Eintritts in die Zielzelle oder die Dauer der IS von verhältnismäßig wenigen Zellen (10-30) analysiert und in Einzelzellstatistiken quantifiziert. Publikationen die ähnlich wie in dieser Arbeit apoptotischen Zielzellysen durch den Nachweis der Aktivität von Caspasen oder Granzym-B untersuchen, verwenden manuelle oder manuell korrigierten Analysen (Choi and Mitchison, 2013; Backes *et al.*, 2018; Liesche *et al.*, 2018).

Mit dem verwendeten Einzelzell-Killing Assay gewonnene FRET-Fluoreszenz Daten von pCasperR exprimierenden Zielzellen, wurden sowohl automatisiert (3.2.8, 3.2.9 und 3.7.2) als auch manuell (3.7.1 und 3.7.4) analysiert, um die Zielzellyse zu quantifizieren. Beide Analyseverfahren sind mit verschiedenen Vor- und Nachteilen verbunden. Wie in Abschnitt 3.7.1 zu erkennen ist, werden durch die manuelle Analyse zusätzliche wertvolle Informationen gewonnen. Zu diesen zählen der Nachweis primärer Nekrosen oder die genaue Bestimmung von Zeitfenstern der Zielzellyse für jede einzelne Zelle, wie Induktions- oder Latenzzeit der Apoptose. Ein Nachteil des manuellen Trackings von Zielzellen oder CTLs über jeden Zeitpunkt der Messung sind ein enormer zusätzlicher Zeitaufwand bei der Analyse. Am Beispiel des in 3.7 analysierten Datensatzes lässt sich der Zeitgewinn der semi-automatisierten Analyse abschätzen. Im Optimalfall wird für die manuelle Analyse schätzungsweise die zehnfache Zeit benötigt (manuell ca. 200 Stunden, semi-automatisiert 15-20 Stunden). Abhängig von der Zellzahl, der Anzahl an untersuchten Bedingungen und dem Migrationsverhalten der Zellen ist der Zeitaufwand einer manuellen Analyse daher so hoch, dass diese nicht mehr durchführbar ist. Da der verwendete Einzelzell-Killing Assay im 96-Well Plattenformat durchgeführt wird, liegt ein großer

Diskussion

Vorteil gegenüber anderen mikroskopischen Analysen in der hohen Anzahl an verfügbaren Wells, die in Screening Ansätzen mit vielen Bedingungen und biologischen sowie technischen Replikaten untersucht werden können. Für diese Untersuchungen ist eine schnellere Alternative, wie die in dieser Arbeit verwendete semi-automatisierte Analyse unerlässlich. Darüber hinaus wäre es bei einer alleinigen manuellen Analyse von hunderten von Zellen nicht möglich, Fehler beim Tracking oder eine subjektive Beeinflussung durch den Experimentator auszuschließen. Wie in Abschnitt 3.7.3 dargestellt wurde, kann die automatisierte Analyse verwendet werden, um Ergebnisse der manuellen Analyse zu verifizieren.

Im Gegensatz zu der manuellen wird bei der semi-automatisierten Analyse kein Einzelzell-Tracking über jeden Zeitpunkt durchgeführt. Dadurch gehen Informationen, die eine Verknüpfung der Signale einer Zelle über mehrere Zeitpunkte voraussetzen, verloren. Bei der semi-automatisierten Analyse werden für jeden einzelnen Zeitpunkt Zielzellen anhand ihres FRET-GFP Signals detektiert. Aus der Summe der analysierten Einzelzell-Fluoreszenzen der jeweiligen Zeitpunkte ergibt sich über den gesamten Messzeitraum eine Populationskinetik der Zielzellyse (Abbildung 32A), die mit den Zelltod-Plots der manuellen Analyse weitestgehend vergleichbar ist (Abbildung 28). Der Anteil lebender und apoptotischer Zielzellen wird im automatisierten Tracking direkt durch die Analyse des pCaspase-Signals quantifiziert. Die Detektion nekrotischer Zellen hingegen erfolgt indirekt, da die Nekrose mit dem Verlust der FRET-Fluoreszenz einhergeht und die nekrotische Zielzelle so nicht mehr automatisiert erfasst werden kann. Der Anteil vollständig lysierter, also primär oder sekundär nekrotischer Zielzellen wird daher indirekt anhand der Differenz lebender apoptotischer Zellen zu der initialen Zielzellenzahl ermittelt. Basierend darauf kommt es bei der semi-automatisierten Analyse zu Analyseartefakten, wie dem geringfügig reduzierten Anteil an Nekrosen (siehe Abbildung 33). Apoptotische Zellen, die den aufgenommenen Bildausschnitt eines Wells verlassen, werden in dieser Analyse als tot erfasst. Da davon auszugehen ist, dass Zielzellen den Bildausschnitt in gleichem Maße betreten wie verlassen, ist trotzdem eine Detektion des Anteils nekrotischer Zielzellen möglich. Dieser Nachteil wird durch manuelles Tracking ausgeschlossen, da eine Zelle von Beginn der Messung bis zu ihrer Nekrose verfolgt wird. Verlässt eine Zelle vorher den Bildausschnitt, wird sie aus der Analyse ausgeschlossen. Diese strikte Vorgabe birgt ebenfalls die Gefahr Analyseartefakte zu verursachen, da so eine Selektion von Zellen, die innerhalb des Ausschnitts verbleiben, stattfindet. Sofern der präzise Nachweis einzelner Interaktionen nicht nötig ist, ist die in dieser Arbeit verwendete semi-automatisierte Analyse ausreichend, um eine Populationskinetik der Zielzellyse zu erstellen (Backes *et al.*, 2018).

Durch die Verwendung beider Analyseverfahren war es möglich sowohl die semi-automatisierte als auch die manuelle Analyse mit Hilfe des jeweils anderen Verfahrens zu verifizieren. So kann zum einen der subjektive Einfluss des Experimentators ausgeschlossen werden und der Einfluss von Analyseartefakten auf das Ergebnis der automatisierten Analyse besser bewertet werden. Eine Optimierung des Assays und der automatisierten Analyse birgt ein großes Potenzial für die

Diskussion

Untersuchung von Zytotoxizität und anderen Immunzellinteraktionen. Eine Weiterentwicklung des Assays könnte daher in Zukunft sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Diagnostik und Immunzelltherapie Anwendung finden, um beispielsweise die Effizienz einer Therapie mit modifizierten T-Zellen vorherzusagen und diese zu optimieren.

5 Appendix

5.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englisch	deutsch
ACT	adoptive cell transfer	Adoptiver Zell Transfer
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APC	Allophycocyanin	Allophycocyanin
BID	BH3 interacting-domain death agonist	BH3- Interaktionsdomänen Todes Agonist
BSA	bovine serum albumin	Bovines Kälber-Serum
CAR	chimeric antigen receptor	Chimärer Antigenrezeptor
CBA	cytometric bead array	Zytometrischer Nachweis von Zytokinen
CD	cluster of differentiation	Differenzierungsgruppen
CMV	Cytomegalovirus	Cytomegalievirus
CRAC	calcium release activated calcium	Calcium-Einstrom aktiviert durch Calcium Freisetzung
DAMP	damage-associated molecular patterns	Schaden-assoziierte molekulare Strukturen
DC	dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated death domain	Fas-assoziierte Todesdomäne
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälber-Serum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
GzB	Granzyme B	Granzym B
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

Appendix

HEV	high endothelial venule	hochendotheliale Venole
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated DNase	Inhibitor Caspase-aktivierter DNase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon γ	Interferon γ
IL	interleukin	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LCK	lymphocyte -specific protein tyrosine kinase	Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1	Lymphozyten Funktions-assoziiertes Antigen 1
MACPF	Membrane Attack Complex/Perforin	Membran Angriffs Komplex Perforin
MHC	major histocompatibility complex	Histokompatibilitätskomplex
miRNA	microRNA	MicroRNA
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization	Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
MPEC	memory precursor effector cell	Memory Vorläufer Effektorzelle
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF- κ B	Nuclear factor- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK	natural killer	Natürliche Killer
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PHA	phytohemagglutinin	Phytohämagglutinin
PLC γ	phospholipase C γ	Phospholipase C γ
PRF1	Perforin	Perforin
RT	room temperature	Raumtemperatur
ROI	region of interest	zu untersuchende Region
SD	standard deviation	Standardabweichung
SEA	staphylococcal enterotoxin A	Staphylokokken-Enterotoxin-A

