

Charakterisierung sekretorischer Lysosomen aus humanen T- und NK-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

HENDRIK SCHMIDT

Kiel
2009

Referent: Prof. Dr. Stefan Rose-John
Koreferent: Prof. Dr. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2009

Zum Druck genehmigt: 13.07.2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Rolle von T- und NK-Zellen im Immunsystem	1
1.1.1 T-Zellen	2
1.1.2 NK-Zellen	3
1.2 Sekretorische Lysosomen	4
1.2.1 Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen	4
1.2.2 Struktur und Inhalt sekretorischer Lysosomen	5
1.2.3 Der Inhalt lysosomaler Granula	6
1.2.4 Die Biogenese sekretorischer Granula	10
1.2.5 Regulation der Exozytose und Bildung der immunologischen Synapse	11
1.2.6 Sekretorische Granula und assoziierte Krankheiten	12
1.3 Proteomanalysen lysosomaler Kompartimente	14
1.3.1 Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)	14
2. FRAGESTELLUNG	16
3. MATERIAL	18
3.1 Material für die Zellbiologie	18
3.1.1 Zellen	18
3.1.2 Medien und Puffer	18
3.1.3 Antikörper	21
3.1.4 Kits	23
3.2 Material für die Biochemie	23
3.2.1 Puffer und Reagenzien	23
3.3 Weitere Materialien	31
3.4 Geräte	32
4. METHODEN	34
4.1 Zellbiologische Methoden	34
4.1.1 Kultivierung von Zellen	34
4.1.2 Kryokonservierung von Zellen	34
4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	35
4.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	35
4.1.5 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen	36
4.1.6 Kultivierung von Lymphozyten-Subpopulationen	38
4.1.7 Zytotoxizitätsassay	38
4.1.8 Immunfluoreszenzanalysen	38
4.1.9 Elektronenmikroskopie	41

4.2	Biochemische Methoden	41
4.2.1	Immunpräzipitation	41
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	42
4.2.4	Western Blot.....	43
4.2.5	2D-Gelelektrophorese	44
4.2.6	Isolation sekretorischer Granula.....	45
4.2.7	Auftrennung und Massenspektrometrie der Organellenlysate.....	47
5.	ERGEBNISSE	51
5.1	Anreicherung und Charakterisierung lytischer Granula.....	51
5.1.1	Etablierung der Anreicherung sekretorischer Granula aus allogenen stimulierten Lymphozyten.....	51
5.1.2	FasL als Marker für sekretorische Granula in Lymphozyten- Subpopulationen.....	54
5.1.3	CD63 als Marker für sekretorische Granula	55
5.2	Etablierung hoch reproduzierbarer 2D-Gelelektrophoresen	57
5.2.1	Etablierung massenkompatibler Gelfärbungen.....	59
5.3	Der Proteinbesatz lytischer Granula aus NK-Zellen	61
5.3.1	Phänotypische Charakterisierung leukämischer und aktivierter humaner NK-Zellen	61
5.3.2	Funktionelle Unterschiede leukämischer NK-Zellen bei der Erkennung von Zielzellen	63
5.3.3	Isolierung und Charakterisierung lytischer Granula aus NK-Zellen	64
5.3.4	2D-DIGE Analyse angereicherter lytischer Granula aus NK-Zellen.....	66
5.3.5	Proteinidentifizierung lytischer Granula aus NK-Zellen durch Massenspektrometrie	69
5.3.6	Differentielle Proteine in sekretorischen Granula aus verschiedenen NK-Zellpopulationen.....	71
5.3.7	Verifikation der Unterschiede im Proteom sekretorischer Granula von NK-Zellen	74
5.4	Proteomanalysen sekretorischer Granula aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen	78
5.4.1	Phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen.....	78
5.4.2	Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus den verschiedenen T-Zellsubpopulationen.....	79
5.4.3	Das Proteom FasL-tragender Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	81
5.4.4	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.	84
5.4.5	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\nu\delta 1^+$ und $\nu\delta 2^+$ T-Zellen	86
5.4.6	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen	89
5.5	Heterogenität sekretorischer Granula in T-Zellen	92
5.5.1	Zytotoxische Proteine werden in unterschiedlich dichten Granula gespeichert.....	92
5.5.2	Elektronenmikroskopische Analysen angereicherter Granula	94
5.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Granula-spezifischen Markern.....	95
5.5.4	Unterschiede im Proteom FasL- und Granzym B-reicher Granula	97
5.5.5	Proteom der Fraktion 6.....	99

5.6	Reifung lytischer Vesikel	103
5.6.1	Besatz an zytotoxischen Proteinen in Lymphozyten-subpopulationen	104
5.7	Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula.....	107
5.7.1	Die Reifung FasL-tragender Vesikel.....	108
5.7.2	Die Reifung Granzym B-angereicherter Vesikel	114
5.8	Identifikation und Expression von Interleukin-16 in NK-Zellen	116
5.8.1	IL-16 wird in FasL-tragenden Granula gespeichert.....	120
6.	DISKUSSION	122
6.1	Etablierung einer effizienten Anreicherung sekretorischer Granula aus Lymphozyten	122
6.2	Das Proteom sekretorischer Lysosomen aus NK-Zellen	124
6.2.1	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der humanen NK-Zelllinien	124
6.2.2	Anreicherung und Charakterisierung sekretorischer Granula aus NK-Zelllinien	125
6.2.3	Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen	126
6.2.4	Interleukin-16 wird von NK-Zellen exprimiert und mit FasL in lysosomalen Granula gespeichert	130
6.3	Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese	132
6.4	Proteomanalysen sekretorischer Granula (Fraktion 2) aus T-Zellsubpopulationen	133
6.4.1	Proteom FasL-reicher Granula (Fraktion 2).....	134
6.4.2	Relevante Proteine der FasL-Granula	136
6.5	Das Proteom Perforin/Granzym B-reicher Granula (Frakt. 6).....	139
6.6	Die Reifung sekretorischer Lysosomen	143
6.6.1	Expression zytolytischer Proteine in Lymphozyten und deren Subpopulationen.....	143
6.6.2	Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula	145
7.	ZUSAMMENFASSUNG	148
8.	SUMMARY	150
9.	LITERATURVERZEICHNIS	152

10. ANHANG: PROTEINDATEN	165
10.1 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen	166
10.2 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 2 ..	175
10.3 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 6 ..	190
11. DANKSAGUNG	201
12. CURRICULUM VITAE	202
13. PUBLIKATIONSLISTE	204
14. ERKLÄRUNG	206

Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arp2/3	Aktin-verwandtes Protein 2/3
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Bandpassfilter
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BVA	biologische Varianzanalyse
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen-4
Cy	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIA	differentielle in-Gel Analyse
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
DZ	Dendritische Zellen
EBV	Epstein-Barr Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-gestützte Zellsortierung
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HLA	humanes Leukozytenantigen
hrIL-2	humanes rekombinantes Interleukin-2
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP	Lysosomen assoziiertes Membranprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger RNA
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MW	Molekulargewicht

NCAM	neurales Zell-Adhäsions-Molekül
NK	Natürliche Killer(zellen)
NP-40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMZ	Periphere Blut-Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PHA-Blasten	Phytohämagglutinin-aktivierte T-Zell-Blasten
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standardabweichung
SL	Sekretorische Lysosomen
SSC	sideward scatter
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von T- und NK-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem höherer Lebewesen dient dem Schutz vor Infektionen durch Pathogene und lässt sich nach der Funktionsweise und dem Zeitpunkt der Immunabwehr grundlegend unterteilen. Stammesgeschichtlich sehr früh entwickelte sich das angeborene Immunsystem, dem neben physiologischen Barrieren und dem Komplementsystem auch spezielle Zellen, wie Makrophagen, Neutrophile Zellen und Natürliche Killerzellen angehören. Diese Zellen können durch spezielle Rezeptoren Pathogene von körpereigenen Zellen unterscheiden. Somit kann eine Abwehr ohne vorherigen Kontakt mit dem Erreger stattfinden. NK-Zellen sind hierfür konstitutiv „bewaffnet“ und können innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung Zielzellen lysieren. Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt rasch, aber relativ unspezifisch, da NK-Zellen nicht über Antigen-spezifische Rezeptoren verfügen [1]. Ergänzend dazu gibt es das adaptive Immunsystem, das sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern auszeichnet. Insbesondere sind die T-Lymphozyten zu nennen, die spezifische Antigene der Pathogene erkennen und dann klonal expandieren. Dies hat den Vorteil, dass nach dieser Proliferationsphase viele T-Zellen und Effektorzellen des adaptiven Immunsystems zur Verfügung stehen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind. Die verschiedenen Zelltypen ergänzen sich nicht nur beim zeitlichen Ablauf einer Immunantwort, sondern auch bei der Erkennung bestimmter pathogener Strukturen. Besonders Viren und einige Bakterien entziehen sich der adaptiven Immunantwort, indem sie sich intrazellulär reproduzieren. Eine Eliminierung der Viren wird durch das Auslösen des programmierten Zelltods, der Apoptose, in der Pathogen-infizierten Zelle erreicht. Apoptose wird nicht nur in Virus-infizierten, sondern auch in entarteten Zellen (Tumore) durch zytotoxische Zellen des Immunsystems ausgelöst. Natürliche Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Zellen werden somit nicht nur zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Infektion aktiv, sondern sie sind auch für die präzise Regulation der Apoptose-auslösenden Effektorsysteme verantwortlich.

1.1.1 T-Zellen

T-Zellen sind die zentralen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Im peripheren Blut sind etwa 30% aller Lymphozyten $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, die wie auch NK-Zellen viral infizierte oder maligne Zellen durch Sekretion zytotoxischer Effektorproteine eliminieren. Diese Effektorproteine werden in speziellen lytischen Granula gespeichert. Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt durch die Präsentation von Peptiden intrazellulärer, meist viraler Proteine über den Haupthistokompatibilitäts (MHC) Klasse-I Komplex von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Der Peptid-MHC Komplex wird dabei über den antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TZR) erkannt.

Den Großteil der Lymphozyten machen mit 40% die $CD4^+$ T-Zellen aus, die durch stimulatorische oder inhibitorische Zytokine und Chemokine die Immunantwort modulieren. Daher werden sie auch als T-Helferzellen bezeichnet. $CD4^+$ T-Zellen können wie auch $CD8^+$ T-Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen lytische Eigenschaften entwickeln [2]. Jedoch ist im Gegensatz zu den klassischen zytotoxischen Zellen, wie $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen, fast nichts über das zytotoxische Potential im Hinblick auf Biogenese und molekulare Zusammensetzung der Effektormaschinerie bekannt [3].

Eine weitere Subpopulation der Lymphozyten stellen die $\gamma\delta$ T-Zellen dar, die sich durch die $\gamma\delta$ Ketten des TZR auszeichnen. Sie stellen einen Anteil von 1-5% der gesamten Lymphozytenpopulation im peripheren Blut dar, jedoch kommen sie in weit größerer Anzahl (bis 50%) in Epithel-reichen Geweben wie der Haut, dem Intestinum und dem Reproduktionstrakt vor [4]. Die Besonderheit dieser Zellen liegt in der Erkennung von proteinogenen und nicht-proteinogenen Strukturen ohne deren Präsentation durch MHC-Komplexe. Nicht zuletzt erschwert diese Eigenschaft, den Zellen eine spezifische biologische Funktion zuzuordnen [5]. Anhand der $\gamma\delta$ Genloci lässt sich eine gewebsspezifische Prädisposition erkennen. So exprimieren $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im peripheren Blut zu 50-95% $v\gamma9$ und $v\delta2$ [6], während die intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen hauptsächlich $v\delta1$ mit verschiedenen $V\gamma$ Elementen kombinieren [7]. Auch die $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen ein zytotoxisches Potential, dass sie unter anderem zum Töten von Tumorzellen befähigt [8]. Es ist auch hier nichts Genaueres über den Inhalt der lytischen Granula und mögliche Unterschiede des Kompartiments im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen oder NK-Zellen bekannt.

1.1.2 NK-Zellen

NK-Zellen werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie stellen ebenfalls einen relativ geringen Anteil der gesamten Lymphozytenpopulation, in der Maus je nach Gewebe 2-10% und im peripheren Blut des Menschen 2-18% [9]. Die Lebensspanne von NK-Zellen beträgt dabei in beiden Spezies rund zwei Wochen [10,11]. Im Menschen werden NK-Zellen durch das Oberflächenantigen CD56 (NCAM) und das Fehlen des TZR (CD3) definiert [12], wobei je nach Expressionsstärke von CD56 verschiedene Subpopulationen unterschieden werden können.

Obwohl NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, ist für eine volle Aktivierung, auch ein „Priming“ ähnlich dem der T-Zellen, zum Beispiel durch Dendritische Zellen (DZ) notwendig [13,14].

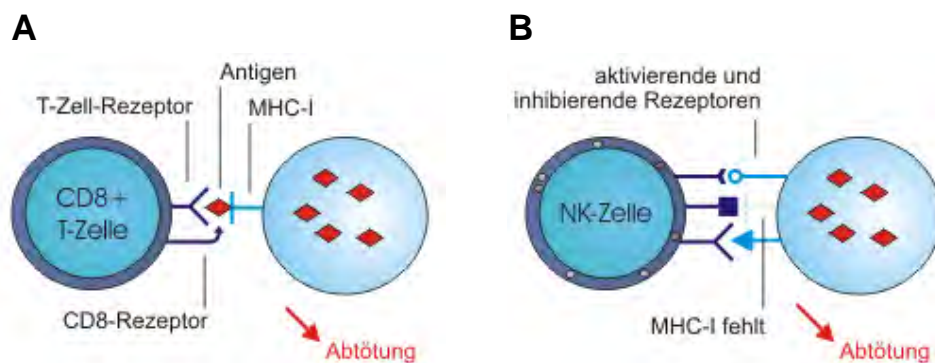


Abb. 1.1: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen (A) und NK-Zellen (B). Die T-Zellen werden durch Antigenpräsentation über den MHC Klasse-I Komplex aktiviert. Fehlt dieser Komplex kommt es zur Aktivierung der NK-Zellen. In beiden Fällen wird durch Apoptose die infizierte Zelle abgetötet. (Abb. nach Dr. M. Schubert, Heidelberg)

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Präsentation pathogener Peptide an CD8⁺ T-Zellen über MHC Klasse-I Moleküle. Einige Pathogene stören diese Präsentation und entziehen sich so der Immunantwort. NK-Zellen erkennen MHC Klasse-I Moleküle über inhibitorische Rezeptoren. Fehlen körpereigene Strukturen bzw. MHC Moleküle oder zeigen ein verändertes Expressionsmuster, wie beispielsweise auf Tumorzellen, wird das inhibitorische Signal aufgehoben und die NK-Zellen werden aktiviert. Die Apoptose der Zielzellen wird auch hierbei durch zytotoxische Proteine vermittelt, die in spezialisierten Organellen gespeichert werden, den sogenannten sekretorischen Lysosomen. Neben der viralen Abwehr, ist der Inhalt der sekretorischen Lysosomen auch für die Tumoreliminierung durch NK-Zellen essentiell [15,16]. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass die An- oder Abwesenheit bestimmter NK-Zell-Liganden des Tumors der Erkennung dient. So führt bei den

Tumoren eine reduzierte Expression von MHC Klasse-I („missing-self“), sowie die Hochregulation von NKG2D- oder CD27-Liganden zur NK-Zell-vermittelten Lyse [17-19]. NK-Zellen tragen zudem zur Regulation der Immunhomöostase bei, indem unreife Dendritische Zellen (DZ), aktivierte CD4⁺ T-Zellen und hyperaktivierte Makrophagen eliminiert werden [20-22]. Des Weiteren können sie verschiedene Zytokine freisetzen, wobei auch die Mechanismen der Speicherung und Sekretion entsprechender Zytokine noch weitestgehend unbekannt sind [23].

1.2 Sekretorische Lysosomen

Sekretorische Lysosomen (SL) sind spezialisierte bifunktionelle Organellen, die degradative Eigenschaften konventioneller Lysosomen mit einer induzierbaren Freisetzung zytotoxischer Effektorproteine vereinen.

1.2.1 Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen

Sekretorische Lysosomen sind im Wesentlichen in Zellen der hämatopoetischen Linie zu finden. So setzen Osteoklasten als spezialisierte Zellen des mononukleär-phagozytären Systems nach Fusion von SL mit der Plasmamembran gezielt lysosomale Hydrolasen frei, die dann Knochensubstanz abbauen [24,25].

Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen oder B-Zellen prozessieren Antigene und MHC Klasse-II Moleküle in so genannten MHC-II Kompartimenten, die einige Eigenschaften von sekretorischen Lysosomen aufweisen [26]. Thrombozyten induzieren die Blutgerinnungskaskade durch die Freisetzung von Serotonin und P-Selectin aus sekretorischen Vesikeln [27]. Weitere Zellen der hämatopoetischen Linie sind basophile Granulozyten und Mastzellen, die nach IgE- oder chemotaktisch vermittelter Stimulation Histamin und/oder Serotonin aus ihren Granula freisetzen und dadurch allergische Reaktionen vermitteln können [28]. Eine wesentliche Ausnahme an Zellen mit sekretorischen Lysosomen außerhalb der hämatopoetischen Reihe sind Melanozyten, die dem Neuroektoderm entspringen und als Pigmentzellen der Haut fungieren. Diese Zellen produzieren als Pigment Melanin, welches in Melanosomen synthetisiert und gelagert wird [29,30]. Der vielleicht deutlichste Hinweis dafür, dass Melanosomen als sekretorische Lysosomen angesehen werden können, basiert auf Befunden im Rahmen von genetischen Defekten lysosomaler Transportproteine, die phänotypisch einerseits mit Immundefizienzen, andererseits aber auch mit Pigmentstörungen (Albinismus) assoziiert sind [31].

1.2.2 Struktur und Inhalt sekretorischer Lysosomen

Morphologisch sind sekretorische Lysosomen von konventionellen Lysosomen kaum unterscheidbar. Beide repräsentieren den Endpunkt eines endozytotischen Weges [32] und entstehen hauptsächlich durch Fusion und Teilung endozytotischer und lysosomaler Kompartimente [33]. Hierdurch bilden sich multivesikuläre Strukturen, die sich nach dem Proteinbesatz der SL unterschiedlich darstellen können. So haben zum Beispiel SL von Thrombozyten dichte Bereiche, während sich MHC-II Kompartimente von APZ (Monozyten, reife DZ) eher lamellenartig darstellen [34]. In diesen findet die Prozessierung und Beladung der MHC Moleküle mit extrazellulären Antigenen statt [35]. T- und NK-Zellen weisen vermutlich sowohl elektronendichte Strukturen (dense cores) auf, die durch Proteoglykane und assoziierte Proteine hervorgerufen werden, als auch Strukturen, die eher an die weniger dichten SL von APZ erinnern.

Der Inhalt konventioneller und sekretorischer Lysosomen ähnelt sich in hohem Maße in der Zusammensetzung. Dementsprechend besitzen beide saure lysosomale Hydrolasen für die Degradation von Proteinen und eine Reihe charakteristischer Membranproteine. Hier sind die lysosomal-assoziierten Membranproteine (LAMPs) zu nennen, zu deren Vertretern LAMP-1 (CD107a) [36], LAMP-2 (CD107b) [37] und LAMP-3 (CD63) [38] gehören. Deren eigentliche Funktion ist noch weitgehend unbekannt, sie spielen aber auch im Zusammenhang mit dem Prozess der Autophagie eine wichtige Rolle [39,40]. Die Proteine der 70 kDa Hitzeschockprotein-Familie (Hsc70) erkennen spezifische Sequenzen zytosolischer Proteine und transportieren diese mit Hilfe der LAMP-Proteine in das Lumen der Lysosomen [41,42]. Der essentielle Unterschied zu konventionellen Lysosomen ist im Falle der SL der Besatz mit Zelltyp-spezifischen Effektorproteinen. Diese können gerichtet sezerniert werden und sind gleichzeitig entscheidend für das jeweilige morphologische Erscheinungsbild.

Die meisten Zelltypen enthalten sowohl konventionelle, als auch sekretorische Lysosomen [43]. Es wurde postuliert, dass die meisten Lysosomen zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL) sekretorische Proteine enthalten [44]. Da diese sekretorischen Komponenten häufig eine zytolytische Aktivität aufweisen, werden die Organellen auch als lytische Granula bezeichnet.

1.2.3 Der Inhalt lytischer Granula

Die lytischen Granula von T- und NK-Zellen setzen sich aus einer äußeren Membran und den bereits erwähnten elektronendichten „dense cores“ zusammen. In diesen liegen vor allem zytotoxische Proteine, wie Granulysin, Perforin und Granzyme komplexiert mit Chondroitin-Sulfat-reichen Proteoglykanen vor [45,46]. Diese zur Serglycinfamilie gehörenden, negativ geladenen Moleküle regulieren Lagerung und Freisetzung von Perforin und Granzymen [47,48]. Neben den oben genannten stark glykosilierten LAMP Proteinen, die bei Lysosomen etwa 50% der Membranproteine ausmachen, sind in T- oder NK-Zellen charakteristische Proteine wie der negative Kostimulator CTLA-4 (CD152) und der Todesfaktor Fas Ligand (CD178) zu finden (Abb.1) [49-51].

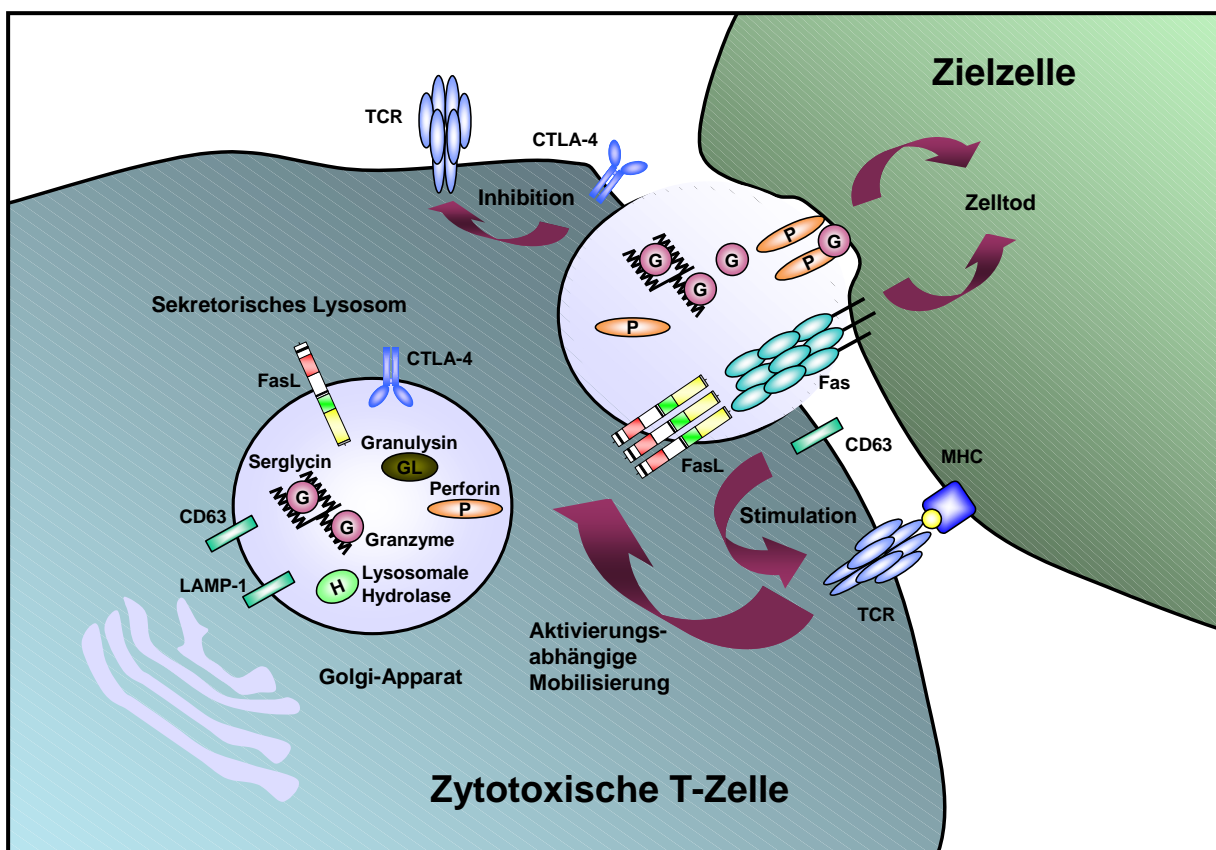


Abb. 1.2: Sekretorische Lysosomen zytotoxischer T-Zellen. Nach Erkennung über den T-Zellrezeptor (TZR) werden lytische Granula mobilisiert und deren Inhalt in die immunologische Synapse freigesetzt. Dabei werden neben klassischen lytischen Proteinen (FasL, Perforin, Granzyme, Granulysin), auch akzessorische (Serglycin) und regulatorische (CD63, CTLA-4) Moleküle ausgeschleust. (Abb. verändert nach Lettau, Schmidt et al. 2007 [52])

Fas Ligand

Der Fas Ligand (FasL, CD178, CD95L oder auch TNFSF6) ist ein Typ II Transmembranprotein und gehört zur Tumor-Nekrosis-Faktor Superfamilie (TNFSF) von Zytokinen [53]. FasL kann durch Interaktion mit seinem Rezeptor Fas (CD95) Apoptose auslösen und ist ein wesentlicher Regulator der Immunhomöostase [54]. FasL ist nicht nur zytotoxisches Effektormolekül von T- und NK-Zellen, sondern ist auch an der Ausbildung sogenannter immunprivilegierten Gewebe beteiligt, wie dem Trophoblasten, dem Gehirn oder dem Auge [55-57]. Der dabei zugrunde liegende Mechanismus wird von einigen Tumoren genutzt, um sich vor infiltrierenden T-Lymphozyten zu schützen, ein Vorgang, der als „tumor-counterattack“ bezeichnet wird [58,59].

CTLA-4

Das zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen-4 (CTLA-4) ist ein membranständiges Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie mit ähnlichen Bindungspartnern wie das kostimulatorische Protein CD28 [60,61]. Eine T-Zelle benötigt neben der Aktivierung über den TZR ein zweites (kostimulatorisches) Signal, welches von CD28 vermittelt wird. Nach Aktivierung wird mit der Freisetzung zytotoxischer Proteine auch das membranständige CTLA-4 auf die Oberfläche transloziert. Da dieses Protein eine 10-fach höhere Affinität zu den CD28 Liganden CD80 und CD86 hat, kommt es zur kompetitiven Hemmung und negativen Regulation der T-Zell Aktivierung [62].

CD63

CD63 ist ein Mitglied der Tetraspaninfamilie und gilt als Markerprotein für das lysosomale Kompartiment [63]. CD63 (LAMP-3, Granulophysin, Tetraspanin-30) wird in T-Zellen nach Aktivierung auf der Plasmamembran exprimiert, wo es unter Umständen auch als kostimulatorisches Molekül fungieren kann [64].

Perforin

Perforin war das erste Protein, welches aus lytischen Granula isoliert und 1985 als Ca^{2+} -abhängiges, porenformendes Protein beschrieben wurde [65-67]. In ZTL kolokalisiert das Ca^{2+} -assoziierte Protein Calreticulin mit Perforin und wird ebenfalls bei Degranulation freigesetzt [68]. Die Interaktion der beiden Proteine findet an der P-Domäne des Perforins statt, welche auch eine hohe Affinität gegenüber Ca^{2+} besitzt. Bei hohen Ca^{2+} Konzentrationen dissoziieren die beiden Proteine und

Perforin verankert sich in der Membran der Zielzelle, wo es polymerisiert und zylindrische Poren mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 20 nm bildet [69,70]. Calreticulin kann somit als Ca^{2+} -abhängiges Chaperon für Perforin angesehen werden [71]. Auch 24 Jahre nach seiner Entdeckung werden Wirkmechanismus und Funktion von Perforin kontrovers diskutiert. Drei Modelle zur zytolytischen Aktivität von Perforin wurden dabei experimentell etabliert.

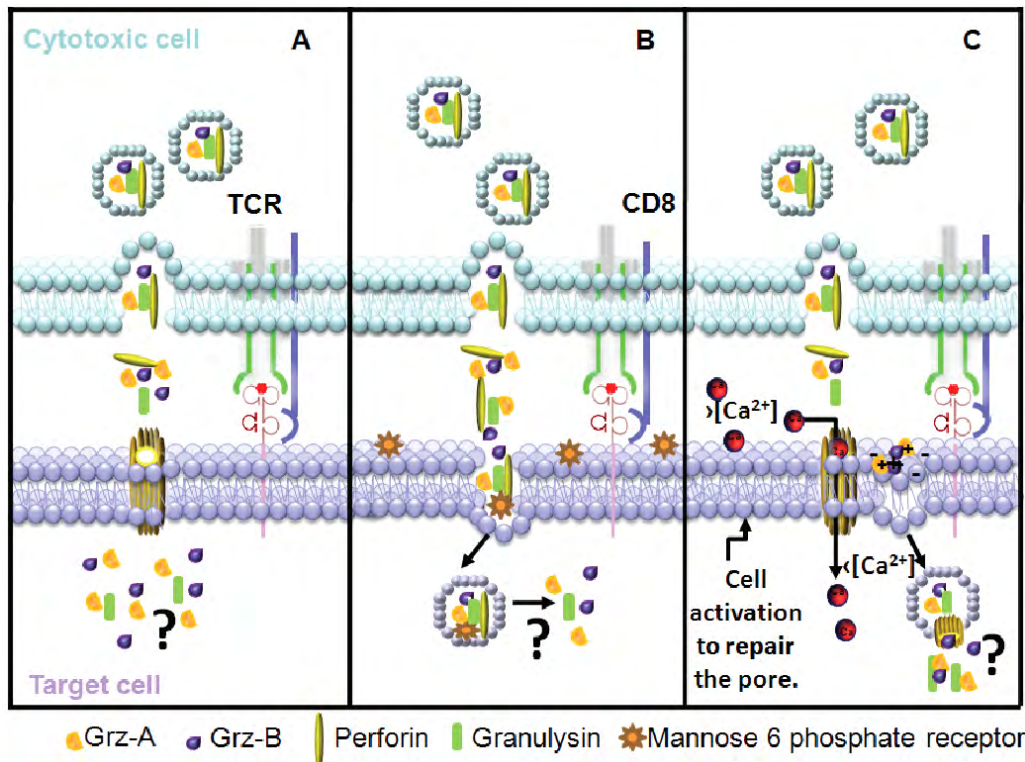


Abb. 1.3: Drei Modelle für die Transport zytolytischer Moleküle in die Zielzelle. Die Mechanismen zu den drei Modellen sind im nachfolgenden Text erläutert. (Abb. aus [72])

A) Das am weitesten anerkannte Modell postuliert, dass die oben genannten Poren einen passiven Transport von Granzymen und Granulysin (siehe unten) durch die Plasmamembran der Zielzelle ermöglichen. Des Weiteren kommt es zum Ausstrom von Ionen, was ein osmotisches Ungleichgewicht hervorruft und damit das Eintreten des Zelltodes unterstützt [73].

B) Motyka et al. zeigten jedoch, dass Granzym B auch in Abwesenheit von Perforin über die ionenunabhängige Internalisierung eines Granzym B / Mannose-6-phosphat Rezeptor Komplexes in die Zielzelle gelangen kann [74]. Sie postulierten, dass zusammen mit Granzym B auch Granzym A, Granulysin und Perforin in kompletten endosomalen Vesikeln internalisiert. Perforin ermöglicht dann eine Freisetzung ins

Zytoplasma durch Porenbildung in der endo-lysosomalen Membran der Zielzelle. Hierdurch kann wiederum Apoptose induziert werden.

C) Keefe et al. zeigten, dass Granzym-haltige multimolekulare Komplexe durch elektrostatische Wechselwirkungen an negativ geladene Glykosaminoglykane der Zielzell-Plasmamembran adhären [75]. Durch Perforin wird ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verursacht, die dadurch aktiviert wird und versucht durch Internalisierung der geschädigten Membran die eigene Nekrose zu verhindern. Endozytierte Granzyme können so Apoptose in der Zielzelle auslösen [76].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Perforin vielleicht nicht essentiell für den Transport von Proteasen in die Zielzelle ist, jedoch als ein zentraler Vermittler der Zytolyse fungiert.

Granzyme

Granzyme sind globuläre Serinproteasen. Es gibt mindestens fünf humane und zehn murine Granzyme, von denen Granzym A und B zu den abundantesten zählen und am besten untersucht sind. Granzyme lösen durch verschiedene Mechanismen in der Zielzelle Apoptose aus. Granzym A induziert durch Hydrolyse von Proteinen mit basischen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin eine Caspase-unabhängige Apoptose [77,78]. Des Weiteren aktiviert Granzym A einen dem endoplasmatischen Reticulum (ER) assoziierten Komplex (SET-Komplex), der auf noch unbekannte Weise in den Kern transloziert [77]. Dort wird durch Granzym A das Protein NM23-H1 freigesetzt, welches die chromosomale DNA degradiert [79]. Auch eine mögliche Spaltung des Histons 1 wird postuliert, wodurch das freigesetzte Chromatin für Endonukleasen zugänglich wird [80].

Granzym B spaltet Proteine am C-Terminus nach sauren Aminosäuren, besonders nach Asparaginsäure [81]. Granzym B kann Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen induzieren. Beim extrinsischen Weg wird direkt die Effektor-Caspase-3 aktiviert, was zur Apoptose mit DNA-Fragmentierung, Auflösung der Kernmembran und Zerstörung des Zytoskeletts führt [82]. Beim intrinsischen Weg wird die Permeabilität der äußeren Membran von Mitochondrien erhöht und das Protein Bid gespalten [83]. Dieses induziert die Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptogenen Proteinen (z.B. Apoptose induzierende Faktor (AIF)) [81]. Durch Cytochrom C wird wiederum die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Caspase-9 induziert, die anschließend über eine Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 die oben beschriebenen Effekte auslöst.

Neben diesen beiden Granzymen gibt es in lytischen Granula noch weitere, deren Funktion allerdings bisher weniger detailliert beschrieben ist. Granzym K ist eine Trypsin-ähnliche Protease, die ebenfalls Bid-abhängige Apoptose auslösen kann [84]. Granzym H ist eine Chymotrypsin-ähnliche Protease (Chymase) und scheint synergistisch mit Granzym B zum Zelltod zu führen [85]. Das letzte bekannte Granzym im Menschen ist Granzym M, welches vornehmlich in NK-Zellen exprimiert wird [86] und Zelltod insbesondere durch Spaltung von Ezrin und α -Tubulin induziert [87].

Granulysin

Granulysin ist ein kleines, zytolytisches Protein, das zur Saposin-Familie gehört und ebenfalls in lytischen Granula von T- und NK-Zellen gespeichert wird [88]. Eine Zellschädigung wird durch die Anlagerung des kationischen Proteins an negativ geladene Lipide der Mitochondrienmembran ausgelöst, wodurch Cytochrom C und AIF, sowie Caspasen und Endonukleasen aktiviert werden [89-91]. Bei Infektion mit intrazellulären, mikrobiellen Pathogenen wirkt Granulysin direkt durch Veränderung der Membranintegrität [92]. Granulysin wird neben der zytotoxischen Funktion auch eine Funktion als Chemokin und Aktivator von Leukozyten zugeschrieben [93].

1.2.4 Die Biogenese sekretorischer Granula

Die Granzyme A und B gelangen über den Mannose-6-phosphat Rezeptor (MPR) Weg in die SL. Hierzu werden die Proteine zunächst im Cis-Golgi-Netzwerk mit Mannose-6-phosphat (M6P) modifiziert und über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den SL transportiert [94]. Jedoch scheint es auch noch einen M6P-unabhängigen Weg zu geben, da bei MPR-defizienten Zellen noch 30% der Granzyme in die Granula transportiert werden [95]. Auch Perforin und Granulysin nutzen einen MPR unabhängigen Weg, der noch nicht im Detail aufgeschlüsselt ist.

Lysosomale Membranproteine werden in der Regel über Adapter Proteine (AP-1 bis AP-3) zu den SL transportiert [96]. Hierbei stellt FasL eine Ausnahme dar. Die Expression und der Transport dieses potenten Todesfaktors muss streng kontrolliert werden. Hierfür wird offensichtlich die prolinreiche Domäne des cytoplasmatischen Anteils des FasL genutzt, welche Proteine mit Src-Homologie-3 Domänen (SH3) binden kann. Es wird postuliert, dass über die Bindung von SH3-Proteinen ein direkter Transport vom TGN zu den Granula gewährleistet wird [97]. Über den

genauen molekularen Mechanismus ist jedoch auch im Falle des FasL Transportes wenig bekannt.

1.2.5 Regulation der Exozytose und Bildung der immunologischen Synapse

Die Exozytose der SL findet nur nach vorheriger Aktivierung der T- und NK-Zellen statt. Bei ZTL geschieht dies über die Stimulation des T-Zellrezeptors durch Antigen auf der Zielzelle und Ausbildung einer „immunologischen Synapse“. Erkennt der TZR ein spezifisches Antigen, initiiert dies eine Signalkaskade, die zum Ca^{2+} Einstrom und zur Aktivierung der T-Zelle führt. Es bildet sich an der T-Zell – APZ Kontaktzone ein zentraler supramolekularer Aktivierungskomplex (SMAC) aus, der unter anderem den TZR und CD8 enthält. Dieser zentrale Komplex (c-SMAC) wird in der Peripherie von einem Ring aus Adhäsionsproteinen (LFA-1) umgeben, der als p-SMAC bezeichnet wird [98]. Innerhalb des zentralen Komplexes befindet sich auch die sekretorische Domäne, in der die lytischen Granula ihren Inhalt freisetzen [99] (siehe auch Abb. 1.2).

Bei NK-Zellen verläuft die Bildung der immunologischen Synapse (IS) ähnlich, jedoch erfolgt die Auflösung durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Wie bereits erwähnt, kann eine Reduktion körpereigener MHC-I Komplexe auf transformierten Zielzellen über bestimmte NK Rezeptoren erkannt werden.

Nach Aktivierung der Zellen verläuft der Transport zur Plasmamembran in T- und NK-Zellen vergleichbar. Das Mikrotubuli-Organisations Zentrum (MTOC), der Golgi-Apparat und Mitochondrien reorientieren und polarisieren durch F-Aktin Reorganisation zur immunologischen Synapse [100]. Die Granula sammeln sich am MTOC und werden von dort über Dynein-Dynactin Motorproteine entlang der Microtubuli zur immunologischen Synapse transportiert [101]. Dort findet der weitere Transport wahrscheinlich über das Aktinzytoskelett statt, dabei spielt auch Myosin IIA eine wichtige Rolle [102]. An der Fusion mit der Plasmamembran und der anschließenden Degranulierung ist unter anderem Rab27a beteiligt [103]. Dieses G-Protein vermittelt die Bindung zu Munc13-4, welches vermutlich mit SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor associating-protein receptor) Proteinen der Plasmamembran interagiert [104].

Neueste Befunde zeigen allerdings, dass der Mechanismus der Exozytose nicht einheitlich auf alle sekretorischen Granula projiziert werden kann. So konnte in

murinen Zellen gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von gespeichertem FasL Ca^{2+} -unabhängig verläuft, während die Degranulation von Granzymen und Perforin ein Ca^{2+} Signal benötigt [105]. Diese verschiedenen Signale hängen unter anderem von der Stärke der TZR Aktivierung ab [106]. Es wurde postuliert, dass bei einem schwachen TZR Signal eine FasL-vermittelte Apoptose stattfindet, während eine starke Aktivierung zur Perforin/Granzym-vermittelten Zytotoxizität führt [107]. Ebenfalls scheint auch der Transport zur immunologischen Synapse unterschiedlich zu verlaufen. Es wurden für die FasL- und Perforin/Granzym-Degranulation verschiedene Zytoskelett Proteine identifiziert, die unabhängig voneinander einen Transport ermöglichen. Außerdem wurde in diesen Studien keine fluoreszenzmikroskopische Kollokalisierung des FasL mit anderen klassischen lytischen Proteinen beobachtet [105,108]. Aufgrund dieser Befunde postulierten Kassahn und Kollegen, dass der FasL und andere Marker für sekretorische Lysosomen auf unterschiedlichen Wegen freigesetzt werden bzw. dass die unterschiedlichen Effektorproteine nicht im gleichen Kompartiment lokalisiert sind [108].

1.2.6 Sekretorische Granula und assoziierte Krankheiten

Fehlfunktionen des Transportes und der Sekretion von sekretorischen Granula äußern sich in der Regel gleichzeitig in Immundefizienzen und (partiell) Albinismus, was auf den funktionellen Zusammenhang zwischen SL in Effektorzellen des Immunsystems und in Melanozyten zurückzuführen ist. Durch die nachfolgend beschriebenen genetischen Defekte konnten die Funktionen einiger an der Sekretion beteiligter Proteine aufgeklärt werden.

Chédiak-Higashi Syndrom (CHS)

Das Chédiak-Higashi Syndrom ist eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die neben den oben genannten Defekten auch neurologische Fehlfunktionen aufweist [109]. Patienten mit CHS bzw. Mäuse mit dem entsprechenden Syndrom (*beige*) weisen einen Defekt des 400 kDa Protein CHS1 (bzw. Lyst in der Maus) auf. Morphologisch äußert sich dies in vergrößerten Lysosomen, die als Riesenlysosomen in verschiedenen Zelltypen vorliegen [110]. Beide Formen sind mit partiellem Albinismus und Funktionsstörungen in T- und NK-Zellen assoziiert.

Hermansky-Pudlack Syndrom (HPS)

Zurzeit gibt es beim Menschen acht verschiedene Mutationen, die in verschiedener Ausprägung als HPS zusammengefasst wurden [111]. Bei Mäusen sind wenigstens 15 verschiedene Mutationen beschrieben [112]. Die „*pearl*“ Mutation entspricht dem HPS Typ 2 des Menschen. Hierbei ist das Gen AP3B1 mutiert, welches für die β -Untereinheit des Adapter Protein 3 (AP3) codiert [113,114]. Im Gegensatz zum CHS stellt sich die Pathologie zusätzlich zum Albinismus und defekter Zytotoxizität, auch durch Thrombozytenaggregationsstörungen mit einer Blutungsneigung dar. Dieser Phänotyp beruht auf einer Dysfunktion der Exozytose sekretorischer Granula von Thrombozyten [115]. Die AP-3 Mutation resultiert in einem fehlerhaften Transport der LAMP Proteine zu den sekretorischen Lysosomen, wie auch in einem defekten Transport der Lysosomen selbst entlang der Mikrotubuli [116].

Griscelli Syndrom (GS)

Beim Griscelli Syndrom werden zwei verschiedene Typen unterschieden. Das Griscelli Syndrom Typ 2 resultiert aus einem Defekt der Rab27a Expression [117]. Diese kleine GTPase ist in Melanozyten für das Andocken von Lysosomen an die Plasmamembran verantwortlich. Eine Dysfunktion verhindert eine Sekretion von Melanosomen und resultiert in Hypopigmentierung. Auch die Sekretion lytischer Granula ist beeinträchtigt, was zu einer deutlich geschwächten Immunabwehr und damit erhöhter Infektanfälligkeit führt. Beim GS Typ 1 liegt der Defekt in der Myosin Va Expression [118]. Dieses Protein ist zusammen mit Rab27a für den Transfer von Melanosomen von Mikrotubuli zum Aktinzytoskelett verantwortlich. Da es bei diesem Defekt aber nicht zur fehlerhaften Sekretion von lytischen Granula kommt, lässt sich hier schlussfolgern, dass in ZTL ein anderer Mechanismus vorliegt [119].

Familiäres Hämophagozytose-Syndrom (FHL)

Bei dieser Erbkrankheit liegt ebenfalls eine Störung der Zytotoxizität vor. Hier kommt es vor allem im Rahmen einer antiviralen Immunantwort zu einer unkontrollierten Aktivierung und Proliferation von ZTL. Die dadurch entstehende massive Zytokinausschüttung mit nachfolgender Makrophagenaktivierung führt morphologisch zur Phagozytose von Blutzellen, was auch als Hämophagozytose bezeichnet wird. Es werden mehrere Typen der FHL unterschieden. Hierzu gehören Defekte im Perforin-Gen (FHL-2), wobei die Granula zwar noch degranulieren können, jedoch kein funktionelles Perforin beinhalten [120]. Bei FHL-3 dagegen ist die

Degranulierung gestört, da hier das Gen defekt ist, welches für Munc13-4 kodiert. Wie bereits zuvor erwähnt, interagiert dieses Protein mit Rab27a und vermittelt die Fusion mit der Plasmamembran [121].

1.3 Proteomanalysen lysosomaler Kompartimente

Das Spektrum an SL-assoziierten Krankheiten kann bei weitem nicht den Proteinbesatz der lysosomalen Strukturen wiedergeben. Eine Proteomanalyse von gereinigten Granula ermöglicht jedoch eine detailliertere Analyse. Der Vorteil von Proteomanalysen liegt in der quantitativen Detektion von Proteinen, die meist in ihrer aktiven Form vorliegen. Dagegen sind RNA-Analysen nur bedingt aussagekräftig, da die mRNA-Expression nicht zwangsweise mit der Proteinmenge korrelieren muss. Dies ist besonders bei gespeicherten Proteinen der Fall. Die ersten Experimente zur Isolierung von Lysosomen wurden mit Rattenhepatozyten durchgeführt. Mit der Erfindung der Matrix-unterstützten Laser-Desorption / Ionisation (MALDI) war es ab den 1980-er Jahren möglich, einzelne Proteine unabhängig von immunologischen oder enzymatischen Nachweisen zu identifizieren. So gelang es unter anderem Bagshaw et al., eine erste Proteinkarte von Tritosomen aus der Rattenleber zu erstellen [122]. Tritosomen sind lysosomale Strukturen, die nach oraler Verabreichung von Triton WR1339 eine veränderte Dichte aufweisen, wodurch eine einfachere Separation im Dichtegradienten ermöglicht wird. Da jedoch bei der Analyse von humanen Proben dieses Hilfsmittel entfällt, ist ein effizientes Reinigungsprotokoll der Lysosomen essentiell. Dichtegradientenfraktionen sind zwangsläufig nicht absolut rein, dies muss aber nicht unbedingt von Nachteil sein. Angereicherte, Granula-assoziierte Proteine lassen so Rückschlüsse auf eine mögliche Verknüpfung zum Zytoskelett oder anderen subzellulären Strukturen zu. Diese assoziierten Proteine könnten dadurch eine Bedeutung in Mobilisierung, Transport und Fusion mit der Plasmamembran haben.

1.3.1 Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Das Prinzip der 2D-DIGE Technologie beruht, ähnlich der konventionellen zwei-dimensionalen Gelelektrophorese, auf der Separation der Proteine anhand ihres Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes. Jedoch findet vor dieser Separation eine Markierung der Proteinlysate mit fluoreszierenden Farbstoffen statt. Diese sogenannten CyDyes binden dabei über einen N-Hydroxysuccinimidester (NHS-

Ester) an primäre Amine (wie z.B. Lysin). Da die Fluoreszenzintensität eines Spots im Gel mit seiner Proteinmenge korreliert, kann man durch die Nutzung verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe, Unterschiede in Proteinbesatz und -expression quantifizieren. Aufgrund der Eigenschaften der Farbstoffe und der Markierungsmethodik erreicht man im Gegensatz zu herkömmlichen Silber- oder Coomassie-Gelen zudem einen sehr großen dynamischen Bereich [123]. Da sich durch die Eigenmasse der Farbstoffe das Molekulargewicht der Proteine um je 434-464 Da (abhängig vom CyDye) vergrößern würde, wird das Verhältnis von Protein und Farbstoff so gewählt, dass nur circa 3-5% der Proteine markiert werden. Deshalb wird diese Methode auch als Minimalmarkierung bezeichnet. Trotz dieser geringen Farbstoffmenge liegt die Detektionsgrenze bei 0,1-1,0 ng Protein [124,125]. Der größte Vorteil dieser Technologie ist jedoch der Vergleich von zwei ähnlichen Proben in einem Gel, wodurch elektrophoretische Laufunterschiede zwischen zwei separat laufenden Gelen entfallen. Dies reduziert die Anzahl der Gele um ein Vielfaches und erlaubt anschließend eine softwaregestützte, statistische Analyse der differentiellen Proteine.

2. Fragestellung

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen vermitteln ihre Effektorfunktionen über eine induzierbare Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie FasL, Perforin, Granulysin und Granzymen. Um eine effiziente Lyse von Zielzellen zu erreichen, ist es notwendig, dass diese Effektormoleküle in mobilisierbaren Organellen gespeichert werden, aus denen sie bei Bedarf schnell in die zytotoxische immunologische Synapse freigesetzt werden können.

Zu Beginn der Arbeit war unklar, ob in verschiedenen Zellpopulationen einheitliche sekretorische Lysosomen vorliegen, oder ob sich anhand des Proteinbesatzes verschiedene sekretorische Granula unterscheiden lassen. Des Weiteren waren die Befunde zur Reifung der sekretorischen Vesikel und damit zur Expression einzelner Effektorproteine in ruhenden oder aktivierten Lymphozyten widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine Methodik zur Isolierung und Analyse intakter Vesikel etabliert werden, um mittels differentieller Proteomanalytik die oben angedeuteten Unklarheiten zu beseitigen.

Zielsetzung im Einzelnen:

1. Etablierung eines Protokolls zur Anreicherung von sekretorischen Lysosomen aus T-Zellen und natürlichen Killerzellen
2. Charakterisierung und Abgrenzung der individuellen Organellenfraktionen mittels Nachweis bekannter Markerproteine in Western Blots
3. Etablierung der 2D-DIGE-Plattform und Optimierung der Probenvorbereitung und -prozessierung für die folgenden differentiellen Proteomanalysen
4. Erste Validierung der Methodik durch vergleichende Analysen einzelner Fraktionen aus T-Zellpopulationen unterschiedlicher Spender
5. Anwendung der Methodik zur Charakterisierung und zum Vergleich angereicherter sekretorischer Vesikel aus NK-Zelllinien und primären NK-Zellen
6. Erstellung einer Proteomkarte sekretorische Lysosomen aus NK-Zellen
7. Exemplarische Verifizierung ausgewählter apparenter Unterschiede (biochemisch, durchflußzytometrisch, mikroskopisch)
8. Charakterisierung und Vergleich angereicherter sekretorischer Lysosomen aus verschiedenen T-Zell-Subpopulationen
9. Erstellung einer Proteomkarte sekretorische Lysosomen aus T-Zellen

10. Vergleich angereicherter sekretorischer Lysosomen aus $\alpha\beta$ T-Zellen (hier $CD4^+$ und $CD8^+$) und $\gamma\delta$ T-Zellen (hier $v\delta1^+$ und $v\delta2^+$)

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ergaben sich während der Arbeit neue Fragestellungen zur Reifung sekretorischer Vesikel in unterschiedlichen Zellpopulationen und zu Vorkommen und Besatz unterschiedlich beladener lysosomaler Granula.

Im Laufe der Arbeit neu formulierte Ziele:

11. Darstellung der Reifung sekretorischer Granula anhand der Expression zytotoxischer Moleküle in individuellen Zellpopulationen, sowie Vergleich von Vesikeln aus ruhenden und aktivierten Zellen (mittels 2D-DIGE Analyse).
12. Mikroskopische und biochemische Charakterisierung sowie direkter Vergleich zweier Populationen von sekretorischen Granula aus der differentiellen und Dichtegradienten-Zentrifugation (Fraktion 2 - „FasL/CD63“ Lysosomen; Fraktion 6 - dichte „Granzym“ Granula)

3. Material

3.1 Material für die Zellbiologie

3.1.1 Zellen

Als Quelle für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) dienten Buffy-Coat Präparationen gesunder Spender, die vom Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH, Campus Kiel bzw. Campus Lübeck bereitgestellt wurden.

Die NK-Zelllinien NKL und YTS und die MHC-Klasse-I negative B-Zelllinie 721.221 wurden von Carsten Watzl (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Erythroleukämie-Linie K562 (ATCC: CCL-243) wurde von David Kaplan (Cleveland, USA) bereitgestellt. Der stabil FasL exprimierende Klon JFL39.1 wurde im Labor aus einer Apoptose-resistenten Variante (RAPO) der humanen Leukämie-Linie Jurkat hergestellt. Für Restimulationen wurden EBV-transformierte B-Zelllinien (EBV-O und EBV-M) eingesetzt, die ebenfalls aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen. Darüber hinaus wurden neben eigens gereinigten T- und NK-Zellpopulationen etablierte $\gamma\delta$ T-Zelllinien (DCv δ 1, DCv δ 2, DKv δ 1 und DKv δ 2) von Dr. Daniela Wesch (AG Kabelitz, Immunologie Kiel) für einige Versuche verwendet.

3.1.2 Medien und Puffer

3.1.2.1 Zellkulturmedien

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Invitrogen

Zusätze für Zellkulturmedien

Penicillin / Streptomycin (10000U) / (10000 μ g)	Biochrom AG, Berlin
FCS (fetal calf serum) (inaktiviert bei 56°C für 30 min, 0,22 μ m steril filtriert)	Invitrogen, Karlsruhe

Die Medien wurden mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, Zelllinien-spezifisch mit 5-12,5% (v/v) FCS und 50 μ M β -Mercaptoethanol versetzt. Lagerung: 4°C

weitere Zusätze

Phytohämagglutinin (HA16) in PBS		Remel, Dartford, UK
Proleukin® S (Interleukin-2)		Novartis, Nürnberg
0,01 M β -Mercaptoethanol (200-fach Stock) 70 μ l in 100 ml PBS, filtriert durch 0,22 μ m PVDF		

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO), gekühlt unmittelbar verwenden		Merck, Darmstadt
---	--	------------------

PBS (Phosphate-buffered saline)

PBS/DULBECCO	eine Einheit	Biochrom AG
ddH ₂ O, Lagerung :4°C	ad 10 l	

Eosin-Lösung

Eosin	2 g	Merck
NaN ₃	0,25 g	Merck
FCS	50 ml	Invitrogen
0,9% NaCl-Lösung	450 ml	
Filterieren, Lagerung: 4°C		

Trypanblau-Lösung

0,1% Trypanblau in PBS		Merck
------------------------	--	-------

3.1.2.2 Zellseparation

Ficoll (1,077 g/ml)		Biochrom AG
---------------------	--	-------------

MACS Waschpuffer

BSA (bovines Serumalbumin)	0,5% (w/v)	Roth, Karlsruhe
EDTA	2 mM	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C		

3.1.2.3 Durchflusszytometrie

Waschpuffer

BSA	1% (w/v)	Roth
NaN ₃	0,1% (w/v)	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C		

Fixierungspuffer

PFA (Paraformaldehyd)	1% (w/v)	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C		

3.1.2.4 Konfokale Mikroskopie

Poly-L-Lysin-Lösung

Poly-L-Lysin in PBS	100 µg/ml	Sigma, München
---------------------	-----------	----------------

PEM-Puffer (2x)

PIPES	200 mM	Merck
MgCl ₂	2 mM	Merck
EGTA	2 mM	Merck
pH 6,95 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)		

Borat-Puffer (2x)

Natriumborat (Na ₂ B ₄ O ₇)	200 mM	Merck
MgCl ₂	2 mM	Merck
pH 11 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)		

Fixierungspuffer

PFA in PBS	6% (w/v)	Merck
pH 7 einstellen, zur Herstellung des Fixierungspuffers mit gleichem Volumen PEM-Puffer (2x) bzw. Borat-Puffer (2x) mischen		

Permeabilisierungspuffer

Triton X-100 in PBS	1% (v/v)	Merck
---------------------	----------	-------

Reduktionslösung

NaBH ₄ in PBS	0,1% (w/v)	Merck
--------------------------	------------	-------

Blockierungspuffer

BSA	0,2% (w/v)	Merck
Triton X-100 in PBS	0,01% (v/v)	Merck

Mounting Medium

Prolong Gold Antifade Reagent Mounting Medium mit DAPI	Invitrogen
--	------------

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.1: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Klon	Isotyp	Applikation		Bezugsquelle
			DZ	KM	
α -CD2-FITC (S5.2)		IgG2a	1/5	-	BD Pharmingen, Heidelberg
α -CD2-PE (S5.2)		IgG2a	1/5	-	BD
α -CD3-FITC (SK7)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD3-PE (SK7)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD4-FITC (SK3)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD4-PE (SK3)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD8-FITC (SK1)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD8-PE (SK1)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD16-FITC (Leu11a)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD19-FITC (4G7)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD19-PE (4G7)		IgG1	1/5	-	BD
α -CD25-PE (IL-2R)	PC61	IgG1	1/5	-	BD
α -CD56-FITC (NCAM)		IgG2b	1/5	-	BD
α -CD56-PE (NCAM)		IgG2b	1/5	-	BD
α -NKG2D	1D11	IgG1	1/5	-	BD
α -TZR $\alpha\beta$ -FITC		IgG1	1/5	-	BD
α -TZR $\gamma\delta$ -PE		IgG1	1/5	-	BD
α -v δ 1-FITC		IgG1	1/5	-	BD
α -v δ 2-FITC		IgG1	1/5	-	BD
α -Granzyme A-FITC	GrA-11	IgG1	1/5	1/50	immunotools
α -Granzyme B Alexa 647	GB11	IgG1	1/100	1/50	BD
α -Perforin Alexa 647	dG9	IgG2b	1/40	-	Biozol, Eching

Primärantikörper	Klon	Isotyp	Applikation		Bezugsquelle
			DZ	KM	
α -Perforin Alexa 488	dG9	IgG2b	1/40	-	Biozol, Eching
α -HLA-DR-FITC	L243	IgG2a	1/50	-	BD
α -Interleukin-16	70719	IgG1	-	1/50	R&D, Minneapolis, USA
α -FasL	Nok1	IgG1	-	1/50	BD
Isotypkontrollen					
α -IgG ₁ -FITC			1/5	-	BD
α -IgG ₁ -PE			1/5	-	BD
α -IgG _{2a} -FITC			1/5	-	BD
α -IgG _{2a} -PE			1/5	-	BD
IgG ₁ Kontrolle (MOPC21)			-	1/50	Abcam, Cambridge, UK
Isotypkontrollen für intrazelluläre Färbungen					
α -IgG ₁ -Alexa 647	MOPC-21		1/100	-	BD
α -IgG _{2b} -Alexa 488	MPC-11		1/40	-	BD
α -IgG ₁ -Alexa 488	MOPC-21		1/50	-	BD
α -IgG _{2b} -Alexa 647	MPC-11		1/40	-	BD

Abkürzungen: DZ, durchflusszytometrische Analyse; KM, konfokale Mikroskopie

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Konz.	Applikation		Bezugsquelle
		DZ	KM	
Esel α -Maus Alexa 555	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen
Esel α -Maus Alexa 488	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen
Kaninchen α -Ziege Alexa 555	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen

Abkürzungen: DZ, durchflusszytometrische Analyse; KM, konfokale Mikroskopie

3.1.4 Kits

Zellisoliationskits

Tabelle 3.3: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Name	Nummer	Isolationsmethode
CD4 ⁺ T-Zell Isolations Kit II	#130-091-155	negativ
CD8 ⁺ T-Zell Isolations Kit	#130-094-156	negativ
Anti TZR g/d Micro Bead Kit	#130-050-701	positiv
NK-Zell Isolations Kit	#130-092-657	negativ

Zytotoxizitätskit

CytoTox96 Zytotoxizitätsassay Promega

3.2 Material für die Biochemie

3.2.1 Puffer und Reagenzien

3.2.1.1 Lysepuffer

NP40-Lysepuffer

Nonidet [®] P 40 (NP40)	1% (v/v)	Fluka, Seelze
Tris-Puffer	20 mM	Merck
NaCl	0,15 M	Merck
Aprotinin	2 µg/ml	Sigma
Leupeptin	2 µg/ml	Sigma
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	1 mM	Sigma
Natriumorthovanadat	1 mM	Merck
Natriumfluorid	10 mM	Fluka
Natriumpyrophosphat	1 mM	Sigma
Pepstatin A	2 µg/ml	Sigma
Lagerung: 4°C bis zu 3 Wochen		

2D-DIGE-Lysepuffer

Harnstoff	7 M	GE Healthcare
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4% (w/v)	Merck
Tris	30 mM	Fluka
pH 8,5 vor CHAPS Zugabe eingestellt, aliquotiert und gelagert bei: -20°C		
Protease Inhibitor Cocktail (40-fach) 1 Tablette pro 250 µl ddH ₂ O	2,5% (v/v)	Roche, Penzberg

2D-Lysepuffer (2x Probenpuffer)

Harnstoff	7 M	GE Healthcare
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4% (w/v)	Merck
aliquotiert a 500 µl, gelagert bei -20°C, vor Benutzung Zugabe von:		
DTT	2% (w/v)	GE Healthcare
IPG Puffer	2% (v/v)	GE Healthcare

3.2.1.2 SDS-PAGE Systeme

SDS-PAGE: NuPAGE-System (Invitrogen)

<u>NuPAGE®-LDS-Probenpuffer (4x)</u>	Invitrogen
<u>NuPAGE®-MES SDS-Laufpuffer (20x)</u>	Invitrogen
vor Gebrauch mit ddH ₂ O verdünnen	

10x Reduktionslösung

DTT in ddH ₂ O	0,85 M	Merck
---------------------------	--------	-------

Protein-Molekulargewichts-Standards

MagicMark™ XP Standard	Invitrogen
NuPage SeeBlue® Plus2	Invitrogen
Novex® Sharp Protein Standard	Invitrogen

SDS-PAGE: Protean II-System (Bio-Rad)Laufgel (10 %)

ddH ₂ O	8,7 ml	Braun, Melsungen
1 M Tris/HCl, pH 8,8	11,2 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	10 ml	Carl Roth
10% SDS	300 µl	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetra-methylendiamin)	20 µl	Merck
20% APS	100 µl	Merck

Sammelgel

ddH ₂ O	7,03 ml	Braun
1 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	1,67 ml	Carl Roth
10% SDS	100 µl	Merck
TEMED	10 µl	Merck
20% APS	50 µl	Merck

10x Elektrophoresepuffer

Tris	250 mM	Merck
Glycin	1,92 M	Merck
SDS	0,1 %	Merck

vor Gebrauch 500 ml Puffer mit 4,5 l ddH₂O gemischt

3x Probenpuffer

SDS	6% (w/v)	Merck
Glycerin	30% (v/v)	Merck
Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM	Merck
Bromphenolblau	0,005% (w/v)	Merck
β-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)	Merck

Protein-Molekulargewichts-Standards

Low Range-Standard		Bio-Rad, München
Precision Plus Protein™ Standards		Bio-Rad

SDS-PAGE: Ettan Dalt six (GE Healthcare)

Trenngel (12,5 %)

ddH ₂ O	127 ml	Braun, Melsungen
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	100 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	166,7 ml	Carl Roth
10% SDS	4 ml	Merck
entgasen für mindestens 5 Stunden vor Zugabe von:		
20% APS	1 ml	GE Healthcare
TEMED	111 µl	GE Healthcare

Verdrängungslösung

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	375 mM	Merck
Glycerol (87% (v/v))	50% (v/v)	Carl Roth
Bromphenolblau	0,002% (w/v)	Merck

Equilibrierungslösung

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	75 mM	Merck
Harnstoff	6 M	GE Healthcare
SDS	2% (w/v)	GE Healthcare
Glycerol (87% (v/v))	30% (v/v)	Carl Roth
Equilibrierungslösung A	+ 1% Dithiothreitol	GE Healthcare
Equilibrierungslösung B	+ 2,5% Iodacetamid	GE Healthcare

Low-melting Agarose

L.M.P. Agarose	0,5% (w/v)	Gibco
Bromphenolblau	0,005% (w/v)	Merck

in 2x Elektrophoresepuffer aufkochen und auf 40-50°C abkühlen lassen

3.2.1.3 Western Blot

Transferpuffer

Tris	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Merck
Methanol	20% (v/v)	Sigma
SDS	0,015% (v/v)	Merck
Lagerung: 4°C		

Protein-Färbe-Lösung

Ponceau S-Farbkonzentrat		Sigma
--------------------------	--	-------

Waschpuffer (TBST)

Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Tween20	0,05% (v/v)	Merck
auf pH 7,5-8,0 einstellen, Lagerung: 20°C		

BSA Blockierungslösung

Tris/HCl pH 7,5	100 mM	Merck
NaCl	2,2% (w/v)	Merck
BSA	5% (w/v)	Carl Roth
NaN ₃	0,01% (w/v)	Merck
Steril filtrieren (0,22 µm), Lagerung: 4°C		

Milchpulver Blockierungslösung

Instant-Milchpulver	5% (w/v)	frema-Refrom
in TBST-frisch ansetzen,		

“Stripping”-Lösung

Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM	Merck
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)	Merck
SDS	6,9% (w/v)	Merck

Tabelle 3.4: Für Western Blot verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	MW (kDa)	Bestnr.	Firma	Einsatzkonz.
BiP/GRP78	40	Maus	78	610978	BD	1:250
Catalase	-	Kaninchen	65	ab1877-100	Abcam	1:1000
Cathepsin D	CTD-19	Maus	34 und 52	C0715	Sigma	1:2500
CD26 / DPPIV	222113	Ratte	110	MAB1180	R&D	1:1000
CD63 / LAMP3	MEM-259	Maus	40-60	SM3035P	Acris	1:1000
COX IV	10G8D12C12	Maus	17	MS408	MitoScience	1:1000
Cytochrom c	7H8.2C12	Maus	15	556433	BD	1:1000
EEA-1	14	Maus	180	610456	BD	1:2500
FasL	G247-4	Maus	45	556387	BD	1:1000
Galectin-3	9C4	Maus	31	sc-56108	Santa Cruz	1:3000
GAPDH	6C5	Maus	36	RDI-TRK5G4-6C5	RDI	1:2500
GM130	35	Maus	130	610822	BD	1:250
Golgin 84	26	Maus	84	611382	BD	1:250
Granulysin	-	Ziege	9 und 15	AF3138	RnD	1:1000
Granzyme B	2C5/F5	Maus	32	550558	BD	1:2500
Interleukin-16	70719	Maus	75	MAB316	R&D	1:1000
LAMP-1	25	Maus	110	611042	BD	1:500
p230	15/p230	Maus	230	611280	BD	1:1000
p47A	18	Maus	47	610900	BD	1:250
pan Cadherin	mAb22744	Maus	139	ab22744	abcam	1:1000
Perforin	B-D48	Maus	70	ab47225	abcam	1:500
Rab 4A (D-20)	-	Kaninchen	24	sc-312	Santa Cruz	1:500
Rab 5B (A-20)	-	Kaninchen	24	sc-598	Santa Cruz	1:500
Rab 7 (C-19)	-	Ziege	22	sc-6563	Santa Cruz	1:500
Vti1b	7	Maus	27	611404	BD	1:1000
α -Maus-IgG-HRP	-	Schaf	-	NA931V	GE Healthcare	1:7500
α -Kaninchen-IgG-HRP	-	Esel	-	NA9340V	GE Healthcare	1:7500
α -Ratte-IgG-HRP	-	Ziege	-	NA9350V	GE Healthcare	1:7500
α -Ziege-IgG-HRP	-	Esel	-	sc-2033	Santa Cruz	1:7500

Abkürzungen: HRP: Meerrettich-Peroxidase

3.2.1.4 Färbelösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Ruthenium II-bathophenanthrolin Disulfonat Chelat (RuBPS)

Fixierlösung

Ethanol	30% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth

Färbelösung

RuBPS	1µM	eigene Herstellung
-------	-----	--------------------

Entfärbelösung

Ethanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth

Sypro Ruby

Fixierlösung

Methanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth

Färbelösung

Sypro Ruby gel stain		Invitrogen
----------------------	--	------------

Entfärbelösung

Methanol	10% (v/v)	Merck
Essigsäure	7% (v/v)	Carl Roth

Flamingo Pink

Fixierlösung

Ethanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth

Färbelösung

Flamingo Fluorescent gel stain		Bio-Rad
--------------------------------	--	---------

Entfärbelösung

Tween20	0,1% (w/v)	Merck
---------	------------	-------

Deep Purple / Lava PurpleFixierlösung

Ethanol	15% (v/v)	Merck
Zitronensäure	1% (v/v)	Merck

Färbelösung

Lava Purple oder Deep Purple in 100 mM Natriumborat, pH 10,5		Fluorotechnics, Sydney, Australien GE Healthcare
---	--	--

Entfärbelösung

Ethanol	15% (v/v)	Merck
---------	-----------	-------

3.2.1.5 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie10 x Ammoniumbicarbonat (ABC)

Ammoniumbicarbonat (MW 79,06)	250 mM	Fluka
Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	192 mM	Carl Roth

TFA 0,1%

Trifluoressigsäure (TFA)	0,1%	Fluka
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)		Carl Roth

Matrixlösung (3,2 mg/ml)

α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (CHCA)	3,2 mg	Laser Labs, Sophia- Antipolis Cedex, Frankreich
0,1% Trifluoressigsäure (TFA)	650 μ l	Fluka
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	350 μ l	Carl Roth

25 mM Ammoniumbicarbonat + Acetonitril 1:1

Ammoniumbicarbonat 250mM	5 ml	Merck
Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	45 ml	Carl Roth
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	50 ml	Carl Roth

3.3 Weitere Materialien

96-Loch-Spitzbodenplatte	Nerbe plus, Winsen
96-Loch-Spitzbodenplatte aus PP	Greiner-Bio, Frickenhausen
96-Loch-U-Bodenplatte aus PP	Greiner-Bio
Centricon [®] -30 Konzentrator 30000 MWCO	Amicon, MA, USA
Coomassie-Protein-Assay-Reagenz	Thermo Scientific, Karlsruhe
Deckgläschen (18 mm)	Carl Roth
ECL-Detektionsreagenzien	GE Healthcare
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, UK
Gel-Spotpicker (1,5 mm und 3 mm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Microlance [®] Kanülen	Becton Dickinson
Nitrozellulosemembran Hybond [™] C Extra; 0,45 µm	GE Healthcare
Nitrozellulosemembran PuraBind 02; 0,2 µm	Whatman
NuPAGE [™] 4-12% Bis-Tris-Gel (10 Wells, 1.5 mm)	Invitrogen
NuPAGE [™] 4-12% Bis-Tris-Gel (15 Wells, 1.5 mm)	Invitrogen
Objektträger	Carl Roth
Opti-Tof [®] MALDI-Platte	Applied Bio, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Protein G-Sepharose [™] 4B	Invitrogen
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Serologische Pipetten	Greiner
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spektrometer-Küvetten	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Sartorius
Sterilvakuumfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio
Zellkulturplatten	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

3.4 Geräte

CO ₂ -Begasungsbrutschränke	Heraeus, Osterode
Ettan IPGphor	GE Healthcare
Ettan Dalt six	GE Healthcare
Ettan Spotpicker	GE Healthcare
Ettan Digester	GE Healthcare
Ettan Spotter	GE Healthcare
Typhoon Trio, Fluoreszenzscanner	GE Healthcare
Gelcaster	GE Healthcare
elektr. 8-Kanalpipette E8-200	Mettler Toledo
Ultrazentrifuge für SW60Ti	Beckman-Coulter
Ultrazentrifuge für TLA-100	Beckman-Coulter
Ultraschallbad	Branson
Dounce-Homogenisatoren	Braun
Ein- und Zwölfkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektronische Achtkanalpipette E8-200	Mettler Toledo, Gießen
Elektrophoresekammer Protean [®] II	Bio-Rad
Elektrophoresekammer X Cell SureLock [™]	Invitrogen
Western Blot Transfer-Tank Trans-Blot [®]	Bio-Rad
Western Blot Transfer-Tank Mini Trans-Blot [®]	Bio-Rad
Entwicklungskassetten Hypercassette [™]	GE Healthcare
Geltrockner	Bio-Rad
Filmentwicklungsmaschine Agfa Curix60	Agfa Deutschland, Köln
Spektrometer SmartSpec [™] 3000	Bio-Rad
Ultraschallstab	Branson, USA
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Netzgeräte Power Pack 200/300	Bio-Rad
Netzgerät PS 250-2	Sigma Techware, München
Neubauer Zählkammer	Fischer, Frankfurt
Feinwaage A120S	Sartorius
Gel Imager (Videokamera und Thermodrucker)	Intas, Göttingen
pH-Meter wtw pH 315i	WTW, Weilheim
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit Apotome (Zoophysilogie, CAU Kiel)	Zeiss
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson

Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Sicherheits-Sterilbank	Heraeus
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge Avanti J-25 I (Rotoren JA-10 und JA-25.50)	Beckman Coulter, Krefeld
Flachbettscanner GS-800	Bio-Rad
Wipptisch Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Heizblöcke Thermostat DB-2 und DB-3	Techne, Wertheim
MALDI-Tof/Tof 4700 Proteomics Analyzer	Applied Biosystems
Kühlfalle RVT-400	Savant, Farmingdale, USA
accu-jet pro	Brand, Wertheim
SpeedVac Plus SC110A	Savant

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO₂. Die Suspensionszelllinien Jurkat (JFL39.1), EBV-M und EBV-O wurden in RPMI-1640-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 5% FCS (v/v) kultiviert. Die NK-Zelllinie NKL wurde in RPMI mit 10% FCS und 100 U/ml rIL-2 kultiviert, YTS in IMDM mit 12,5% FCS und 50 µM β-Mercaptoethanol.

Für T-Zellklone und -linien wurden dem Medium 10% FCS (v/v) und rekombinantes IL-2 (rIL-2, 100 U/ml) zugesetzt. Die T-Zellklone oder -linien wurden direkt nach dem Auftauen oder periodisch etwa 14-21 Tagen nach Aktivierung mit einem sogenannten „Feeder-Cocktail“ restimuliert. Dieser „Feeder-Cocktail“ bestand aus 10⁶ isolierten peripheren mononukleären Zellen (PBMZ, 40 Gy bestrahlt) und 10⁵ EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL, 60 Gy bestrahlt) pro ml. Die bestrahlten Zellen wurden zusammen in einer zehnfach konzentrierten Menge angesetzt und vor Zugabe von rIL-2 (1000 U/ml) und PHA (5 µg/ml) zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um durch Bestrahlung eventuell entstandene Radikale zu entfernen. Die zu restimulierenden Zellen wurden mit 10⁶ Zellen/ml in Kulturmedium mit 10% FCS aufgenommen und mit einem Zehntel des Volumens an „Feeder-Cocktail“ versetzt. Zur Erzeugung von T-Zell Blasten wurden PBMZ durch PHA (0,5 µg/ml) aktiviert. Wie bei der Stimulation von Zelllinien/Klonen wurden auch hier nach drei bis fünf Tagen lebende Zellen mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt und unter Zusatz von rIL-2 (100 U/ml) weiter expandiert. Die phänotypische Charakterisierung sämtlicher Zellen erfolgte periodisch mittels Durchflusszytometrie.

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Die Zellen wurden dazu zentrifugiert und mit einer Dichte von maximal 20-30 x 10⁶ Zellen pro ml in kaltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen. Hierbei verhindert das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO eine Kristallbildung innerhalb der Zelle und eine damit verbundene Schädigung. Als nächstes wurde die Zellsuspension auf Eis

in Kryoröhrchen überführt, die dann unter Verwendung von Luftpolster-Isolationsmaterial langsam auf zunächst -20°C abgekühlt wurde. Nach der zweiten Einfrierphase bei -80°C erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C). Zum Auftauen wurden 10 ml kaltes Kulturmedium unter ständigem Schütteln tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellzahl und Zellvitalität wurde nach zweimaligem Waschen (1300 rpm, 7 min) mit Kulturmedium bestimmt. Der Auftauvorgang erfolgte möglichst rasch, da DMSO bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch ist.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypanblau- bzw. Eosin-Lösung verdünnt. Dabei dringt der Farbstoff (Trypanblau bzw. Eosin) durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol ein und färbt so selektiv tote Zellen an. Die lebenden Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergibt sich durch Multiplikation des Mittelwerts, der in zwei bis vier Teilquadraten gezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor (10^4).

4.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Aus Leukozytenkonzentraten, sogenannten „Buffy-Coats“, die nach dem Abzentrifugieren von Vollblut abgepresst werden, lassen sich durch eine Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMZ) isolieren. Dabei reichern sich die Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen Plasma- und Thrombozyten-Überstand und der Ficoll-Lösung an. Im Sediment setzten sich Erythrozyten und Granulozyten (und gegebenenfalls tote PBMZ) ab. Vor der Isolierung der Zellen wurden zunächst 100 ml PBS in einer mittleren Zellkulturflasche vorgelegt und der „Buffy-Coat“ (meist ca. 25-30 ml) darin verdünnt. In 50 ml Röhrchen wurden jeweils 25 ml des verdünnten „Buffy-Coats“ vorgelegt und mit 15 ml Ficoll ($d=1,077$ g/ml) vorsichtig unterschichtet. Nach der Zentrifugation (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse) wurde der Lymphozytenring abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, zweimal mit PBS, einmal mit Kulturmedium gewaschen (1300 rpm, 7 min) und schließlich in RPMI-Medium mit 5% FCS aufgenommen. Dabei dienten die Waschschritte der Entfernung von Thrombozyten, Serum und Ficollrückständen.

4.1.5 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

4.1.5.1 Separation von T-, NK- und B-Lymphozyten (E-Rosettierung)

Humane T- und NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu B-Zellen das Oberflächenmolekül CD2, welches an ein Glykoprotein (T11TS) bindet, das in hoher Dichte auf Schaferythrozyten (sheep red blood cells, SRBC) exprimiert wird. Dadurch lagern sich die Schaferythrozyten in „Rosetten“ an die T- und NK-Zellen (E-Rosetten). Diese Rosetten lassen sich aufgrund ihrer insgesamt höheren Dichte mittels Ficoll-Dichtegradienten von den restlichen Leukozyten der PBMZ (B-Zellen oder Monozyten) separieren. Die Schaferythrozyten werden anschließend mit einer 1 M NH_4Cl -Lösung lysiert. Die zu behandelnden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml eingestellt und 20 ml dieser Zellsuspension mit 5 ml Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten versetzt. Anschließend wurde dieses Gemisch auf 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse). Der Interphasering enthielt die E^- Zellen, die Rosetten bildenden E^+ Zellen befanden sich im Zellsediment. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das sedimentierte Material in 1-2 ml NH_4Cl resuspendiert und anschließend dreimal mit RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen.

Herstellung von Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten

20 ml Schafblut (zur Konservierung 1:2 mit Alsever-Lösung verdünnt) wurden dreimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Dabei wurde jeweils die sich ablagernde Schicht von Schaflymphozyten auf den Erythrozyten entfernt. Das Erythrozytensediment wurde dann in 20 ml RPMI-Medium mit 10% FCS aufgenommen. Nach Zugabe von 500 μl Neuraminidase und 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Erythrozyten noch zweimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Ausgehend vom Volumen des erhaltenen Pellet wurde eine 10%-ige Schaferythrozyten-Suspension in RPMI-Medium mit 10% FCS hergestellt. Die Reinheit der Erythrozyten wurde durch die Lyse von 500 μl Suspension in NH_4Cl -Lösung und anschließender Zählung der verbleibenden Leukozyten in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Schaferythrozyten wurden nur für Rosettierungen verwendet, wenn die Auszählung weniger als sieben Leukozyten pro Quadrant ergab.

4.1.5.2 Negative Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

Zur Isolierung von CD4⁺, CD8⁺ oder NK-Zellen wurde das Prinzip der Negativselektion mittels magnetischer Sortierung eingesetzt. Hierbei wurden alle nicht erwünschten Zellen mittels spezifischer Antikörper magnetisch aus dem Lymphozytenpräparat entfernt. Die gereinigten PBMZ wurden zunächst zweimal mit kaltem MACS Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min). Je 10⁷ Zellen wurden in 40 µl MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl des jeweiligen Antikörpergemisches zugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden 30 µl MACS Puffer und 20 µl anti-Biotin Mikrobeads zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Für die magnetische Separation wurde das Pellet in 50 µl / 10⁷ Zellen resuspendiert und über einen Vorfilter (Porengröße 70 µm) auf die magnetisierte und mit MACS Puffer equilibrierte Säule gegeben. Je nach Zellmenge wurden hierfür verschiedene Magnetsäulen verwendet. Die nicht magnetisch markierten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit MACS Puffer in ein neues Röhrchen gespült, abschließend zentrifugiert (1400 rpm, 5 min) und in einem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen.

4.1.5.3 Positive Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

γδ T-Zellen wurden durch positive Isolierung gewonnen. Sie wurde analog zur negativen Isolierung durchgeführt, jedoch werden hierbei die gewünschten Zellen „magnetisch markiert“. Die Präparation der Zellen bis zur Applikation auf die Magnetsäule verlief identisch. Beim Waschen der Säule wurden die nicht gewünschten Zellen entfernt, während die γδ T-Zellen in der magnetisierten Säule verblieben. Durch Entfernen des Magnetfeldes wurden die Zellen in ein neues Röhrchen mit 1 ml MACS Puffer gespült. Mit einem weiteren Milliliter Puffer und einem passenden Stempel wurde die restliche Zellsuspension aus dem Totvolumen der Säule gedrückt. Die erhaltenen Zellen wurden nach Zentrifugation in Kulturmedium aufgenommen.

4.1.6 Kultivierung von Lymphozyten-Subpopulationen

4.1.6.1 Kultivierung von isolierten T-Zellen

Isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mit einem allogenen „Feeder-Cocktail“ stimuliert und unter Zugabe von rekombinantem IL-2 expandiert. Zur Expansion isolierten NK-Zellen wurde ein gesondertes Protokoll [126] verwendet.

4.1.6.2 Kultivierung von isolierten NK-Zellen

Im Gegensatz zu anderen Zellen erreicht man eine optimale Expansion von NK-Zellen bei der Verwendung von Mitogen-aktivierten Feeder Zellen. Hierfür wurden zunächst PBMZ aus „Buffy-Coats“ isoliert und unter Zugabe von 50 U/ml rIL-2 und 0,5 µg/ml PHA für 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Medium wurde das PHA entfernt und die Zellen auf 10⁷ Zellen pro ml in RPMI mit 10% humanen AB-Serum in RPMI eingestellt. Nach der Bestrahlung mit 60 Gy erfolgte die Zugabe zu den isolierten NK-Zellen in einem Volumenverhältnis von 1:10. Die NK-Zellen wurden unter Zusatz von 10³ U/ml rIL-2 bei einer Zelldichte von 1,5-2,0 x 10⁶ Zellen/ml expandiert.

4.1.7 Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizität von Zellen wurde in einem nicht-radioaktiven Assays bestimmt, der auf der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) nach Lyse der Zielzellen beruht. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die enzymatische Reaktion am ELISA-Reader bei 492 nm gemessen. Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte unter Berücksichtigung der Spontanlyse von Effektor- und Zielzellen. Die maximale LDH Freisetzung der Zellen wurde durch Zugabe von Lysepuffer ermittelt und nach Abzug der Spontanlyse und Mediumkontrolle einer Zytotoxizität von 100% gleich gesetzt.

4.1.8 Immunfluoreszenzanalysen

4.1.8.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie (FACS) basiert auf Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die sowohl Oberflächenantigene, als auch intrazelluläre Antigene nachweisen können. Des Weiteren können aufgrund der Lichtstreuung der Zellen gleichzeitig deren Zellgröße und Granularität analysiert werden.

Nachweis von Zelloberflächenantigenen

Für einen Ansatz wurden 2×10^5 Zellen in eine Kavität einer 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte pipettiert, zentrifugiert (180 g, 4 min, 4°C) und anschließend mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden mit direkt konjugierten Antikörpern bzw. einer geeigneten Isotypkontrolle gleicher Konzentration (siehe Tab. 3.1) in einem Volumen von 10 µl resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper durch zwei weitere Waschschrte wurden die Zellen in einer 1%-igen PFA-Lösung fixiert und innerhalb von 48 h analysiert.

Nachweis intrazellulärer Antigene

Zur Detektion intrazellulärer Antigene müssen die Zellen permeabilisiert werden. Hierzu wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit von Becton Dickinson verwendet. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden in einer 96-Loch-Spitzboden Mikrotiterplatte zentrifugiert (1000 rpm, 4 min, 4°C) und einmal mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und 15 Minuten auf Eis belassen. Nach zwei weiteren Waschschrten mit jeweils 100 µl Perm/Wash-Lösung wurden die Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle gleicher Konzentration in einem Volumen von 100 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach zwei weiteren Waschschrten mit Perm/Wash-Lösung direkt in einer 1%-igen PFA-Lösung aufgenommen.

4.1.8.2 Konfokale Mikroskopie

Zur Reinigung der Deckgläser wurden diese für 15 Minuten in konzentrierter Salzsäure geschwenkt. Anschließend wurden sie zweimal mit Wasser und einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurden sie zu Sterilisationszwecken über Nacht bei 180°C getrocknet und waren so für den Gebrauch in der Zellkultur geeignet. Damit Zellen auf den Glas-Deckgläsern adhäreren, wurden diese in 12-Loch-Platten überführt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml in PBS) und die anschließende Inkubation der Deckgläser erfolgten bei 37°C für 30 Minuten. Nachfolgend wurden die Deckgläser wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Die verwendeten Suspensionszellen wurden direkt auf vorgekühlte Deckgläser in einer 12-Loch-Platte überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Adhärenz der Zellen wurde

lichtmikroskopisch überprüft. Nicht-adhärente Zellen wurden durch Abnehmen des Kulturmediums vorsichtig entfernt.

Die adhärenenden Zellen wurden vor der Fixierung einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation mit 3% PFA in PEM-Puffer, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation mit 3% PFA in Borat-Puffer. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese nachfolgend 15 Minuten mit 1% Triton X-100 in PBS behandelt. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen. Zur Reduktion reaktiver Aldehydgruppen, welche zur Hintergrundfluoreszenz des Präparats beitragen könnten, wurden die Zellen zweimal 10 Minuten mit Natriumborhydrid (1 mg/ml in PBS) behandelt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen gefärbt. Eine Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation der Präparate mit 1% BSA in PBS. Zur Färbung wurden die Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration inkubiert. Hierzu wurden die Antikörper in einem Volumen von 60 µl in Blockierungspuffer verdünnt und auf Parafilm aufgebracht. Die mit Zellen beschichteten Deckgläser wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit auf Parafilm vorgelegten Antikörpern inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Deckgläser nach einem weiteren Waschschriff mit destilliertem Wasser direkt auf die Objektträger aufgebracht. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Zellen mit einem geeigneten Fluorochrom-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert (45-60 min, RT). Die Deckgläser wurden abschließend mit 14 µl „Prolong Gold Antifade Reagent Mounting“ Medium auf dem Objektträger fixiert. Das Mounting Medium enthielt zusätzlich DAPI zur Visualisierung der Zellkerne. Die Präparate wurden konfokalmikroskopisch am LSM 510 mit einem 63x Objektiv untersucht.

4.1.8.3 Fluoreszenzmikroskopie mit Apotome[®]

Einige Proben wurden nicht nur im Laserscanning Mikroskop, sondern auch an einem Zeiss Axio Imager.Z1 mit Apotome[®] im Institut für Zoophysiologie (Prof. Dr. M. Leippe) untersucht. Ein Apotome[®] ist ein Modul im Mikroskop, welches ein bestimmtes Gitter enthält. Durch definierten Versatz der Gitterstruktur in der Präparatebene und anschließende Verrechnung der entstandenen drei Rohbilder ergibt sich ein präziser optischer Schnitt durch das Präparat. Hierbei ermöglicht das gute Signal/Rausch Verhältnis eine hohe optische Auflösung mit hohem Kontrast. Die Aufnahmen wurden mit einem 100x Objektiv durchgeführt.

4.1.9 Elektronenmikroskopie

Die in Homogenisationspuffer zentrifugierten Organellen wurden im selbigen Puffer mit 2,5% Glutaraldehyd aufgenommen und über Nacht bei 4°C fixiert. Die Proben wurden danach im Institut für Anatomie unter Leitung von Prof. Dr. Ralph Lucius mit PBS gewaschen, mit 2% OsO₄ nachfixiert, mit steigenden Konzentrationen an Ethanol dehydriert und abschließend in Araldit eingebettet. Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-beschichteten Trägern befestigt und mit einer gesättigten Lösung von Uranylacetat in 70% Methanol und Bleicitrat gefärbt. Die Proben wurden mit einem Zeiss EM 900 Transmissions Elektronenmikroskop untersucht.

4.2 Biochemische Methoden

In Abhängigkeit von Zelltyp und der späteren Verwendung der Lysate wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen einmal mit PBS gewaschen und in einem definierten Volumen 1% NP40-Lysepuffer resuspendiert. Um die Degradation und Modifikation von Proteinen zu hemmen, wurden dem Lysepuffer die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid, Pepstatin A, Natrium-Orthovanadat, EDTA, Natriumfluorid und Natriumpyrophosphat beigelegt. In einigen Fällen wurde das Lysat unter Verwendung eines 2 ml Homogenisators zusätzlich mechanisch aufgeschlossen. Nach 15-25 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 17300 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.1 Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von spezifischen Proteinen aus Zelllysaten wurden 2 µg eines Antikörpers und 60 µl in PBS gewaschene Protein G-Sepharose-Beads (50% (v/v) in PBS) zugegeben und zwei Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die „Beads“ zentrifugiert, viermal mit kaltem Lysepuffer gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht (5 min, 95°C). Die Proben wurden nachfolgend über SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Western Blot analysiert.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit einem auf Coomassie G-250 basierendem kolorimetrischen Reagenz (Bradford) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte nach einer 10 minütigen Inkubation bei 595 nm.