Appendix

SERCA	sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase	Sarkoplasmatische/ endoplasmatische Calcium ATPase
SLEC	short lived effector cell	kurzlebige Effektorzelle
SMAC	supramolecular activation cluster	Supramolekularer Adhäsionskomplex
SOCE	store operated calcium entry	Speichergesteuerter Kalzium-Einstrom
STIM	stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
TCR	T cell receptor	T-Zell-Rezeptor
TMHR	Trans membrane helical region	trans membran helicalen regionen
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TCM	central memory T cell	Central-Memory T-Zelle
TEM	effector memory T cell	Effektor-Memory T-Zelle
TEMRA	terminal differentiated CD45RA ⁺ effector memory T cell	Terminal differenzierte CD45RA ⁺ Effektor-Memory T-Zelle
TN	naïve T cell	naïve T-Zelle
TRM	resident memory T cell	Gewebs-residente Memory T-Zelle
TSCM	stem cell-like memory T cell	Stammzellartige Memory T-Zelle

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten durchflusszytometrischen Antikörper	- 24 -
Tabelle 2: Liste der verwendeten stimulatorischen oder inhibitorischen Antikörper	- 25 -
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien	- 25 -
Tabelle 4: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer	- 28 -
Tabelle 5: Liste verwendeter qPCR Primer	- 28 -
Tabelle 6: Liste verwendeter Primer unter Angabe des Herstellers und der Bestellnummer	- 28 -
Tabelle 7: Liste der wesentlichen Komponenten im ImageXpress Micro XLS System.....	- 29 -
Tabelle 8: Liste der wesentlichen Komponenten im TILL Photonics System	- 29 -
Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte	- 29 -
Tabelle 10: Liste der verwendeten Kits	- 30 -
Tabelle 11: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials	- 30 -
Tabelle 12: Liste der verwendeten Zelllinien unter Angabe der Bezugsquelle	- 31 -
Tabelle 13: Liste der verwendeten Software	- 32 -
Tabelle 14: Calcium-readdition-Protokoll	- 34 -
Tabelle 15: PBMC-Subpopulationen Panel.....	- 37 -

Appendix

Tabelle 16: CD8 Panel 1.	- 37 -
Tabelle 17: CD8 Panel 2.	- 38 -
Tabelle 18: CD8 Panel 3.	- 38 -

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phänotypische Einteilung von CD8 ⁺ T-Zellen	- 13 -
Abbildung 2: Differenzierungsstatus und funktionale Kapazität von CD8 ⁺ Subtypen	- 14 -
Abbildung 3: Zytotoxische Mechanismen CD8 ⁺ T-Zellen.	- 18 -
Abbildung 4: Subtypenzusammensetzung von PBMCs	- 45 -
Abbildung 5: Vergleich der Reinheit	- 46 -
Abbildung 6: Expansion von CD8 ⁺ T-Zellen	- 48 -
Abbildung 7: Zytotoxizität SEA-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen	- 49 -
Abbildung 8: Analyse der Perforinspeicher	- 51 -
Abbildung 9: CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen exprimieren den Trail Liganden	- 52 -
Abbildung 10: Nachweis von funktionellen Subpopulationen TC1, TC2 und TC17	- 53 -
Abbildung 11: Zytotoxizität SEA-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen	- 56 -
Abbildung 12: HLA-DR Expression und Präsentation von SEA	- 57 -
Abbildung 13: Zytotoxizität von SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen gegen NALM-6 Zellen	- 58 -
Abbildung 14: FAS-R und TRAIL Expression	- 59 -
Abbildung 15: pCaspase-GR wird homogen von vitalen NALM-6 Zellen exprimiert	- 60 -
Abbildung 16: Identifikation von Arten des Zelltodes.	- 62 -
Abbildung 17: Detektion von Apoptosen in NALM-6 pCasper Zellen	- 64 -
Abbildung 18: Todesrezeptor-vermittelte Lyse-Mechanismen	- 68 -
Abbildung 19: Schema der Generierung und Isolation von CD8 ⁺ T _{EM} und T _{CM} Subtypen.	- 70 -
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Sortierung von T _{EM} und T _{CM}	- 72 -
Abbildung 21: Calcium-Signale in CD8 ⁺ T-Zell-Subtypen.	- 74 -
Abbildung 22: Expression von Stim und Orai auf mRNA Ebene in Subtypen	- 74 -
Abbildung 23: Die Calcium-abhängige Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen.	- 75 -
Abbildung 24: SEA-stimulierte CD8 ⁺ T _{EM} zeigen ein gesteigertes zytotoxisches Potential.	- 77 -
Abbildung 25: Subtypenabhängige Expression von Effektormolekülen	- 78 -
Abbildung 26: Sekretion von Effektormolekülen durch T _{EM} und T _{CM}	- 79 -
Abbildung 27: Expression von Perforin in gesorteten T _{EM} , T _{CM} und T _N .	- 81 -
Abbildung 28: Zelltod-Plots der Subtypen-vermittelten Lyse.	- 82 -
Abbildung 29: Manuelle Analyse Zytotoxizität von T _{EM} und T _{CM} auf Einzelzellebene.	- 84 -
Abbildung 30: Primäre und sekundäre Nekrosen sind von Perforin abhängig.	- 86 -
Abbildung 31: T _{EM} und T _{CM} induzieren mittels FAS-L Apoptosen.	- 87 -
Abbildung 32: Die Lyse-Mechanismen von T _{EM} und T _{CM} sind Perforin vermittelt	- 90 -
Abbildung 33: Der direkte Vergleich der automatisierten und der manuellen Analyse	- 91 -
Abbildung 34: T _{EM} bilden effizienter immunologische Synapsen.	- 92 -
Abbildung 35: Die Behandlung mit CMA verzögert die Bildung von lytischen IS.	- 93 -
Abbildung 36: Lyseprofil von CD8 ⁺ T-Zell Memory Subtypen T _{EM} und T _{CM} .	- 111 -

5.4 Anhänge

Defining highly cytotoxic CD8⁺ T cell subsets by flow cytometry and a real-time cytotoxicity assay



Arne Knörck, K. Friedmann, M. Hoth, E.C. Schwarz
University of Saarland, Biophysics, Homburg



Abstract:

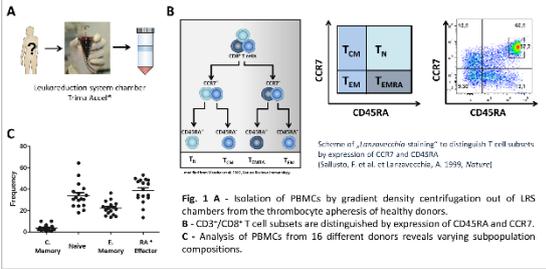
Introduction: Cytotoxic T lymphocytes (CTL) provide protection against pathogenic microorganisms and cancer by elimination of both, virus infected and malignant cells. Following antigen recognition CTLs undergo differentiation into various subtypes of effector and memory T cells. In vitro stimulation of CTL generates a variable composition of effector and memory cells, which can vary in their phenotype and cytotoxic potential. Perforin, granzyme B, KLRG1 and CD107a were used to define, out of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), a CD3⁺ CD8⁺ CD27^{hi}, CD45RA population that displays a high cytotoxic potential.