4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden diese zunächst mit Natrium- oder Lithiumdodecylsulfat (SDS oder LDS) denaturiert und mit β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) reduziert. Hierdurch kommt es zur Reduktion der Disulfidbrückenbindungen und zur Bindung von negativ geladenem SDS an hydrophobe Regionen der Proteine. Dieses überdeckt wiederum die Eigenladung der Proteine, wodurch deren Mobilität im Acrylamidgel nur noch von ihrer Größe abhängt. Die SDS-PAGE wurde auf verschiedenen Systemen durchgeführt: 1.) NuPAGE-System von Invitrogen, 2.) Protean II-System der Firma Bio-Rad und 3.) Ettan Dalt six von GE Healthcare. Das Ettansystem wurde ausschließlich für 2D-Gelelektrophoresen genutzt. Bei allen Systemen wurde die Elektrophorese in der Regel gestoppt, wenn die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

NuPAGE-System (Invitrogen)

Hierbei wurden 4-12% Bis-Tris-Fertiggele in einem MES-Puffersystem verwendet. 3-6 μ g der Probe wurden mit einem Viertel des Endvolumens an NuPAGE-Probenpuffer und einem Zehntel an 0,85 M DTT-Lösung versetzt und mit Wasser auf ein maximales Volumen von 30 μ l eingestellt. Die Proben wurden nachfolgend 10 Minuten bei 70°C denaturiert, zentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. eine Stunde bei 200 V.

Protean-II-System (BioRad)

Bei diesem Gelsystem konnte die Acrylamidkonzentration des Trenngels entsprechend der gewünschten Auftrennung angepasst werden. Die anschließende Überschichtung des Trenngels mit 96%-igem Ethanol diente einer ebenen Oberfläche. Das Ethanol wurde nach erfolgter Polymerisation abgegossen und etwaige Reste durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser von der Geloberfläche entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinmenge der zu untersuchenden Proben betrug zwischen 20-50 μ g. Die Proben wurden mit einem Drittel des Endvolumens an Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Abschließend wurden die Proben zentrifugiert und in die mit Laufpuffer gefüllten Taschen überführt. Aufgekochte Präzipitate auf Protein A/G Beads wurden direkt in

die trockenen Geltaschen geladen und erst danach mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-70 V über Nacht.

Ettan Dalt six System (GE Healthcare)

Auch bei Verwendung des Ettan-Systems musste die Acrylamidkonzentration den Anforderungen entsprechend angepasst werden. Die für mindestens zwei Stunden entgaste Acrylamidlösung wurde luftblasenfrei durch die Rinne des „Gelcasters“ bis 1 cm vor Plattenende gegossen. Durch Zugabe von 1,5 ml Verdrängungslösung wurde die beim Auspolymerisieren entstehende Hitzeentwicklung am Boden der Kammer verhindert, wodurch ein homogeneres Acrylamidnetz entstehen konnte. Um dies zu erreichen wurde zudem die erforderliche APS und TEMED Konzentrationen empirisch bestimmt, um ein langsames, homogenes Polymerisieren zu gewährleisten. Abschließend wurden die Gele mit fein vernebeltem destilliertem Wasser überschichtet. Die Kammer wurde mit Parafilm abgedeckt und zum vollständigen Auspolymerisieren über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die reduzierten und alkylierten IPG-Streifen (siehe Isoelektrische Fokussierung) wurden mit niedrig schmelzender Agarose in den mit destilliertem Wasser gewaschenen Geltaschen fixiert. Zunächst wurde die untere Pufferkammer mit Laufpuffer gefüllt, danach die obere mit doppelt konzentriertem Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte initial für eine Stunde bei 10 mA / Gel und anschließend bei 12-14 mA / Gel über Nacht unter konstanter Kühlung bei 20°C.

4.2.4 Western Blot

Der Transfer separierter Proteine erfolgt durch „Tank-Blotting“ auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurden die Komponenten der Transfer-Kammer zunächst in Western Blot-Transferpuffer equilibriert. Die Transferkammer wurde von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, zwei Whatman-Papiere, Gel, Nitrozellulosemembran, zwei Whatman-Papiere, Schwamm.

NuPAGE-Gele wurden unter Verwendung kleiner Gelkassetten bei 100 V für eine Stunde unter Eiskühlung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert; Protean II Gele dagegen bei 4°C und 0,8 A für zwei Stunden. Die Membran wurde im Anschluss kurz mit Wasser equilibriert und fünf Minuten mit Ponceau S gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Unspezifisch gebundenes Ponceau S wurde mit Wasser entfernt und der Blot anschließend abgelichtet. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in TBST) wurde die Membran zunächst mit TBS entfärbt

und mit 5% BSA oder 5% Milchpulver für eine Stunde blockiert. HRP-konjugierte Sekundärantikörper (1:7500 in TBST) wurden für 45 Minuten inkubiert. Dabei wurde zwischen jedem Schritt die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST-gewaschen. Die spezifisch markierten Proteine konnten nach Inkubation mit ECL-Detektionsreagenz und die nachfolgende Belichtung von Hyperfilm-ECL Filmen visualisiert werden.

4.2.5 2D-Gelelektrophorese

Vorbereitung

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese trennt Proteine in der ersten Dimension anhand ihrer spezifischen Eigenladung (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (MW) auf. Für analytische Proben wurden hierfür zunächst Streifen mit einem in Acrylamidmatrix immobilisierten pH-Gradienten (z.B. Immobiline DryStrip pH 3-11NL) mit einem entsprechenden Volumen (z.B. 450 μ l für 24 cm) DeStreak-Lösung (GE-Healthcare) und 0,5% Ampholyten rehydriert. Bei präparativen Gelen (>250 μ g Protein) wurden die IPG-Streifen mit der in 2D-Lysepuffer mit 1% (w/v) DTT und 1% (v/v) Ampholyten gelösten Probe rehydriert. Die Streifen wurden in den einzelnen Quellschalen mit je 3 ml Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid, GE Healthcare) überschichtet, um die Proben während der 10-stündigen Rehydration vor Austrocknung und Oxidation zu schützen.

Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die differentielle Gelelektrophorese wurden Fluoreszenzfarbstoffe (Cy5, Cy3 und Cy2) verwendet, die über einen reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester kovalent an primäre Amine binden. Bei den DIGE-Versuchen wurde eine Minimalmarkierung durchgeführt, wobei durchschnittlich nur 3% der Gesamtproteinmenge markiert wurden. Die trockenen Fluorochrome (CyDye) wurden als 1 mM Lösung in DMF rekonstituiert. Die Markierung von 50 μ g Protein erfolgte mit 400 pmol CyDye bei einem pH von 8,5 für 30 Minuten auf Eis. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 μ l (10 mM) Lysin zugegeben und damit reaktive CyDyes abgesättigt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die einzeln markierten Proben vereinigt und isoelektrisch fokussiert.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die Proben wurden bei analytischen Versuchen (auch bei DIGE) mittels Napf-Beladung (cup loading) appliziert. Hierzu wurden die Proben zuvor mit dem gleichen Volumen an 2-fach 2D-Probenpuffer (+2% (v/v) Ampholyte, +2% (w/v) DTT) versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und abschließend bei 180.000 x g für 20 min ultrazentrifugiert. Die Streifen wurden entsprechend der Markierung auf dem Keramikblock der IPGphor (GE-Healthcare) platziert und die Enden der IPG-Streifen mit in Wasser getränkten Papierstreifen abgedeckt. Hierauf wurden die Elektroden fixiert, der Keramikblock mit Öl überschichtet und die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit folgendem in Abb. 4.2.1 schematisch aufgeführten Programm gestartet. Dabei wurde das Limit für die anliegende Stromstärke auf 75 μA pro Streifen gesetzt. Die totale Fokussierungszeit betrug durchschnittlich 65-70 kWh.

SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen für 15 Minuten reduziert und für 15 Minuten alkyliert. Anschließend wurden die Streifen in zweifachem Laufpuffer abgespült und in die gewaschene Geltasche der SDS-PAGE (siehe oben) transferiert.

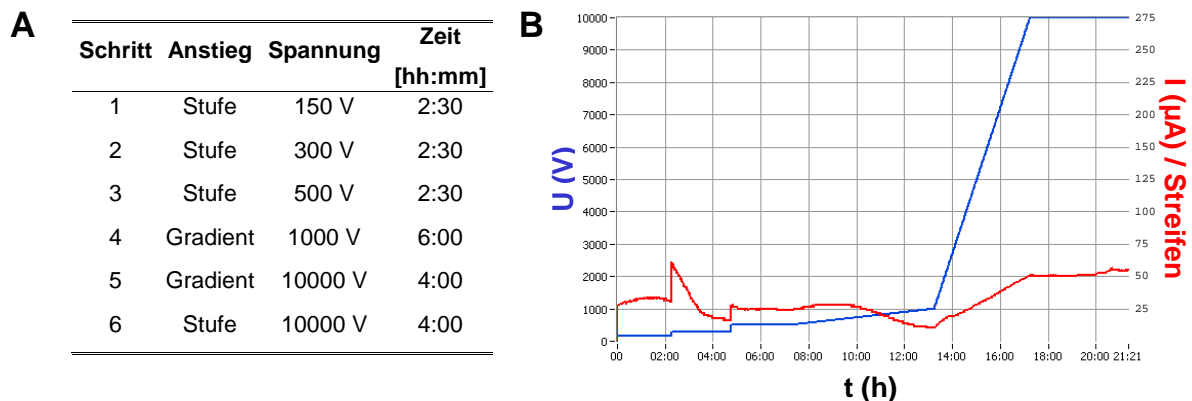


Abb. 4.2.1: Repräsentativer Verlauf einer IEF unter Verwendung der in A aufgeführten Parameter

4.2.6 Isolation sekretorischer Granula

Sekretorische Granula wurden mittels einer Kombination aus differentieller und Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierbei diente die differentielle Zentrifugation der Anreicherung von Organellen und dem Entfernen von intakten Zellen und Zellkernen.

Differentielle Zentrifugation

Zur Anreicherung von Organellen wurden je nach Zelltyp zwischen $4\text{-}20 \times 10^8$ Zellen verwendet. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Volumen des Zellpellets bestimmt. Anschließend wurde das 2,7-fache Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. Die resuspendierten Zellen wurden in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit 20-30 Zügen eines Pistills mit geringem Spaltmaß vorsichtig aufgeschlossen. Das Aufschließen der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen mittels Trypan-Blaufärbung unter einem Lichtmikroskop überprüft und bei einem Zellbruch von 80-85% gestoppt. Vor möglicher Proteindegradation schützten dabei die zugegebenen Proteaseinhibitoren. Das Homogenat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei $1000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Organellen wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei $20000 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert. Die Organellen konnten danach in einem geringen Volumen ($455 \mu\text{l}$) Extraktionspuffer resuspendiert und der Dichtegradientenzentrifugation zugeführt werden. Aus einem Teil des Gesamthomogenats und der angereicherten Organellen wurden NP-40 Lysate hergestellt, die in der Folge mittels Western Blot analysiert wurden.

Dichtegradienten Zentrifugation

Als Dichtegradientenmedium diente Optiprep[®], das als 60%-ige Stocklösung vorlag. Die in der differentiellen Zentrifugation angereicherten und in $455 \mu\text{l}$ Extraktionspuffer resuspendierten Organellen wurden mit $156,5 \mu\text{l}$ Optiprep[®] Verdünnungslösung und $288 \mu\text{l}$ Optiprep[®] versetzt und somit auf eine Konzentration von 19% Optiprep[®] eingestellt. Der Gradient wurde auf Eis in Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen geschichtet (Tabelle 4.2.2).

Tab. 4.2.2 Schichtung des Dichtegradienten

Gehalt an Optiprep [®]	Volumen
8%	0,9 ml
12%	0,8 ml
16%	0,7 ml
19%	0,9 ml
22,5%	0,7 ml
27%	0,4 ml

Die einzelnen Gradientenstufen wurden auf 230 mOsm mit 2,5 M Saccharoselösung angeglichen, um eine osmotische Homöostase zu gewährleisten. Nach einer

fünfstündigen Zentrifugation bei 38000 rpm (148000 x g) und 4°C wurden die Interphasen sequenziell von oben abgenommen und in einzelne Reaktionsgefäße überführt.

4.2.7 Auftrennung und Massenspektrometrie der Organellenlysate

4.2.7.1 Lyse der Proben für die 2D-Gelelektrophorese

Zur Gewinnung von 2D-Lysaten aus gereinigten Organellen wurden die einzelnen Fraktionen in neue Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogenisationspuffer aufgefüllt. Durch Zentrifugation bei 148000 x g für 20 Minuten wurden die gereinigten Organellen konzentriert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 40 µl 2D-Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die 2D-Gelelektrophorese verwendet.

4.2.7.2 Dokumentation, Gelanalyse und Ausstanzen individueller Proteinspots

Die spezifischen Emissionswellenlängen der mit Cy5, Cy3 und Cy2 gefärbten Proteine im 2D-Gel wurden mit dem Fluoreszenzscanner „Typhoon Trio“ quantifiziert. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Menge an Protein über einen weiten dynamischen Bereich. Die einzelnen Scans der Kanäle wurden in die DIA (Differential In-gel Analysis) Software des DeCyder 6.5 Softwarepakets geladen. Hier wurden zunächst die einzelnen Spots analysiert und nach bestimmten Kriterien (Fluoreszenzintensität, Steilheit, Fläche) in die nachfolgende Gelanalyse einbezogen. Dabei wurde mit Hilfe eines berechneten Schwellenwertes die differentiellen Spots festgelegt und in eine Pickliste übertragen.

Zum Ausstanzen wurden nach Herstellerangaben die hinteren Glasplatten silanisiert und die vorderen mit „Repel-Silane-ES“ behandelt. Die dadurch entstandene Funktionalisierung der Glasoberflächen verhinderte ein Ablösen der Gele von den hinteren Glasplatten.

Die Pickliste wurde zum Ausstanzen der Spots auf den „Ettan Spotpicker“ übertragen, der anhand von Referenzmarkierungen mit einem Pickkopf von 2 mm Durchmesser die Gelstücke in eine 96-Loch Platte transferierte. Das korrekte Stanzen wurde durch nochmaliges Scannen verifiziert.

4.2.7.3 Post-elektrophoretische Gelfärbungen

Aufgrund der Veränderungen des Molekulargewichtes durch CyDye Markierung (siehe Diskussion Kapitel 6.3) wurde in den meisten Fällen eine Nachfärbung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt.

Ruthenium II-bathophenanthrolin Disulfonat Chelat (RuBPS) (leicht modifiziert nach [127])

Die Gele wurden über Nacht fixiert. Danach wurde das Gel dreimal für 30 Minuten mit 20%-igem Ethanol gewaschen und anschließend über Nacht in einer 1µM RuBPS Lösung (eigene Herstellung nach [128]) gefärbt. Entfärbt wurde zweimal für je 20 Minuten. Vor dem Scannen fand eine abschließende Equilibrierung in ddH₂O für 10 Minuten statt. Der Scan fand bei 610 nm BP30 mit 457 nm Anregungswellenlänge statt.

Deep Purple / Lava Purple

Die Gele wurden auch bei dieser Methode über Nacht fixiert. Der Farbstoff wurde in 100 mM Natriumborat, pH 10,5 anschließend für 1,5 Stunden auf das Gel gegeben. Danach wurde das Gel für 45 Minuten in 15% Ethanol entfärbt und schließlich wieder für 10 Minuten in der Fixierlösung geschwenkt. Die Detektion fand bei 610 nm BP30 mit 532 nm Anregungswellenlänge statt.

Sypro Ruby (Invitrogen)

Die Gele wurden für mindestens drei Stunden fixiert und über Nacht mit Sypro Ruby gefärbt. In einem ersten Schritt wurde das Gel zweimal für 30 Minuten entfärbt und anschließend zweimal fünf Minuten mit ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde nach Herstellerangaben mit einer Anregungswellenlänge von 457 nm bei einer Emission von 610 nm BP30 eingescannt.

Flamingo Pink (Bio-Rad)

Auch bei dieser Färbemethode wurden die Gele mindestens drei Stunden fixiert und anschließend mit Flamingo Pink für 14 Stunden gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele zweimal 10 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Die Fluoreszenz wurde nach den Herstellerangaben mit 532 nm im Fluoreszenzscanner angeregt und bei 610 BP30 nm gemessen.

4.2.7.4 Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie

In Abhängigkeit von der Anzahl der Spots wurde die proteolytische Spaltung manuell oder automatisiert (Ettan Digester, GE Healthcare) durchgeführt. Bei beiden Methoden wurden umfangreiche Schutzmaßnahmen gegen das Einbringen von Fremdproteinen (wie z.B. Keratin) in die Proben getroffen.

Manueller Verdau und Spotting

Die Gelspots wurden dreimal mit je 100 µl ddH₂O (HPLC Grade) für mindestens 5 min gewaschen. Anschließend wurde mit 100 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril (ACN) für 5 Minuten umgepuffert und gleichzeitig dehydriert. Die vollständige Dehydration der Gelspots erfolgte mit 100 µl Acetonitril und war an einer Weißfärbung der Spots erkennbar. Die Gelspots konnten an dieser Stelle bei –80°C für bis zu 3 Monate gelagert werden oder direkt dem tryptischen Verdau zugeführt werden. Hierfür wurden die Spots mit 100 ng porcinem Trypsin in 10 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat bei 4°C für 15 Minuten rehydriert. Danach wurden noch je 10 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat auf die gequollenen Gelstücke gegeben und bei 37°C über Nacht verdaut. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 10 µl 0,3% Trifluoressigsäure (TFA) in ACN abgestoppt. Die Elution der Peptide aus der Gelmatrix wurde durch 15-minütige Ultraschall-Behandlung unterstützt. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neue 96-Loch U-Bodenplatte überführt. Die Gelspots wurden hinterher mit 20 µl ACN dehydriert und der Überstand mit dem bereits abgenommenen vereinigt. Die eluierten Peptide wurden in der Vakuumzentrifuge auf mittlerer Heizstufe für 30 Minuten eingengt. Die Proben wurden in 0,8 µl Matrixlösung aufgenommen und auf eine 192-Loch MALDI-Edelstahlplatte pipettiert und luftgetrocknet.

Automatisierter Verdau (Ettan Digester) und Spotting (Ettan Spotter)

Der automatisierte Verdau verlief, mit geringen Abweichungen, analog zum manuellen Vorgehen. Die Spots wurden hierbei vom Ettan Digester (GE Healthcare) zweimal mit je 70 µl ddH₂O und dreimal mit je 70 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Methanol für je 20 Minuten gewaschen. Die Dehydration erfolgte mit 70%-igem Acetonitril. Trypsinisiert wurde wie zuvor beschrieben. Durch Zugabe von 40 µl 0,1% TFA in 50% Acetonitril wurde die Reaktion gestoppt und darauf folgend zweimal mit je 30 µl derselben Lösung eluiert. Die abschließende Dehydrierung erfolgte durch 70%-iges Acetonitril. Alle Überstände wurden bei diesen je 20-minütigen Schritten in einer neuen 96-Loch Spitzbodenplatte vereint und zunächst in der Vakuumzentrifuge

und anschließend durch Verdunstung bei Raumtemperatur eingengt. Die Peptide wurden danach automatisch durch den Ettan Spotter (GE Healthcare) mit je 1,3 µl Matrixlösung vermischt und auf eine 192-Loch MALDI-Edelstahlplatte pipettiert.

Bei beiden Methoden wurde zur Kalibrierung des Massenspektrometers noch der Peptidstandard „4700-Cal1“ auf die Kalibrierpunkte der Edelstahlplatte aufgebracht.

Peptidmassenanalyse

Die Peptidmassenanalyse erfolgte mit dem 4700 Proteomics Analyzer MALDI-Tof/Tof Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) und wurde von Herrn Dr. Christoph Gelhaus (Abteilung Zoophysiologie, Prof. Dr. M. Leippe, Zoologisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt. Für die Analyse wurden die Spots mit 1000-2000 Laserimpulsen beschossen und die gemessenen Spektren kumuliert. Die autolytischen Fragmente des porcinen Trypsins dienten zur internen Kalibrierung der Spektren und wurden aus der Datenbanksuche ausgeschlossen.

Datenverarbeitung

Die Datenbanksuche mit den erhaltenen Peptidmassen wurde mit Hilfe der Software „GPS Explorer Version 3.6“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Massen wurden dazu mit dem Programm an den MASCOT-Server Version 2.0 (Matrix Science Ltd., London, UK) übertragen, der dabei gegen eine „in-house“ Datenbank, mit allen hinterlegten Proteinen aus Homo sapiens (191694 Einträge, 28/02/2007) suchte. MASCOT-wurde dabei mit den folgenden Einstellungen verwendet: Modifikation von Cysteinen durch Carboxyamidomethylierung wurde als obligatorisch betrachtet und die Oxidation von Methionin wurde als eine potentielle Modifikation eingestuft. Die maximale Anzahl an fehlenden tryptischen Spaltungen wurde auf 1 gesetzt, monoisotopische Massen wurden zugelassen und die Massentoleranz wurde auf ± 20 ppm gesetzt. Die Proteine galten als sicher identifiziert, wenn ein MASCOT-Score ≥ 65 (entsprechende Identifikationswahrscheinlichkeit höher als 95%) erreicht wurde.

5. Ergebnisse

5.1 Anreicherung und Charakterisierung lytischer Granula

Für eine detaillierte Analyse des Proteoms von sekretorischen Lysosomen (SL) war es zunächst essentiell, diese möglichst effizient und frei von anderen subzellulären Strukturen anzureichern. Hierfür wurde auf der Basis von Iodixanol[®], einem nicht-ionischen, niedrig osmolaren Röntgenkontrastmedium, eine mehrschichtige Dichtegradientenzentrifugation etabliert.

5.1.1 Etablierung der Anreicherung sekretorischer Granula aus allogenen stimulierten Lymphozyten

Die Organellen des Lymphozytenhomogenats von 14 Tage alten PHA-Blasten (Allogen-stimulierte Lymphozyten) wurden zunächst mittels differentieller Zentrifugation angereichert und auf 19% Iodixanol[®] eingestellt. Die Organellensuspension wurde in die Mitte des diskontinuierlichen Dichtegradienten pipettiert und durch Ultrazentrifugation in sechs Fraktionen separiert (Abb. 5.1.1).

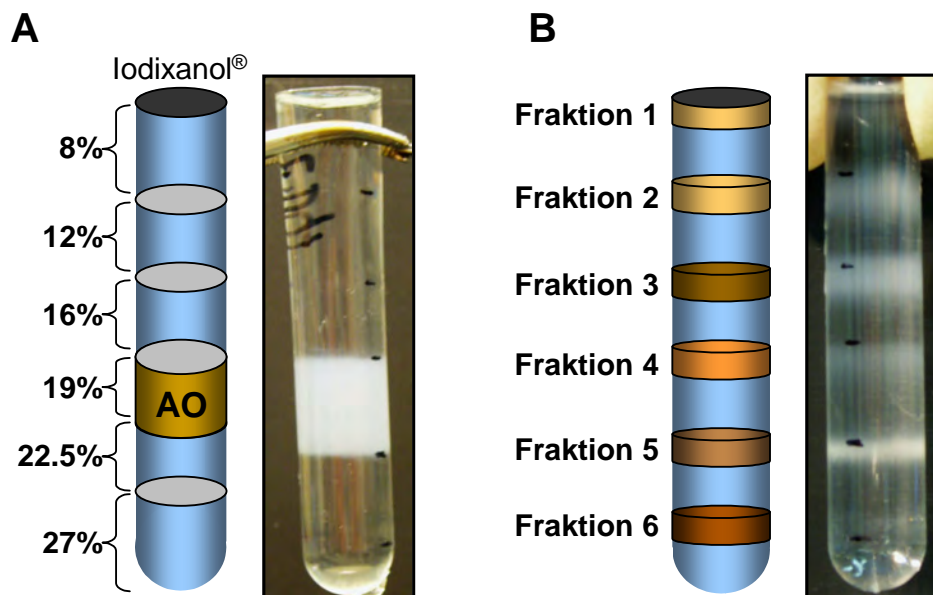


Abb. 5.1.1: Dichtegradientenzentrifugation. Die Schichtung des Gradienten erfolgte mit den angegebenen Iodixanolkonzentrationen durch langsames Pipettieren von oben (A). Dabei wurden die angereicherten Organellen (AO) in die Mitte des Gradienten platziert. Nach fünfständiger Zentrifugation bei 148000 x g erfolgte eine Auftrennung der Organellen in sechs verschiedene Fraktionen (B).

Die einzelnen Fraktionen wurden von oben abgenommen, die Proteinmenge quantifiziert und je 4 µg im Western Blot analysiert. Als Marker für sekretorische Granula in T- und NK-Zellen dienten zunächst die zytotoxischen Proteine Fas Ligand (FasL, CD178) und Perforin [52]. Als klassische Marker für Lysosomen wurden LAMP-1 (CD107a) und LAMP-3 (CD63) benutzt [51,97]. Zusätzlich wurde Vti1b, ein membrangebundenes SNARE Protein gefärbt, das mit der Regulation des post-Golgi Vesikeltransports und sekretorischen Transportwegen in Verbindung steht [129]. Alle putativen Markerproteine für SL waren in der Fraktion 2 deutlich angereichert (Abb. 5.1.2). Dagegen war in dieser Fraktion weder Golgin-84 als Marker für Golgi-Zisternen [130], CoxIV oder Cytochrom C als mitochondriale Marker [131], noch Katalase als Marker für Peroxisomen [132] nachweisbar. Die einzelnen Fraktionen waren zudem nicht durch Plasmamembran verunreinigt, was durch pan-Cadherin Antikörper nachgewiesen wurde. Bip/Grp78, ein Marker für das endoplasmatische Retikulum [133] und EEA-1 ein früher Endosomenmarker [134] wurden in der putativen SL Fraktion 2 nachgewiesen. Das etablierte Protokoll kann somit verwendet werden, um nach den oben genannten Kriterien sekretorische Vesikel signifikant anzureichern. Interessanterweise waren die beiden zytotoxischen Proteine Granzym B und Granulysin auch in anderen Fraktionen vorhanden. In den dargestellten Fraktionen aus PHA-Blasten war bei Granulysin die unreife 15 kDa Form in der Fraktion 2 angereichert, während die reife Form (9 kDa) verstärkt in den Fraktionen 4 und 6 nachgewiesen wurde. Ganz ähnlich war die Verteilung von Granzym B, bei dem die stärksten Signale in Fraktion 4 und 6 festzustellen waren. Weiteres Indiz für die effiziente Anreicherung und Separation von mitochondrialen Verunreinigungen war das Auftreten der mitochondrialen Proteine Cytochrom C und CoxIV ausschließlich bzw. angereichert in der Fraktion 5 (Abb.5.1.2).

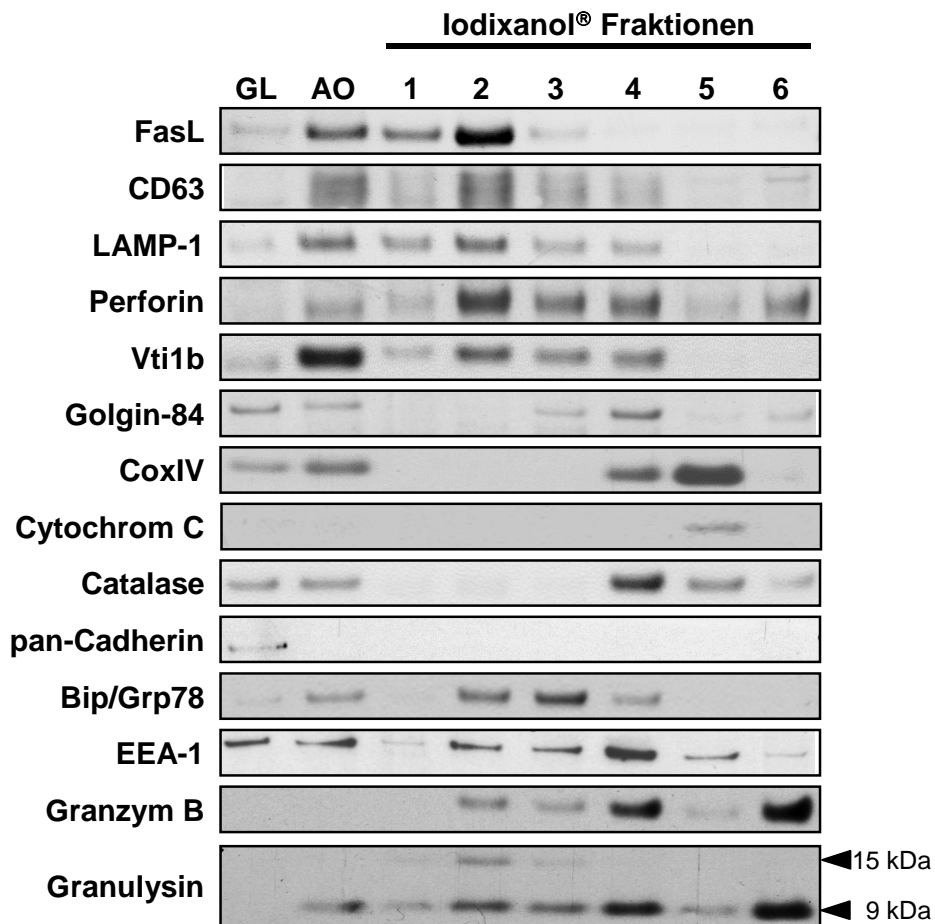


Abb. 5.1.2: Western Blot Analyse der Dichtegradientenfraktionen. Das Gesamtlysate (GL) wurde aus dem Zellhomogenat entnommen und in 1% NP-40 lysiert. Die gleiche Prozedur wurde mit den durch die differentielle Zentrifugation angereicherten Organellen (AO) durchgeführt. Von allen Proben wurden je 4 µg aufgetragen und unter nicht-reduzierenden (CD63, Granulysin) oder reduzierenden Bedingungen auf einem 4-20% NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Der Transfer erfolgte auf 0,2 µm Nitrozellulose-(NC) Membranen, die für verschiedene Antikörperinkubationen gestrippt wurden.

5.1.1.1 Vergleich der subzellulären Fraktionen 2 und 5

In initialen DIGE Versuchen wurden die Fraktionen 2 und 5 miteinander verglichen. Die Fraktionen unterscheiden sich in den oben genannten Markerproteinen. Dieser Unterschied wurde auch durch das Proteinprofil im 2D-Gel bestätigt. Hierbei war festzustellen, dass das Spotmuster der Fraktion 5 (Abb. 5.1.3, grün) zu dem bereits veröffentlichten Proteom der Mitochondrien einer lymphoblastoiden Zelllinie in den meisten Proteinlokalisationen analog ist [135]. Das dargestellte 2D-Gel zeigt zusätzlich, dass sich der Proteinbesatz der Fraktion 2 und 5 nahezu komplett unterscheidet, was auch die deutliche Trennung der Organellen im Dichtegradienten widerspiegelt.

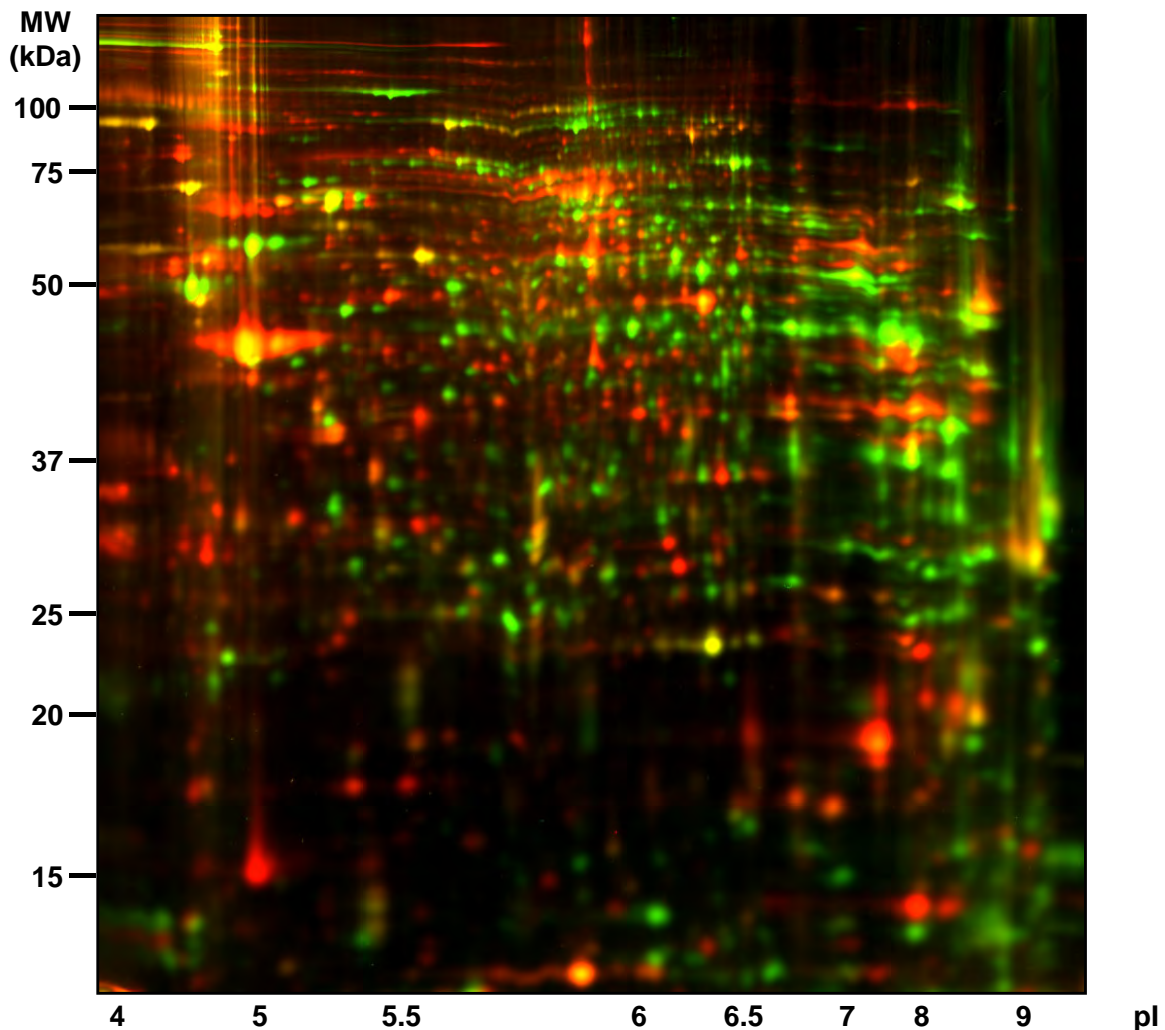


Abb. 5.1.3: 2D-DIGE Analyse der Fraktion 2 und 5 aus PHA-Blasten. Die Organellen der Fraktionen wurden wie beschrieben angereichert und anschließend mit Cy-Farbstoffen markiert. Hierbei wurde Fraktion 2 mit Cy5 (rot) und Fraktion 5 mit Cy3 (grün) markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängig durchgeführten.

5.1.2 FasL als Marker für sekretorische Granula in Lymphozyten-Subpopulationen

Als Marker für lytische Granula diente der FasL, der nach dem derzeitigen Literaturstand direkt vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in die Granula transportiert wird. Für die nachfolgenden Proteomanalysen mussten zunächst entsprechende Granula aus verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen isoliert und angereichert werden. Die durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten Fraktionen wurden deshalb jeweils auf Anreicherung des FasL in Fraktion 2 überprüft. Hierfür wurde zunächst analysiert, ob der FasL in allen zu untersuchenden Subpopulationen in meßbarer Menge vorhanden war. Die Immunpräzipitation (Abb. 5.1.4) mit zwei verschiedenen FasL mAKs (NOK-1 und FasLcyto-2) zeigte bei allen

Proben, mit Ausnahme der Negativkontrollen, ein positives Signal bei 37 kDa. Dies bedeutet, dass Granula aus *in vitro* expandierten PHA-Blasten sowie CD4⁺, CD8⁺, vδ1⁺, vδ2⁺ T-Zellen und aus NK-Tumorzelllinien NKL, YTS und *in vitro* expandierten NK-Zellen FasL als Effektormolekül enthalten.

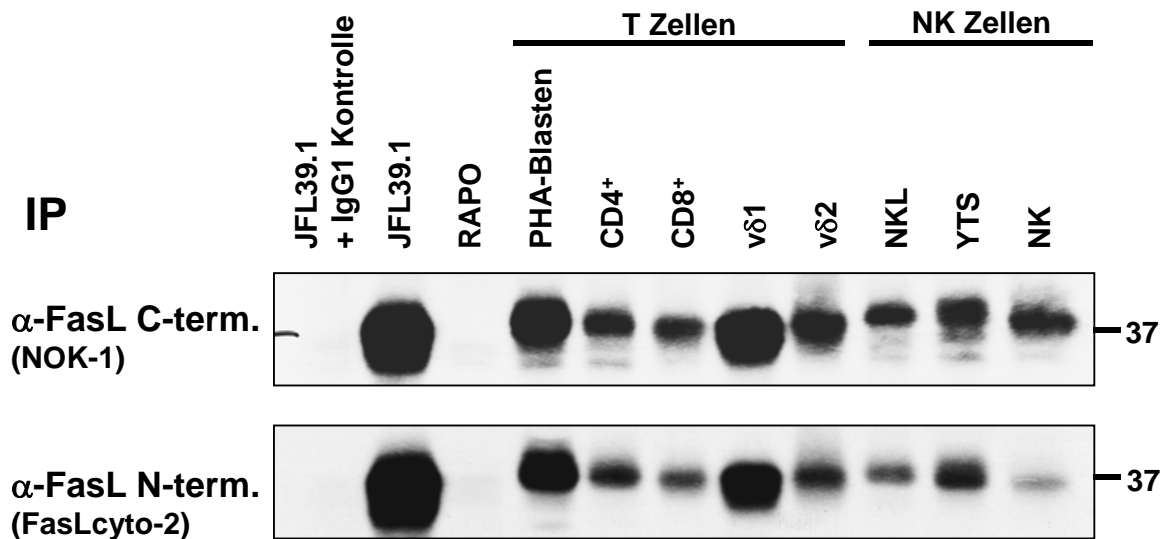


Abb. 5.1.4: Immunpräzipitation des Fas Liganden aus Lymphozytensubpopulationen. Aus den Lysaten von 10 Mio. Tumorzellen (JFL39.1, RAPO, NKL, YTS) oder 20 Mio. Zellen der verschiedenen stimulierten und expandierten Lymphozytensubpopulationen wurde mit je 1 µg α-FasL (NOK-1) und 25 µl Protein G Sepharose für vier Stunden präzipitiert. Zusätzlich wurde auch mit 2 µg FasLcyto-2 präzipitiert, der an den N-Terminus des FasL bindet. Der Western Blot wurde abschließend mit α-FasL (G247-4) gefärbt. Als Negativkontrollen dienen eine Präzipitation mit IgG1 und das Lysat der RAPO Zellen, die keinen FasL exprimieren. Als Positivkontrolle wurde die mit FasL stabil transfizierte Zelllinie JFL39.1 benutzt.

5.1.3 CD63 als Marker für sekretorische Granula

CD63 wurde wie bereits erwähnt als Markerprotein für lysosomale Membranen beschrieben und wird erst nach Aktivierung auf der Plasmamembran exprimiert. Der Transport von CD63 (LAMP-3) vom Golgi-Apparat in die sekretorischen Granula erfolgt im Gegensatz zu den anderen LAMP Proteinen über AP-3. Die anderen LAMPs werden von AP-1 und AP-2 zunächst zu den Endosomen eskortiert und gelangen erst von dort aus zu den SL [136]. Gegenüber den anderen LAMPs stellt CD63 somit einen spezifischeren Marker für SL dar. Im folgenden Versuch sollte deshalb geklärt werden, ob CD63 angereicherte Granula in der Fluoreszenzmikroskopie mit den FasL Speichervesikeln kolokalisieren. Hierfür wurden die in Abbildung 5.1.5 angegebenen Zellen verwendet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. In den untersuchten T- und NK-Zellen

war eine deutliche Kolo-kalisation von FasL und CD63 in denselben Kompartimenten zu beobachten. CD63 ist damit als ein weiteres Markerprotein für lytische Granula in den hier untersuchten Zellen anzusehen.

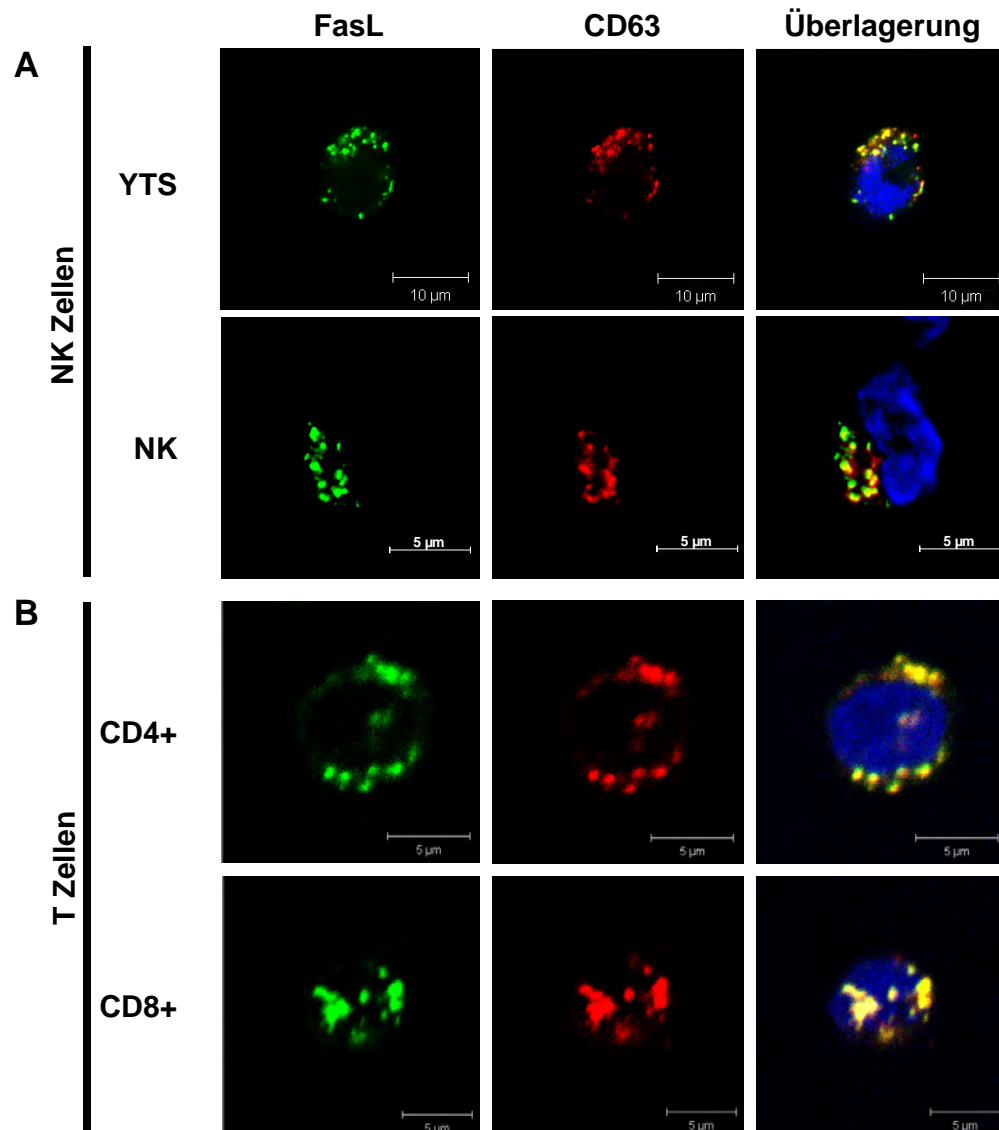


Abb. 5.1.5: CD63 als Marker für sekretorische Granula in NK- (A) und T-Zellen (B). Die NK-Zelllinie YTS und die für 16 Tage *in vitro* expandierten CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG und anschließend nach intensivem Waschen mit Alexa Fluor 555 direkt markiertem anti-CD63 mAk MEM-259 gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Eine Skalierung ist für die jeweilige Zelle angegeben. Die Bilder von YTS, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden am LSM, die der NK-Zellen am Axio Imager Z1 mit Apotome aufgenommen.