Material and Methods: CD8⁺ T cells were isolated out of PBMC from healthy donors by CD8 untouched purification. CD8⁺ T cell subsets were defined by multicolor flow cytometry following stimulation either by anti CD3/anti-CD28 coated beads, Staphylococcus aureus enterotoxin A (SEA) or by pp65 peptide-specific antigens. The cytotoxic potential was analyzed using a time-resolved population based killing assay.

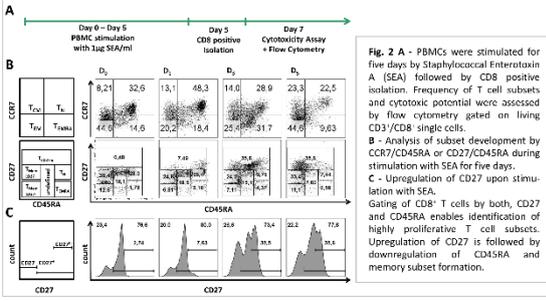
Results: So far the analysis of PBMCs from healthy donors revealed varying subpopulation compositions of effector, effector-memory, central-memory and naïve CD8⁺ T cells possibly due to the different immune experiences. The stimulation of CD8⁺ T cells by SEA generated a large pool of the effector-memory subpopulation, which revealed efficient cytotoxicity in the real-time killing assay.

Conclusion and outlook: We use our antibody panel to define a subpopulation with a preferably high cytotoxic potential which will be verified by the real-time killing assay. In addition to the already established stimulation methods, we will optimize different parameter as for example the variation of extracellular [Ca²⁺].

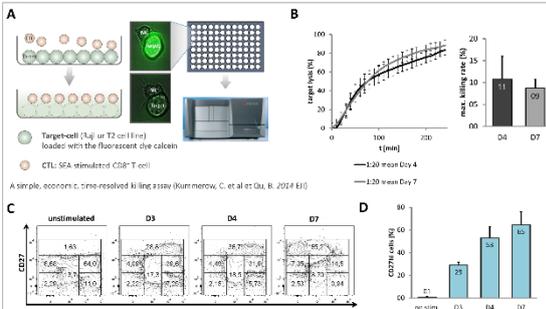
Outline of Experiment:



SEA stimulation of PBMCs

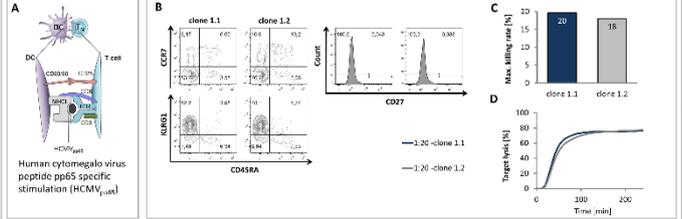


Cytotoxicity of SEA-stimulated CD8⁺ T cells

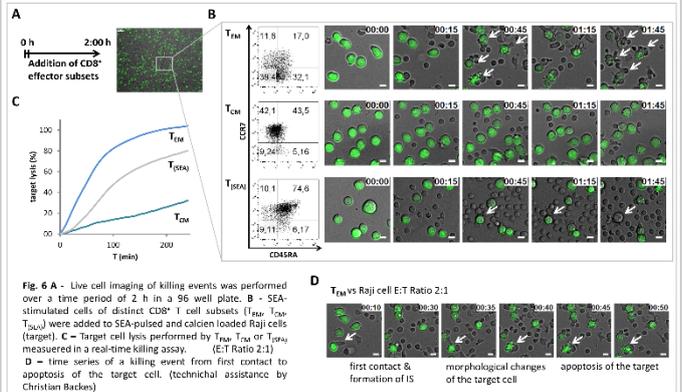
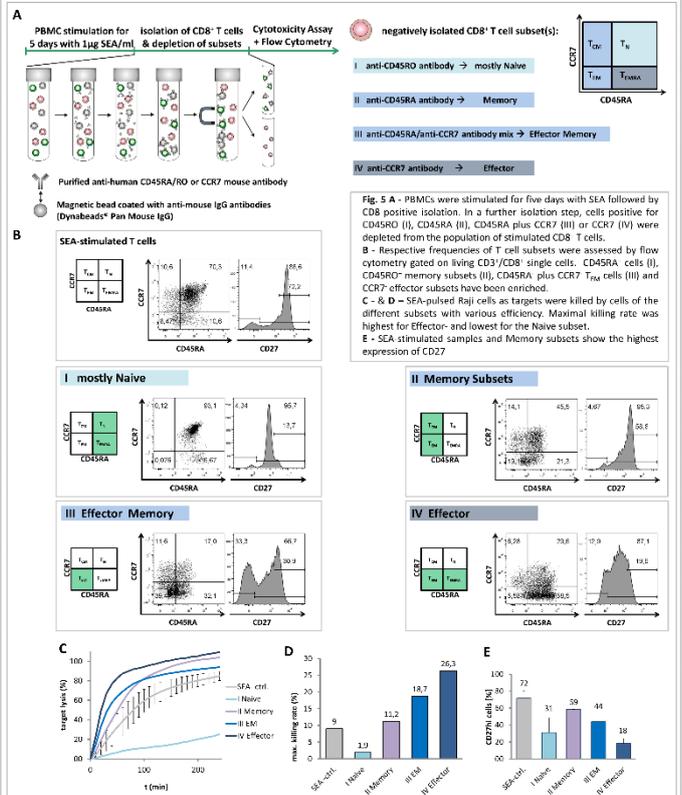


Contact: arne.knoerck@uni-saarland.de

Cytotoxicity of HCMV-specific expanded T-cells clones



Depletion of distinct subsets to increase cytotoxicity of SEA-stimulated CD8⁺ T cells



5.5 Literaturverzeichnis

van Aalderen, M. C. *et al.* (2017) 'Label-free Analysis of CD8+T Cell Subset Proteomes Supports a Progressive Differentiation Model of Human-Virus-Specific T Cells', *Cell Reports*, 19(5), pp. 1068–1079. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.014.

Acha-Orbea, H. *et al.* (1990) 'Inhibition of lymphocyte mediated cytotoxicity by perforin antisense oligonucleotides.', *The EMBO Journal*, 9(12), pp. 3815–3819. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07599.x.

Ahmed, R. and Gray, D. (1996) 'Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation', *Science*, 272(April), pp. 54–61.

Akbar, a N. *et al.* (1988) 'Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), pp. 2171–2178.

Alter, G., Malenfant, J. M. and Altfeld, M. (2004) 'CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity', *Journal of Immunological Methods*, 294(1–2), pp. 15–22. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008.

Apetoh, L. *et al.* (2015) 'Consensus nomenclature for CD8 + T cell phenotypes in cancer', *Oncolmmunology*, 4(4), p. e998538. doi: 10.1080/2162402X.2014.998538.

Appay, V. *et al.* (2002) 'Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections', *Nature Medicine*, 8(4), pp. 379–385. doi: 10.1038/nm0402-379.

Appay, V. *et al.* (2006) 'Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples', *Journal of Immunological Methods*, 309(1–2), pp. 192–199. doi: 10.1016/j.jim.2005.11.007.

Appay, V. *et al.* (2008) 'Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues', *Cytometry Part A*, 73(11), pp. 975–983. doi: 10.1002/cyto.a.20643.

Ashkenazi, A., Holland, P. and Eckhardt, S. G. (2008) 'Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: The potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)', *Journal of Clinical Oncology*, 26(21), pp. 3621–3630. doi: 10.1200/JCO.2007.15.7198.

Backes, C. S. *et al.* (2018) 'Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms', *Journal of Biological Chemistry*, 293(42), pp. 16348–16363. doi: 10.1074/jbc.RA118.004549.

Badovinac, V. P., Haring, J. S. and Harty, J. T. (2007) 'Initial T Cell Receptor Transgenic Cell Precursor Frequency Dictates Critical Aspects of the CD8+ T Cell Response to Infection', *Immunity*, 26(6), pp. 827–841. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.013.

Badovinac, V. P., Porter, B. B. and Harty, J. T. (2002) 'Programmed contraction of cd8+ t cells after infection', *Nature Immunology*, 3(7), pp. 619–626. doi: 10.1038/ni804.

Appendix

- Basu, R. *et al.* (2016) 'Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing', *Cell*. Elsevier Inc., 165(1), pp. 100–110. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.021.
- Bendall, S. C. *et al.* (2012) 'A deep profiler's guide to cytometry', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 33(7), pp. 323–332. doi: 10.1016/j.it.2012.02.010.
- Bensch, B. *et al.* (2016) 'Deep immune profiling by mass cytometry links human T and NK cell differentiation and cytotoxic molecule expression patterns', *Journal of Immunological Methods*. The Authors, 453, pp. 3–10. doi: 10.1016/j.jim.2017.03.009.
- Benmebarek, M. R. *et al.* (2019) 'Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells', *International journal of molecular sciences*, 20(6). doi: 10.3390/ijms20061283.
- Berghe, T. Vanden *et al.* (2010) 'Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 17(6), pp. 922–930. doi: 10.1038/cdd.2009.184.
- Vanden Berghe, T. *et al.* (2013) 'Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo', *Methods*. Elsevier Inc., 61(2), pp. 117–129. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
- Betts, M. R. *et al.* (2003) 'Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation', *Journal of Immunological Methods*, 281(1–2), pp. 65–78. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00265-5.
- Bhat, S. S. *et al.* (2016) 'Syntaxin 8 is required for efficient lytic granule trafficking in cytotoxic T lymphocytes', *Biochimica et biophysica acta*, 1863(7 Pt A), pp. 1653–1664. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.014.
- Bjornson, Z. B., Nolan, G. P. and Fantl, W. J. (2013) 'Single Cell Mass Cytometry for Analysis of Immune System Functional States', *Curr Opin Immunol.*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Blok, E. J. *et al.* (2017) 'Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8 + tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer', *Oncotarget*, 8(9), pp. 15610–15620.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) *Pathways of Antigen Processing Janice*. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.Pathways.
- Bossi, G. and Griffiths, G. M. (1999) 'Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells', *Nature Medicine*, 5(1), pp. 90–96. doi: 10.1038/4779.
- Brunner, K. T. *et al.* (1968) 'Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.', *Immunology*, 14(2), pp. 181–96.
- Available at:
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4966657><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi>

Appendix

?artid=PMC1409286.

Buchholz, V. R., Schumacher, T. N. M. and Busch, D. H. (2016) 'T Cell Fate at the Single-Cell Level', *Annual Review of Immunology*, 34(1), pp. 65–92. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112014.

Bueno, C. *et al.* (2007) 'T Cell Signalling Induced by Bacterial Superantigens', 93, pp. 161–180.

Busch, D. H. *et al.* (2016) 'Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy', *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd, 28(1), pp. 28–34. doi: 10.1016/j.smim.2016.02.001.

Busch, D. H. and Pamer, E. G. (1999) 'T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection', *Immunology Letters*, 65(1–2), pp. 93–98. doi: 10.1016/S0165-2478(98)00130-8.

Cerottini, J. C., Nordin, A. A. and Brunner, K. T. (1970) 'Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens', *Nature*, 228(5278), pp. 1308–1309. doi: 10.1038/2281308a0.

Chae, H. J. *et al.* (2000) 'Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts', *Pharmacological Research*, 42(4), pp. 373–381. doi: 10.1006/phrs.2000.0700.

Chang, J. T. *et al.* (2007) 'Asymmetric T Lymphocyte Adaptive Immune Responses', *Science (New York, N.Y.)*, 315(March), pp. 1687–1691.

Chávez-Galán, L. *et al.* (2009) 'Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes', *Cellular and Molecular Immunology*, 6(1), pp. 15–25. doi: 10.1038/cmi.2009.3.

Choi, P. J. and Mitchison, T. J. (2013) 'Imaging burst kinetics and spatial coordination during serial killing by single natural killer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), pp. 6488–6493. doi: 10.1073/pnas.1221312110.

Chyuan, I. T. *et al.* (2018) 'TRAIL-mediated suppression of T cell receptor signaling inhibits T cell activation and inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Frontiers in Immunology*, 9(JAN), pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2018.00015.

Dietz, A. B. *et al.* (2006) 'A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers', *Transfusion*, 46(12), pp. 2083–2089. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.01033.x.

Dohlsten, M. *et al.* (1990) 'Targeting of human cytotoxic T lymphocytes to MHC class II-expressing cells by staphylococcal enterotoxins', pp. 96–100.

Dörrie, J. *et al.* (2001) 'Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells', *Cancer Research*, 61(12), pp. 4731–4739.

Dourmashkin, R. *et al.* (1980) 'Electron microscopic demonstration of lesions in target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity.', *Clinical and experimental immunology*, 42, pp. 554–560. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1537145/>.

Appendix

- Fadok, V. A. *et al.* (1992) 'Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), pp. 2207–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545126>.
- Falschlehner, C., Schaefer, U. and Walczak, H. (2009) 'Following TRAIL's path in the immune system', *Immunology*, 127(2), pp. 145–154. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03058.x.
- Farber, D. L., Yudanin, N. a and Restifo, N. P. (2014) 'Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 14(1), pp. 24–35. doi: 10.1038/nri3567.
- Friedman, H. (1964) 'Inhibition of antibody plaque formation by sensitized lymphoid cells: Rapid indicator of transplantation immunity', *Science*, 145(3632), pp. 607–609. doi: 10.1126/science.145.3632.607.
- Gattinoni, L. *et al.* (2011) 'A human memory T cell subset with stem cell-like properties.', *Nature medicine*, 17(10), pp. 1290–7. doi: 10.1038/nm.2446.
- Gattinoni, L. *et al.* (2017) 'T memory stem cells in health and disease', *Nat Med.*, 23(1), pp. 18–27. doi: 10.1038/nm.4241.T.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2003) 'Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines.', *Blood*, 101(11), pp. 4260–6. doi: 10.1182/blood-2002-11-3577.
- Gerlach, C. *et al.* (2016) 'The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Article The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surv', *Immunity*. Elsevier Inc., 45(6), pp. 1270–1284. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.018.
- Gett, A. V. *et al.* (2003) 'T cell fitness determined by signal strength', *Nature Immunology*, 4(4), pp. 355–360. doi: 10.1038/ni908.
- Golstein, P. (1987) 'Cytolytic T -cell melodrama', *Nature immunology*, 327.
- Golstein, P. and Griffiths, G. M. (2018) 'An early history of T cell-mediated cytotoxicity', *Nature Reviews Immunology*. Springer US. doi: 10.1038/s41577-018-0009-3.
- Gorak-Stolinska, P. *et al.* (2001) 'Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha.', *Journal of leukocyte biology*, 70(5), pp. 756–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698496>.
- Halle, S., Halle, O. and Förster, R. (2017) 'Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 38(6), pp. 432–443. doi: 10.1016/j.it.2017.04.002.
- Hamann, D. *et al.* (1997) 'Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells.', *The Journal of experimental medicine*, 186(9), pp. 1407–18. Available at:

Appendix

<http://jem.rupress.org/content/186/9/1407.short%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Hammarlund, E. *et al.* (2003) 'Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination', *Nature Medicine*, 9(9), pp. 1131–1137. doi: 10.1038/nm917.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hashimoto-Tane, A. *et al.* (2016) 'Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(8), pp. 1609–1625. doi: 10.1084/jem.20151088.

Hassin, D. *et al.* (2011) 'Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable', 2, pp. 190–196. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x.

Henkart, B. Y. P. A. *et al.* (1984) 'CYTOLYTIC GRANULES ACTIVITY OF PURIFIED RAT FROM LARGE GRANULAR TUMORS Despite the efforts of many laboratories over a period of years , the mechanism of lysis by natural killer (NK) I cells and other cytotoxic lymphocytes remains controversial . Our pr', 160(July), pp. 75–93.

Hersperger, A. R., Makedonas, G. and Betts, M. R. (2008) 'Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells', *Cytometry Part A*, 73(11), pp. 1050–1057. doi: 10.1002/cyto.a.20596.