5.2 Etablierung hoch reproduzierbarer 2D-Gelelektrophoresen

Für die nachfolgenden Proteomanalysen war es notwendig ein 2D-Gelelektrophoresesystem zu etablieren, welches eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb einzelner elektrophoretischer Auftrennungen gewährleistet. Die Reproduzierbarkeit wurde überprüft, indem elektrophoretisch aufgetrennte und Flamingo Pink gefärbte Lysate von sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) aus CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern miteinander verglichen wurden. Eine erste visuelle Auswertung der drei verschiedenen Gele ergab eine sehr große Ähnlichkeit zwischen den Proteinprofilen der SL aus verschiedenen Spendern. Dieses Ergebnis wurde auch durch die durchgeführte statistische Auswertung mit der Image Master Software 6.0 bestätigt. Die Spots der einzelnen Gele wurden analysiert und die relativen Spotintensitäten in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Nach der Berechnung einer Regressionsgeraden, konnte anhand des Korrelationskoeffizienten die Abweichung zwischen den Spendern bestimmt werden. Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient lag bei 0,95, wobei ein Koeffizient von eins einem absolut identischen Spotmuster entsprechen würde. Somit ist festzuhalten, dass die Spender- und Elektrophorese-spezifischen Unterschiede im Proteom von CD4⁺ T-Zellgranula sehr gering ausfallen.

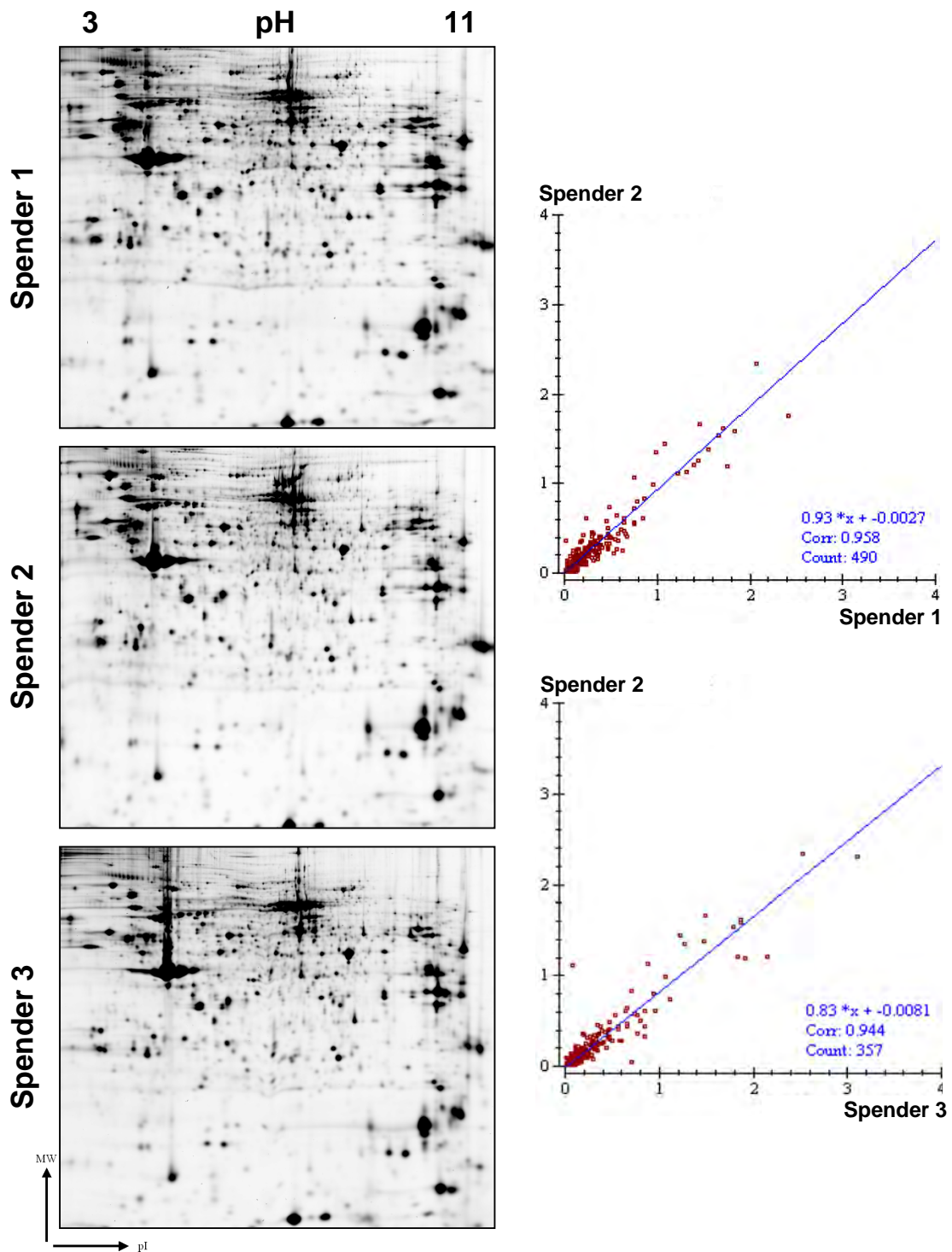


Abb. 5.2.1: Übereinstimmung der Proteinprofile von sekretorischen Granula aus verschiedenen CD4⁺ T-Zelllinien. Die isolierten Granula (Fraktion 2) aus CD4⁺ Zellen von drei individuellen Spendern wurden auf einem 2D-Gel separiert und mit Flamingo Pink gefärbt. Die statistische Analyse der Spotintensitäten wurde mit Hilfe der Image Master Software erstellt und ergab ein sehr analoges Proteinmuster in allen drei Spendern. Dies wurde auch durch die Regressionsgerade und den Korrelationskoeffizienten verdeutlicht.

5.2.1 Etablierung massenkompatibler Gelfärbungen

Eigene Beobachtungen und ein parallel veröffentlichter Befund von Hrebicek und Kollegen [137] ergaben, dass ein direktes Stanzen CyDye markierter Proteine zu erheblichen Ungenauigkeiten in der Identifikation von Proteinen führen kann. Dies begründet sich durch das zusätzliche Gewicht der markierten Proteine, dass durch die CyDyes (434-464 Da) verursacht wird. Dieser leichte Unterschied im Molekulargewicht macht sich besonders bei niedermolekularen, aber auch einigen hochmolekularen Proteinen bemerkbar. Dadurch werden im Einzelfall nur 3-5% des zu identifizierenden Proteins gestanzt, während der Rest des Proteins unter dem fluoreszierenden Spot lokalisiert ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die CyDye Gele mit sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen nachgefärbt. Es wurde eine relativ große Varianz in Sensitivität und Massenkompatibilität festgestellt, daher wurde durch zunächst vergleichende Versuche ein optimiertes Färbeprotokoll etabliert.

Neben den klassischen Proteinfärbemethoden (Coomassie oder Silber) standen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, die auf Massenkompatibilität und Sensitivität geprüft werden sollten. Hierzu gehörten Lava Purple, Deep Purple, Flamingo Pink und ein im Labor synthetisierter Ruthenium-basierter Farbstoff (RuBPs) als Alternative zu dem kommerziell erhältlichen Ruthenium-Farbstoff Sypro Ruby. Da bei Coomassiefärbungen eine geringe Sensitivität und bei Silberfärbungen niedrige massenspektrometrische Identifikationsraten zu verzeichnen waren, sollten zunächst die Färbereigenschaften der genannten Fluoreszenzfarbstoffe überprüft werden.

Dabei zeigte Flamingo Pink bei gleichen Färbe- und Detektionsbedingungen die deutlich höchste Sensitivität. Ebenfalls waren die MALDI-Identifikationsraten bei diesem Farbstoff zufrieden stellend. Der im eigenen Labor synthetisierte Farbstoff zeigte einen starken Hintergrund, wies aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Lava und Deep Purple auf. Sypro Ruby hatte eine ähnliche Sensitivität, zeigte aber ein besseres Signal-Rauschverhältnis (nicht gezeigt). Deshalb wurde für zukünftige post-elektrophoretische Färbungen standardmäßig Flamingo Pink verwendet. RuBPs dagegen konnte als kostengünstige Alternative zu den kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen für Vorversuche verwendet werden.

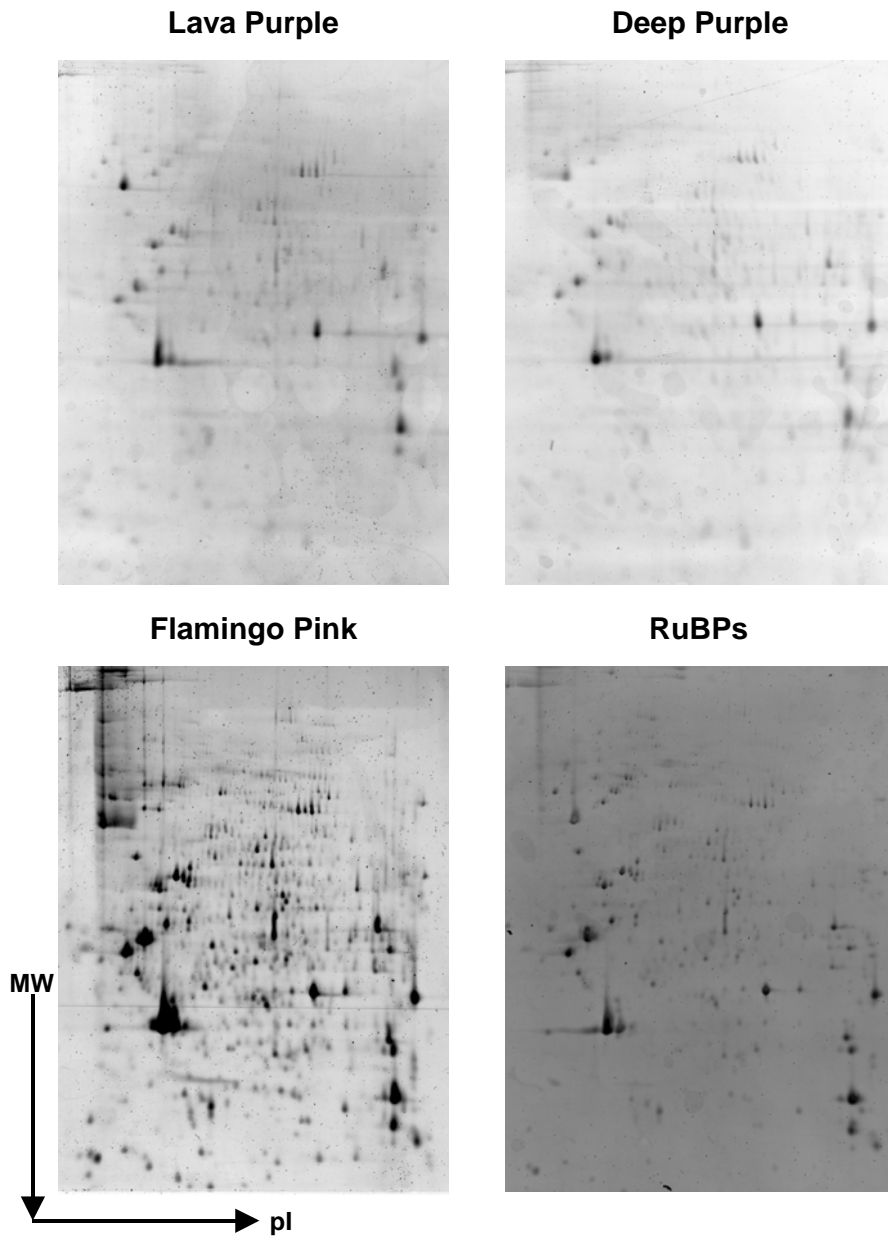


Abb. 5.2.2: Vergleich der Fluoreszenzfarbstoffe. Es wurden je 75 µg Gesamtzelllysate auf nicht linearen 13 cm pH 3-11 IPG Streifen in der ersten Dimension aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine auf 10%-igen Gelen separiert. Die Färbungen erfolgten nach Herstellerangaben. Die Gele wurden mit Anregungswellenlängen von 532 nm bzw. 457 nm (bei RuBPs) eingescannt. Die Detektion erfolgte bei 610 nm BP30 mit 555V am PMT. Die Gelbilder wurden ausgeschnitten, aber weder in Kontrast noch Helligkeit verändert.

5.3 Der Proteinbesatz lytischer Granula aus NK-Zellen

Zu Beginn der Untersuchung wurde zur Darstellung des Proteoms angereicherter sekretorischer Lysosomen der Schwerpunkt auf NK-Zellen gelegt. Ausgehend von ihrer Funktion als zytotoxische Effektorzellen werden diese auch als „large granular lymphocytes“ bezeichnet, was bereits auf einen hohen Besatz an lytischen Granula hindeutet. NK-Zellen bzw. NK-Zelllinien stellen somit ein geeignetes System zur Etablierung der differentiellen Proteomanalyse angereicherter Vesikel dar. Wie zuvor beschrieben, war auch in dieser Population eine Anreicherung von FasL in der Fraktion 2 sowie eine Kolo-kalisation dieses Markers mit dem lysosomalen Markerprotein CD63 nachweisbar. Der limitierende Faktor bei vergleichenden Proteomanalysen isolierter Organellen ist in der Regel die Proteinmenge, die aus subzellulären Fraktionierungen gewonnen werden kann. Vorversuche ergaben, dass mindestens 400×10^6 *in vitro* expandierte NK-Zellen notwendig sind, um genügend Granula zu isolieren. Da sich diese Zellen jedoch nur aufwändig expandieren lassen, wurde zunächst auf leukämische NK-Zellen zurückgegriffen. NKL und YT(S) sind dabei die NK-Zelllinien, die derzeit weltweit in Laboratorien zur Funktionsanalyse von NK-Zellen am häufigsten benutzt werden [138]. Die Zelllinien zeichnen sich jedoch durch individuelle Oberflächenmarker aus und repräsentieren deshalb nicht unbedingt primäre, polyklonal expandierte NK-Zellen.

5.3.1 Phänotypische Charakterisierung leukämischer und aktivierter humaner NK-Zellen

Leukämische NK-Zelllinien und MACS isolierte, expandierte NK-Zellen wurden durch spezifische Oberflächenmarker charakterisiert (Abb. 5.3.1). Wie erwartet waren primäre NK-Zellen positiv für CD2, CD16, CD56, aber negativ für CD3 und CD28. Des Weiteren exprimieren sie auch den aktivierenden c-Typ Lektin Rezeptor NKG2D. Den NKL-Zellen fehlten dagegen CD16 und CD56. YTS-Zellen waren NKG2D⁻ und exprimierten weder CD2 noch CD16. Erstaunlicherweise waren YTS deutlich positiv für CD28. Diese massiven Unterschiede bei spezifischen Oberflächenmarkern schlagen sich auch funktionell in der Erkennung der Zielzellen nieder.

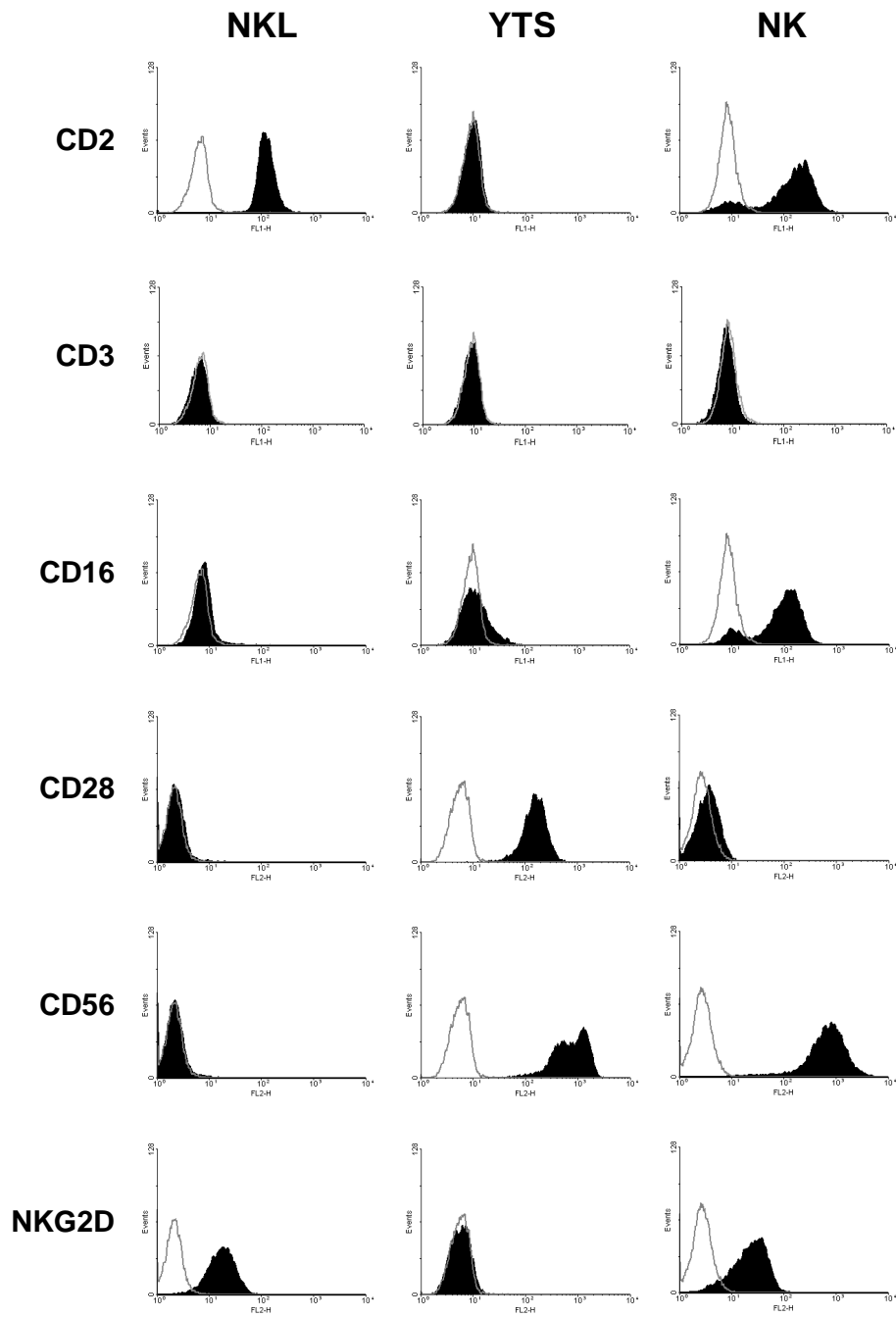


Abb. 5.3.1: FACS Analyse phänotypischer Charakteristika von NKL (links), YTS (Mitte) und *in vitro* expandierten NK-Zellen (rechts). Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die aufgeführten Oberflächenproteine gefärbt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen pro Probe im FACS analysiert. Die schwarz gefüllte Fläche repräsentiert die Fluoreszenz des spezifischen Antikörpers, während die Fluoreszenz der entsprechenden Isotypkontrolle als graue Linie abgebildet ist.

5.3.2 Funktionelle Unterschiede leukämischer NK-Zellen bei der Erkennung von Zielzellen

Die eben erwähnten Unterschiede im Besitz der Oberflächenproteine hatten auch einen Einfluss auf die Erkennung von Zielzellen. Als Zielzellen dienten 721.221 und K562, die sich ebenfalls im Besitz ihrer Oberflächenmoleküle unterscheiden und dadurch unterschiedlich von den NK-Zellen erkannt werden. Die Zytotoxizität wurde mit einem LDH-Freisetzungs-Assay bestimmt. NKL zeigte gegenüber K562 eine höhere Zytotoxizität als gegenüber 721.221 (Abb. 5.3.2 A). YTS war dagegen nicht in der Lage, K562 Zielzellen effizient zu lysieren (Abb. 5.3.2 B).

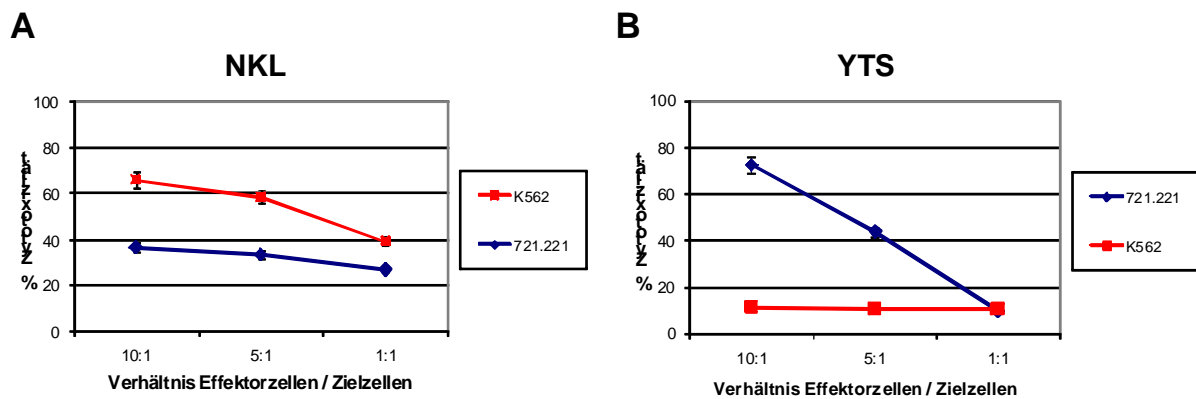


Abb. 5.3.2: Zytotoxizität von NKL (A) und YTS (B) gegenüber 721.221 und K562. Es wurden je 20000 Zielzellen in Triplikaten mit den entsprechenden Effektorzellen in den angegebenen Verhältnissen bei 37°C für 45 min inkubiert. Durch Lyse freigesetztes LDH wurde im Überstand gemessen und die Zytotoxizität unter Berücksichtigung der Kontrollen für Spontan- und Maximallyse der Effektor- bzw. Zielzellen ermittelt.

5.3.3 Isolierung und Charakterisierung lytischer Granula aus NK-Zellen

Analog zu der bereits beschriebenen Methode zur Anreicherung sekretorischer Lysosomen aus Lymphozyten, wurde auch bei den NK-Zellen eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurde eine leicht abweichende Verteilung der Organellenmarker im Vergleich zu Abb. 5.1.3 beobachtet. Bei YTS-Zellen wurde eine Anreicherung des Fas Liganden in den Fraktionen 1 und 2 festgestellt, wobei nur Fraktion 2 auch eine Anreicherung der lysosomalen Membranproteine (LAMP-1 und CD63) aufweist. Nach Entfernen der Antikörper (durch Stripping) wurden die Blots mit weiteren Antikörpern gegen spezifische subzelluläre Strukturen inkubiert. Neben den zu Beginn benutzten Markern wurde die Golgi-Membran mit anti-GM130 nachgewiesen. Die Anreicherung in Fraktion 4 und 5 deckt sich mit der von anti-p47A, das ein Teil des AP3 Komplexes darstellt und am Proteintransport im trans-Golgi Netzwerk (TGN) beteiligt ist.

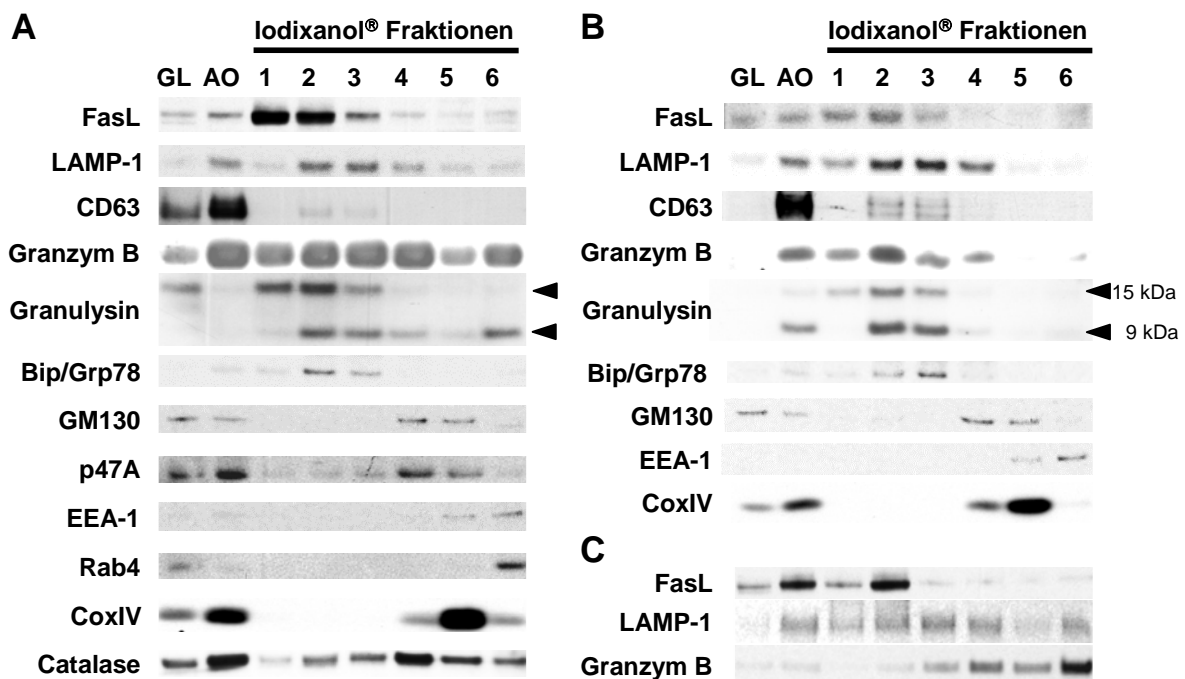


Abb. 5.3.3: Verteilung Organell-spezifischer Marker in individuellen subzellulären Fraktionen. Dargestellt sind repräsentative Western Blots für fünf Experimente mit **YTS (A)** und **NKL (B)**, und für drei Experimente mit **NK-Zellen (C)**. FasL und CD63 dienten als Marker für sekretorische Granula, LAMP-1 für Lysosomen, GM130 und p47A für Golgi-Matrix bzw. -Membran, EEA-1 und Rab4 sind frühe Endosomenmarker, CoxIV ist ein Markerprotein für Mitochondrien und Catalase für Peroxisomen.

Die Anreicherung der frühen Endosomen wurde mit anti-EEA-1 und anti-Rab4 überprüft. Rab4 ist am endosomalen Recycling der Plasmamembranproteine beteiligt. Im Gegensatz zur Anreicherung von Granula aus PHA-Blasten war bei den leukämischen NK-Zellen keine Kontamination mit endosomalen Markern, dafür aber mit Katalase und dem ER Markerprotein Bip/Grp78 nachweisbar. Interessanterweise zeigte Granzym B eine ähnliche Verteilung wie LAMP-1 in NKL (Abb. 5.3.3 B), jedoch ein stärkeres und unerwartet breites Vorkommen in allen Fraktionen von YTS-Zellen (Abb. 5.3.3 A). NK-Zellen zeigten, wie bereits bei PHA-Blasten beobachtet, eine Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6, obwohl FasL ein deutliches Vorkommen in der 2. Fraktion aufwies (Abb. 5.3.3 C). Bereits diese Western Blot Analysen gaben erste Hinweise auf einen unterschiedlichen Besatz mit zytotoxischen Proteinen zwischen leukämischen und *in vitro* expandierten NK-Zellen.

5.3.4 2D-DIGE Analyse angereicherter lytischer Granula aus NK-Zellen

Basierend auf den Ergebnissen der Western Blot Analysen wurden angereicherte sekretorische Lysosomen (Fraktion 2) nachfolgend auf zwei-dimensionalen Gelen aufgetrennt und separierte Spots mittels der Peptidmassenanalyse identifiziert. Die CyDye markierten Granulalysate aus NKL, YTS und *in vitro* expandierten NK-Zellen (18 Tage) wurden wie in Tabelle 5.3.1 dargestellt in verschiedenen DIGE Experimenten bezüglich ihres Proteinbesatzes miteinander verglichen.

Tabelle 5.3.1: 2D-DIGE Experimente der NK-Zellen. Dargestellt ist ein Experimentenschema für direkte Vergleiche von angereicherter lytischer Granula aus NKL und YTS (Experimente 1-5) und NKL, YTS und NK-Zellen (Experimente 6-8).

Exp. Nr.	Proteinmenge	CyDye Markierung			Spots	verringert in YTS		erhöht in YTS	
		Cy5	Cy3	Cy2		#	%	#	%
1	150 µg	NKL	--	YTS	1492	83	5.6	72	4.8
2	150 µg	YTS	NKL	--	1513	53	3.5	77	5.1
3	200 µg	NKL	YTS	--	1758	74	4.2	55	3.1
4	200 µg	YTS	NKL	--	1909	92	4.8	64	3.4
5	200 µg	--	NKL	YTS	1414	68	4.8	93	6.6
				Durchschnitt:	1617	74	4.6	72	4.6
				Reproduzierbarkeit*:		45		56	
6	150 µg	NK	NKL	YTS	2036				
7	225 µg	NKL	YTS	NK	1484				
8	150 µg	YTS	NK	NKL	1154				

Nach den DeCyder Berechnungen entspricht die angegebene Spotanzahl der Menge an differentiell exprimierten Proteinen. Hierbei bezieht sich die Anzahl der geringer oder verstärkten auftretenden Spots auf YTS-Zellen.

*) Veränderungen, die in mindestens drei Experimenten reproduzierbar waren.

Der direkte Vergleich von NKL und YTS ergab eine ermittelte Spotanzahl von 1414-1909 (1617 im Durchschnitt) in fünf unabhängigen Experimenten. Durch unterschiedliche Farbstoffkombinationen („Dye Swap“) wurde eine CyDye spezifische Färbung bestimmter Proteine ausgeschlossen. Die Berechnungen mit Hilfe der ‚Differentiellen in-Gel Analyse‘ (DIA) des DeCyder[®] Softwarepakets ergab bei einem Grenzwert von 3.0 für den Unterschied in den Spot Volumina, 101 Spots, die reproduzierbar differentiell zwischen NKL und YTS waren. Ein repräsentatives Experiment für diesen Vergleich ist in Abb. 5.3.4 dargestellt (entspricht Experiment Nr. 3 in der Tabelle 5.3.1).

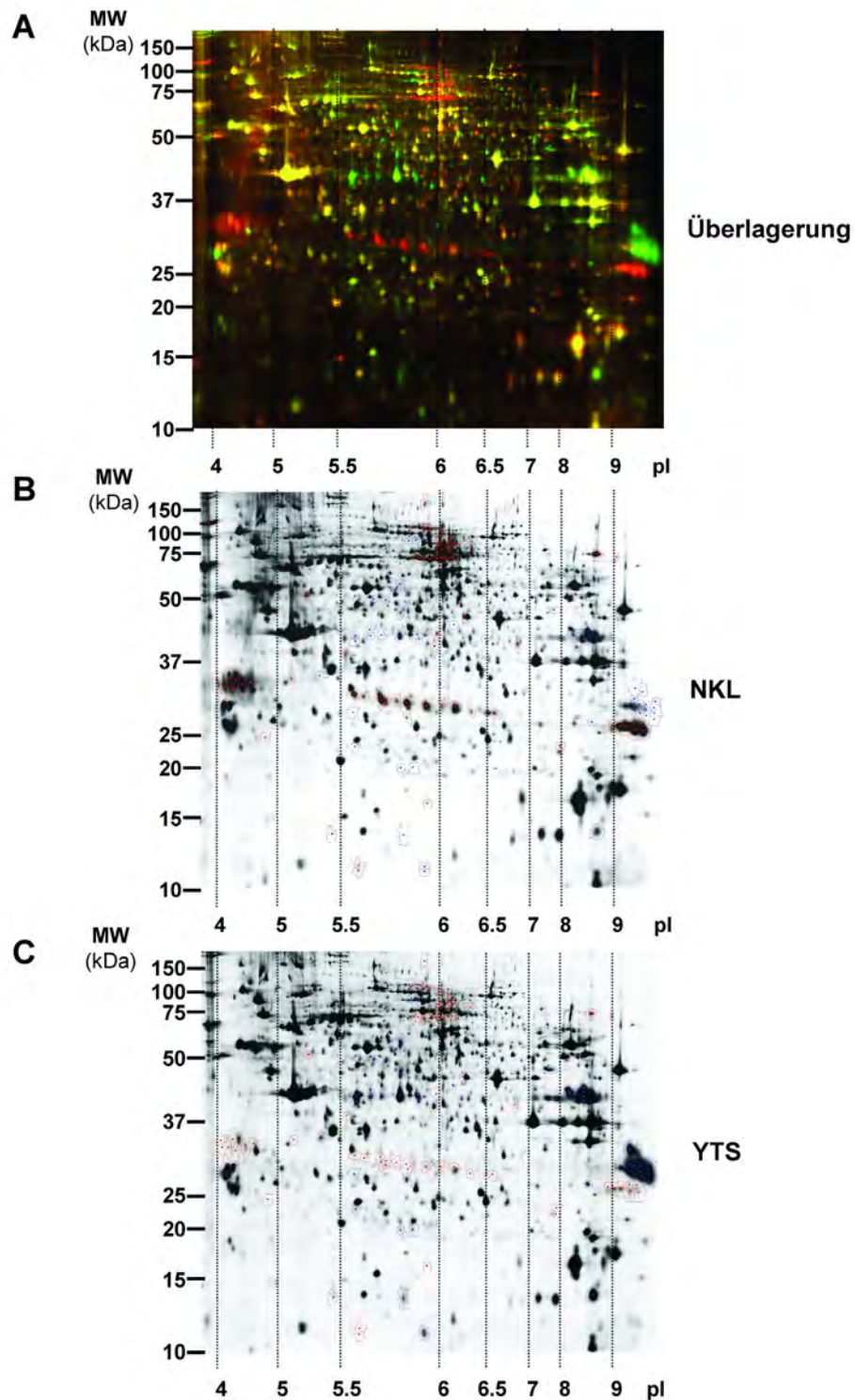


Abb. 5.3.4: 2D-DIGE Analyse von angereicherten SL aus zwei verschiedenen NK-Zelllinien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 (=SL) von NKL mit Cy5 (rot) bzw. von YTS mit Cy3 (grün) markiert und auf 24 cm Streifen, pH 3-11 NL in der 1. Dimension und auf 12,5 % Laemmli Gelen in der 2. Dimension aufgetrennt. Die **Überlagerung (A)** beider Fluoreszenzkanäle ergibt eine Gelbfärbung bei ähnlichen von Proteinmengen in einem Spot. Die einzelnen Kanäle sind repräsentativ für fünf Experimente (Exp. Nr. 3, Tabelle 5.3.1) auch als Graustufenbild für **NKL (B)** und **YTS (C)** dargestellt. Unterschiedlich exprimierte Proteine sind rot umrandet bei einer Verminderung und blau bei einer Erhöhung der Spotvolumina außerhalb einer 3-fachen Veränderung von NKL zu YTS. Die korrespondierenden *pI* Bereiche sind als gestrichelte Linien angegeben

Beim Vergleich der *in vitro* expandierten NK-Zellen mit den leukämischen NK-Zelllinien ergaben sich bei maximal 2036 Spots je 28 geringer bzw. verstärkter exprimierte Proteine beim direkten Vergleich von NK- und NKL-Zellen. Zwischen NK- und YTS waren 35 vermindert und 37 erhöht. Ein repräsentatives Experiment (Nr. 6 in Tabelle 5.3.1) ist in Abbildung 5.3.5 dargestellt. Bei all diesen Experimenten ergab sich eine überwiegende Übereinstimmung im Proteinprofil, da mehr als 90% der Proteine ein ähnliches Spotvolumen (mit den benutzten Parametern) in den 2D-Gelen aufwiesen. Dennoch waren klare und hoch reproduzierbare Unterschiede zwischen den einzelnen leukämischen Zelllinien auf der einen Seite bzw. den Zelllinien und den aktivierten NK-Zellen auf der anderen Seite, festzustellen. Diese Unterschiede im Proteinbesatz wurden nachfolgend im Rahmen der Erstellung einer Proteinkarte lytischer NK-Granula, mittels Massenspektrometrie identifiziert.

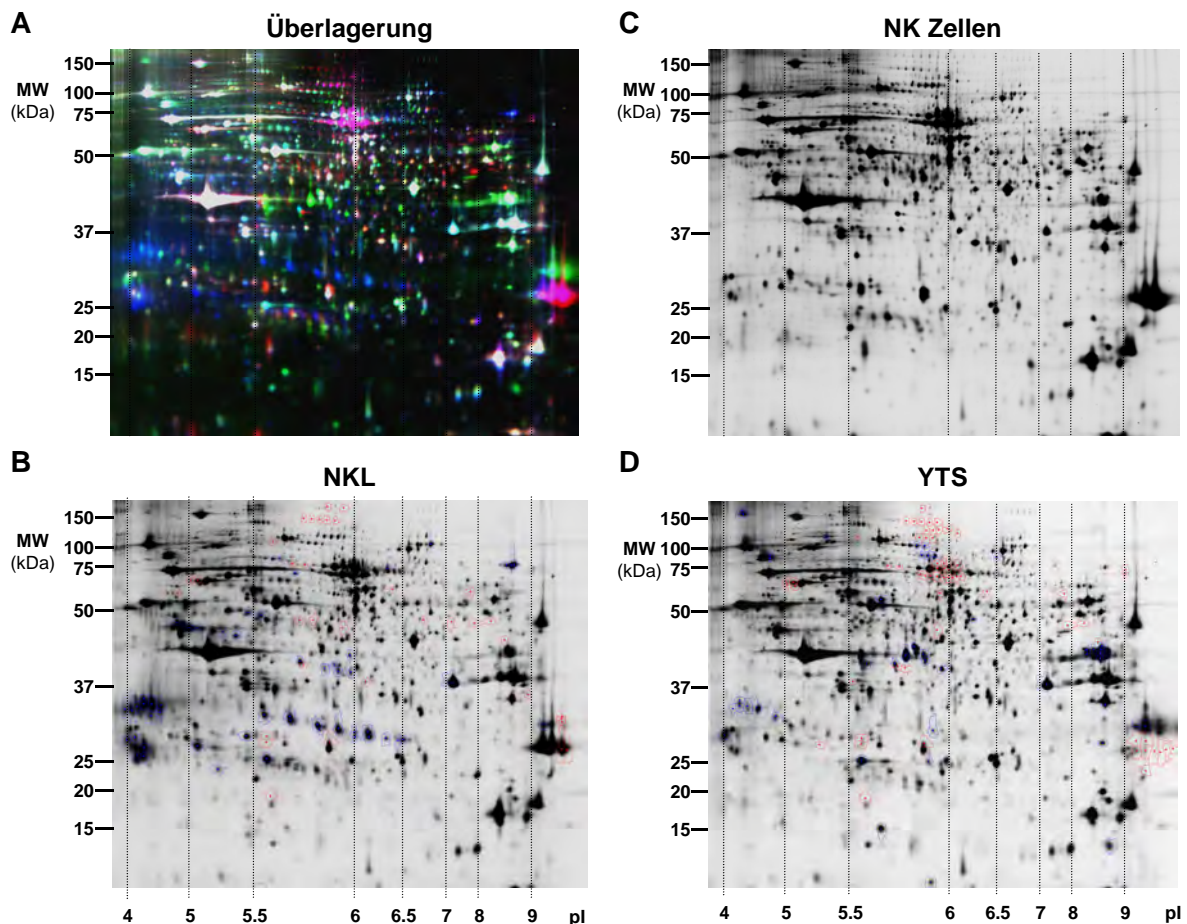
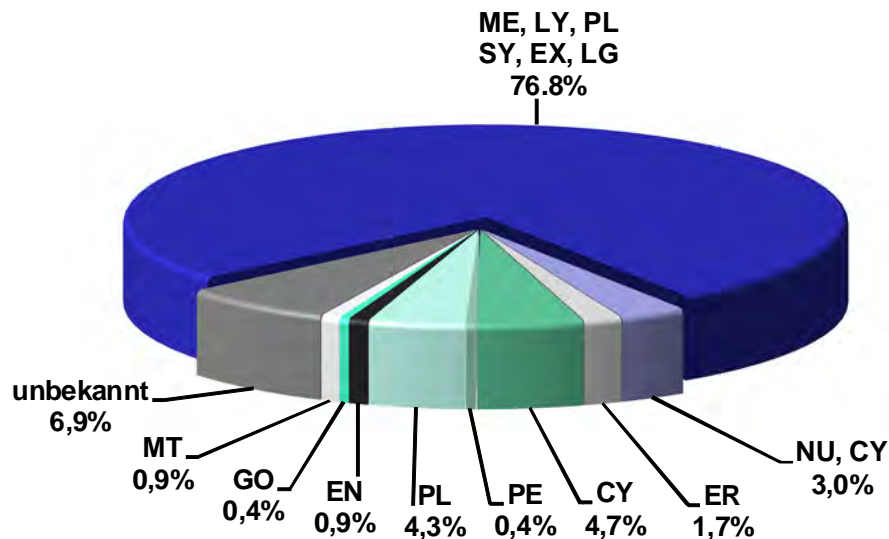


Abb. 5.3.5: 2D-DIGE Analyse von angereicherten lytischen Granula aus NKL und YTS im Vergleich zu expandierten NK-Zellen. Es wurden jeweils 50 µg der Granulafraktion von NK (C), NKL (B) und YTS (D) mit Cy5, Cy3 und Cy2 markiert. Der daraus resultierende Farbcode NK/Cy5/rot, NKL/Cy3/blau und YTS/Cy2/grün ist in (A) als **Überlagerung** dargestellt. Dieses Gel zeigt die Unterschiede im Proteinbesatz repräsentativ für drei unabhängige Experimente (Exp. Nr. 6, Tabelle 5.3.1). Proteinspots von NKL- (B) und YTS- (D) Zellen, die eine Änderung im Spotvolumen von mehr als 3-fach im Vergleich zu expandierten NK-Zellen aufwiesen, wurden bei erhöhten Spotvolumenverhältnissen blau und bei verminderten rot markiert.

5.3.5 Proteinidentifizierung lytischer Granula aus NK-Zellen durch Massenspektrometrie

Die Identifizierung von individuellen Proteinen wurde nur mit den Spots durchgeführt, die ein vergleichbares Expressionsprofil in mindestens zwei Experimentsätzen (NKL/YTS und NKL/YTS/NK) zeigten. Die Spots wurden mit Fokus auf die differentiellen Proteine automatisch gestanzt und manuell für die Massenspektrometrie aufbereitet. Obwohl nur zwischen 150 und 225 µg Gesamtprotein für die 2D-PAGE eingesetzt wurden, konnten insgesamt 1008 Proteine aus allen acht Gelen (siehe Tabelle A1 im Anhang) identifiziert werden. Da verschiedene Spots (besonders die differentiellen) mehrfach aus verschiedenen Gelen gestanzt und analysiert wurden, ergab sich eine Anzahl von 397 unterschiedlichen Proteinspots, die 234 Proteine und deren Isoformen repräsentierten. Von diesen 234 Proteinen wurden 76,8% bereits im Zusammenhang mit anderen proteomischen Analysen von Lysosomen oder sekretorischen Vesikeln anderer Zelltypen, wie Melanosomen, Exosomen oder synaptischen Vesikeln identifiziert. Anhand dieser bioinformatischen Analyse von Hu und Kollegen [139] wurde eine iProXpress Datenbank (GUMC, Washington DZ, USA) erstellt, die die Proteinprofile von sieben lysosomen-assoziierten Organellen, als auch vom ER und Mitochondrien beinhaltet. Einträge dieser Datenbank konnten anhand der UniProt Nummer gesucht werden. Des Weiteren dienten diese Nummern auch dazu in der ‚UniProt Knowledgebase‘ und der ‚literature hyperlinked database‘ ‚ihop-net‘ (www.ihop-net.org [140]) die funktionellen Eigenschaften der Proteine zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser bioinformatischen Analyse wurden in Abb. 5.3.6 zusammengefasst.