Hollville, E. and Martin, S. J. (2016) 'Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry', *Current Protocols in Immunology*. Elsevier Inc., 2016(2), pp. 14.38.1-14.38.24. doi: 10.1002/0471142735.im1438s112.

House, I. G. *et al.* (2017) 'Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation', *EMBO reports*, 18(10), p. e201744351. doi: 10.15252/embr.201744351.

Huang, D. C. S. *et al.* (1999) 'Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), pp. 14871–14876. doi: 10.1073/pnas.96.26.14871.

Huber, M. *et al.* (2009) 'Th17-like developmental process leads to CD8+ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity', *European Journal of Immunology*, 39(7), pp. 1716–1725. doi: 10.1002/eji.200939412.

Iancu, E. M. *et al.* (2010) 'Profile of a Serial Killer: Cellular and Molecular Approaches to Study Individual Cytotoxic T-Cells following Therapeutic Vaccination', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(January), pp. 1–21. doi: 10.1155/2011/452606.

Invitrogen (2010) 'Dynabeads magnetic cell separation technology'. Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Dynabeads_cell_separation_guide.pdf.

Appendix

Jameson, S. C. and Masopust, D. (2018) 'Understanding Subset Diversity in T Cell Memory.', *Immunity*. Elsevier Inc., 48(2), pp. 214–226. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.010.

Janssen, E. M. *et al.* (2010) 'Distinct roles of cytolytic effector molecules for antigen-restricted killing by CTL in vivo', *Immunology and Cell Biology*, 88(7), pp. 761–765. doi: 10.1038/icb.2010.37.

Jenkins, M. R. *et al.* (2015) 'Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(3), pp. 307–317. doi: 10.1084/jem.20140964.

Jo, M. *et al.* (2000) 'Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Retroviral membrane display of apoptotic effector molecules', *Nat Med*, 6(5), pp. 564–567. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10802713 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10737766.

Joeckel, L. T. and Bird, P. I. (2014) 'Are all granzymes cytotoxic in vivo?', *Biological Chemistry*, 395(2), pp. 181–202. doi: 10.1515/hsz-2013-0238.

Joffre, O. P. *et al.* (2012) 'Cross-presentation by dendritic cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 557–569. doi: 10.1038/nri3254.

Joshi, N. S. *et al.* (2007) 'Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor', *Immunity*, 27(2), pp. 281–295. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.

Joshi, N. S. and Kaech, S. M. (2008) 'Effector CD8 T Cell Development: A Balancing Act between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation', *The Journal of Immunology*, 180(3), pp. 1309–1315. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1309.

Kaech, S. M. *et al.* (2003) 'Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells', *Nature Immunology*, 4(12), pp. 1191–1198. doi: 10.1038/ni1009.

Kaech, S. M. and Cui, W. (2012) 'Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 12(11), pp. 749–61. doi: 10.1038/nri3307.

Kägi, D. *et al.* (1994) 'Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice', *Nature*, 369(6475), pp. 31–37. doi: 10.1038/369031a0.

Kappler, J. *et al.* (1989) 'V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins', *Science*, 244(4906), pp. 811–813. doi: 10.1126/science.2524876.

Kataoka, T. *et al.* (1996) 'Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of

Appendix

contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(10), pp. 3678–3686. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2653.

Kataoka, T. *et al.* (1997) 'Inactivation and proteolytic degradation of perforin within lytic granules upon neutralization of acidic pH.', *Immunology*, 91(3), pp. 493–500. doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00257.x.

Kayagaki, N. (1996) 'Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand', *Journal of Experimental Medicine*, 182(6), pp. 1777–1783. doi: 10.1084/jem.182.6.1777.

Kerr, J. F. ., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) 'Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257. doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.

Khazen, R. *et al.* (2016) 'Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse'. doi: 10.1038/ncomms10823.

Kircher, S. *et al.* (2018) 'Profiling calcium signals of in vitro polarized human effector CD4+ T cells', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(6), pp. 932–943. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.04.001.

Klebanoff, Christopher, Gattoni, Luca, Restifo, N. (2013) 'Sorting through subsets: Which T cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy?', *Journal of immunotherapy*, 35(9), pp. 651–660. doi: 10.1097/CJI.0b013e31827806e6.Sorting.

Knörck, A. *et al.* (2018) 'Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits', *Transfusion*, 00, pp. 1–11. doi: 10.1111/trf.14616.

Koren, H. S., Ax, W. and Freund-Moelbert, E. (1973) 'Morphological observations on the contact-induced lysis of target cells', *European Journal of Immunology*, 3(1), pp. 32–37. doi: 10.1002/eji.1830030108.

Kroemer, G. *et al.* (2009) 'Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell Death and Differentiation*, 16(1), pp. 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.

Kumar, B. V. *et al.* (2017) 'Human tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites', 46(5), pp. 1247–1262. doi: 10.1002/jmri.25711.PET/MRI.

Kummerow, C. *et al.* (2014) 'A simple, economic, time-resolved killing assay', *European Journal of Immunology*, 44(6), pp. 1870–1872. doi: 10.1002/eji.201444518.

Kurschus, F. C. *et al.* (2008) 'Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), pp. 13799–13804. doi: 10.1073/pnas.0801724105.

Appendix

- De La Roche, M., Asano, Y. and Griffiths, G. M. (2016) 'Origins of the cytolytic synapse', *Nature Reviews Immunology*, 16(7), pp. 421–432. doi: 10.1038/nri.2016.54.
- Lacombe, M.-H. *et al.* (2005) 'IL-7 Receptor Expression Levels Do Not Identify CD8+ Memory T Lymphocyte Precursors following Peptide Immunization', *The Journal of Immunology*, 175(7), pp. 4400–4407. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4400.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E. *et al.* (2003) 'Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice', *Nature Immunology*, 4(3), pp. 255–260. doi: 10.1038/ni894.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2002) 'Opinion-decision making in the immune system: Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response', *Nature Reviews Immunology*, 2(12), pp. 982–987. doi: 10.1038/nri959.
- Law, R. H. P. *et al.* (2010) 'The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin', *Nature*, 468(7322), pp. 447–451. doi: 10.1038/nature09518.
- Lemke, J. *et al.* (2014) 'Getting TRAIL back on track for cancer therapy', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 21(9), pp. 1350–1364. doi: 10.1038/cdd.2014.81.
- Lesteberg, K., Orange, J. and Makedonas, G. (2017) 'Recycling endosomes in human cytotoxic T lymphocytes constitute an auxiliary intracellular trafficking pathway for newly synthesized perforin', *Immunologic Research*. Immunologic Research, 65(5), pp. 1031–1045. doi: 10.1007/s12026-017-8945-8.
- Leung, C. *et al.* (2017) 'Real-time visualization of perforin nanopore assembly', *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group, 12(5), pp. 467–473. doi: 10.1038/nnano.2016.303.
- Li, J. *et al.* (2014) 'Real-Time Detection of CTL Function Reveals Distinct Patterns of Caspase Activation Mediated by Fas versus Granzyme B', *The Journal of Immunology*, 193(2), pp. 519–528. doi: 10.4049/jimmunol.1301668.
- Li, Z. *et al.* (2016) 'Celastrol increases osteosarcoma cell lysis by γ ; δ T cells through up-regulation of death receptors', *Oncotarget*, 7(51). doi: 10.18632/oncotarget.12756.
- Liesche, C. *et al.* (2018) 'Single-fluorescent protein reporters allow parallel quantification of natural killer cell-mediated granzyme and caspase activities in single target cells', *Frontiers in Immunology*, 9(AUG). doi: 10.3389/fimmu.2018.01840.
- Liu, L. *et al.* (2002) 'Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates', *Nature Medicine*, 8(2), pp. 185–189. doi: 10.1038/nm0202-185.
- Lopez, J. A., Jenkins, M. R., Whisstock, J. C., *et al.* (2013) 'Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack', *Blood*, 121(14), pp. 2659–2669. doi: 10.1182/blood-2012-07-446146.