A



B

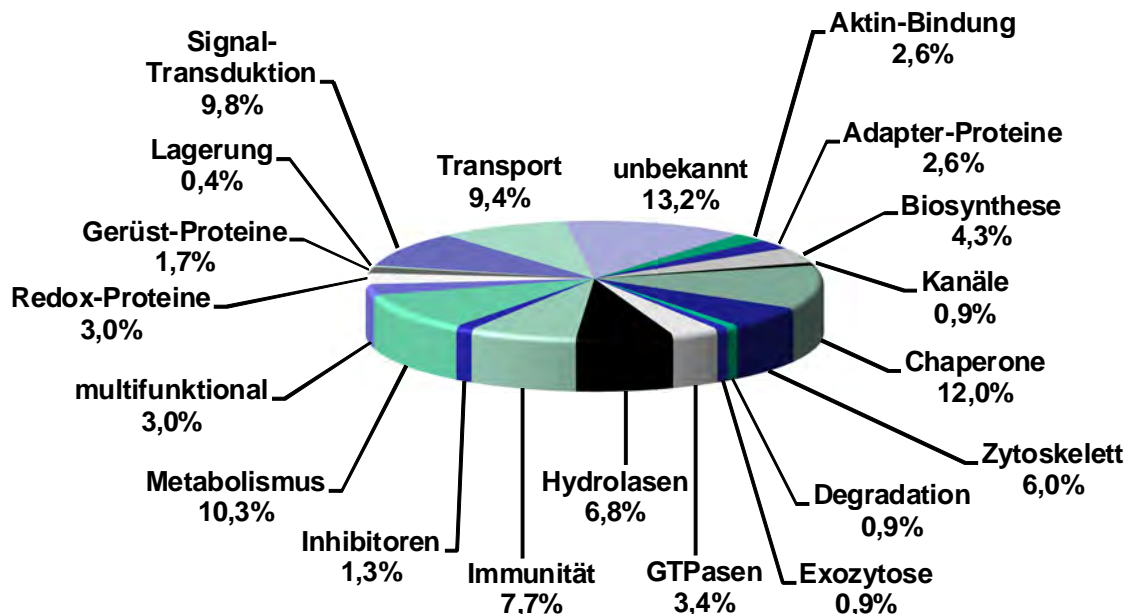


Abb. 5.3.6: Zelluläre Lokalisation (A) und funktionelle Klassifizierung (B) der identifizierten Proteine. Jedes der 234 identifizierten Proteine wurde wie im Text beschrieben nach ihrer Funktion und zellulären Lokalisation in Gruppen eingeteilt. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Lysosomen (LY), Melanosomen (ME), Blutplättchen Granula (PL), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lytischen Granula (LY) vertreten. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Plasmamembran (PM), Peroxisomen (PE), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

Neben der großen Anzahl an lysosomalen und sekretorischen Proteinen, wurden auch Proteine (z.B. Granzyme und Perforin) identifiziert, die nur in lytischen Granula von T- und NK-Zellen vorkommen. Die funktionelle Analyse der Proteine (Abb. 5.3.6 B) zeigte eher ein heterogenes Profil. Dennoch zeichneten sich funktionelle Gruppen (Hydrolasen, Chaperone, Immunität) ab, die den bifunktionellen Charakter

der lytischen Granula hervorheben. Zusätzliche Informationen zu den Identifikationen, wie NCBI, UniProt Nummer, theoretisches Molekulargewicht und *pI*, die Anzahl der übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden, gemessenen Peptide und die daraus resultierenden MASCOT-Punkte können der Tabelle A1 im Anhang entnommen werden.

5.3.6 Differentielle Proteine in sekretorischen Granula aus verschiedenen NK-Zellpopulationen

Durch die DIGE-Technologie kann die Menge eines spezifischen Proteins aus einem Proteingemisch quantifiziert und mit einer Vergleichsprobe in Relation gesetzt werden. Durch die zuvor beschriebene massenspektrometrische Analyse war es möglich 90 der 101 differentiellen Proteinspots der beiden leukämischen Zelllinien zu identifizieren und in der folgenden Tabelle 2 zusammenzufassen.

Tabelle 5.3.2: Differentielle Proteine aus angereicherten Granula leukämischer und expandierter humaner NK-Zellen.

Proteinname	Spot Nr. ^{a)}	Uni Prot Nr.	relatives Vorkommen ^{b)} in		
			NKL	YTS	NK
14-3-3 Protein epsilon	2	P62258	0	1	0
Actin gamma	11	Q562R8	1	1	0
Active breakpoint cluster region-related prot.	14,15	Q12979	0	1-2	0
Acyl-CoA synthetase 4	16,17	O60488	1-2	0	0
Aldolase C, fructose-bisphosphate	25	P09972	0	1	0
Annexin A2	30,31	P07355	1	1	0
Annexin A5	35	P08758	1	1	0
Cathepsin C	64	P53634	0	1	1
Cathepsin C	63	P53634	0	2	n.d.
Cathepsin D	65,67,68	P07339	0	0	1
Cathepsin D preproprotein	66	P07339	0	1	1
Cathepsin D preproprotein	69	P07339	0	1	2
Cathepsin S	71	P25774	1	0	1
Coronin 7 (Golgi)	87	P57737	1	0	1
Galactose mutarotase	132	Q96C23	0	1	0
Galectin-1	133	P09382	1	0	1
Galectin-3	134	P17931	0	1	0
Granzyme A	154,155	P12544	2	0	1
Granzyme A	156,157	P12544	3	0	3
Granzyme B	159	P10144	0	1	0
Granzyme B	160,162,163	P10144	0	2	0
Granzyme B	161,164	P10144	0	3	1
Granzyme B	165	P10144	0	4	0
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	185	P51659	1	0	1
Interleukin-16	191-193	Q14005	0	0	1
Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	196-198,200,201	Q9HBX2	1	0	1
Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	199,202	Q9HBX2	1	0	2

Proteinname	Spot Nr. ^{a)}	Uni Prot Nr.	relatives Vorkommen ^{b)} in		
			NKL	YTS	NK
LIM and SH3 protein 1	206	Q14847	0	0	1
Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	209,210	P13796	0	0	1
Lysosomal acid alpha-mannosidase	215	O00754	0	0	1
MHC class I antigen	220,223	P30443	0	1-2	0
MHC class I antigen	222	P30443	1	0	0
MHC class II HLA-DQ alpha	224,225	P01907	2	1	0
MHC class II HLA-DQ beta	231	P01918	2	1	0
MHC class II HLA-DR alpha	226	P01903	3	1	0
MHC class II HLA-DR alpha	227-230	P01903	1	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	232	Q861H6	3	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	233,238	Q861H6	1	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	234,236	Q861H6	3	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	235,242	Q861H6	3	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	237	Q861H6	2	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	239	Q861H6	4	1	0
MHC class II HLA-DR beta-2	240,241	P01911	1	0	0
Moesin	244-257	P26038	2-3	0	3
Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	266	P15531	1	1	0
NME1-NME2 protein	264	unbekannt	0	1	0
Perforin 1 (pore forming protein)	268-272	P14222	0	1	1
Peroxiredoxin 1	273	Q06830	1	1	0
Peroxiredoxin 4	275	Q13162	1	1	0
Phosphoglycerate kinase 1	282-285	P00558	0	1	0
Prolyl 4-hydroxylase, alpha I subunit	297	P13674	1	1	0
Septin 9	339	Q9UHD8	2	0	0
Serpin B1	340, 341, 342, 343	P30740	0	1-2	0
Serpin B9	344, 345	P50453	0	3	1

n.d. nicht definiert

^{a)} Spots desselben Proteins mit ähnlichem Expressionsprofil wurden zusammengefasst.

^{b)} Das relative Vorkommen von Proteinen ist in Relation zur geringsten Expression (0) in Teilbereiche gegliedert worden, bei denen 1 eine Änderung von bis zu 10 –fach, 2: 10-20 -fach, 3: 20-30 –fach und 4 größer 30 –fach bedeutet.

Interessanterweise waren viele differentielle Proteine mit zytotoxischen Funktionen (Granzym A und B, Perforin) aber auch mit Antigenpräsentation (MHC Moleküle) verknüpft. Diese Proteinspots wurden auch in Abb. 5.3.4 für den Vergleich NKL gegen YTS bzw. in Abb. 5.3.5 für NK vs. NKL und NK vs. YTS dargestellt. Die Lokalisierung der individuellen Spots wurde zusätzlich in der Abb. A1 des Anhangs dargestellt.

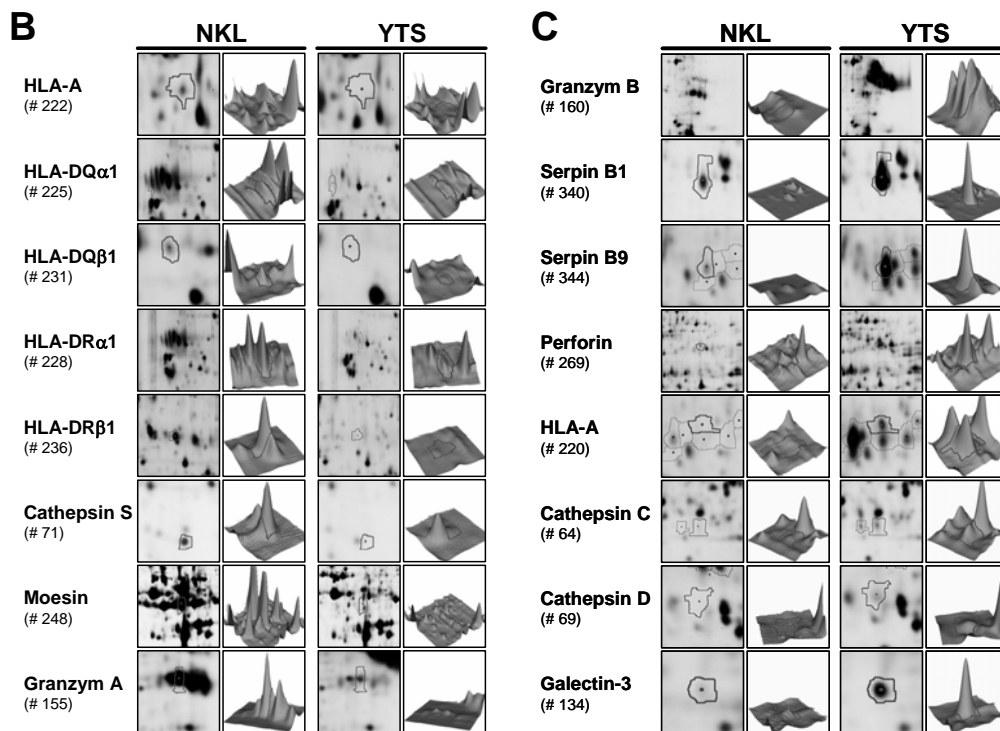
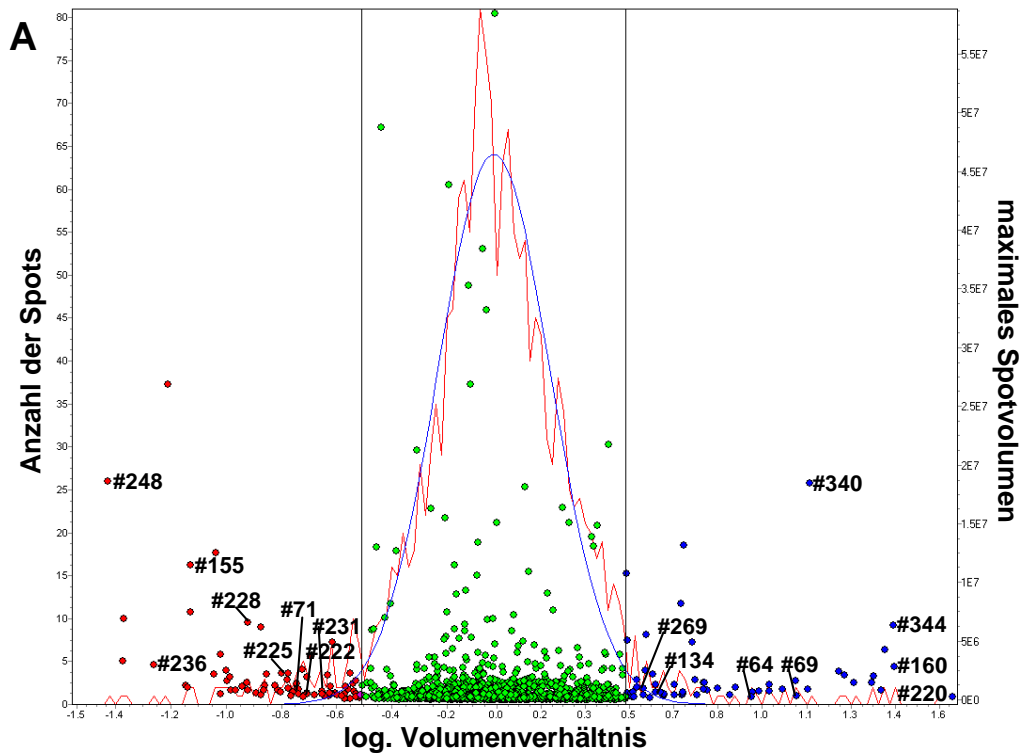


Abb. 5.3.7: (A) Histogramm der DeCyder Analyse aus dem Vergleich von NKL mit YTS (siehe auch Abb. 5.3.4). Die rote Linie gibt dabei die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen wieder. Die blaue Linie stellt dabei die Gaußsche Regressionskurve dar. Die Höhe der abgebildeten Punkte gibt das maximale Spotvolumen jedes analysierten Spots wieder. Durch die Festlegung eines Grenzbereiches (vertikale Linien), welcher der 3-fachen Änderung des Volumenverhältnisses entspricht, stellen sich ähnliche Proteinspots hier als grüne Punkte, verminderte als rote und erhöhte Volumenverhältnisse als blaue Punkte dar. Einige der differentiellen Proteine der NK-Zelllinien (mit den entsprechenden Spotnummern versehen) wurden exemplarisch detaillierter dargestellt (B,C). Proteine von YTS mit mehr als 3-fach geringerem Spotvolumen als in NKL sind in B und mit erhöhtem in C dargestellt. Die korrespondierenden 3D Bilder verdeutlichen diese Unterschiede. Die graue Umrandung zeigt dieselbe Position in beiden Bildern.

Einige Beispiele für differentiell vorhandene Proteine wurden in Abb. 5.3.7 mit den dazugehörigen Spotintensitäten dreidimensional visualisiert. Wie sich bereits bei Western Blot Analysen der Fraktionen andeutete, war Granzym B (#160) in Granula von YTS im Vergleich zu NKL (bis zu 35-fach) erhöht. Es wurde auch eine höhere Expression des 42 kDa Serin Protease Inhibitors Serpin B1 (#340), des Granzym B Inhibitors Serpin B9 (#344), des Poren formenden Proteins Perforin (#269), der Proteasen Cathepsin C (#64) und D (#69), des β -Galaktosidase bindenden Lectins Galectin-3 (#134) und offensichtlich zelltyp-spezifischer HLA-A Isoformen (#220) gemessen. Auch bei den aus NKL stammenden Granula konnte eine spezifische HLA-A Isoform (#222) identifiziert werden. Des Weiteren wurden auch funktionell relevante Proteine, wie MHC Klasse-II DQ (#225, 231) und DR (#228, 236) Isoformen exklusiv in den NKL, aber nicht in NK-Zellen gefunden. Passend dazu wurde auch ein erhöhtes Vorkommen von Cathepsin S (#71) festgestellt, die als Protease die invariante Kette der MHC II Proteine degradiert [141]. Das in Vesikel Transport involvierte Protein Moesin (#244-257), das sich als Spotakkumulation von 68 kDa und *pI* 6 darstellte, wurde nur in Präparationen von NKL und nicht von YTS gefunden. Interessanterweise wurde in Fraktion 2 von NKL im Gegensatz zu YTS eine größere Menge an Granzym A (#154-157) ermittelt. Der Vergleich *in vitro* expandierter NK-Zellen mit den leukämischen Zelllinien ergab ebenfalls interessante Resultate (siehe Tabelle 5.3.2). So wurden einige Proteine in den Präparationen der NK-Zellen festgestellt, die weder in NKL noch in YTS auftraten. Hierzu gehörten z. B. Interleukin-16 (#191-193), welches chemotaktisch auf CD4⁺ Zellen wirkt. Des Weiteren wurden auch Cathepsin D (#65-70), die lysosomale saure α -Mannosidase (#215) und L-Plastin (#209, 210) verstärkt in den IL-2 expandierten NK-Zellen gefunden. Interleukin-16 wurde bis dato noch nicht in NK-Zellen gefunden und wurde daher genaueren Untersuchungen unterzogen (siehe Kapitel 5.8).

5.3.7 Verifikation der Unterschiede im Proteom sekretorischer Granula von NK-Zellen

Die vorherigen Ergebnisse deuteten auf Unterschiede im Besitz lytischer Proteine zwischen den NK-Zelllinien hin. Deshalb wurde auch das zytotoxische Molekül FasL, das nicht im Proteom identifiziert wurde, ebenfalls einer genaueren Analyse unterzogen. Hierbei wurde eine verstärkte Expression in YTS und NK-Zellen im Vergleich zu NKL ermittelt und dies sowohl im Western Blot (Abb. 5.3.8 B) als auch in der konfokalen Mikroskopie (Abb. 5.3.8 A).

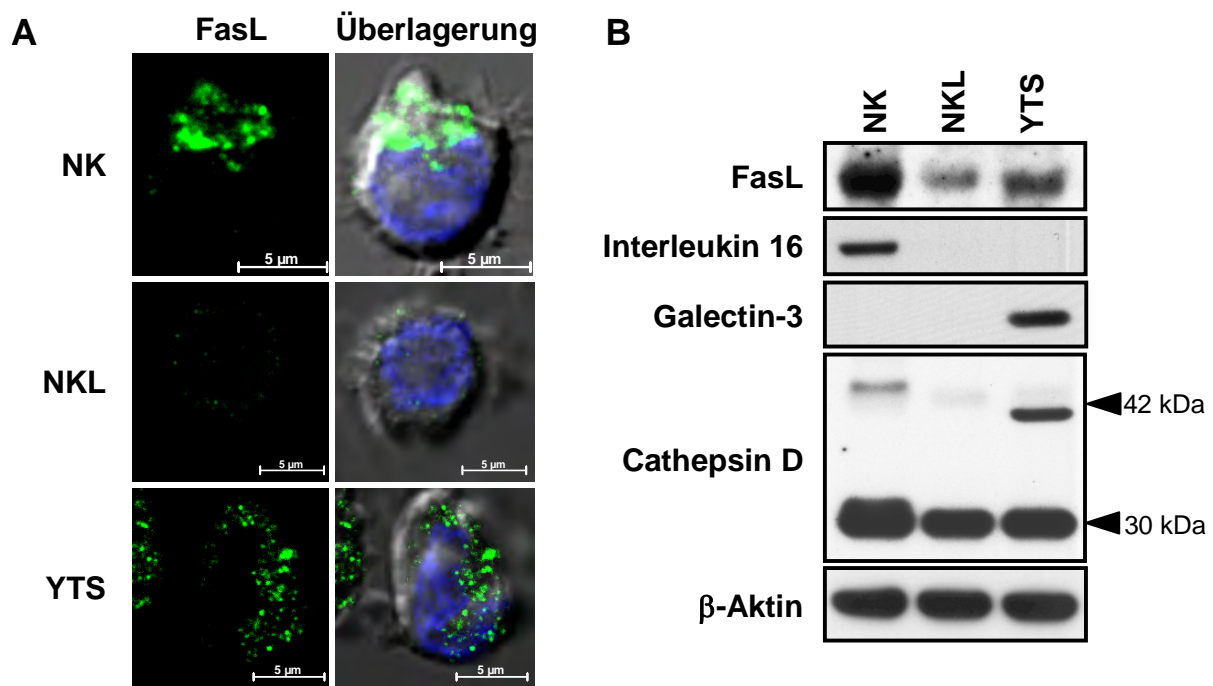


Abb. 5.3.8: Expressionsunterschiede in leukämischen und aktivierten humanen NK-Zellen. (A) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Expression des FasL in NKL, YTS und 16 Tage expandierte NK-Zellen. Die Zellen wurden in PFA fixiert, permeabilisiert und gegen FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und anschließend mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Der Größenmaßstab von 5 μ m ist für jede Zelle entsprechend angegeben. **(B)** Western Blot von je 5 μ g Protein von Zelllysaten aus NK, NKL und YTS. Der Blot wurde gefärbt mit anti-FasL (Klon G247-4), anti-IL 16, anti-Galectin-3, Cathepsin D (Klon CTD-19) und mit anti- β -Aktin als Beladungskontrolle.

Die in den DIGE-Versuchen gefundenen Unterschiede wurden mit verschiedenen etablierten Methoden verifiziert. Western Blot Analysen (Abb. 5.3.8 B) bestätigten so ein verstärktes Vorkommen von Galectin-3 in YTS Zellen. Auch der Nachweis von Interleukin-16 auf dem Western Blot zeigte ein selektives Vorkommen in expandierten NK-Zellen. Dagegen ist die Interpretation des Cathepsin D Western Blot Ergebnisses schwieriger, da die theoretisch berechnete 42 kDa Bande bei NK- und YTS nicht auf identischer Höhe liefen. Trotzdem ließ sich ein verstärkter Cathepsin D Besitz bei den NK-Zellen feststellen, da sich die 30 kDa Bande hier höchstwahrscheinlich als Doppelbande zeigte.

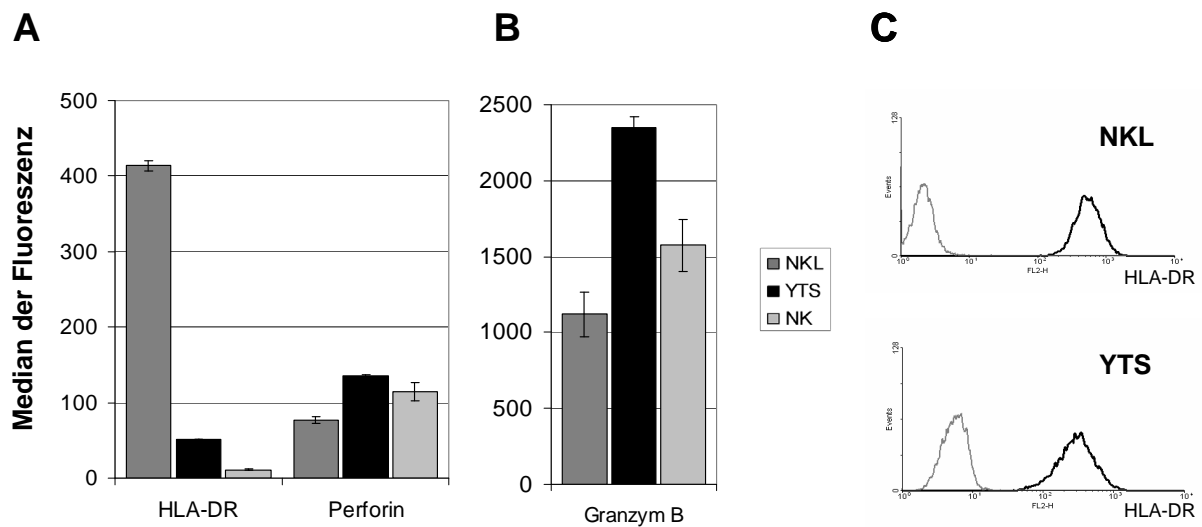


Abb. 5.3.9: FACS Analyse differenziell exprimierter Proteine. Die in der Legende angezeigten NK-Zellen wurden intrazellulär für HLA-DR und Perforin **(A)** und Granzym B **(B)** gefärbt. Der Median der Fluoreszenzintensität ergibt sich auch drei unabhängigen Messungen. Die Oberflächenexpression von HLA-DR (schwarze Linie) auf NKL- (oben) und YTS- (unten) Zellen ist mit der dazugehörigen Isotyp Kontrolle in grau **(C)** dargestellt.

Als eine weitere Verifikationsmethode diente die intrazelluläre FACS-Färbung. Sie ergab bei HLA-DR, Perforin und Granzym B (Abb. 5.3.9) Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten bei den untersuchten NK-Zellen. Der Median der gemessenen Fluoreszenz von HLA-DR zeigte in drei verschiedenen Messungen bei NKL ein 10-mal so hohes Vorkommen wie bei YTS Zellen. Die Oberflächenexpression von HLA-DR wies jedoch einen weit aus geringeren Unterschied auf. Granzym B war dagegen in allen drei Zelltypen nachweisbar, jedoch verstärkt in YTS und expandierten NK-Zellen. Ebenfalls war die Perforin Expression in YTS erhöht, was sich mit den DIGE Analysen aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten deckte (nicht gezeigt).

Bisher traten alle untersuchten zytotoxischen Proteine in NKL in geringeren Mengen auf als in YTS. Eine Ausnahme stellte bei den DIGE Analysen allerdings Granzym A dar, das in mindestens vier unabhängig durchgeführten Experimenten im Gegensatz zu Granzym B verstärkt in NKL aufzufinden war (Abb. 5.3.10 A). Diese Unterschiede konnten ebenfalls im Western Blot (Abb. 5.3.10 B, C) und in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.3.10 D) nachgewiesen werden.

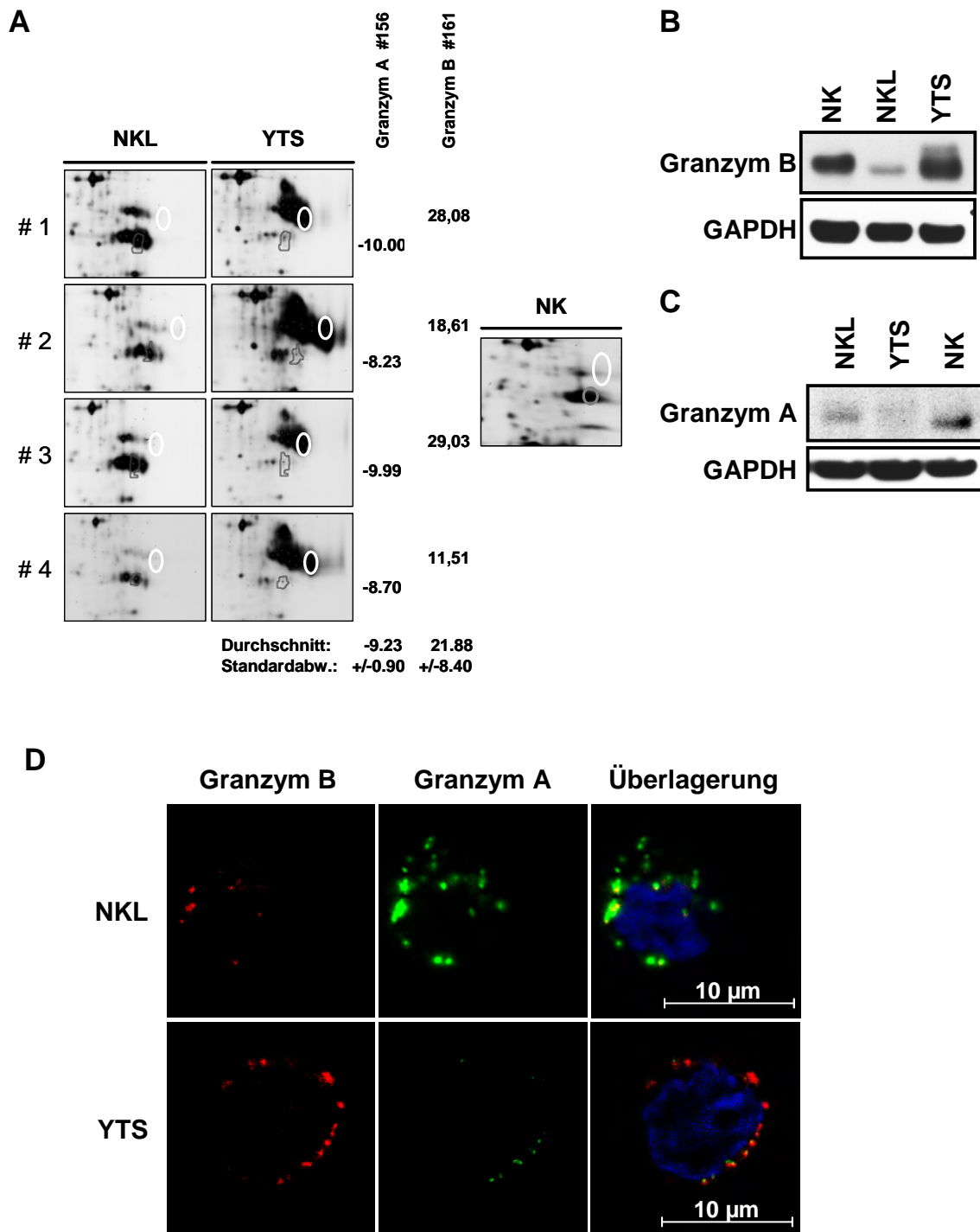


Abb. 5.3.10: Differentielle Expression von Granzym A und B in leukämischen NK-Zelllinien, NKL und YTS. (A) Ausschnitte aus 2D-Gelen von vier unabhängigen Experimenten zeigen Proteinmuster für Granzym A (#156, grauer Kreis) und Granzym B (#161, weißer Kreis). Der gleiche Ausschnitt ist auch für NK-Zellen dargestellt. Die angegebenen Zahlen geben die Änderungen der Spotvolumina wieder. Verifikationen erfolgten durch Western Blots mit je 5 µg Protein des Zelllysats der angegebenen Zellen mit anti-Granzym B (B) und anti-Granzym A mAk (C). Des Weiteren wurden Granzyme mit direkt markierten anti-Granzym A-FITC und anti-Granzym B-Alexa Fluor 647 mAk fluoreszenzmikroskopisch in PFA fixierten NKL und YTS nachgewiesen (D). Die Detektion erfolgte mit identischen Parametern. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) visualisiert.

5.4 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen

Neben Natürlichen Killerzellen als Effektorzellen der angeborenen Immunität treten T-Zellen als zytotoxische Effektorzellen der adaptiven Immunität auf. Die verschiedenen T-Zellsubpopulationen ($\alpha\beta$ und $\gamma\delta$) zeichnen sich dabei möglicherweise durch unterschiedliche Aktivierungs- und Effektoreigenschaften aus. Darüber hinaus ist seit langem bekannt, dass auch $CD4^+$ T-Lymphozyten im Rahmen einer *in vitro* Expansion zytotoxisches Potenzial entwickeln [142,143]. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war zudem bekannt, dass auch in $CD4^+$ Zellen FasL als ein Markerprotein von sekretorischen Lysosomen angesehen werden kann. Dementsprechend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Proteom angereicherter Vesikel (Fraktion 2) aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen vergleichend analysiert werden.

5.4.1 Phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen

Zur Gewinnung von $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen wurden PBMZ verschiedener Spender mittels MACS in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sortiert und anschließend allogon durch einen „Feeder-Cocktail“ stimuliert. Ähnlich wurde bei der Etablierung von $\gamma\delta$ Zelllinien vorgegangen. Nach 14-tägiger Expansion wurden die Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker im FACS charakterisiert. Hierbei ergab sich das erwartete Färbemuster für jede Subpopulation (Abb. 5.4.1). Mindestens 95% der Zellen waren ebenfalls positiv für die T-Zellmarker CD2 und CD3 (nicht gezeigt) und somit für nachfolgende subzelluläre Fraktionierungen geeignet.

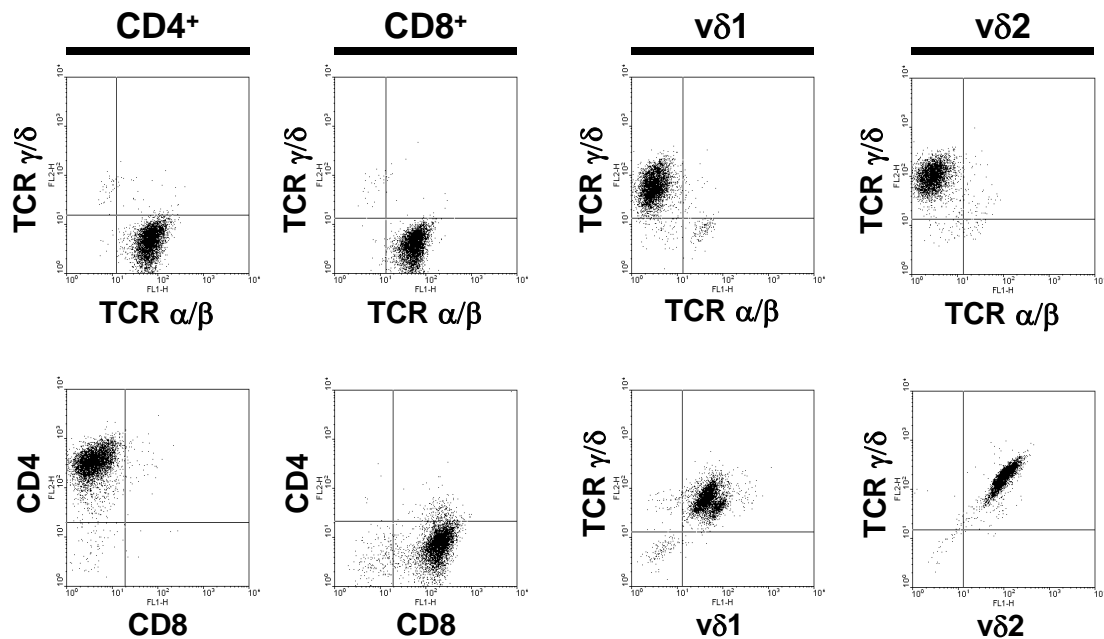


Abb. 5.4.1: FACS Analyse der T-Zellsubpopulationen. Isolierte und expandierte Lymphozyten wurden 14 Tage nach Stimulation mit anti-TZR $\alpha\beta$ -FITC, anti-TZR $\gamma\delta$ -PE, anti-CD8-FITC, anti-CD4-PE, anti-v δ 1-FITC bzw. anti-v δ 2-FITC gefärbt und die spezifische Fluoreszenz im FACS gemessen. Die Quadranten wurden anhand der Isotypkontrollen festgelegt (nicht abgebildet). Die dargestellten Streudiagramme repräsentieren beispielhaft die phänotypischen Analysen von Subpopulationen aus verschiedenen Spendern.

5.4.2 Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus den verschiedenen T-Zellsubpopulationen

Die Anreicherung sekretorischer Granula aus den verschiedenen Subpopulationen erfolgte analog zu denen der NK-Zellen. Für die differentielle Zentrifugation wurden jeweils mindestens 600×10^6 Zellen verwendet, die zuvor mit PHA aktiviert und in Medium mit rIL-2 für 16 Tage expandiert worden waren. Es wurde während der Zellkultur darauf geachtet, dass alle Zellen zu identischen Zeitpunkten und mit identischem Medium versorgt wurden, um exogene Einflüsse auf den Proteinbesatz der Granula auszuschließen. Die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Fraktionen wurden zunächst mittels Western Blot charakterisiert. Hierfür wurden je 4 μ g Protein der einzelnen Fraktionen auf ein Gradientengel aufgetragen und anschließend auf eine NC-Membran transferiert. Bei der folgenden Färbung wurden im Wesentlichen Antikörper gegen Organellen-spezifische Markerproteine eingesetzt (Abb 5.4.2).

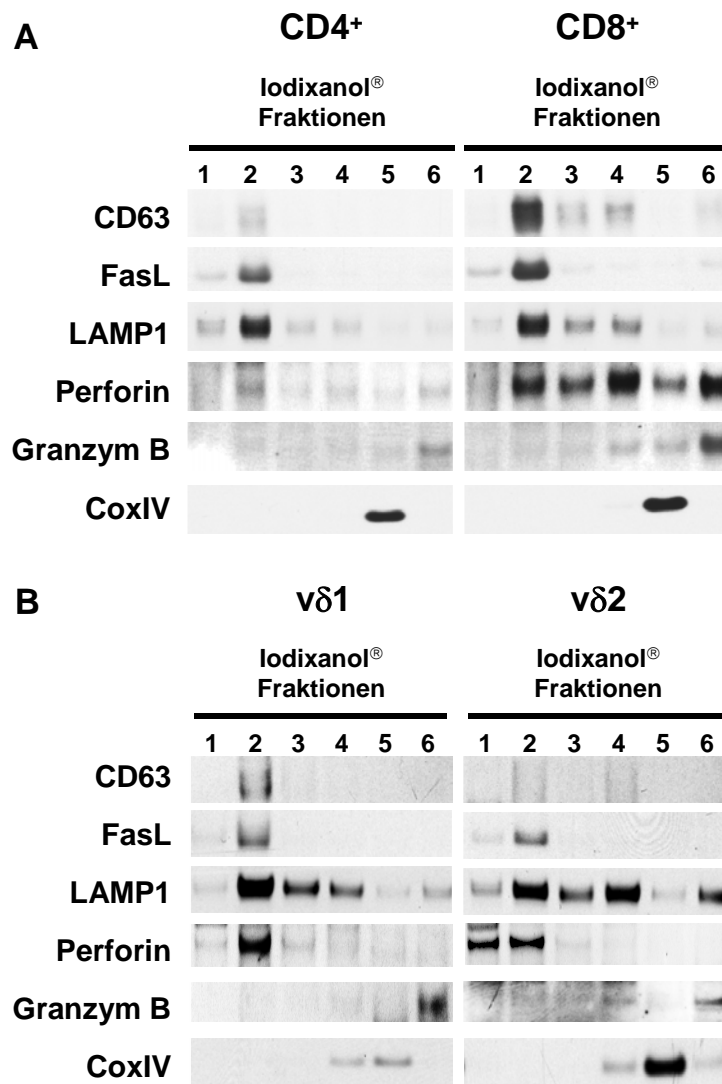


Abb. 5.4.2: Western Blot Analyse der Iodixanol® Fraktionen aus T-Zellsubpopulationen. CD4⁺ und CD8⁺ αβ Zellen (**A**) bzw. vδ1 und vδ2 (**B**) γδ T-Zellen wurden nach 16-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert, je 4 µg Protein jeder Fraktion auf Gradientengelen aufgetrennt und anschließend auf NC-Membran transferiert. Die Immunodetektion erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen CD63, FasL, LAMP-1, Perforin, Granzym B und CoxIV. Die Western Blots der CD4⁺, CD8⁺ (**A**) und der vδ1⁺, vδ2⁺ (**B**) T-Zellen sind repräsentativ für je vier bzw. je zwei unabhängig durchgeführte Experimente dargestellt.

In allen Fällen waren die lysosomalen Membranproteine CD63 und LAMP-1 sowie FasL als spezifische Marker für sekretorische Lysosomen von T- und NK-Zellen in Fraktion 2 deutlich angereichert (Abb. 5.4.2) Interessanterweise ergab sich für Perforin neben einer Anreicherung in Fraktion 2 bei allen Zellen und insbesondere bei CD8⁺ Zellen ein erhöhtes Vorkommen in den Fraktionen 4 und 6. Überraschend war die Verteilung von Granzym B. Hier war in allen Linien keine Anreicherung in der zweiten Fraktion festzustellen, sondern nur in Fraktion 6. In allen durchgeführten Versuchen war diese zunächst widersprüchliche Verteilung der zytotoxischen Effektorproteine ebenso reproduzierbar wie die Anreicherung der Mitochondrien in Fraktion 5. Aufgrund der Literaturlage und der eigenen Vorbefunde aus NK-

Zellpopulationen wurden in der vorliegenden Arbeit sekretorische Granula einheitlich über ihre membranständigen Marker FasL, CD63 und LAMP-1 klassifiziert.

5.4.3 Das Proteom FasL-tragender Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Zur Darstellung unterschiedlicher Proteomzusammensetzungen von sekretorischen Lysosomen aus T-Zellen war es zunächst erforderlich, eine möglichst komplette Proteinkarte der Granula zu erstellen. Dies war möglich, da sich die Sensitivität der Proteinidentifizierungen im Laufe der Doktorarbeit optimieren ließ. Es wurden so aus 9 Gelen, die zu gleichen Mengen mit Granula-Lysaten von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verschiedener Spender beladen waren, insgesamt über 1600 Spots ausgestanzt, tryptisch verdaut und massenspektroskopisch analysiert. Davon wurden 1344 identifiziert. Da viele Identifikationen doppelt oder in Einzelfällen bis zu 6-fach vorlagen, ergab sich schließlich eine Anzahl von 751 individuellen Annotationen, die in der Proteinkarte in Abb. 5.4.3 und im Anhang in Tab. A2 zusammengefasst dargestellt sind. Mehrfachidentifikationen an derselben Position in unterschiedlichen Gelen wiesen erneut auf die Reproduzierbarkeit der Analysen hin. Einige Proteine wurden als Isoformen oder posttranslationale modifizierte Varianten mehrfach in unterschiedlichen Spots identifiziert, wodurch sich eine tatsächliche Anzahl von 402 individuellen Proteinen ergab. Die anschließende Zuordnung ihrer Lokalisation und Funktion wurde analog zu den NK-Zellauswertungen durchgeführt und ist in Abb. 5.4.4 dargestellt. Die bioinformatischen Analysen ergaben, dass 68,2% von 402 Proteinen bereits in anderen lysosomalen oder sekretorischen Vesikeln identifiziert wurden (Abb. 5.4.4 A). Im Vergleich zu den NK-Zellen waren dies 8,6% weniger vesikuläre Proteine. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil zytoplasmatischer Proteine um 5,7% auf 10,9%. Dieser Anstieg könnte unter anderem auf viele gering exprimierte Proteine zurückzuführen sein, die in NK-Zelllysosomen nicht identifiziert wurden. Insgesamt wurden in T-Zellen 274 Lysosomen- oder Granula-assoziierte Proteine benannt, im Vergleich zu 179 im Falle der NK-Zellen.

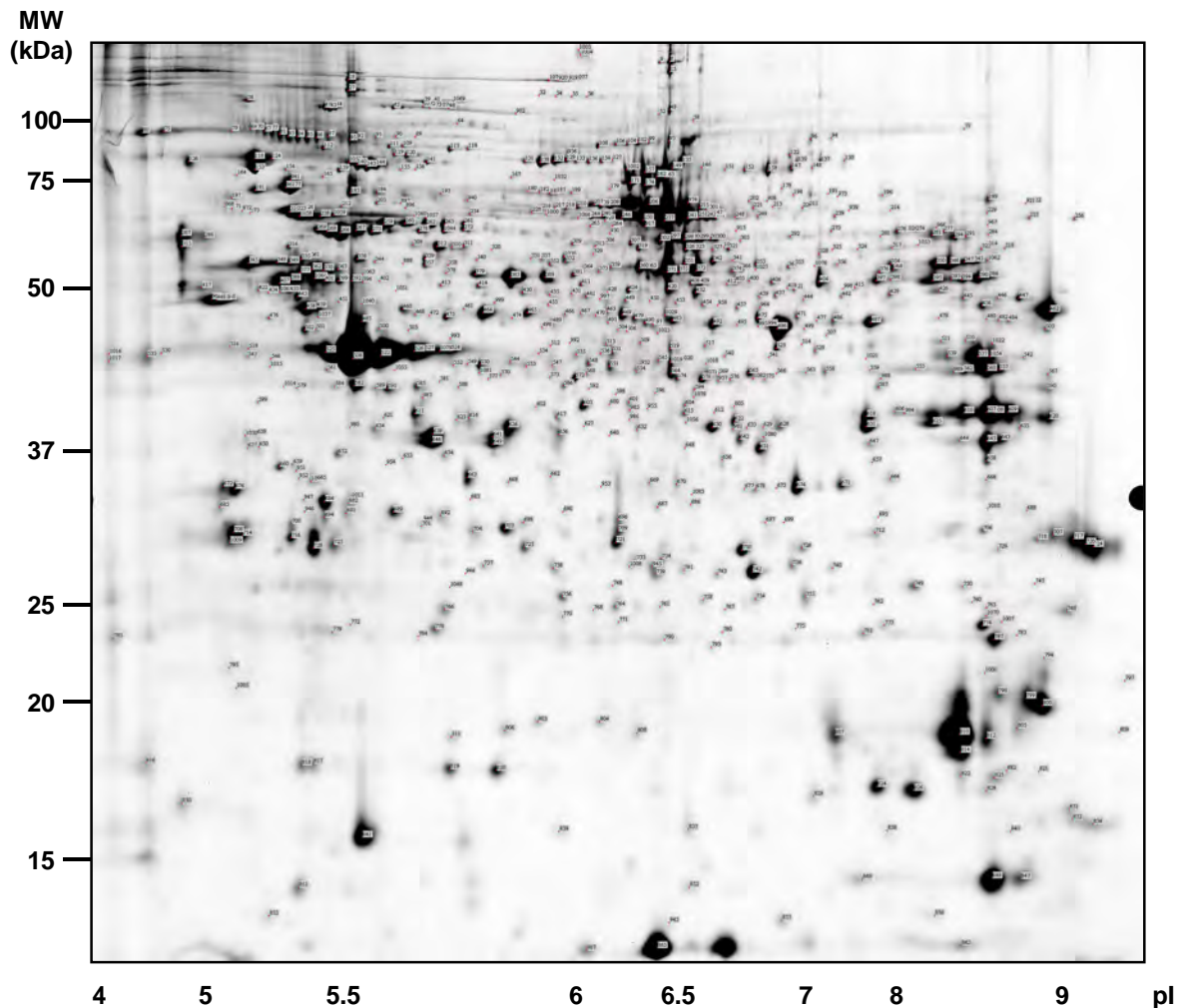


Abb. 5.4.3: Annotierte Proteomkarte FasL-angereicherter Vesikel aus $\alpha\beta$ T-Zellen. Es wurden je 125 μg Proteinlysate der Fraktion 2 aus CD4^+ und CD8^+ T-Zellen (von Spender 2, Tab. 5.4.1) auf einem 24 cm Streifen mit dem nicht linearen pH-Bereich 3-11 in der ersten Dimension und auf 12,5% Tris-Glycin Gelen in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteinfärbung erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Pink. Die Liste der Identifikationen mit den entsprechenden Spotnummern (Tab. A2) und vergrößerte Gelausschnitte (Abb. A2) sind im Anhang zusammengestellt. Proteinspots, die in diesem Gel nicht identifiziert wurden, jedoch in mehreren anderen Gelen, wurden implementiert und sind mit Nummern größer als 865 annotiert.