Appendix

- Lopez, J. A., Jenkins, M. R., Rudd-Schmidt, J. A., *et al.* (2013) 'Rapid and Unidirectional Perforin Pore Delivery at the Cytotoxic Immune Synapse', *The Journal of Immunology*, 191(5), pp. 2328–2334. doi: 10.4049/jimmunol.1301205.
- Lugli, E. and Gattinoni, L. (2015) 'Harnessing Stem Cell-Like Memory T Cells for Adoptive Cell Transfer Therapy Chapter 8 Harnessing Stem Cell-Like Memory T Cells for Adoptive Cell Transfer Therapy of Cancer', (August 2016). doi: 10.1007/978-3-319-21167-1.
- Mackay, L. K. *et al.* (2015) 'Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention', *The Journal of Immunology*, 194(5), pp. 2059–2063. doi: 10.4049/jimmunol.1402256.
- MacKay, L. K. *et al.* (2013) 'The developmental pathway for CD103+ CD8+ tissue-resident memory T cells of skin', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 14(12), pp. 1294–1301. doi: 10.1038/ni.2744.
- Maecker, H. T., McCoy, J. P. and Nussenblatt, R. (2012) 'Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project', *Nature Reviews Immunology*, 12(3), pp. 191–200. doi: 10.1038/nri3158.
- Mahnke, Y. D. *et al.* (2013) 'The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets', *European Journal of Immunology*, 43(11), pp. 2797–2809. doi: 10.1002/eji.201343751.
- Mahnke, Y. D., Beddall, M. H. and Roederer, M. (2012) 'OMIP-013: Differentiation of human T-cells', *Cytometry Part A*, 81A(11), pp. 935–936. doi: 10.1002/cyto.a.22201.
- Marchingo, J. M. *et al.* (2016) 'T-cell stimuli independently sum to regulate an inherited clonal division fate', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, pp. 1–12. doi: 10.1038/ncomms13540.
- Martin, M. D. and Badovinac, V. P. (2016) 'Previews Sifting through CD8 + T Cell Memory', *Immunity*. Elsevier Inc., 45(6), pp. 1184–1186. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.005.
- Martin, M. D. and Badovinac, V. P. (2018) 'Defining memory CD8 T cell', *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.02692.
- Martinez-Lostao, L. *et al.* (2015) 'Death ligands and granulysin: Mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities', *Immunotherapy*, 7(8), pp. 883–898. doi: 10.2217/imt.15.56.
- Martinez, M. and Moon, E. K. (2019) 'CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment', *Frontiers in Immunology*, 10(February), p. 128. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128.
- Masson, D. and Tschopp, J. (1985) 'Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 260(16), pp. 9069–9072.
- Matou-Nasri, S. *et al.* (2017) 'CD95-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B-cells is associated with Pim-1 down-regulation', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V.,

Appendix

1863(1), pp. 239–252. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.09.012.

Mazar, J. *et al.* (2009) 'Cytotoxicity mediated by the Fas ligand (FasL)-activated apoptotic pathway in stem cells', *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), pp. 22022–22028. doi: 10.1074/jbc.M109.032235.

Meiraz, A. *et al.* (2009) 'Switch from perforin-expressing to perforin-deficient CD8+ T cells accounts for two distinct types of effector cytotoxic T lymphocytes in vivo', *Immunology*, 128(1), pp. 69–82. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03072.x.

Merkenschlager, M. *et al.* (1988) 'Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation', *European Journal of Immunology*, 18(11), pp. 1653–1662. doi: 10.1002/eji.1830181102.

Mescher, M. F. *et al.* (2006) 'Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells', *Immunological Reviews*, 211, pp. 81–92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x.

Michie, C. A. *et al.* (1992) 'Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms', *Nature*, 360(6401), pp. 264–265. doi: 10.1038/360264a0.

Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. and Huber, M. (2014) 'Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8(+) T Cells.', *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. doi: 10.1007/s00005-014-0293-y.

Monel, B. *et al.* (2019) 'HIV Controllers Exhibit Effective CD8 + T Cell Recognition of HIV-1-Infected Non-activated CD4 + T Cells', *Cell Reports*. ElsevierCompany., 27(1), pp. 142-153.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.016.

Moog, R. (2004) 'Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells', *Transfusion and Apheresis Science*, 31(3), pp. 207–220. doi: 10.1016/j.transci.2004.09.006.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1987) 'Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation', *Trends in Immunology*, 8(7–8), pp. 223–227.

Na, I. K. *et al.* (2010) 'The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease', *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), pp. 343–356. doi: 10.1172/JCI39395.

Nagata, S. and Tanaka, M. (2017) 'Programmed cell death and the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 17(5), pp. 333–340. doi: 10.1038/nri.2016.153.

Néron, S. *et al.* (2007) 'Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: A new source of viable human blood cells', *Transfusion*, 47(6), pp. 1042–1049. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01233.x.

Ni, X. *et al.* (2005) 'Resistance to activation-induced cell death and bystander cytotoxicity via the Fas/Fas ligand pathway are implicated in the pathogenesis of cutaneous T cell lymphomas', *Journal of*

Appendix

Investigative Dermatology. Elsevier Masson SAS, 124(4), pp. 741–750. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23657.x.

Nilsson, N., Ingvarsson, S. and Borrebaeck, C. A. K. (2000) 'Immature B cells in bone marrow express Fas/FasL', *Scandinavian Journal of Immunology*, 51(3), pp. 279–284. doi: 10.1046/j.1365-3083.2000.00701.x.

Nolz, J. C. and Harty, J. T. (2011) 'Protective Capacity of Memory CD8 + T Cells Is Dictated by Antigen Exposure History and Nature of the Infection', *Immunity*. Elsevier Inc., 34(5), pp. 781–793. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.020.

Only, U. (2012) 'BD Biosciences European Customer Support BD FACSAria™ III User's Guide'.

Ornatsky, O. *et al.* (2006) 'Multiple cellular antigen detection by ICP-MS', *Journal of Immunological Methods*, 308(1–2), pp. 68–76. doi: 10.1016/j.jim.2005.09.020.

Packard, B. Z. *et al.* (2014) 'Granzyme B Activity in Target Cells Detects Attack by Cytotoxic Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 179(6), pp. 3812–3820. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3812.

De Paoli, P. *et al.* (1984) 'Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation', *Journal of Immunological Methods*, 72(2), pp. 349–353. doi: 10.1016/0022-1759(84)90003-6.

Park, H. *et al.* (2005) 'A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17', *Nature Immunology*, 6(11), pp. 1133–1141. doi: 10.1038/ni1261.

Pasternack, M. S. and Eisen, H. N. (1985) 'A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes', *Nature*, 314(6013), pp. 743–745. doi: 10.1038/314743a0.

Perlmann, B. Y. P., Ph, D. and Broberger, O. V. E. (1963) 'IN VITRO STUDIES OF ULCERATIVE COLITIS II . CY ~ crroxic ACTION OF WRITE BLOOD CELLS FROM PATIENTS ON (From the Wenner-Crren Institute for Experimental Biology , University o / Stockkolm , Stockkolm , and the Pediatric Clinic , University of Gothenburg ', (1), pp. 717–733.

Peter, M. E. *et al.* (2015) 'The role of CD95 and CD95 ligand in cancer.', *Cell death and differentiation*. Nature Publishing Group, 22(4), pp. 549–59. doi: 10.1038/cdd.2015.3.

Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003) 'The CD95 (APO-1 / Fas) DISC and beyond', 95, pp. 26–35. doi: 10.1038/sj.cdd.4401186.

Peters, P. J. (1991) 'Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes', *Journal of Experimental Medicine*, 173(5), pp. 1099–1109. doi: 10.1084/jem.173.5.1099.

Podack, E. R. and Konigsberg, P. J. (1984) 'CYTOLYTIC T CELL GRANULES Isolation, Structural,

Appendix

- Biochemical, and Functional Characterization', 160(September), pp. 695–710.
- Posovszky, C. *et al.* (1999) 'Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis', *Leukemia*, 13(3), pp. 400–409. doi: 10.1038/sj.leu.2401327.
- Pradelli, L. A., Bénétteau, M. and Ricci, J. E. (2010) 'Mitochondrial control of caspase-dependent and-independent cell death', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), pp. 1589–1597. doi: 10.1007/s00018-010-0285-y.
- Prager, I. *et al.* (2019) 'NK cells switch from granzyme B to death receptor–mediated cytotoxicity during serial killing', *The Journal of Experimental Medicine*, p. jem.20181454. doi: 10.1084/jem.20181454.
- Prager, I. and Watzl, C. (2019) 'Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity', *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), pp. 1319–1329. doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R.
- Purbhoo, M. A. *et al.* (2004) 'T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse', *Nature Immunology*, 5(5), pp. 524–530. doi: 10.1038/ni1058.
- Rae, T. (1977) 'Tolerance of Mouse Macrophages in vitro to Barium Sulfate used in Orthopedic Bone Cement', 11, pp. 839–846.
- Ramaswamy, M. *et al.* (2011) 'Specific elimination of effector memory CD4+ T cells due to enhanced Fas signaling complex formation and association with lipid raft microdomains', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 18(4), pp. 712–720. doi: 10.1038/cdd.2010.155.
- Restifo, N. P. (2014) 'Big bang theory of stem-like', 124(4), pp. 476–477.
- Role, A. C. *et al.* (2005) 'Calcium-dependent Plasma Membrane Binding and Cell Lysis by Perforin Are Mediated through Its C2 Domain', 280(9), pp. 8426–8434. doi: 10.1074/jbc.M413303200.
- Romero, P. *et al.* (2007) 'Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 178(7), pp. 4112–4119. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4112.
- Rouvier, B. E. *et al.* (1993) 'Fas Involvement in Ca²⁺-independent T Cell-mediated Cytotoxicity', *J. Exp. Med.*
- Sackstein, R., Schatton, T. and Barthel, S. R. (2017) 'T-lymphocyte homing: An underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 97(6), pp. 669–697. doi: 10.1038/labinvest.2017.25.
- Saini, R. V. *et al.* (2011) 'Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells', *The Journal of Immunology*, 186(6), pp. 3497–3504. doi: 10.4049/jimmunol.1003409.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, L. A. (1999) 'Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potential and effector functions', 6(October), pp. 6270–6273. doi: 10.1038/44385.

Appendix

- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004) 'Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance', *Annual Review of Immunology*, 22(1), pp. 745–763. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Saunders, A. E. and Johnson, P. (2010) 'Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45', *Cellular Signalling*. Elsevier B.V., 22(3), pp. 339–348. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.10.003.
- Scaffidi, C. *et al.* (1998) 'Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways', 17(6), pp. 1675–1687.
- Schluns, K. S. *et al.* (2000) 'Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo', *Nature Immunology*, 1(5), pp. 426–432. doi: 10.1038/80868.
- Schwarz, E. C. *et al.* (2016) 'Deep characterization of blood cell miRNomes by NGS', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(16), pp. 3169–3181. doi: 10.1007/s00018-016-2154-9.
- Shcherbo, D. *et al.* (2009) 'Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins', *BMC Biotechnology*, 9, pp. 1–6. doi: 10.1186/1472-6750-9-24.
- Shrestha, B. and Diamond, M. S. (2007) 'Fas Ligand Interactions Contribute to CD8 T-Cell-Mediated Control of West Nile Virus Infection in the Central Nervous System', *JOURNAL OF VIROLOGY*, 81(21), pp. 11749–11757. doi: 10.1128/JVI.01136-07.
- Smith, M. B. *et al.* (2011) 'Interactive, computer-assisted tracking of speckle trajectories in fluorescence microscopy: Application to actin polymerization and membrane fusion', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 101(7), pp. 1794–1804. doi: 10.1016/j.bpj.2011.09.007.
- Spicer, B. A. *et al.* (2017) 'Perforin—A key (shaped) weapon in the immunological arsenal', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 72, pp. 117–123. doi: 10.1016/j.semcd.2017.07.033.
- Staniek, J. *et al.* (2019) 'TRAIL-R1 and TRAIL-R2 Mediate TRAIL-Dependent Apoptosis in Activated Primary Human B Lymphocytes', *Frontiers in Immunology*, 10(April), pp. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2019.00951.
- Staser, K. W. *et al.* (2018) 'OMIP-042: 21-color flow cytometry to comprehensively immunophenotype major lymphocyte and myeloid subsets in human peripheral blood', *Cytometry Part A*, 93(2), pp. 186–189. doi: 10.1002/cyto.a.23303.
- Stemberger, Christian *et al.* (2007) 'A single naïve CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets.', *Immunity*, 27(6), pp. 985–997. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.012.
- Stemberger, C *et al.* (2007) 'Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets', *Cell Mol Immunol*, 4(6), pp. 399–405. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18163951.

Appendix

- Stinchcombe, J. C. and Griffiths, G. M. (2007) 'Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), pp. 495–517. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123521.
- Strasser, A., Jost, P. J. and Nagata, S. (2009) 'The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System', *Immunity*. Elsevier Inc., 30(2), pp. 180–192. doi: 10.1016/j.immuni.2009.01.001.
- Strasser, E. F. *et al.* (2007) 'From Leukoreduction System Chambers of', *October*, 47(October), pp. 1943–1944. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01461.x.
- Tang, Y. *et al.* (2012) 'Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, 129(6), pp. 1611-1620.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.976.
- Tangye, S. G. (2015) 'Thucydides and longer-lived plasma cells Heat-shock proteins : a', 125(11), pp. 2014–2015.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008) 'Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), pp. 231–241. doi: 10.1038/nrm2312.
- Thomas, D. *et al.* (2009) 'Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human V β patterns', *Infection and Immunity*, 77(5), pp. 2043–2050. doi: 10.1128/IAI.01388-08.
- Thucycides (no date) 'Die Geschichte der peloponnesischen Kriege' Buch 2. Kapitel 49 Vers 6', in, p. <https://web.archive.org/web/20090516070953/http://>.
- Togashi, K., Kataoka, T. and Nagai, K. (1997) 'Concanamycin A, a vacuolar type H(+)-ATPase inhibitor, induces cell death in activated CD8(+) CTL.', *Cytotechnology*, 25, pp. 127–35. doi: 10.1023/A:1007995212658.
- Trebak, M. and Kinet, J. P. (2019) 'Calcium signalling in T cells', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 19(3), pp. 154–169. doi: 10.1038/s41577-018-0110-7.
- Trivedi, R. and Mishra, D. P. (2015) 'Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells', *Frontiers in Oncology*, 5(April). doi: 10.3389/fonc.2015.00069.
- Vanherberghen, B. *et al.* (2013) 'Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response', 121(August), pp. 1326–1335. doi: 10.1182/blood-2012-06-439851.
- Vasconcelos, Z. *et al.* (2015) 'Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing', *Cell Reports*, 11(9), pp. 1474–1485. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.002.
- Vassilev, A. *et al.* (1999) 'Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex', *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), pp. 1646–1656. doi:

Appendix

10.1074/jbc.274.3.1646.

Vermes, I. *et al.* (1995) 'A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V', *Physica B: Condensed Matter*, 358(1–4), pp. 232–246. doi: 10.1016/j.physb.2005.01.398.

Voskoboinik, I. *et al.* (2005) 'Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491', *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 8426–8434. doi: 10.1074/jbc.M413303200.

Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. and Trapani, J. A. (2015) 'Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(6), pp. 388–400. doi: 10.1038/nri3839.

Voss, M. *et al.* (2008) 'Posttranslational regulation of Fas ligand function', *Cell Communication and Signaling*, 6, pp. 1–12. doi: 10.1186/1478-811X-6-11.