Die funktionelle Annotierung der Proteine erfolgte ebenfalls anhand der ‚UniProt‘ und ‚ihop‘ Datenbanken (Abb. 5.4.4 B). Hierbei wurden neben vielen Proteinen, die mit dem Zytoskelett (9,7%) oder allgemeinen Transportfunktionen (10,4%) in Verbindung stehen, auch ein großer Anteil (13,4%) degradativer Proteine gefunden.

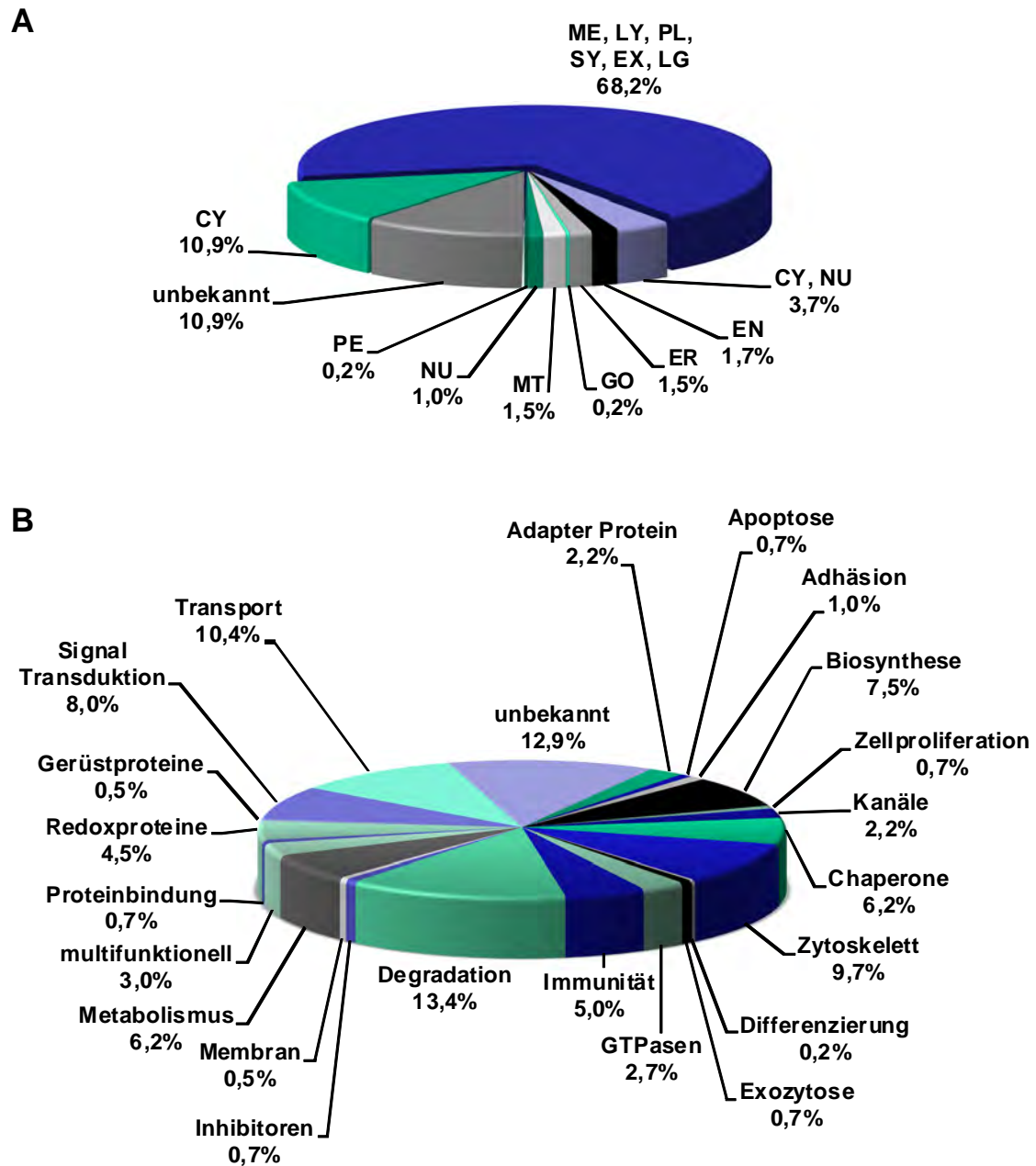


Abb. 5.4.4: Einteilung der identifizierten Proteine nach Lokalisation (A) und Funktion (B). Die 402 identifizierten Proteine wurden nach ihrer Funktion und zellulären Lokalisation in Gruppen eingeteilt. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Melanosomen (ME), Lysosomen (LY), Blutplättchen Granula (PL), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lysischen Granula (LG) repräsentiert. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Peroxisomen (PE), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

5.4.4 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Mittels differentieller Gelelektrophorese wurden im Folgenden Proteinmuster von angereicherten sekretorischen Lysosomen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen direkt miteinander verglichen. Hierbei wurden die Granula von identisch expandierten Subpopulationen von vier Spendern jeweils mit Cy5 bzw. Cy3 markiert und anschließend auf einem 2D-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus allen 8 Proben mit Cy2 markiert, um spenderspezifische Unterschiede in der späteren Analyse auszuschließen. Dadurch ergab sich das in Tab. 5.4.1 dargestellte Experimentdesign. In der Tabelle ist auch die Anzahl der analysierten Spots aufgeführt, die den verwendeten Kriterien entsprachen und in die Analyse eingingen (siehe NK-Zellen). Die angegebene 2-fache Standardabweichung (2x SD) ist das Maß für die Ähnlichkeit der Spotvolumina in den beiden Fluoreszenzkanälen Cy5 und Cy3. Eine Standardabweichung von 1 würde dabei einem 100%-ig identischem Gel entsprechen. Die differentiellen „in-Gel“ Analysen (DIA) ergaben bei einem Grenzbereich, der der 2-fachen Standardabweichung entsprach, eine Anzahl von durchschnittlich insgesamt 122 differentiellen Spots. Diese verteilten sich zu gleichen Teilen auf Spots, die entweder vermindert oder verstärkt in CD8⁺ T-Zellen vorlagen.

Tab. 5.4.1: Experimentdesign für den Vergleich von SL aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die annotierte Proteinkarte von Spender 2 ist in Abb. 5.4.3 dargestellt.

Spender Nr.	CyDye Markierung			Spots	2x SD	vermindert in CD8 ⁺		erhöht in CD8 ⁺	
	Cy5	Cy3	Cy2			#	%	#	%
1	CD4 ⁺ 1103	CD8 ⁺ 1103	mix	1913	1.50	65	3.4	59	3.1
2	CD4⁺ 2003	CD8⁺ 2003	mix	1937	1.71	86	4.4	46	2.4
3	CD4 ⁺ 3004	CD8 ⁺ 3004	mix	2146	1.53	50	2.3	56	2.6
4	CD4 ⁺ 1704	CD8 ⁺ 1704	mix	1775	1.62	48	2.7	80	4.5
Durchschnitt:				1943	1.59	62	3.2	60	3.2

In einem nächsten Schritt wurden die vier 2D-Gele mit den T-Zellpaaren der vier Spender über den Cy2 markierten internen Standard (Gemisch aus allen Proben) virtuell überlagert. Hierdurch ergab sich eine Anzahl von 1463 Spots, die in allen vier Gelen reproduzierbar ermittelt werden konnten. Anschließend wurden in der so genannten „biologischen Variationsanalyse“ (BVA) spenderspezifische Unterschiede

durch Wahrscheinlichkeitsberechnungen ausgeschlossen. Durch die Verwendung der Varianzanalyse (t-Test) konnten so die Spots identifiziert werden, die bei allen vier Spendern mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ein ähnliches differentielles Profil zeigten. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Änderung des durchschnittlichen Volumenverhältnisses. Hierdurch ergaben sich letztendlich 13 von 1463 Spots, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% in ihrem Volumenverhältnis durchschnittlich um mindestens das 1,5-fache unterschieden.

Tab. 5.4.2: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Spenderunabhängige Unterschiede sind im Falle der Identifizierung mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell Proteomkarte (Abb. 5.4.3 und A2) gezeigt. Als Auswahlkriterien wurden $p < 0,05$ und ein durchschnittliches Volumenverhältnis $> 1,5$ bzw. $< -1,5$ angelegt.

Nr.	Spot ID	t-Test	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	305	0.00022	2.07	syntaxin binding protein 1 (Munc18-1)
2	ni	0.03600	1.76	nicht identifiziert
3	706	0.03500	1.67	galectin-3
4	553	0.02800	1.60	adenosine desaminase
5	1081	0.03000	1.59	endophilin-B1
6	1067	0.04000	1.53	vacuolar sorting protein 33A
7	677	0.00200	1.55	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
8	596	0.00150	-1.55	aldose 1-epimerase
9	774	0.00550	-1.56	peroxiredoxin 1
10	ni	0.04200	-1.71	nicht identifiziert
11	738	0.01900	-1.79	cathepsin H
12	ni	0.04000	-1.98	nicht identifiziert
13	691	0.00210	-2.20	cathepsin B

Aus der zuvor erstellten Proteomkarte der Fraktion 2 von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, war es möglich, 10 dieser signifikant differentiellen Spots zu benennen (Tab. 5.4.2). Ein Beispiel für ein verstärkt exprimiertes Protein in sekretorischen Lysosomen von CD8⁺ T-Zellen war das „Syntaxin binding Protein 1“ (Abb. 5.4.5), das auch als Munc18-1 bekannt ist und mit Syntaxin 1 und anderen SNARE Proteinen interagiert, um so bei Andock-, Fusions- und Exozytoseprozessen von Vesikeln mitzuwirken [144]. Neben Munc18-1 (STXBP1) wurden auch Munc18-2 (STXBP2) und Munc18-3 (STXBP3) identifiziert, jedoch war bei diesen Proteinen nur eine Erhöhung des durchschnittlichen Volumenverhältnisses von 1,31 bei Munc18-2 (# 302) bzw. ca. 1,20 bei allen Munc18-3 Isoformen (# 264, 281, 294, 291) festzustellen.

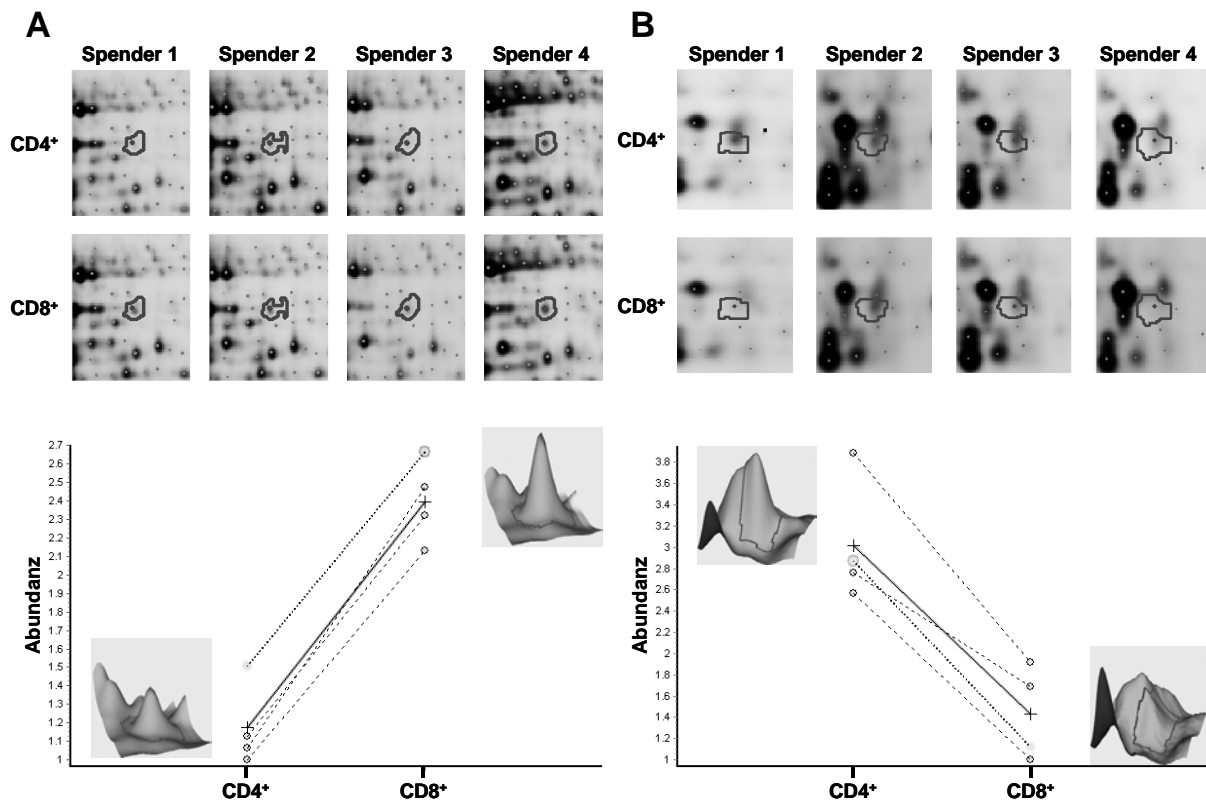


Abb. 5.4.5: Differentielle Expression vom 'Syntaxin binding Proteins 1' (Munc18-1) (A) und 'Cathepsin B' (B). Die biologische Variationsanalyse des Spots 305 (Munc18-1) ergab eine im Mittel 2.07-fache Erhöhung in CD8⁺ Zellen (A). Dagegen ergab die Analyse des Spots 691 (Cathepsin B) eine durchschnittlich 2.20-fache Verminderung in CD8⁺ Zellen (B). Der Gelausschnitt der aufgetrennten Fraktion 2 ist für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus vier verschiedenen Spendern gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und das Mittel dieses Verhältnisses (durchgezogene Linie) wurden in Diagrammen aufgetragen (unten). Zusätzlich ist für Spender 1 auch das umrandete Protein als 3D-Bild für CD4⁺ (links) und CD8⁺ (rechts) T-Zellen dargestellt.

Auf der anderen Seite wurden auch 6 Proteine ermittelt, die in Granula von CD4⁺ T-Zellen verstärkt vorkamen. Hier wäre als ein Beispiel Cathepsin B (#691) zu nennen. Diese lysosomale Cysteinprotease war in allen vier Spendern durchschnittlich 2,20-fach erhöht (Abb. 5.4.5).

5.4.5 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\nu\delta 1^+$ und $\nu\delta 2^+$ T-Zellen

Im Gegensatz zu den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, standen hier aufgrund der schwierigeren *in vitro* Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen nur zwei Zellpaare in ausreichender Zellzahl für DIGE Versuche zur Verfügung. Die Lysate der Granula von $\nu\delta 1^+$ und $\nu\delta 2^+$ T-Zellen der beiden Spender wurden wie in Tabelle 5.4.3 dargestellt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zwei-dimensional aufgetrennt. Hierbei diente das Gemisch aller Proben wiederum als interner Standard. In beiden

Gelen wurden durchschnittlich 1655 Spots analysiert, die eine 2-fache Standardabweichung der mittleren Volumenverhältnisse von 2,32 aufwiesen.

Tab. 5.4.3: Experimentdesign für den Vergleich von SL aus $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ T-Zellen.

Spender Nr.	CyDye Markierung			Spots	2x SD	vermindert in $v\delta 2^+$		erhöht in $v\delta 2^+$	
	Cy5	Cy3	Cy2			#	%	#	%
1	$v\delta 1$	$v\delta 2$	mix	1703	2.33	45	2.6	101	5.9
2	$v\delta 2$	$v\delta 1$	mix	1607	2.31	68	4.2	75	4.7
Durchschnitt:				1655	2.32	57	3.4	88	5.3

Aufgrund der geringen Anzahl an biologischen Replika fehlte im Prinzip die ausreichende statistische Grundlage für die anschließende biologische Varianzanalyse (BVA). Dennoch wurde sie analog zu den $\alpha\beta$ T-Zellen durchgeführt. Der Grenzbereich wurde hierbei auf 2,5 gesetzt, da innerhalb einer Gruppe bereits eine durchschnittliche Varianz im Volumenverhältnis von 2,32 bestand. Zwischen den Gruppen wurde wiederum eine Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5% ($p < 0,05$) angenommen.

Tab. 5.4.4: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ T-Zellen. „Spenderunabhängige“ Unterschiede sind mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell Proteomkarte gezeigt, sofern sie identifiziert wurden. Als Auswahlkriterien wurden $p < 0,05$ und ein Volumenverhältnis $> 2,5$ bzw. $< -2,5$ verwendet.

Nr.	Spot ID	t-Test	$v\delta 2^+/v\delta 1^+$ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	717	0.00041	6.43	granzyme A
2	692	0.01700	5.85	proteasome activator subunit 2
3	707	0.00540	4.99	granzyme A
4	717	0.00140	4.81	granzyme A
5	ni	0.03000	4.36	nicht identifiziert
6	710	0.01800	3.98	proteasome activator reg (alpha)
7	691	0.04700	3.95	cathepsin B
8	ni	0.03400	3.72	nicht identifiziert
9	738	0.00600	3.51	cathepsin H
10	81	0.04900	3.20	dipeptidyl peptidase 4
11	130	0.02100	3.20	MTHFD1
12	83	0.02800	3.08	dipeptidyl peptidase 4
13	605	0.00050	2.93	calcium-binding protein 39 (MO25)
14	69*	0.02000	2.92	uncharakterisiertes Protein DKFZp547A1913
15	77	0.03800	2.85	dipeptidyl peptidase 4
16	ni	0.03100	2.53	nicht identifiziert
17	ni	0.01700	2.51	nicht identifiziert

Nr.	Spot ID	t-Test	$v\delta 2^+/v\delta 1^+$ Volumen- verhältnis	Protein Name
18	250	0.01500	-2.53	moesin
19	694	0.00260	-2.53	nuclear chlorid channel
20	829	0.00300	-2.54	cyclophilin A
21	163	0.02800	-2.55	moesin
22	237	0.02300	-2.60	moesin
23	246	0.00530	-2.66	moesin
24	ni	0.01100	-2.81	nicht identifiziert
25	389*	0.02900	-2.85	annexin A11
26	895*	0.00210	-2.92	MHC class I
27	ni	0.03900	-2.95	nicht identifiziert
28	ni	0.04700	-2.96	nicht identifiziert
29	342	0.01200	-3.22	EH-domain containing 1
30	684	0.02900	-3.31	nuclear chlorid channel
31	572	0.03200	-4.27	gelsolin like capping protein (CapG)

* keine Mastergelnummern, da separate Identifikationen aus „ $\gamma\delta$ Gelen“ (siehe Tab. A4, Gel 36702)

Von insgesamt 985 Spots, die in beiden Gelen anhand des internen Standards übereinander gelegt werden konnten, wurden 31 Spots mit den oben genannten Kriterien als differentiell angesehen. Hiervon wurden, unter anderem durch die Identifikation von Proteinen aus $\gamma\delta$ 2D-Gelen, 24 Spots identifiziert und wie in der Tabelle 5.4.4 dargestellt, benannt. Als ein Beispiel für eine verstärkte Expression in $v\delta 2^+$ Zellen ist in Abb. 5.4.6 das zytotoxische Protein Granzym A dargestellt. Auf der anderen Seite ist als Beispiel das „Gelsolin like capping Protein“ (Cap G) in $v\delta 1^+$ T-Zellen um das 4,27-fache Spotvolumen erhöht. Dieses Kalzium-sensitive Protein kann die Enden der Aktinfilamente blockieren und so potentielle Interaktionen zellulärer Strukturen mit Aktin regulieren [145]. Neben einer beschriebenen zytosolischen und nukleären Lokalisation wurde dieses Protein auch in gereinigten Melanosomen identifiziert [146].

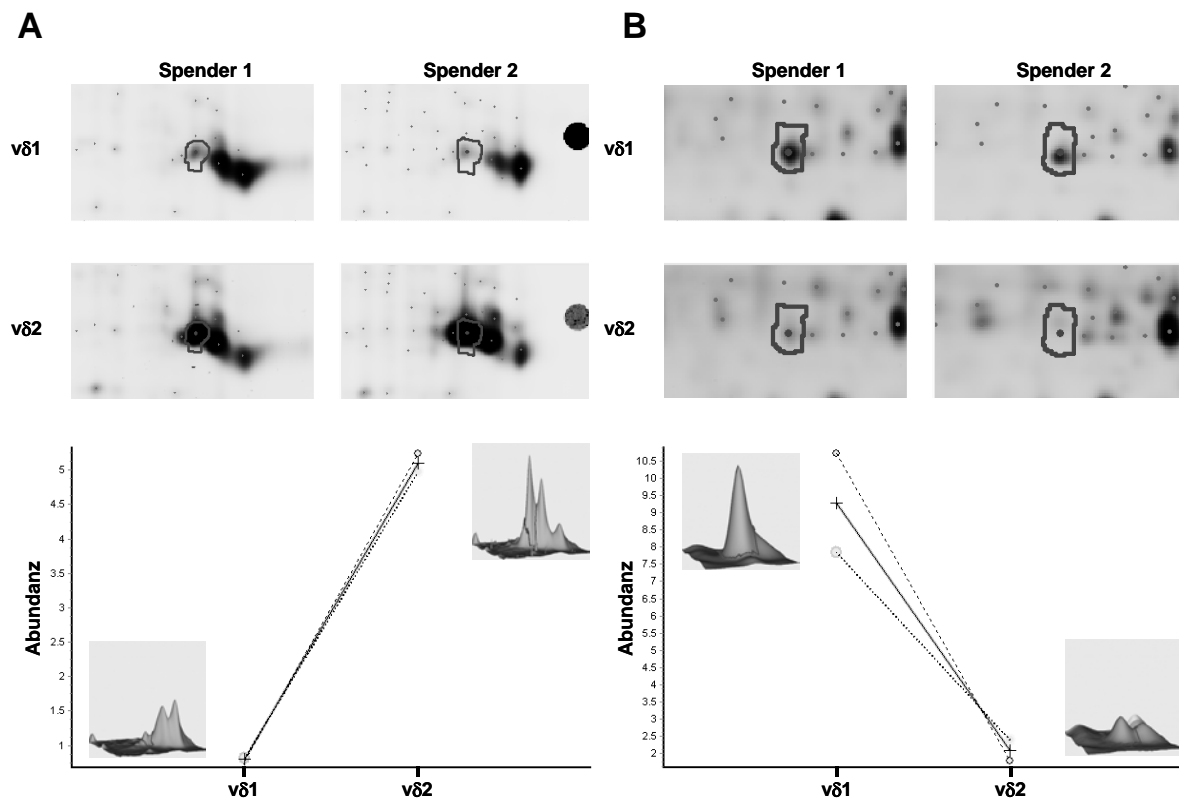


Abb. 5.4.6: 2D-DIGE Analyse von Granzym A (A) und „Gelsolin like capping Proteins (CapG)“ (B). (A) Die biologische Variationsanalyse des Spots 717 der Fraktion 2 ergab durchschnittlich eine 6,63-fache Erhöhung in $v\delta 2^+$ T-Zellen. (B) Für CapG (Spot 572) ergab diese Analyse eine Verminderung um das 4,27-fache. Der Gelausschnitt ist jeweils für $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ Zellen aus zwei verschiedenen Spendern gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und deren arithmetische Mittel (durchgezogene Linie) wurden in einem Diagramm aufgetragen (unten). Zusätzlich ist für Spender 1 auch das umrandete Protein als 3D-Bild für $v\delta 1^+$ (links) und $v\delta 2^+$ (rechts) T-Zellen dargestellt.

5.4.6 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

In abschließenden DIGE Experimenten wurden auch die Granula der $\gamma\delta$ Zellpopulation $v\delta 1$ mit den Granula der $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen verglichen. Die in Tabelle 5.4.5 dargestellte Übersicht verdeutlicht den experimentellen Aufbau der DIGE Analyse.

Tab. 5.4.5: Experimentdesign für den Vergleich von SL aus $v\delta 1^+$ und $\alpha\beta$ T-Zellen.

Exp. Nr.	CyDye Markierung			Spots	2x SD	vermindert in $v\delta 1$		erhöht in $v\delta 1$	
	Cy5	Cy3	Cy2			#	%	#	%
1	$v\delta 1$	$CD8^+$	mix	1637	3.00	60	3.7	129	7.9
2	$CD4^+$	$v\delta 1$	mix	1768	2.37	41	2.3	141	8.0
Durchschnitt:				1703	2.68	51	3.0	135	8.0

In beiden Experimenten war der Anteil der verstärkt exprimierten Proteine in der $\gamma\delta$ Subpopulation deutlich höher. Da die bereits gezeigten Unterschiede von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellgranula gegenüber den hier analysierten verschwindend gering waren, wurde auch eine Varianzanalyse der beiden Gruppen ($\alpha\beta$ und $\gamma\delta$) durchgeführt (Tab. 5.4.6).

Tab. 5.4.6: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen. Experimentell unabhängige Unterschiede sind mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell Proteomkarte aufgeführt, sofern sie identifiziert wurden. Als Auswahlkriterien wurden $p < 0,05$ und ein Volumenverhältnis $> 3,5$ bzw. $< -3,5$ angelegt.

Nr.	Spot ID	t-Test	$\gamma\delta/\alpha\beta$ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	ni	0.01300	6.62	granzyme B*
2	720	0.04600	6.32	granzyme A
3	77 ³	0.01100	4.59	hypoxia up-regulated 1
4	76 ³	0.00780	4.59	hypoxia up-regulated 1
5	717	0.04800	4.55	granzyme A
6	837	0.00220	4.53	Interleukin-25
7	853 ²	0.00040	4.51	protein ARMET
8	749	0.01500	4.48	cathepsin S
9	226	0.00940	4.44	heat shock 70kDa protein 5
10	223	0.01500	4.42	heat shock 70kDa protein 5
11	561 ³	0.01900	4.31	protein disulfide isomerase-related protein 5
12	633	0.02100	4.28	heat shock 70kDa protein 5
13	775	0.01100	4.25	proteasome subunit beta type 2
14	194	0.01400	4.20	hexose-6-phosphate dehydrogenase
15	287	0.02200	4.05	calreticulin precursor variant
16	458	0.04300	3.94	protein disulfide isomerase-related protein 5
17	431	0.00087	3.82	beta-hexosaminidase subunit beta
18	312	0.03700	3.91	ERO1-like
19	136	0.03500	3.90	ARTS-1
20	118	0.01200	3.89	tumor rejection antigen (gp96)
21	684 ²	0.03600	3.88	MHC class II
22	ni	0.02100	3.79	nicht identifiziert
23	385	0.03600	3.78	protein disulfide isomerase-associated 3
24	379	0.03000	3.74	protein disulfide isomerase family A member 3
25	226	0.01900	3.72	heat shock 70kDa protein 5
26	133	0.03000	3.52	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
27	689 ²	0.00088	3.51	MHC class II
28	313	0.01300	-3.56	dihydropyrimidinase-like 2
29	406	0.00680	-3.76	CAP, adenylate cyclase associated protein 1
30	1020	0.02400	-4.23	DK1 lymphocyte antigen
31	820	0.00460	-4.72	stathmin1/oncoprotein 18

* Annotierung anhand der Proteome der Fraktion 6 und der NK-Zellen

² Identifikation aus $\gamma\delta$ 2D Gel Nr. 36696, siehe Tab. A4 im Anhang

³ Identifikation aus $\gamma\delta$ 2D Gel Nr. 36703, siehe Tab. A4 im Anhang

Von 1170 übereinander gelagerten Spots waren 31 mit einer durchschnittlichen Änderung im Volumenverhältnis von mehr als 3,5-fach differentiell. Davon wurden 29 Spots identifiziert. Ähnlich wie bei den DIGE Analysen der $v\delta 1$, $v\delta 2$ Proben, wurden hier 6 Proteine nur in „ $\gamma\delta$ 2D-Gelen“ identifiziert, was auf eine niedrige Abundanz (unter der Nachweisgrenze des MALDI) der hier aufgelisteten Proteine in $\alpha\beta$ T-Zellen hinweist.

Aufgrund der niedrigen Proteinmenge von Granzym B in der Fraktion 2 von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen konnte nur eine Annotierung anhand der exklusiven Spotposition durch Identifikationen in den NK-Zell-Gelen und in der Fraktion 6 (siehe Kapitel 5.5.5) vorgenommen werden. Wie Granzym B wies auch Granzym A eine über 6-fach höhere Abundanz in $v\delta 1^+$ T-Zellen auf (Abb. 5.4.7). Im Gegensatz dazu war die Expression von Stathmin 1 in Granula aus $v\delta 1^+$ T-Zellen deutlich erniedrigt. Zytosolisches Stathmin 1 reguliert das Mikrotubuli-Filamentsystem, indem es die Mikrotubuli destabilisiert [147].

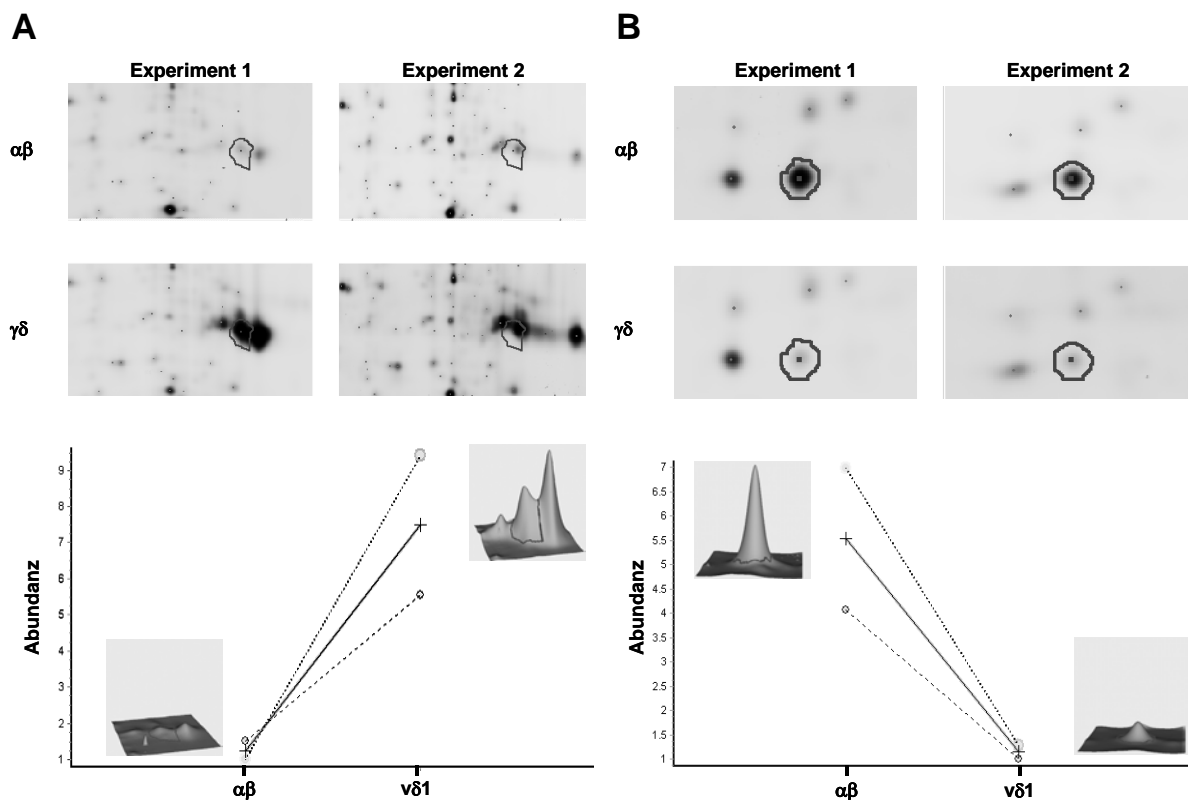


Abb. 5.4.7: DIGE Analyse von Granzym A (A) und Stathmin1/Oncoprotein 18 (B). Die BVA Analyse des Spots 720 ergab eine durchschnittliche Erhöhung von 6,32 in $\gamma\delta$ T-Zellen (A). Demgegenüber war der Spot 820 um das 4,72-fache im Spotvolumen der $\gamma\delta$ T-Zellen vermindert (B). Der Gelausschnitt ist für $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ Zellen von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und deren arithmetische Mittel (durchgezogene Linie) wurden in einem Diagramm aufgetragen (unten). Zusätzlich ist das in Experiment 1 umrandete Protein als 3D-Bild für $\alpha\beta$ (links) und $\gamma\delta$ (rechts) T-Zellen dargestellt.

5.5 Heterogenität sekretorischer Granula in T-Zellen

5.5.1 Zytotoxische Proteine werden in unterschiedlich dichten Granula gespeichert

Die Charakterisierung der Fraktionen aus den initialen Experimenten mit PHA-Blasten deutete auf eine unterschiedliche Verteilung der zytotoxischen Proteine in verschieden dichten Granula hin. Ebenfalls zeigten die in Abb. 5.4.2 dargestellten Western Blot Analysen der einzelnen Fraktionen bei den für 16 Tage expandierten T-Zellsubpopulationen auch eine unerwartete Verteilung von Granzym B gegenüber FasL. Gleichzeitig wurde in CD8⁺ T-Zellen eine breitere Verteilung von Perforin in verschiedenen Fraktionen festgestellt. Diese Heterogenität wurde nachfolgend mit einem zusätzlichen lytischen Markerprotein (Granulysin) in verschiedenen Subpopulationen verifiziert (Abb. 5.5.1). Dabei wurde eine Anreicherung des reifen Granulysins (9 kDa Form) in der Fraktion 6 und eine Dominanz der unprozessierten Form (15 kDa) in der Fraktion 2 sowohl für $\alpha\beta$, als auch $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt. Dieser Befund deutete darauf hin, dass Lymphozyten nicht nur eine homogene Population sekretorischer Granula beinhalten.

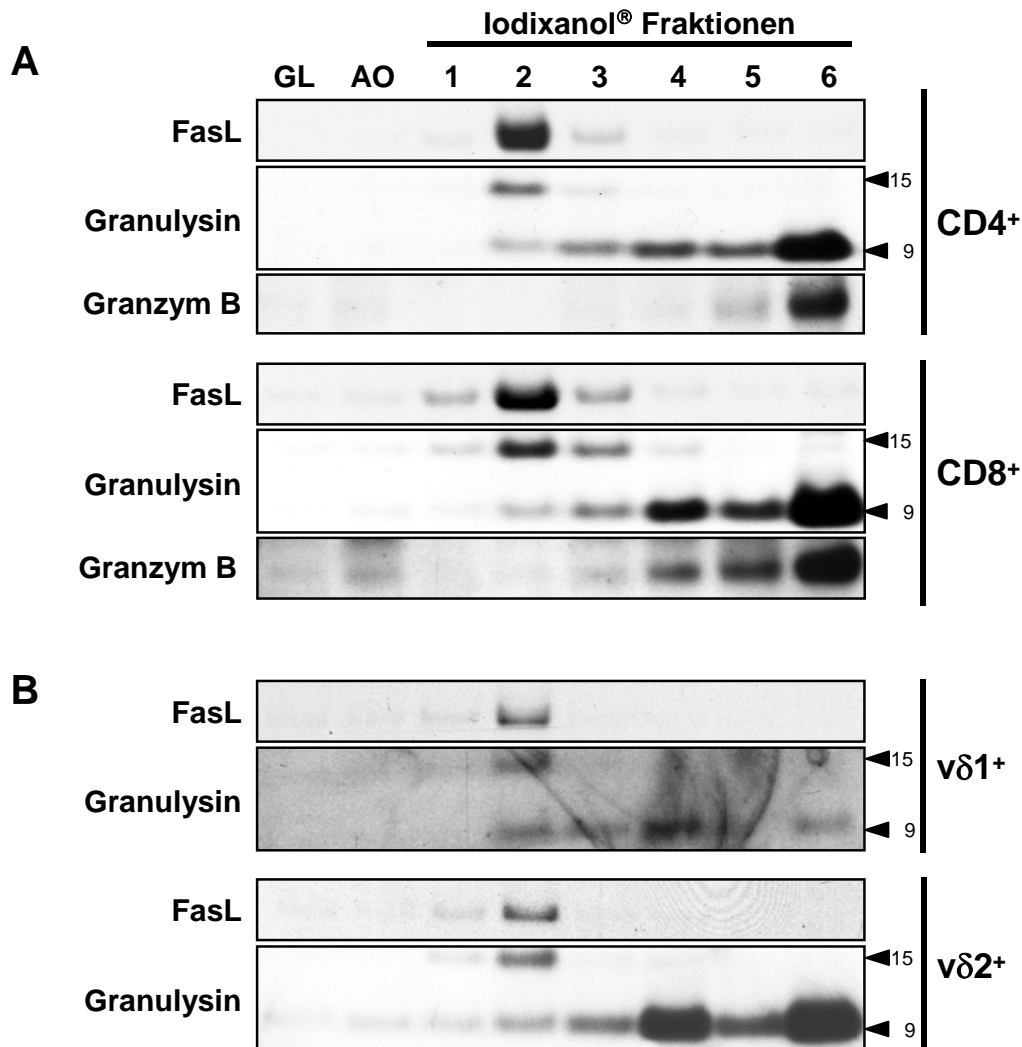


Abb. 5.5.1: Verteilung zytotoxischer Proteine in unterschiedlichen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. CD4⁺, CD8⁺ (A) und vδ1⁺, vδ2⁺ (B) T-Zellsubpopulationen wurden nach 16-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert und je 4 µg Protein jeder Fraktion auf Gradientengelen separiert. Die immunbiochemische Detektion erfolgte mit spezifischen mAk gegen FasL und Granzym B (nur in A). Die Detektion von Granulysin erfolgte mit polyklonalem Serum und anschließender Färbung durch HRP-konjugierten anti-Ziege Antikörper. GL=Gesamtlysat, AO=angereicherte Organellen

Zusammenfassend ließ sich so aus den Western Blot Analysen von PHA-Blasten und separierten T-Zellsubpopulationen ableiten, dass die FasL-reichen Vesikel selektiv in der Fraktion 2 des Gradienten angereichert waren. Dort wurde auch eine Anreicherung von CD63, LAMP-1, der 15 kDa Form von Granulysin und in einigen Subpopulationen von Perforin ermittelt. Im Gegensatz dazu waren Granzym B, die 9 kDa Form von Granulysin und bei CD8⁺ T-Zellen auch Perforin in der dichteren Fraktion 6 angereichert. Da sekretorische Lysosomen multivesikuläre Strukturen darstellen, sollte im Folgenden elektronenmikroskopisch überprüft werden, ob in beiden Fraktionen intakte Vesikel nachweisbar waren, die sich möglicherweise in ihrer Dichte unterscheiden.

5.5.2 Elektronenmikroskopische Analysen angereicherter Granula

Die über Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Granula von 13 Tage alten PHA-Blasten wurden sedimentiert, mit 2,5%-igem Glutaraldehyd fixiert und elektronenmikroskopisch am Institut für Anatomie (CAU Kiel) analysiert. Repräsentative Aufnahmen der FasL / CD63-reichen Fraktion 2 sind in Abb. 5.5.2 A und B, die der Fraktion 6 in Abb. 5.5.2 C und D dargestellt. Die Strukturen in beiden Fraktionen unterschieden sich deutlich in Größe, Struktur und Elektronendichte. Während die Organellen der Fraktion 2 mindestens 300-700 nm im Durchmesser aufwiesen, zeigten die Organellen aus der Fraktion 6 eine Größe von 150-300 nm. In der Vergrößerung (Abb. 5.5.2 B, D) ist bei beiden Organellen eine deutliche Membranabgrenzung erkennbar. Des Weiteren war in den Granzym B beladenen Vesikeln der Fraktion 6 ein polarisierter Bereich zu beobachten, der sich im Vergleich zum Rest der Vesikel durch eine geringe Elektronendichte auszeichnete. Dies konnte bei fast allen analysierten Vesikeln der Fraktion 6 beobachtet werden (Abb. 5.5.2 E).

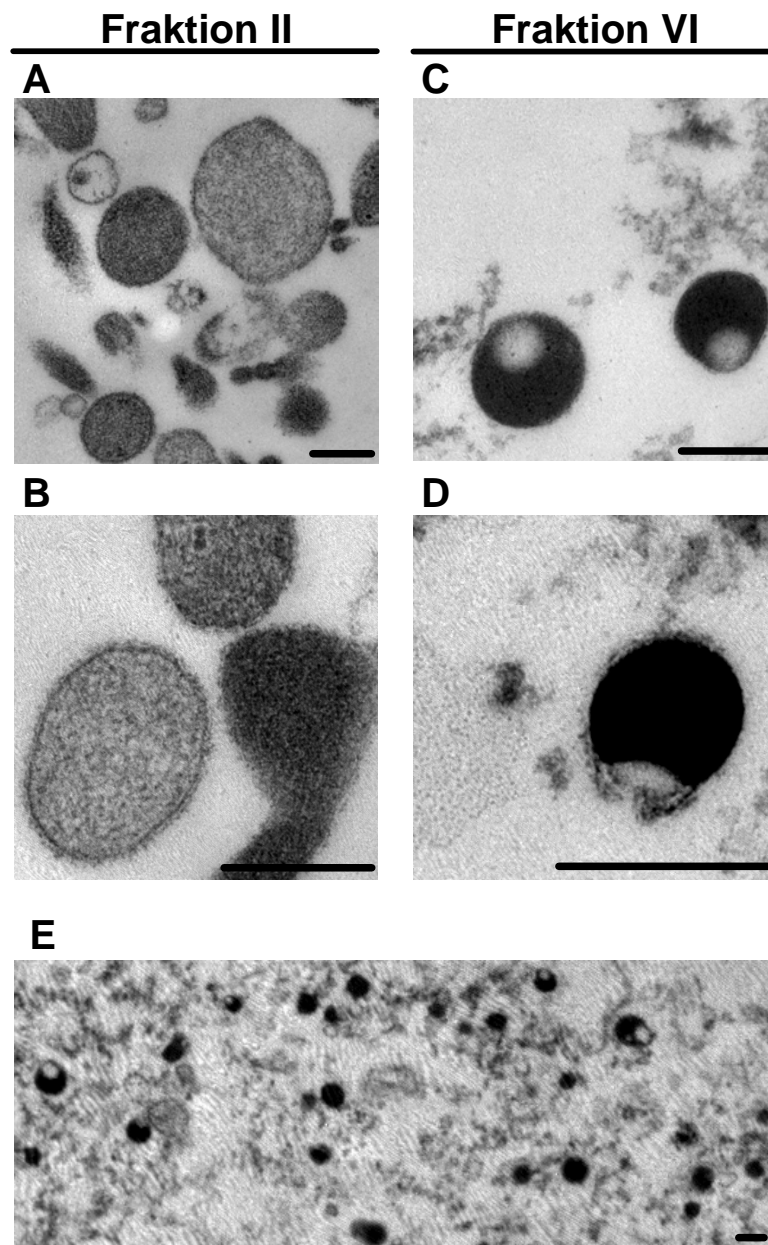


Abb. 5.5.2.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Fraktion 2 (A,B) und 6 (C,D) aus 13 Tage alten PHA-Blasten. Die Organellen wurden in 2,5%-iger Glutaraldehydlösung in Homogenisationspuffer fixiert, in Araldit eingebettet und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. B und D zeigen vergrößerte Darstellungen repräsentativer Organellen der individuellen Fraktionen. Ein zusätzliches Übersichtsbild zu Fraktion 6 ist in Abb. E gezeigt. Der Maßstab entspricht jeweils 250 nm.

5.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Granulaspezifischen Markern

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob sich die Unterschiede im Proteinbesatz der lytischen Granula auch fluoreszenzmikroskopisch darstellen lassen. Hierfür wurden expandierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Subpopulationen Granzym A, Granzym B und Granulysin im selben Kompartiment lokalisieren (Abb.

5.5.3 A). Das polyklonale anti-Granulysin Antiserum erkennt sowohl die reife, als auch die unreife Form des Granulysins. Allerdings ist bei den Aufnahmen davon auszugehen, dass vorwiegend die reife Form erkannt wird, da diese auch im Western Blot der Gradientenfractionen das stärkste Signal ergab.