Vrazo, A. C. *et al.* (2015) 'Live cell evaluation of granzyme delivery and death receptor signaling in tumor cells targeted by human natural killer cells', *Blood*, 126(8), pp. e1–e10. doi: 10.1182/blood-2015-03-632273.

Walsh, J. G. *et al.* (2008) 'Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), pp. 12815–12819. doi: 10.1073/pnas.0707715105.

Wang, W. *et al.* (2018) 'CD8+ T Cells in Immunotherapy, Radiotherapy, and Chemotherapy', in *Oncoimmunology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 23–39. doi: 10.1007/978-3-319-62431-0_3.

Wang, X. *et al.* (2016) 'Comparison of naïve and central memory derived CD8 + effector cell engraftment fitness and function following adoptive transfer', *Oncoimmunology*. Taylor & Francis, 5(1), p. e1072671. doi: 10.1080/2162402x.2015.1072671.

Wiley, S. R. *et al.* (1995) 'Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis', *Immunity*, 3(6), pp. 673–682. doi: 10.1016/1074-7613(95)90057-8.

Wingender, G. and Kronenberg, M. (2015) 'OMIP-030: Characterization of human T cell subsets via surface markers', *Cytometry Part A*, 87(12), pp. 1067–1069. doi: 10.1002/cyto.a.22788.

Wölfel, M. and Greenberg, P. D. (2014) 'Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells Matthias', 100(2), pp. 130–134. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.

Yamada, A. *et al.* (1992) 'CD45 isoform expression on human neonatal T cells: Expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation', *Cellular Immunology*, 142(1), pp. 114–124. doi: 10.1016/0008-8749(92)90273-R.

Appendix

Yamamoto, T. N. *et al.* (2019) 'T cells genetically engineered to overcome death signaling enhance adoptive cancer immunotherapy', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/jci121491.

Yu, J. S. *et al.* (2003) 'Intratumoral T cell subset ratios and Fas ligand expression on brain tumor endothelium.', *Journal of neuro-oncology*, 64(1–2), pp. 55–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952286> (Accessed: 7 June 2019).

Zagury, D. *et al.* (1975) 'Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes: conjugation, killing and recycling at the single cell level', *European Journal of Immunology*, 5(12), pp. 818–822. doi: 10.1002/eji.1830051205.

Zaritskaya, L. *et al.* (2010) 'New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity', *Expert Review of Vaccines*, 9(6), pp. 601–616. doi: 10.1586/erv.10.49.

Zhang, N. and Bevan, M. J. (2011) 'CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System', *Immunity*. Elsevier Inc., 35(2), pp. 161–168. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'Plasma membrane changes during programmed cell deaths', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 28(1), pp. 9–21. doi: 10.1038/cr.2017.133.

Zhou, X. *et al.* (2018) 'A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity', *J Physiol*, 14, pp. 2681–2698. doi: 10.1113/JP274964.

5.6 Publikationen

In Vorbereitung:

Angenendt, A., Steiner, R., **Knörck, A.**, Schwär, G., Krause, E., Lis, A. (2019). Orai, STIM, and PMCA contribute to reduced calcium signal generation in CD8⁺ T cells of elderly mice (in Revision)

Knörck A., Friedmann K. S., Schwär G., Kummerow C., Krause E., Schwarz E. C. (2019) Cytotoxic mechanisms of human CD8⁺ T cell memory subtypes. (in Vorbereitung)

Publiziert:

Zwick, A., Bernhard, M., **Knörck, A.**, Linxweiler, M., Schick, B., Heinzelmann, J., ... Lohse, S. (2019). Monitoring kinetics reveals critical parameters of IgA-dependent granulocyte-mediated anti-tumor cell cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 473, 112644.
<https://doi.org/10.1016/J.JIM.2019.112644>

Backes, C. S., Friedmann, K. S., Mang, S., **Knörck, A.**, Hoth, M., & Kummerow, C. (2018). Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *Journal of Biological Chemistry*, 293(42), 16348–16363.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004549>

Appendix

Zhou, X., Friedmann, K. S., Lyrmann, H., Zhou, Y., Schoppmeyer R., **Knörck A.**, ... Hoth, M. (2018). A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *J Physiol*, *14*, 2681–2698. <https://doi.org/10.1113/JP274964>

Knörck, A., Marx, S., Friedmann, K. S., Zöphel, S., Lieblang, L., Hässig, C., ... Schwarz, E. C. (2018). Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion*, *00*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/trf.14616>

Schoppmeyer, R., Zhao, R., Cheng, H., Hamed, M., Liu, C., [...] **Knörck, A.**, ... Qu, B. (2017). Tumor immunology Human profilin 1 is a negative regulator of CTL mediated cell-killing and migration. *Eur. J. Immunol.*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/eji.201747124>

Schwarz, E. C., Backes, C., **Knörck, A.**, Ludwig, N., Leidinger, P., Hoxha, C., ... Keller, A. (2016). Deep characterization of blood cell miRNomes by NGS. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(16), 3169–3181. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2154-9>

Bhat, S. S., Friedmann, K. S., **Knörck, A.**, Hoxha, C., Leidinger, P., Backes, C., ... Schwarz, E. C. (2016). Syntaxin 8 is required for efficient lytic granule trafficking in cytotoxic T lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1863*(7 Pt A), 1653–1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.014>

Fischer, M., Grundke, I., Sohr, S., Quaas, M., Hoffmann, S., **Knörck, A.**, ... Rother, K. (2013). p53 and Cell Cycle Dependent Transcription of kinesin family member 23 (KIF23) Is Controlled Via a CHR Promoter Element Bound by DREAM and MMB Complexes. *PLoS ONE*, *8*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063187>

5.7 Danksagung

Der Abschluss dieser Arbeit ist für mich mit dem Gefühl tiefer Dankbarkeit verbunden. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren wissenschaftlich und privat begleitet haben und auch in schweren Zeiten hinter mir standen.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Hoth für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und jahrelange Unterstützung und Förderung bedanken. Meine Begeisterung für zytotoxische Zellen war zu Beginn des Studiums schnell geweckt: Daher möchte ich mich besonders für die Möglichkeit bedanken, mit diesem Projekt in deinem Labor promovieren zu können. Vielen Dank für die inspirierenden Anregungen und Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Eva Schwarz. Vielen Dank für die Betreuung meines Projekts, die Einarbeitung in den Laboralltag und die Möglichkeit, meinem Interesse an Durchflusszytometrie und Immunologie nachgehen zu können. Deine fachliche und emotionale Unterstützung in allen Aspekten und Lebenslagen sowie dein Einsatz und das Vertrauen bei der Zusammenarbeit sind für mich und die Fertigstellung dieser Arbeit unersetzlich.

Danken möchte ich außerdem Andrea, Carmen, Cora, Gertrud, Sandra und Susanne für die hervorragende technische Unterstützung, die viele Experimente und Abläufe erleichtert und ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Elmar Krause für die Einarbeitung in das durchflusszytometrische Sortieren bedanken.

Killing- und Klonkrieger Kim, es war mir eine Ehre, an deiner Seite zu stehen. Vielen Dank für deine Freundschaft, deinen Rat und dafür, dass ich dir alles erzählen kann und du mir - auch wirklich - alles erzählst. Auch bei Carsten möchte ich mich für seinen Rat und die zahllosen, ideenreichen Tipps bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Mitstreitern Maik, Adrian und Phillip. Binnen kurzer Zeit sind aus Kollegen echte Freunde geworden, ohne die ich mir die vergangenen Jahre nicht vorstellen könnte. Gleichzeitig möchte ich auch meinem ganzen Büro danken.

Danke an alle Kollegen aus dem „Killing Club“ und der gesamten Biophysik in Homburg.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Frau Janna, meinen Eltern und Großeltern. Vielen Dank für eure Unterstützung, die Motivation und den Rückhalt sowie das Interesse und die Wertschätzung an meiner Arbeit. Janna, deine Unterstützung, Kraft, Geduld, Liebe und unsere kleine Familie mit Ida sind für mich wichtiger als man sich vorstellen kann.