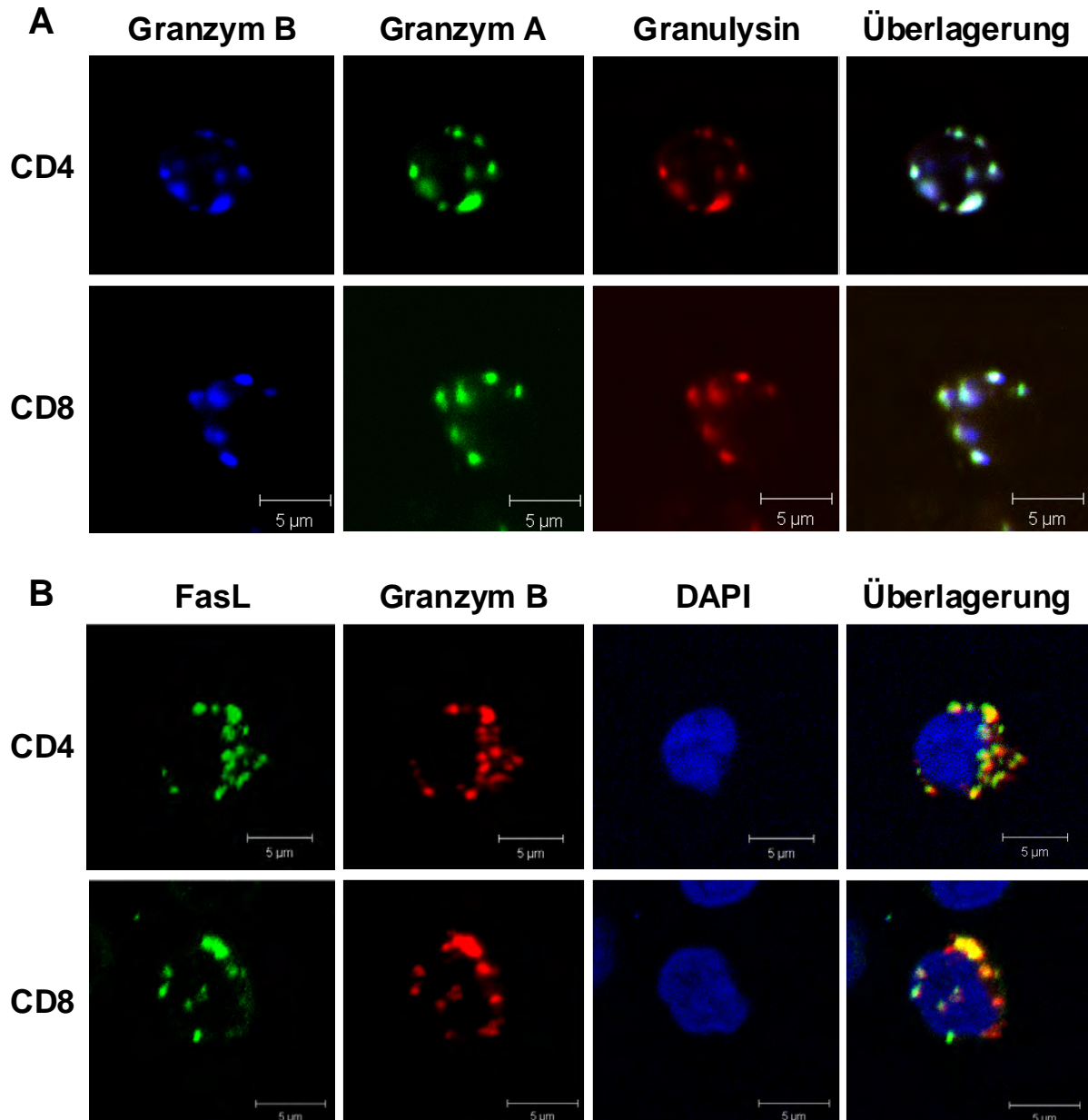


Abb. 5.5.3: Immunfluoreszenz Analyse expandierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Alle Zellen wurden zunächst fixiert und permeabilisiert. **(A)** Die beiden Subpopulationen wurden sequentiell mit anti-Granulysin und anti-Ziege Alexa Fluor 555 und mit FITC markiertem anti-Granzym A mAk und Alexa Fluor 647 markiertem anti-Granzym B mAk gefärbt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen intensiv gewaschen. **(B)** Die Zellen wurden zunächst mit anti-FasL mAk und anti-Maus Alexa Fluor 488 gefärbt. Nach mehreren Waschschrinen erfolgte dann die Färbung mit Alexa Fluor 647 markiertem anti-Granzym B mAk. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert.

Anhand der Western Blot Ergebnisse wäre keine Kollokalisierung von Granzym B und FasL zu erwarten gewesen. Jedoch zeigten die LSM Aufnahmen (Abb. 5.5.3 B) eine partielle Kollokalisierung. Die Ursache hierfür könnte in der fehlenden Auflösung dieser feinen Strukturen liegen.

5.5.4 Unterschiede im Proteom FasL- und Granzym B-reicher Granula

FasL- und Granzym B-reiche Organellen unterscheiden sich in Struktur, Größe, Dichte und Proteinbesatz einiger zytotoxischer Proteine. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich diese Unterschiede auch im Gesamtproteinbesatz darstellen lassen. Hierfür wurden PBMZ mit PHA stimuliert und über 14 Tage in IL-2-haltigem Medium expandiert. Nach Separation der beiden zu untersuchenden Organellenfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation, wurden diese sedimentiert und in 2D-Lysepuffer aufgenommen. Anschließend erfolgten die Markierung der Lysate mit Cy5 bzw. Cy3 und eine Separation mittels 2D-PAGE. Das Scannen der einzelnen Fluoreszenzkanäle ergab das in Abb. 5.5.4 A dargestellte Bild. Im dazugehörigen Diagramm (Abb. 5.5.5) ist deutlich zu erkennen, dass sich die Proteinzusammensetzung der beiden Fraktionen signifikant unterscheidet. Eine genauere softwarebasierte (DIA) Analyse ergab, dass von 2029 ermittelten Spots bei einem festgelegten Grenzbereich, des 6-fachen Volumenverhältnisses, 56 Spots verringert und 91 Spots erhöht in der Fraktion 6 vorlagen. Die 2-fache Standardabweichung aller Volumenverhältnisse in den beiden Proben war 4,57 und spiegelte damit auch die enormen Unterschiede im Proteinbesatz der Fraktion 2 und 6 wieder. Da einige Proteine der Fraktion 2 nicht in Fraktion 6 (und umgekehrt) vorhanden waren, wurde für die folgenden Vergleiche zunächst eine Proteomkarte für Fraktion 6 erstellt.

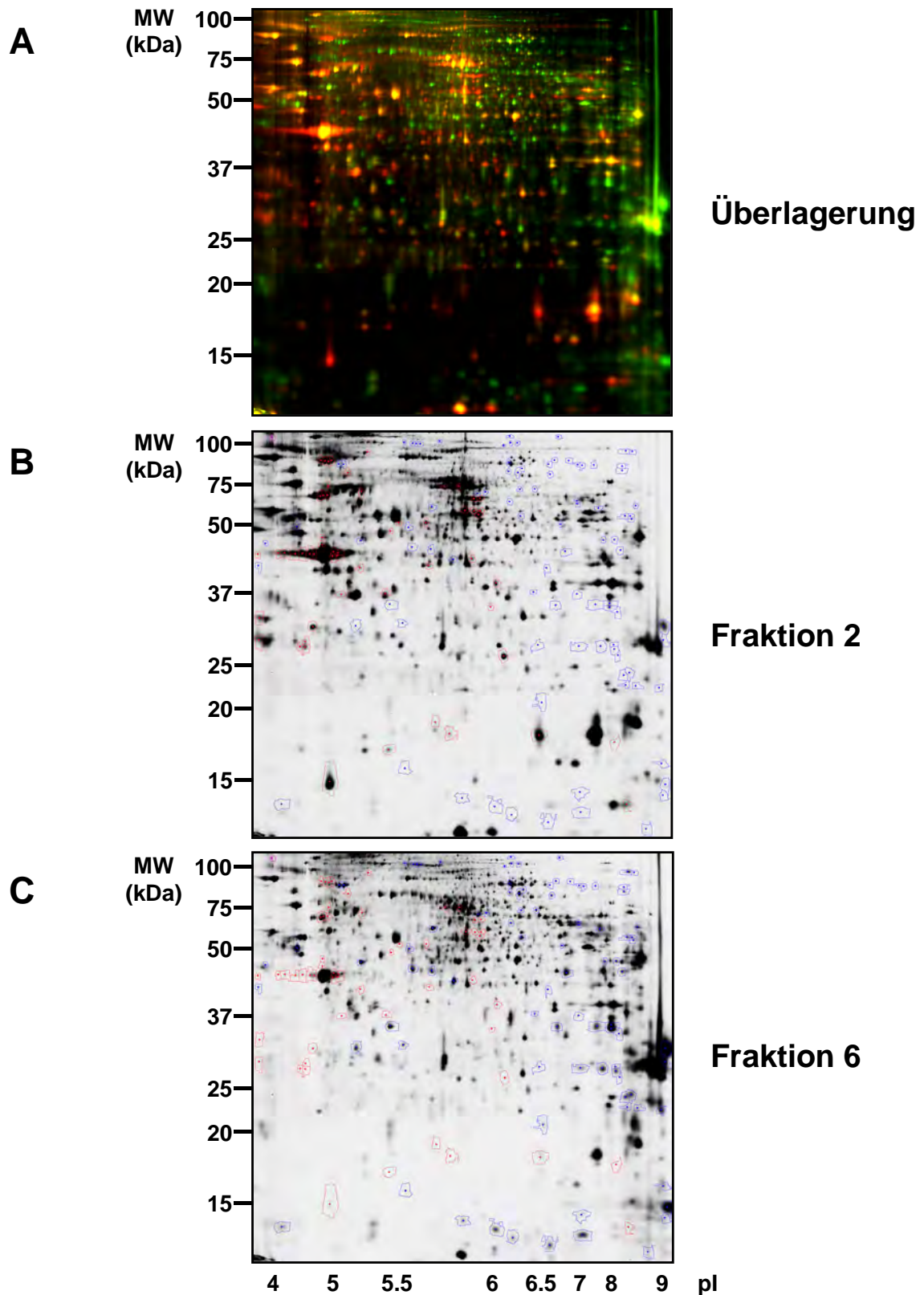


Abb. 5.5.4: 2D-DIGE Analyse der Fraktion 2 und 6 aus PHA-Blasten. Die verschiedenen Organellen wurden wie bereits beschrieben angereichert und anschließend mit CyDye-Farbstoffen markiert. Hierbei wurde Fraktion 2 mit Cy5 (rot in der Überlagerung, **A**) und Fraktion 6 mit Cy3 (grün in der Überlagerung, **A**) gefärbt. Die beiden Fluoreszenzkanäle wurden für Fraktion 2 (**B**) und 6 (**C**) separat als Graustufenbild dargestellt und die differentiellen Spots, die ein Volumenverhältnis >6 und <-6 aufwiesen mit roten (erhöht in Fraktion 2) und blauen (erhöht in Fraktion 6) Umrandungen markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängig durchgeführten.

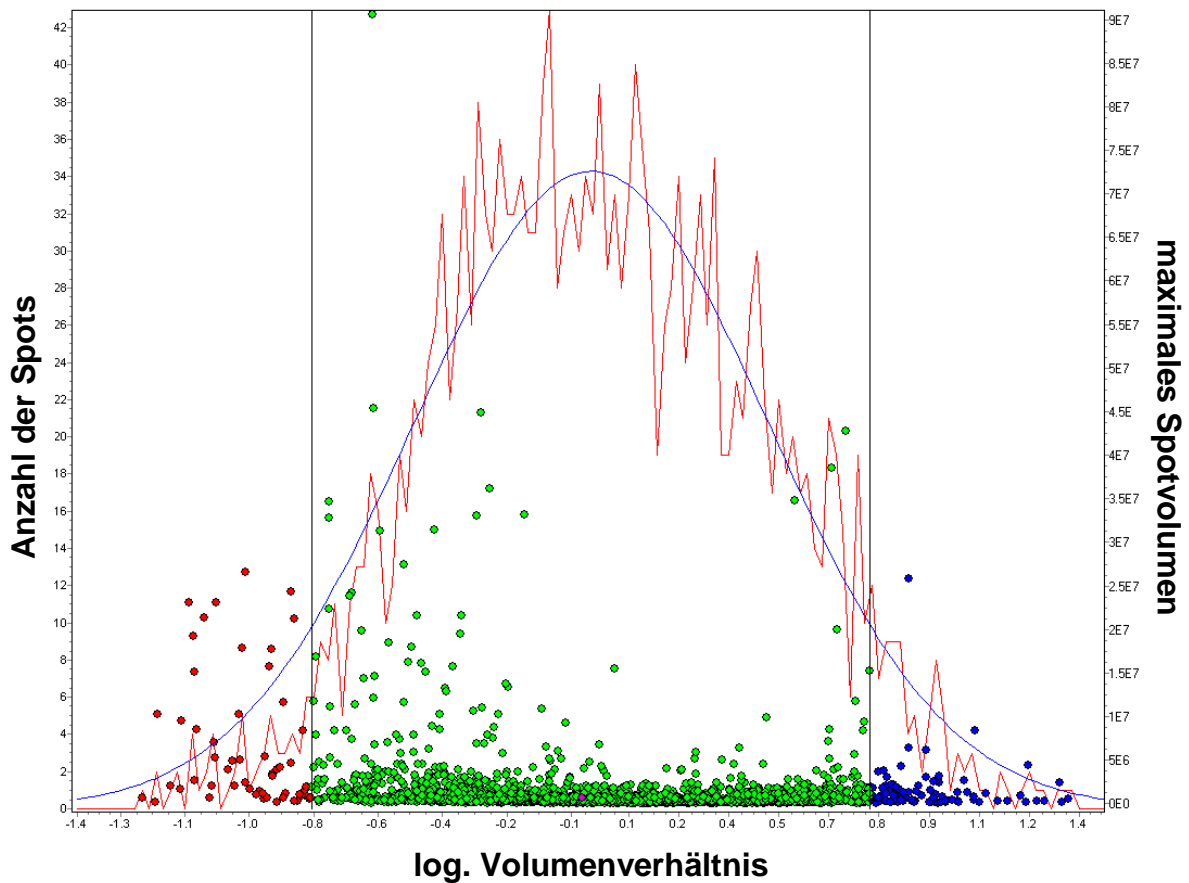


Abb. 5.5.5: Statistische Analyse der Fraktionen 2 und 6. Die in Abb. 5.5.4 dargestellten Unterschiede werden durch das Histogramm wiedergegeben. Die rote Linie spiegelt die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen wieder. Die blaue Linie stellt dabei die Gaußsche Regressionskurve dar. Die Höhe der abgebildeten Punkte gibt das maximale Spotvolumen jedes analysierten Spots wieder. Der Grenzbereich (vertikale Linien) entspricht der 6-fachen Änderung des Volumenverhältnisses. Dadurch stellen sich ähnliche Proteinspots hier als grüne Punkte, verminderte als rote Punkte und erhöhte Volumenverhältnisse als blaue Punkte dar.

5.5.5 Proteom der Fraktion 6

Die Proteomkarte der Fraktion 6 ist in Abb. 5.5.5 dargestellt. Nach Reinigung der Granzym B-reichen Fraktion aus PHA-Blasten und deren Separation auf 2D-Gelen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse einzelner ausgestanzter Spots gelang die Identifizierung von 392 individuellen Spots (siehe auch Tabelle A3). Auch hier reduzierte sich nach Abzug der Proteinisoformen und posttranslationalen Modifikationen die Anzahl auf 253 individuelle Proteine.

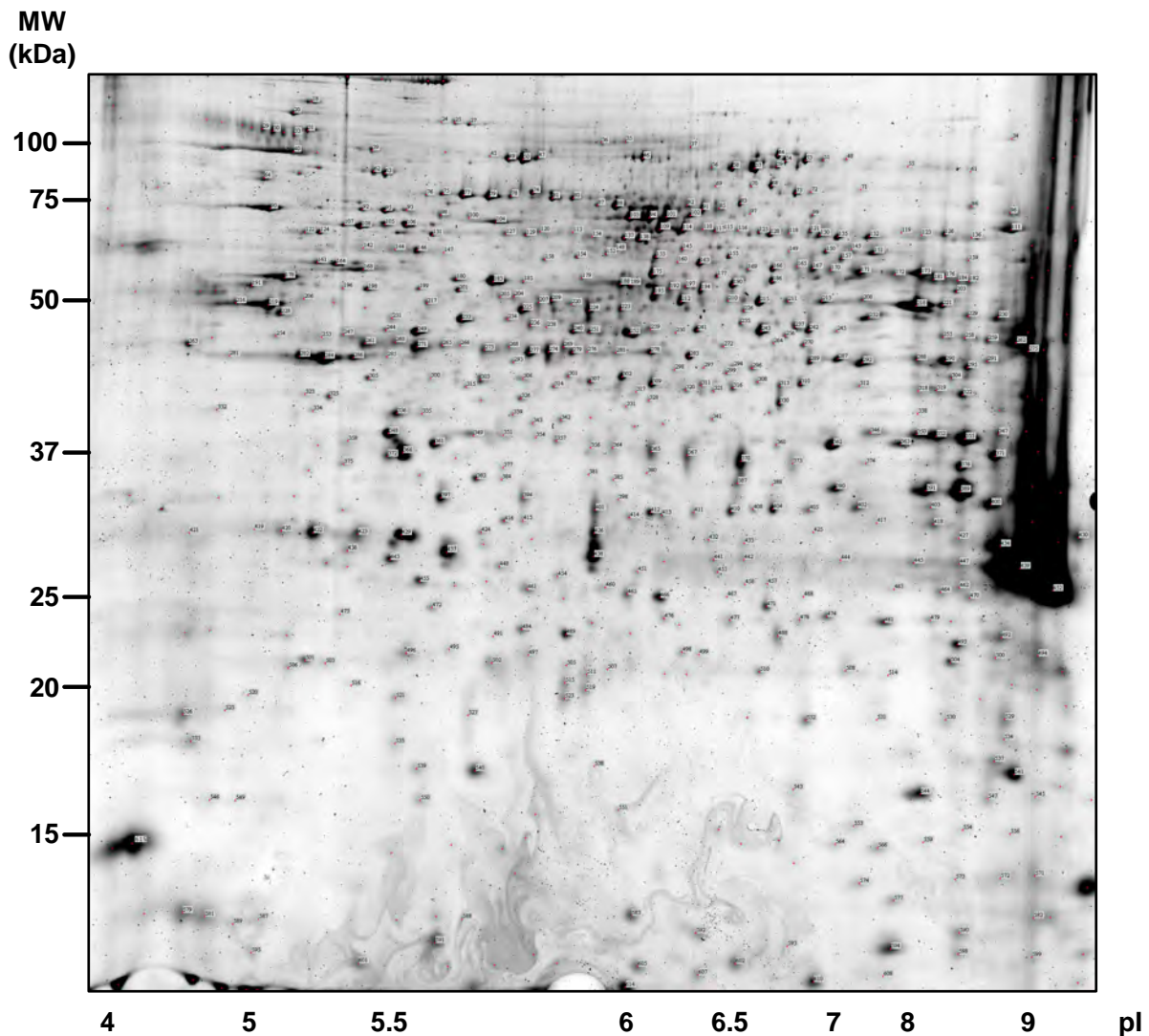


Abb. 5.5.6: Annotierte Proteomkarte der Fraktion 6 nach Dichtegradientenzentrifugation aus PHA-Blasten. Das Proteinlysate wurde auf einem nicht-linearen pH Gradienten von 3-11 über 24 cm aufgetrennt und in der 2. Dimension auf einem 12,5%-igen Polyacrylamidgel separiert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo Pink. Automatisches Picken und semiautomatische, proteolytische Spaltung der Proteine führte zu 392 identifizierten Spots, die in Tabelle A 2 aufgeführt sind.

Von den insgesamt 253 identifizierten Proteinen, ergab die Zuordnung zu den subzellulären Kompartimenten einen Anteil von 14,6% an mitochondrialen Proteinen. Dies ist wahrscheinlich auf die ähnliche Dichte zur mitochondrialen Fraktion 5 im Dichtegradienten zurückzuführen. Des Weiteren gab es Proteine, die gleichermaßen mit lysosomalen / sekretorischen, wie auch mitochondrialen Kompartimenten in Verbindung standen. Diese wurden gesondert aufgeführt und hatten einen Anteil von 7,9% am Gesamtproteom. Erstaunlicherweise wurden dennoch 50% der hier analysierten Proteine bereits in anderen lysosomalen / sekretorischen Kompartimenten gefunden. Hierzu gehörten unter anderem die Proteasen Cathepsin B, D, S und W. Ebenfalls war es möglich, in diesen Fraktionen Granzym B (#430)

und Perforin (#136) zu identifizieren. Wie in der Fraktion 2 konnte auch hier Flotillin 1 (#237,242) als Membrankomponente von Lipid-Rafts identifiziert werden. Dies ist im Einklang mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die ebenfalls Membranstrukturen zeigten.

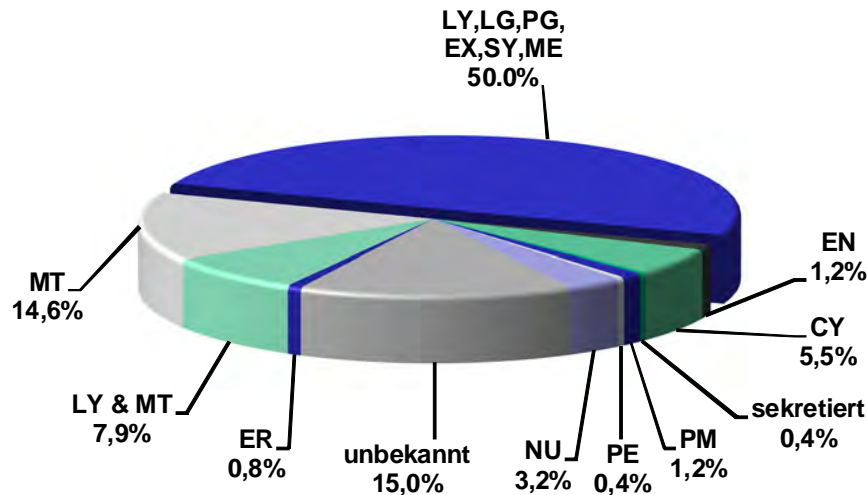


Abb. 5.5.7: Subzelluläre Lokalisation der 253 identifizierten Proteine in der Fraktion 6. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Melanosomen (ME), Lysosomen (LY), Thrombozyten Granula (PG), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lysischen Granula (LG) repräsentiert. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Peroxisomen (PE), Plasmamembran (PM), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

Eine weitere Analyse der Unterschiede der beiden Fraktionen 2 und 6 ist im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation nicht durchgeführt worden. In Abb. 5.5.8 sind einige Beispiele für differentielle Proteine zwischen den beiden Fraktionen abgebildet. Wie bereits erwähnt, gelang erst durch die starke Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6 die Identifizierung dieses Proteins. Weitere verstärkt vorkommende Proteine in der Fraktion 6 waren Granzym A und Cathepsin W.

Die Analyse gab auch Hinweise auf Unterschiede im Hinblick auf die Verknüpfung der verschiedenen Granula mit dem Zytoskelett. Während in der Fraktion 2 ein hohes Vorkommen an Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen (Actinin) auftrat, waren in Fraktion 6 vermehrt Myosin-Isoformen zu finden. Darunter auch Myosin IIA (Myosin 9) welches für die Granzym Sekretion bei NK-Zellen essentiell ist [102].

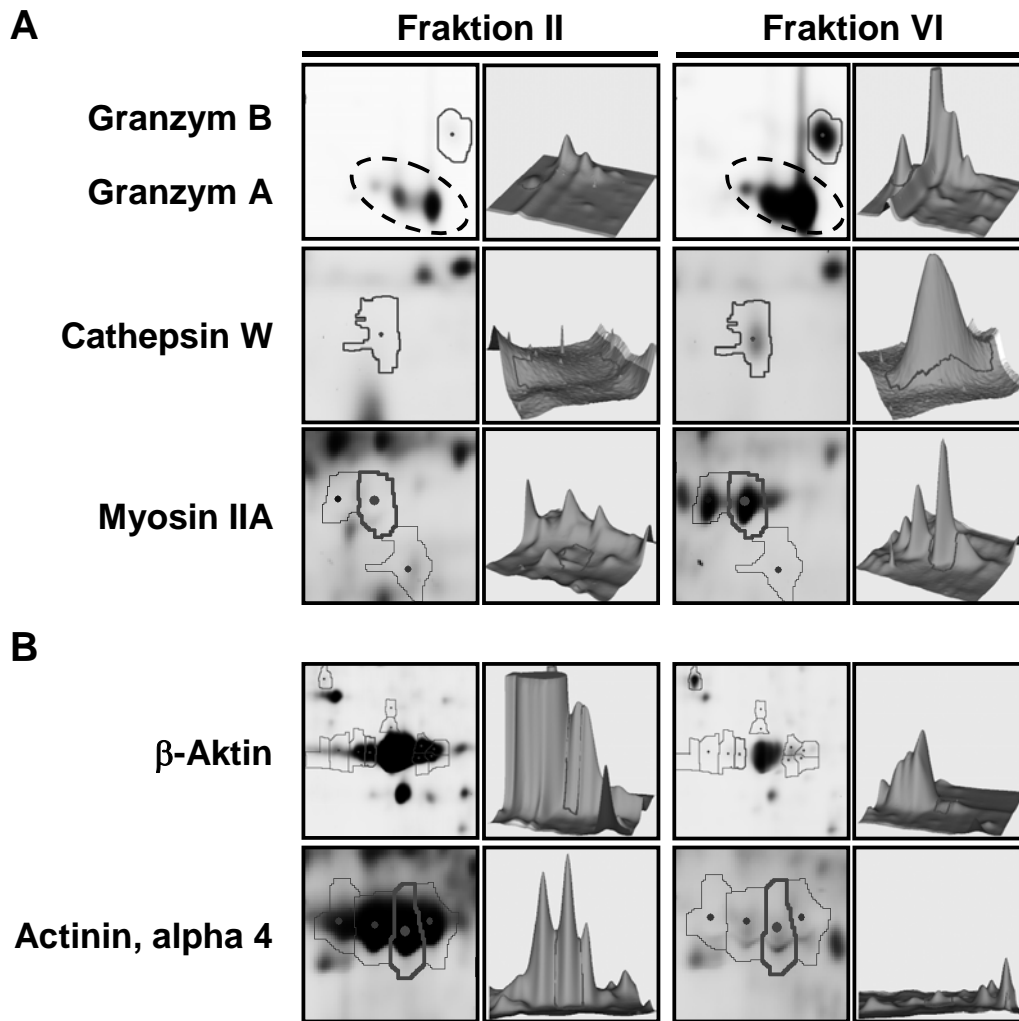


Abb. 5.5.8: Selektierte differentielle Proteine der Fraktionen 2 und 6 aus PHA-Blasten. (A) Granzym B (durchgezogene Linie) zeigte eine Erhöhung im Spotvolumen um das 7,68-fache, ähnlich wie Granzym A (gestrichelte Linie), das 5,13-fach verstärkt war. Cathepsin W wies eine Erhöhung um das 7,03-fache, Myosin IIA um das 9,33-fache Spotvolumen auf. (B) Dagegen war in der Fraktion 6 β -Aktin um das 12,89-fache und Actinin (alpha 4) um das 16,55-fache Spotvolumen vermindert. Die korrespondierenden 3D-Bilder verdeutlichen die Unterschiede im Proteinmuster.

5.6 Reifung lytischer Vesikel

Die Reifung lytischer Vesikel wurde anhand des Expressionsprofils zytotoxischer Markerproteine in Zelllysaten vor und nach PHA Stimulation untersucht. Hierfür wurden zunächst E⁺ Lymphozyten durch Schafererythrozytenrosettierung aus PBMZ isoliert und über 19 Tage durch Stimulation mit einem „Feeder-Cocktail“ *in vitro* expandiert.

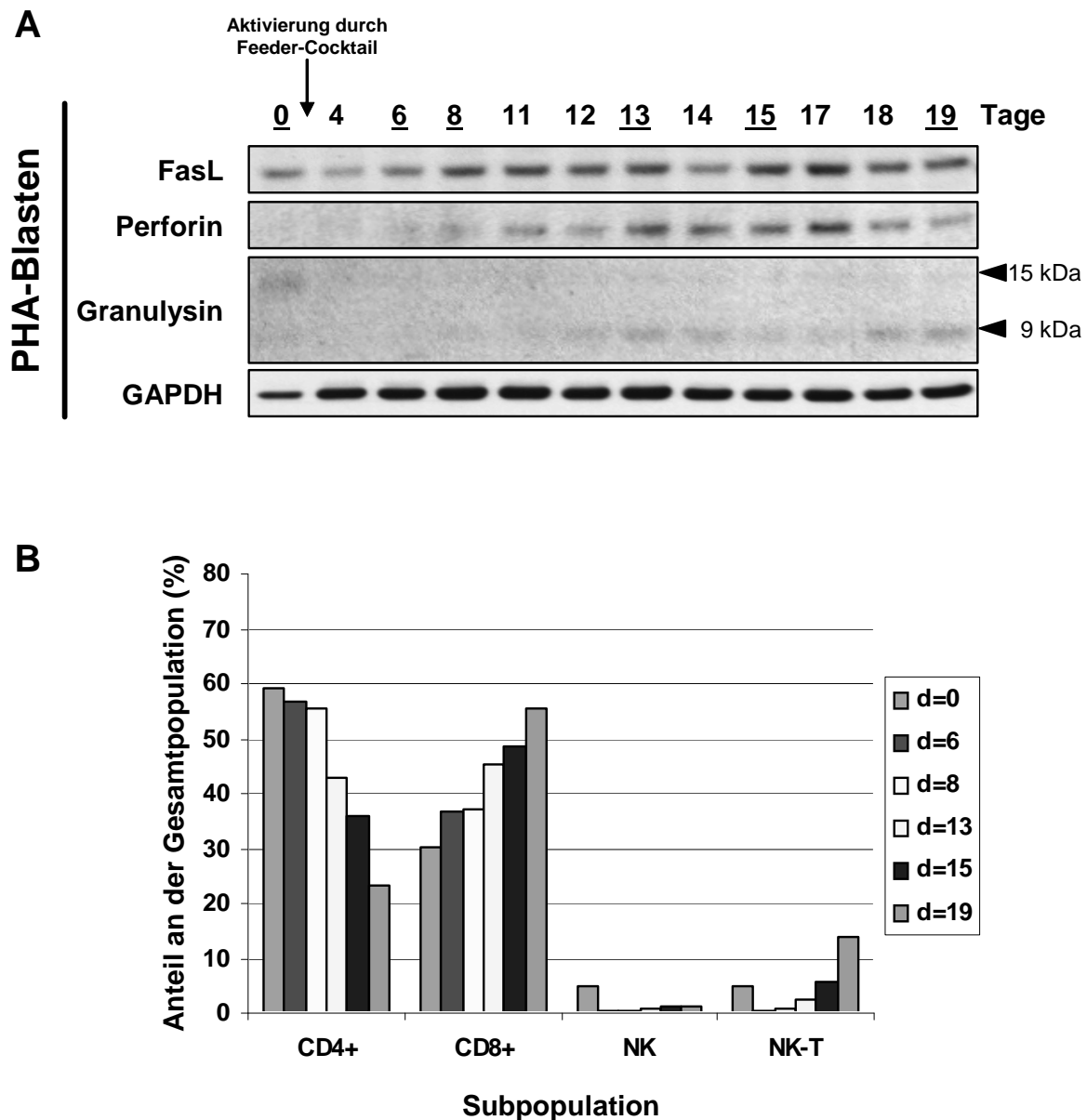


Abb. 5.6.1: Verlauf der Expression zytotoxischer Proteine in isolierten E⁺ Lymphozyten. Die Isolierung von T- und NK-Zellen erfolgte durch Rosettierung mit Schafererythrozyten. Ein Teil der CD2⁺ Lymphozyten wurde vor der Stimulation lysiert. Des Weiteren wurden Lysate an den angegebenen Tagen generiert und auf einem Gradientengel aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde mit anti-FasL, anti-Perforin, anti-Granulysin und als Beladungskontrolle mit anti-GAPDH gefärbt (**A**). Zusätzlich wurde periodisch (an den unterstrichenen Tagen) die Zusammensetzung der gemischten Lymphozytenpopulation mittels FACS bestimmt (**B**). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängig durchgeführten Versuchen.

Im Verlauf der Expansion zeigte sich eine Zunahme von FasL, Perforin und Granulysin. Parallel zur Entnahme von Lysaten aus der Zellkultur, wurden auch zu bestimmten Zeitpunkten Proben für die FACS Analyse entnommen. Hierbei sollte geklärt werden, ob sich das Verhältnis der verschiedenen Lymphozyten-subpopulationen ändert. Eine Zunahme von CD8⁺, NK- und NKT-Zellen und die Verringerung der CD4⁺ Population ließ sich in allen vier durchgeführten Experimenten beobachten. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Zunahme der zytotoxischen Proteine auf eine Reifung der Granula oder auf die Zunahme der Anzahl klassischer zytotoxischer Zellen in der Kultur zurückzuführen war. In der Folge wurden daher in einem nächsten Schritt die Einzelpopulationen innerhalb der E⁺ Lymphozyten untersucht.

5.6.1 Besatz an zytotoxischen Proteinen in Lymphozyten-subpopulationen

Die einzelnen Subpopulationen wurden mittels Negativselektion aus PBMZ isoliert. FACS-Analysen ergaben dabei eine Reinheit von >95% (nicht gezeigt). Die isolierten CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen wurden ebenfalls mit einem „Feeder-Cocktail“ stimuliert, der vor der Probenentnahme an Tag 4 mittels Dichtegradientenzentrifugation weitgehend entfernt wurde. Alle Zellen wurden zu identischen Zeitpunkten isoliert und stimuliert und Proben für Lysate entnommen. Die Expressionsverläufe sind für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 5.6.2 und für NK-Zellen (CD3⁻, CD56⁺) in Abbildung 5.6.3 dargestellt. Bei Betrachtung der Einzelpopulationen zeigte sich nun ein verändertes Bild im Vergleich zu der anfänglich untersuchten Gesamtpopulation (E⁺).

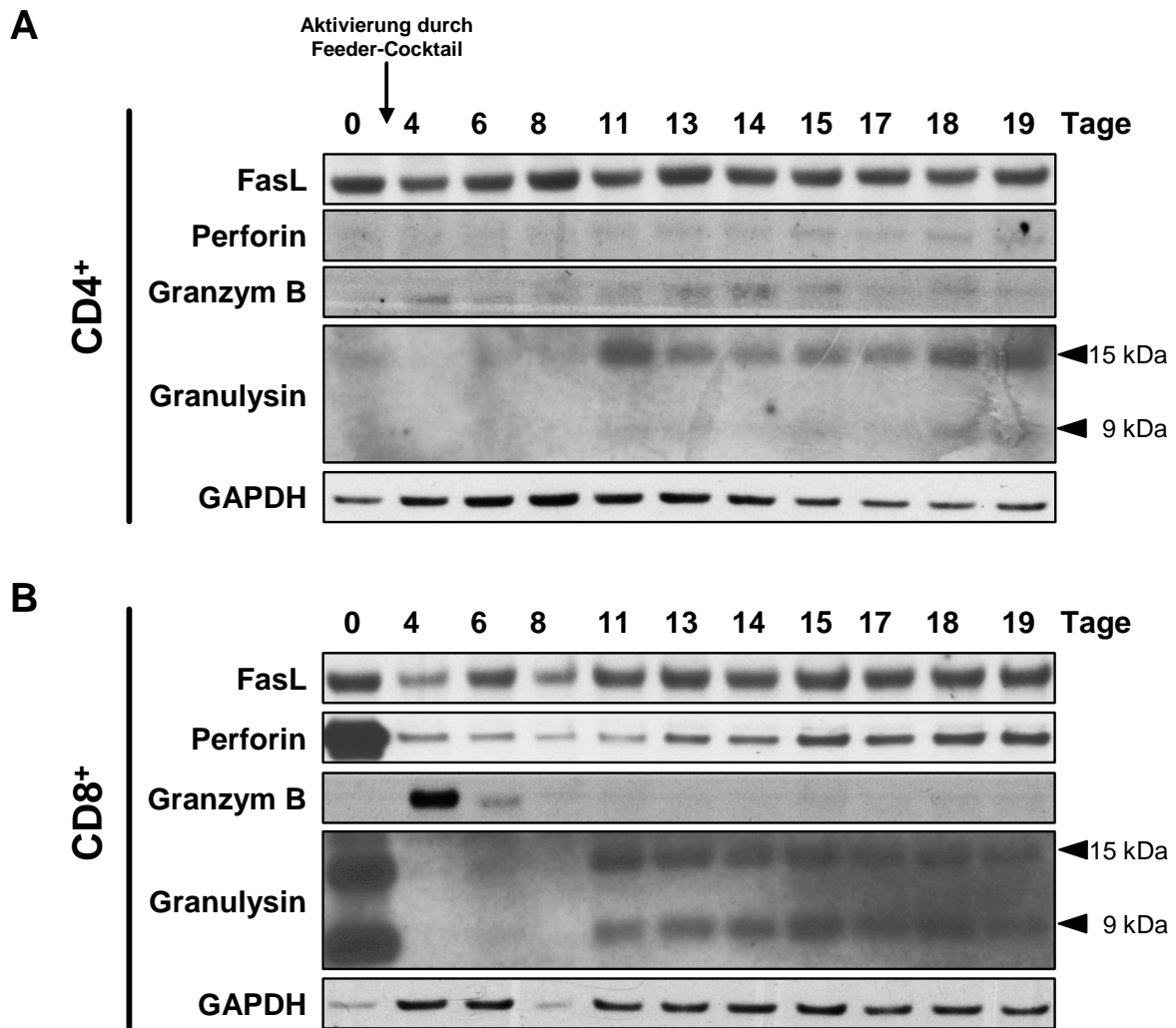


Abb. 5.6.2: Expression zytotoxischer Proteine in CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen. Alle T-Zellsubpopulationen wurden mittels Negativselektion aus PBMZ eines Spenders isoliert. Vor der allogenen Stimulation wurde ein Nullwertlysate hergestellt. Die nächste Entnahme und Lyse von Zellen erfolgte nach Entfernung des „Feeder-Cocktails“ an Tag 4 und periodisch an den angegebenen Tagen nach Isolation. Es wurden je 5 µg Protein des Zelllysats aufgetragen und auf 0,2 µm NC-Membran transferiert. Die antigenspezifische Detektion erfolgte mit anti-FasL mAk (Klon G-247-4), anti-Perforin mAk (Klon B-D48), anti-Granzym B mAk (Klon 2C5/F5) und anti-Granulysin Antiserum. Als Beladungskontrolle diente anti-GAPDH. Es wurden unabhängige Versuche mit je CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus fünf Spendern durchgeführt, wovon hier einer exemplarisch dargestellt ist.

Bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war nur unmittelbar nach der Stimulation (Tag 4) ein Rückgang in der FasL-Expression zu verzeichnen, die sich aber ab Tag 6 wieder auf dem Niveau von frisch isolierten Zellen befand. Die Perforin-Expression zeigte zwischen den beiden T-Zellsubpopulationen deutliche Unterschiede. Sie wies ein hohes Vorkommen in frisch isolierten CD8⁺ T-Zellen auf, das nach Stimulation und damit offensichtlich verbundener Degranulation nicht auf das Anfangsniveau zurückging. Bei CD4⁺ T-Zellen war diese Bande nur schwach ausgeprägt, nahm aber mit der Zeit leicht zu. Auch Granzym B zeigte in CD8⁺ T-Zellen einen deutlichen Anstieg in der Expression nach Stimulation, während dieser Anstieg in CD4⁺ T-Zellen nur marginal zu erkennen war. Interessanterweise waren die Expressionsprofile von

Granzym B und Perforin in CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich. Diese Befunde waren reproduzierbar bei allen vier Spendern (Abb. 5.6.3).

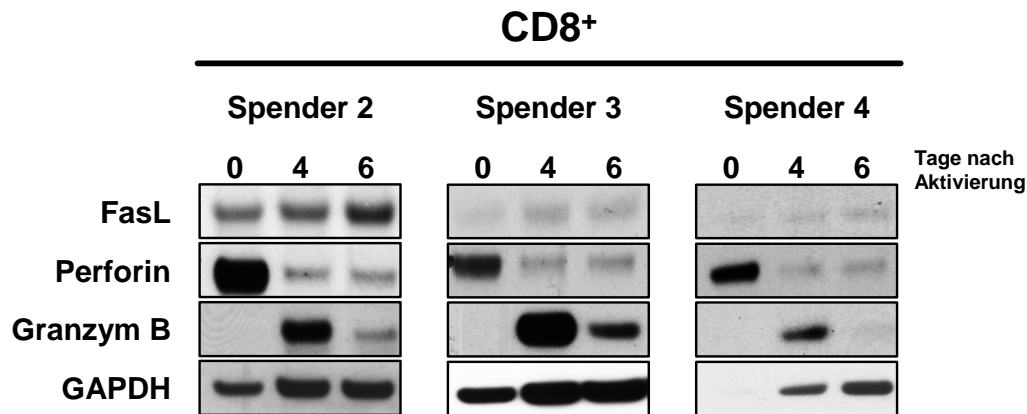


Abb. 5.6.3: Kinetik der Expression von FasL, Perforin und Granzym B in CD8⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern. Die Durchführung war analog zu der Beschreibung in Abb. 5.6.2, jedoch sind hier nur die ersten drei Probenentnahmen dargestellt.

Beide Zelltypen zeigten jedoch in der Expression von Granulysin einen ähnlichen Verlauf, wobei in CD8⁺ T-Zellen bereits vor der Stimulation sowohl die unreife (15 kDa), als auch die reife (9 kDa) Form vorlagen. Nach Stimulation war Granulysin bis zur Neusynthese an Tag 11 dann fast nicht mehr nachweisbar. Die deutliche Expression ab Tag 11 wurde in beiden T-Zellsubpopulationen festgestellt. Diese Daten decken sich mit den Beobachtungen von Huang und Kollegen [148], die bei CD3/CD28 stimulierten Maussplenozyten ebenfalls erst 10 Tage nach Stimulation eine Expression von Granulysin feststellen konnten. Allerdings wurden dabei die hier detailliert untersuchten Subpopulationen und deren unterschiedliche Kinetiken in der Expression zytotoxischer Proteine nicht weiter aufgeschlüsselt.

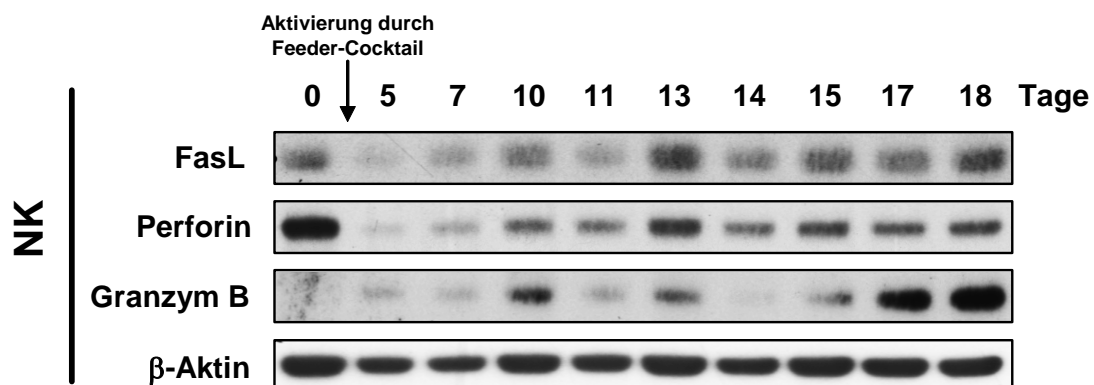


Abb. 5.6.4: Kinetik der Expression zytotoxischer Proteine in NK-Zellen. Die Isolation von NK-Zellen aus PBMZ erfolgte magnetisch durch Negativselektion. Eine Lyse der Zellen erfolgte vor allogener Stimulation sowie zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden je 5 µg Zelllysate durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf 0,2 µm NC-Membran transferiert. Die Färbung erfolgte mit anti-FasL mAk, anti-Perforin mAk und anti-Granzym B mAk. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin.

Die Kinetik der NK-Zellen zeigte im Falle der Expression des FasL und Perforin zunächst einen Rückgang (vermutlich aufgrund einer initialen Degranulation), gefolgt von einer gesteigerten Expression mit Kultivierung der Zellen. Dieser Verlauf ließ sich auch für Granzym B erkennen, jedoch war kaum ein Vorkommen in den frisch isolierten NK-Zellen nachweisbar.

5.7 Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula

Die Ergebnisse der vorherigen Versuche deuteten auf eine Änderung im Proteinbesatz während der Maturierung sekretorischer Granula hin. Im Folgenden sollten diese Änderungen auf Proteomebene aufgeschlüsselt werden. Hierfür wurden aus ökonomischen Gründen E⁺ Zellen untersucht, von denen ein Teil direkt subzellulär fraktioniert und ein anderer nach Stimulation für 14 Tage kultiviert wurde.

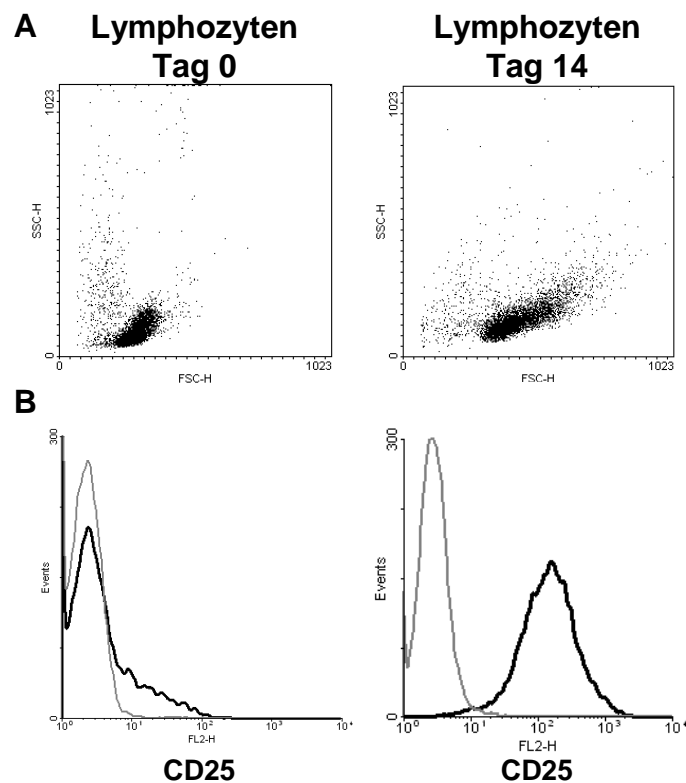


Abb. 5.7.1: Nachweis der Aktivierung von Lymphozyten im FACS. Durch Rosettierung gewonnene humane E⁺ Lymphozyten wurden direkt (links) oder 14 Tage nach allogener Stimulation im FACS auf Größe (FSC) und Granularität (SSC) hin untersucht (A). Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression von CD25 (IL-2 Rez. α -Kette) (schwarze Linie) bestimmt. Die graue Linie stellt die dazugehörige Isotypkontrolle dar (B).

Naive Lymphozyten sind klein und wenig granulär. Dies zeigte sich auch in den vergleichenden FACS-Analysen von naiven und aktivierten Zellen. Ebenfalls fehlte wie erwartet CD25 (α -Kette der IL-2 Rezeptoren) als Aktivierungsindikator (Abb.

5.7.1). Da naive Lymphozyten nur wenige Organellen haben, war es notwendig Lymphozyten von vier Spendern im gleichen Verhältnis zu vereinigen, um ausreichende Proteinmengen für die geplante Proteomanalyse zu erhalten. Nach 14 Tagen separater Zellkultur wurden die expandierten, PHA-stimulierten Lymphozyten ebenfalls zu gleichen Teilen auf Eis vereinigt und sofort subzellulär fraktioniert. Die Western Blot Analyse der beiden Fraktionierungen ist in Abbildung 5.7.2 dargestellt.

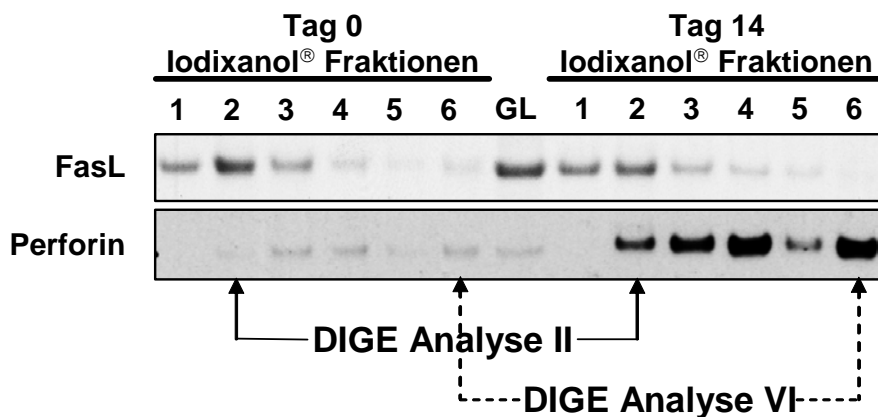


Abb. 5.7.2: Analyse subzellulärer Fraktionen, aus naiven (links) und stimulierten und für 14 Tage expandierte E⁺ Lymphozyten (rechts). Nach Auftrennung und Transfer gleicher Proteinmengen auf eine NC-Membran wurde diese mit anti-FasL mAk und anti-Perforin mAk gefärbt. Die für FasL und Perforin angereicherten Fraktionen wurden anschließend für 2D-DIGE Analysen verwendet. GL= Gesamtlisat der Zellen von Tag 14

Wie schon in der Kinetik für E⁺ Lymphozyten gezeigt (Abb. 5.6.1 A), war auch in diesem Ansatz fast kein Unterschied in der FasL-Expression zu beobachten. Dagegen wurde eine deutliche Zunahme von Perforin an Tag 14 im Vergleich zu frisch isolierten Lymphozyten nachgewiesen. Erneut zeigte Perforin eine breitere Verteilung in einzelnen Fraktionen des Gradienten mit einer deutlichen Anreicherung in Fraktion 4 und 6. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Fraktion 4 im Prinzip die Beladungsposition des Ausgangsmaterials (angereicherte Organellen) darstellt. In einem nächsten Schritt wurden jeweils die Fraktionen 2 und 6 von naiven Lymphozyten (Tag 0) und expandierten Lymphozyten (Tag 14) in 2D-DIGE Experimenten miteinander verglichen.

5.7.1 Die Reifung FasL-tragender Vesikel

Fraktion 2 der naiven Lymphozyten wurde mit Cy5 und die Granula der gleichen Fraktion der 14 Tage expandierten Zellen mit Cy3 markiert (Abb. 5.7.3). Die differentielle „In-Gel“ Analyse (DIA) der auf 2D-Gelen separierten Lysate ergab eine

Anzahl von 1822 ermittelten Spots, von denen sich bei einem Volumenverhältnisgrenzwert von 2,5 46 Spots verstärkt und 28 verringert in den gereiften Granula zeigten. Von den insgesamt 74 differentiellen Spots wurden 42 Spots anhand des annotierten „Mastergels“ und den separaten Identifikationen aus den Maturierungsversuchen (Tab. A5) identifiziert (Tabelle 5.7.1).

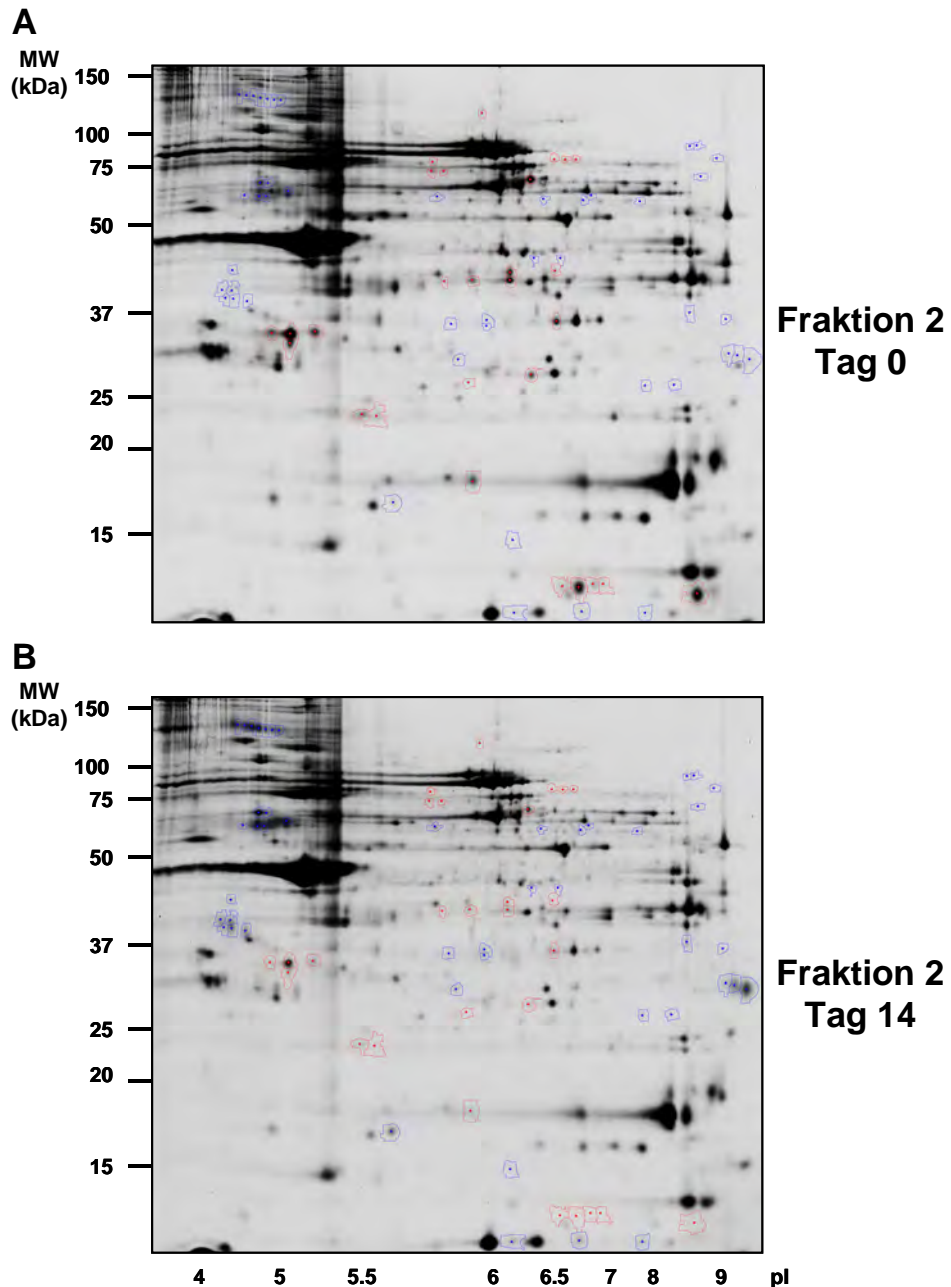


Abb. 5.7.3: DIGE-Analyse II von FasL-reichen Granula aus naiven E⁺ (A) und stimulierten E⁺ Lymphozyten (B). E⁺ Zellen (790 Mio.) aus vier Spendern wurden im gleichen Verhältnis gemischt und die Organellen über einen Dichtegradienten aufgetrennt (Fraktion 2, Tag 0, Cy 5 markiert). Die gleiche Prozedur wurde mit den stimulierten Zellen der gleichen Spender durchgeführt (Fraktion 2, Tag 14, Cy3 markiert). Die Auswertung mit der DIA Software ergab eine unterschiedliche Proteinmenge. Bei einem Grenzwert von 2,5 des Volumenverhältnisses ergaben sich so Spots die in ihrer Abundanz verstärkt (blau) oder vermindert (rot) sind.

Tab. 5.7.1: Identifizierte, differentielle Spots der Fraktion 2 von naiven und stimulierten Lymphozyten. Aufgelistet sind die identifizierten Proteine, die eine Änderung im Volumenverhältnis von mehr als 2,5-fach aufweisen.

Spot Nr.	Volumenverhältnis Tag 14 / Tag 0	Protein Name
*1152	-68.62	beta-globin
*1159	-6.20	alpha-globin
604	-4.54	annexin A1
*878	-4.33	chloride intracellular channe 1
² 615	-3.48	annexin A1
*902	-3.44	chloride intracellular channel 1
² 684	-3.25	nuclear chloride channel
² 678	-3.16	actin related protein 2/3 complex
743	-2.91	triosephosphate isomerase (TIM)
*880	-2.79	chloride intracellular channel 1
808	-2.77	cofilin 1, isoform CRA_c
986	-2.73	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 3
*1023	-2.62	peroxiredoxin-2
² 342	-2.60	EH-domain containing 1
627	-2.56	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1
669	2.59	MHC class II antigen
717	2.67	granzym A
² 1064	2.70	Tubulin, beta
² 81	2.71	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
86	2.73	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
444	2.74	Ena-VASP-like B6
750	2.76	proteasome subunit, beta type, 1
957	2.80	GRAP2 protein
370	2.90	alpha-tubulin
599	2.91	V-type proton ATPase subunit d 1
77	2.91	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
749	2.93	cathepsin S
953	2.96	MHC class II antigen
85	3.00	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
837	3.06	Interleukin-25 (R33729_1)
349	3.20	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor
² 433	3.22	tubulin, beta
84	3.63	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
² 130	3.76	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
426	3.91	ATP synthase, H ⁺ transporting
658	4.23	voltage-dependent anion channel 1
² 720	4.35	granzym A
*789	4.39	MHC class II antigen
*769	4.41	MHC class II antigen
² 820	4.44	stathmin 1/oncoprotein 18
² 83	5.25	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
724	6.69	granzym A

*= wurde nur im Maturierungsgel 36836 identifiziert (separate Identifikationliste im Anhang, Tab. A5)

²= wurde sowohl im Maturierungsgel als auch im Mastergel identifiziert

Einige der aufgelisteten differentiellen Proteine wurden in Abbildung 5.7.4 aufgrund der großen Unterschiede in ihren Volumenverhältnissen detaillierter dargestellt. Hierzu gehörten unter anderem die Dipeptidylpeptidase IV, Granzym A, der spannungsabhängige Anionenkanal 1 (VDAC-1), eine vakuoläre Protonen ATPase, MHC Klasse-II, Cathepsin S und Interleukin-25. Im Gegensatz zu diesen höher exprimierten Proteinen gab es auch solche, die in den Granula der aktivierten Lymphozyten gering oder fast gar nicht mehr vorhanden bzw. nachweisbar waren. Hierzu zählten Annexin A1, der intrazelluläre Chloridkanal 1 und der Arp 2/3 Komplex. Eine Erhöhung der Protonenpumpen-Proteine und eine Erniedrigung der Chloridkanäle könnten auf eine Ansäuerung des reifenden, lysosomalen Kompartiments hindeuten. Im Zusammenhang der Reifung steht auch die Erhöhung von MHC Klasse-II Komplexen und deren funktionell assoziiertes Protein Cathepsin S, das wie bereits erwähnt für die Antigenbeladung der Komplexe notwendig ist.

Alpha- und beta-Ketten des Hämoglobins waren nur in den Granula der naiven Zellen nachgewiesen und entstammten wahrscheinlich den Schaferythrozyten, die für die Isolierung der Lymphozyten benutzt wurden.

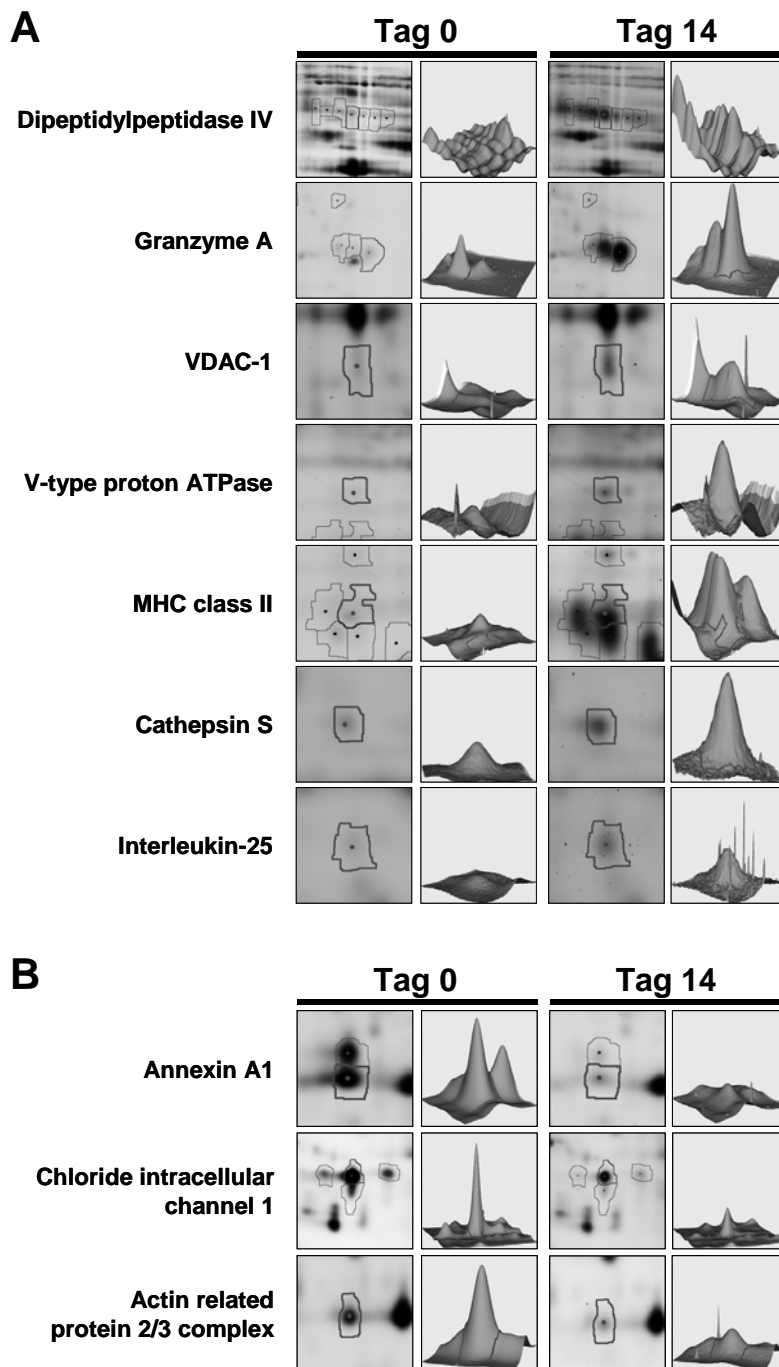


Abb. 5.7.4: Ausgewählte differentiell exprimierte Proteine in Fraktion 2 aus naiven (Tag 0) und aktivierten Lymphozyten (Tag 14). Die Gelausschnitte stellen die angegebenen Proteine bzw. deren Isoformen dar. Das korrespondierende 3D-Profil zeigt den umrandeten Spot. Die Änderungen im Spotvolumen der dargestellten Proteine sind in der Tabelle 5.7.1 zusammengefasst.

5.7.1.1 Expression und Lokalisation der Dipeptidylpeptidase IV / CD26

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4, CD26) sollte im Kontext der Reifung genauer untersucht werden, da 7 Isoformen dieses Proteins eine Erhöhung in den reifen Granula zeigten. Obwohl der Expressionsspiegel der Gesamtllysate hierbei nicht konstant war, so war doch eine deutlich Erhöhung im Vergleich zu unstimulierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu erkennen. Ebenfalls konnte für DPPIV auch immunbiochemisch eine Anreicherung in FasL-reichen Vesikeln gezeigt werden (Abb. 5.7.4).

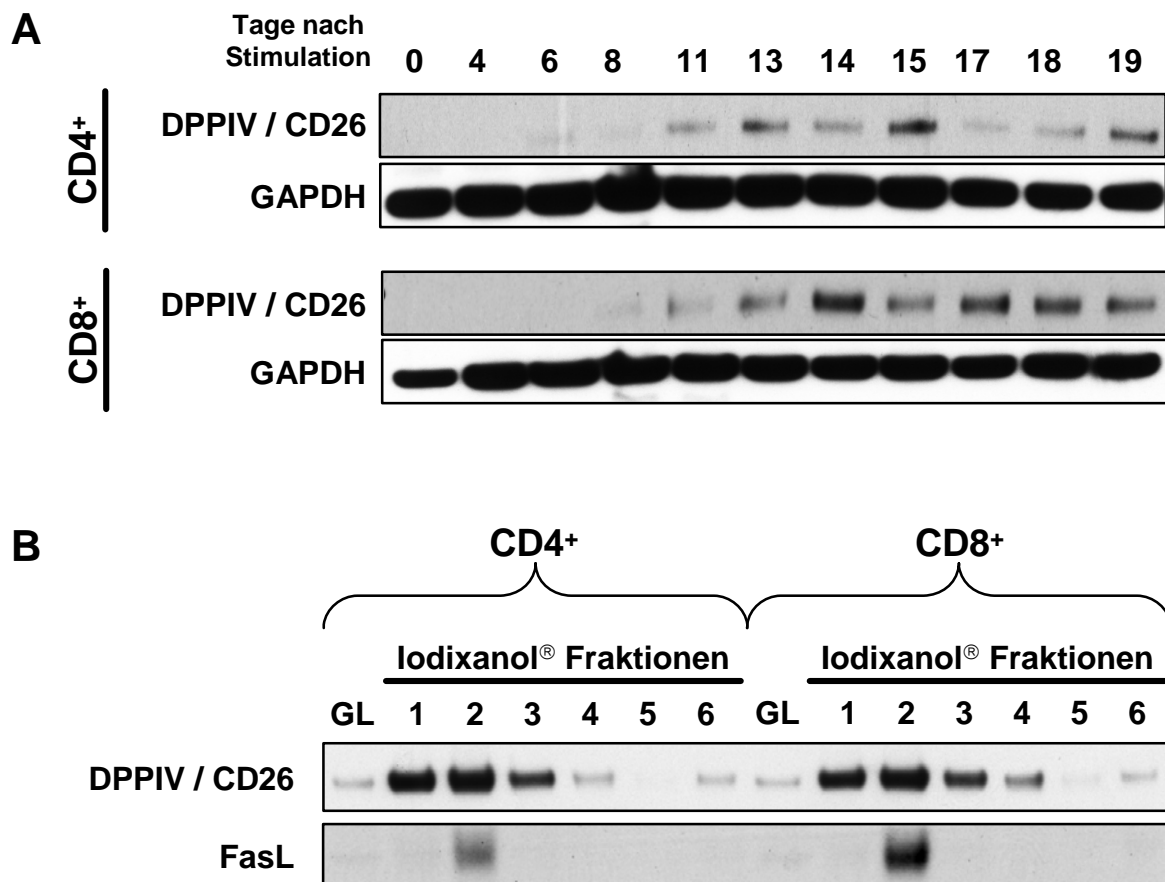


Abb. 5.7.5: Kinetik zur Expression (A) und subzelluläre Lokalisation (B) von DPPIV / CD26. Der Expressionsverlauf von CD26 wurde in autolog stimulierten T-Zellsubpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$) über 19 Tage beobachtet (A). Ebenfalls wurden autologe $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen 16 Tage nach Stimulation subzellulär fraktioniert und je 4 μ g Proteinlysate aufgetrennt. Die Präsenz von CD26 und FasL wurde in Fraktion 2 mit mAk nachgewiesen (B).

5.7.2 Die Reifung Granzym B-angereicherter Vesikel

Vergleichende Analysen wurden auch im Falle der Fraktion 6 durchgeführt. Hierbei wurden wieder die Lysate der angereicherten Granula der naiven Lymphozyten mit Cy5 markiert und die der expandierten mit Cy3 (Abb. 5.7.6).

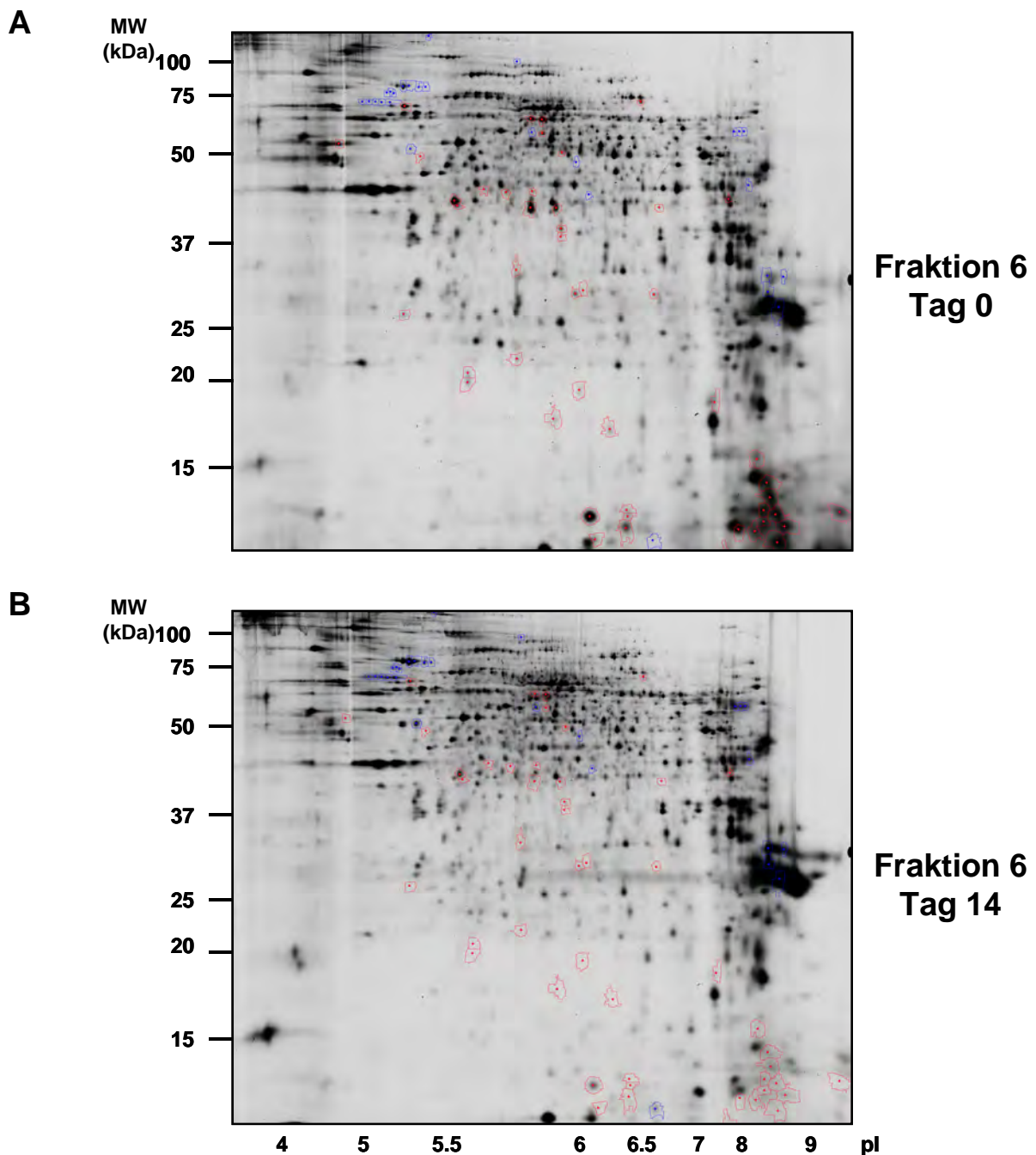


Abb. 5.7.6: DIGE Analyse der Fraktion 6 Granula aus naiven (A) und stimulierten E⁺ Lymphozyten (B). Analog zum vorherigen Versuch wurden die Organellen subzellulär fraktioniert und die Fraktion 6 für DIGE Analysen präpariert. Dabei wurden das Präparat aus den naiven Zellen mit Cy5 und das der aktivierten Zellen mit Cy3 markiert.

Es wurden insgesamt 1659 Spots analysiert. 27 Proteinspots waren bei einem angelegten Volumenverhältnisgrenzwert von 4,0 verstärkt und 49 vermindert in den gereiften Granula exprimiert. Da das Proteom dieser Fraktion noch nicht so umfassend aufgeschlüsselt wurde, konnten hier nur 12 differentielle Spots identifiziert werden (Tab. 5.7.2).

Tab. 5.7.2: Identifizierte, differentielle Spots der Granzym B-reichen Fraktion von naiven und expandierten Lymphozyten. Aufgelistet sind identifizierte Proteine, die eine Änderung im Volumenverhältnis von mehr als 4-fach aufwiesen.

Spot Nr. (Gel 36839)	Volumenverhältnis Tag14 / Tag 0	Protein Name
1653	-6.74	septin 2
*138	-5.61	succinate dehydrogenase
1642	-5.07	actin
*137	-4.25	succinate dehydrogenase
*95	-4.23	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
*303	-4.21	actin
² 439	3.82 ³	granzyme A
² 452	4.05	granzyme A
1865	4.47	granzyme B
1872	4.55	granzyme B
² 63	4.76	myosin IIA
² 616	5.39	Perforin-1

*= Annotierung wurde aus dem „Mastergel“ übernommen, die anderen Identifikationen des Gels 36839 können der Tabelle A5 im Anhang entnommen werden

²= wurde sowohl im Maturierungsexperiment, als auch im „Mastergel“ identifiziert

³= Ausnahme beim Volumenverhältnis

Ausgewählte differentielle Spots aus Tabelle 5.7.2 sind in Abbildung 5.7.7 im Detail dargestellt. Im Gegensatz zu Fraktion 2 wiesen in der Fraktion 6 Granzym A, B und Perforin ein verstärktes Vorkommen in den reifen Granula auf. Ebenfalls war das an der Degranulierung beteiligte Myosin IIA in den reifen Granula erhöht. Auf der anderen Seite war in den Granula der naiven Lymphozyten Septin 2 nachweisbar, welches in den reifen Vesikeln nahezu fehlte. Wie bereits erwähnt, befanden sich in Fraktion 6 vermehrt mitochondriale Proteine (wie z.B. die Succinat Dehydrogenase).

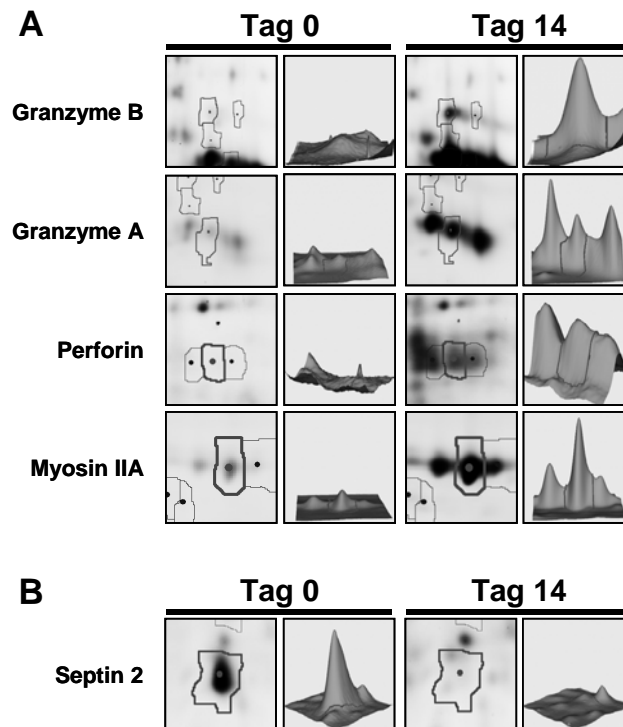


Abb. 5.7.7: Ausgewählte differentielle Proteine der Fraktion 6 aus naiven (Tag 0) und aktivierten Lymphozyten (Tag 14). Proteinspots, die ein erhöhtes oder geringeres Vorkommen in aktivierten Lymphozyten zeigten sind in A bzw. B abgebildet. Die Gelausschnitte stellen die angegebenen Proteine bzw. deren Isoformen dar. Das korrespondierende 3D-Profil zeigt den umrandeten Spot. Das Verhältnis der Spotvolumina der gezeigten Proteine ist in der Tab. 5.7.2 aufgelistet.

5.8 Identifikation und Expression von Interleukin-16 in NK-Zellen

Interleukin-16 (IL-16) wurde bei den Proteomanalysen der NK-Zellen fast exklusiv in primären und expandierten NK-Zellen gefunden. Da allem Anschein nach das Vorkommen in NK-Zellen noch nicht beschrieben wurde, sollte die Expression von IL-16 im Hinblick auf dessen Kinetik und Lokalisation untersucht werden. IL-16 stellte sich im 2D-Gel als verschiedene Isoformen mit demselben Molekulargewicht von ca. 73 kDa, aber leicht unterschiedlichem auch pI dar (Abb.: 5.8.1 A, B). Sowohl das Molekulargewicht, als auch der pI entsprechen den theoretischen Berechnungen von 66,6 kDa und pI 5,67. Wie erwähnt wurde IL-16 nur in expandierten NK-Zellen massenspektroskopisch identifiziert. Die Identifikation beruhte hierbei zunächst auf dem Vergleich der Peptidmassen mit den Datenbankeinträgen (Peptidmassen-Fingerabdruck). Zusätzlich wurden Aminosäuresequenzen der vier stärksten, proteinspezifischen Peptide bestimmt (Abb. 5.8.1 C). Die so erhaltenen Sequenzen deckten sich mit Abschnitten des Datenbankeintrages (UniProt Nr. Q14005) für Interleukin-16 (Abb. 5.8.1 D).

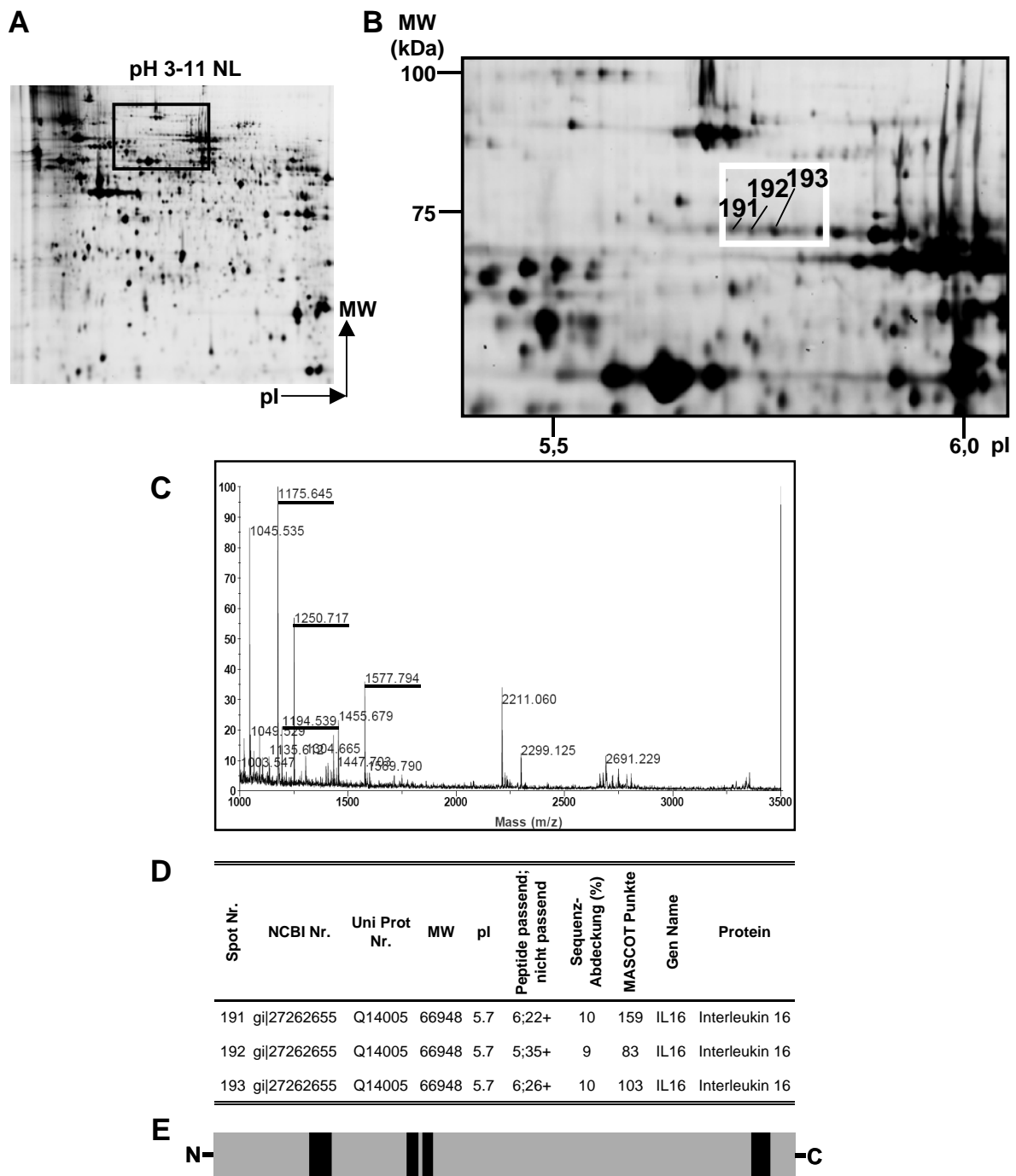


Abb. 5.8.1: Identifizierung von IL-16 mittel MS in der Fraktion 2 von expandierten NK-Zellen. Dargestellt ist das 2D-Gel der Fraktion 2 aus NK-Zellen (**A**). Die nummerierten Spots im vergrößerten Gelabschnitt (**B**) entsprechen denen der Spotnummern im Tabelleauschnitt (**D**). Das Massenspektrum von Spot Nr. 191 (**C**), bei dem die vier stärksten IL-16 spezifischen Peptidmassen (unterstrichen) zusätzlich mittels MS+MS/MS sequenziert wurden. Zur besseren Übersicht sind übereinstimmende Peptide in der schematischen Darstellung des IL-16 schwarz dargestellt (**E**).

In Lymphozyten und bronchialen Epithelzellen wird IL-16 als 631-AS Vorläufermolekül generiert, welches als pro-IL-16 bezeichnet wird. Eine Spaltung durch Caspase-3 am Serin 511, führt zu einem 121 AS langen carboxyterminalen Peptid, welches die bioaktive Form des IL-16 darstellt (Abb. 6.1.1) [149].

Sowohl pro-IL-16, als auch die bioaktive Form ließen sich in nicht-leukämischen T- und NK-Zelllinien (RAPO, JFL bzw. YTS) mit einem IL-16 spezifischen mAk nachweisen (Abb. 5.8.2). Eine Ausnahme stellte hier die NK-Zelllinie NKL dar, bei der sich auf Höhe von pro-IL-16 (73 kDa) nur eine leichte Bande abzeichnete. Die bioaktive Form des IL-16 ist im Vergleich zu den Mengen der pro-Form in T- und NK-Zellen sehr gering. Ein entsprechendes Signal auf Höhe von 15 kDa war erst nach längerer Belichtungszeit (15 min) zu erkennen. Jedoch waren auch hier Unterschiede innerhalb der Zellpopulationen zu beobachten. So zeigten 16 Tage expandierte CD8⁺ und NK-Zellen das stärkste Signal, während $\nu\delta 1^+$, $\nu\delta 2^+$ T-Zellen und nicht aktivierte E⁺ Zellen schwächere Signale aufwiesen. In der Signalstärke des pro-IL-16 war nur bei $\gamma\delta$ T-Zellen eine geringere Intensität zu beobachten, während zwischen E⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen kein wesentlicher Unterschied zu sehen war.

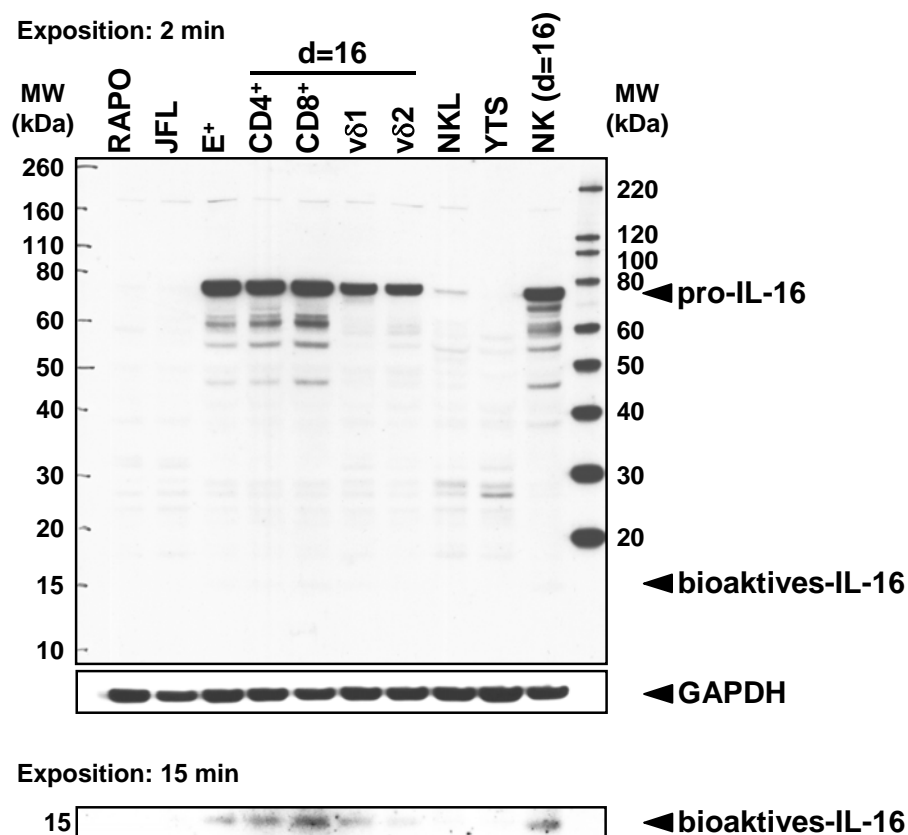


Abb. 5.8.2: Expression von IL-16 in verschiedenen T- und NK-Zellen. Lysate aus den angegebenen Zellen wurden auf einem 4-20%-igen Gradientengel aufgetrennt und auf 0,2 μ m NC-Membran transferiert. Die Detektion von IL-16 erfolgte mit einem gegen den C-Terminus (AS 503-631) gerichteten mAk. Nach längerer Exposition war neben dem pro-IL-16 auch bioaktives IL-16 bei ca. 15 kDa erkennbar (untere Abb.). Als Beladungskontrolle diente anti-GAPDH.

Neben dem erstmaligen direkten Nachweis von IL-16 in $\gamma\delta$ T-Zellen, wurde IL-16 mit der vorliegenden Arbeit erstmals in NK-Zellen nachgewiesen. Bioinformatische Recherchen (<http://biogps.gnf.org>, nicht gezeigt) ergaben, dass NK-Zellen, wie auch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, IL-16 mRNA besitzen und somit auch in der Lage sein sollten dieses Protein zu translatieren. Die Expression von pro-IL-16 wurde in naiven und aktivierten NK-Zellen nachgewiesen. Hierbei ist bis zu 7 Tagen nach Aktivierung ein deutlicher Rückgang der Expression zu verzeichnen. Danach erfolgt ein erneuter Anstieg bis Tag 15 nach Aktivierung. Bei $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ist eine ähnliche Kinetik zu beobachten gewesen (Abb. 5.8.3).

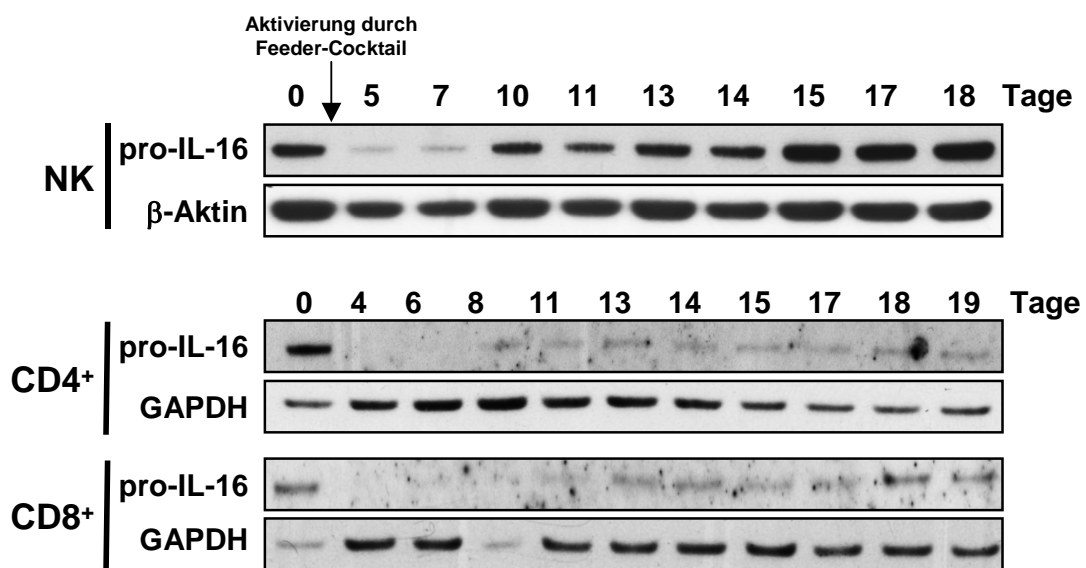


Abb. 5.8.3: Kinetik der Expression von pro-IL-16 in NK-Zellen und T-Zellsubpopulationen. Es wurden je 4 μ g Protein der Zelllysate an den angegebenen Tagen nach Stimulation auf einem Gradientengel aufgetrennt und auf 0,2 μ m NC-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte anschließend mit anti-IL-16 mAk. β -Aktin und GAPDH dienen als Beladungskontrollen.

5.8.1 IL-16 wird in FasL-tragenden Granula gespeichert

Die Speicherung von pro-IL-16 erfolgte in Vesikeln die nach Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation auch die Granula-spezifischen Proteine FasL, CD63 und LAMP-1 (Abb. 5.8.4) enthielten. Dies konnte nicht nur in den Fraktionen von PHA-Blasten, sondern auch in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden.

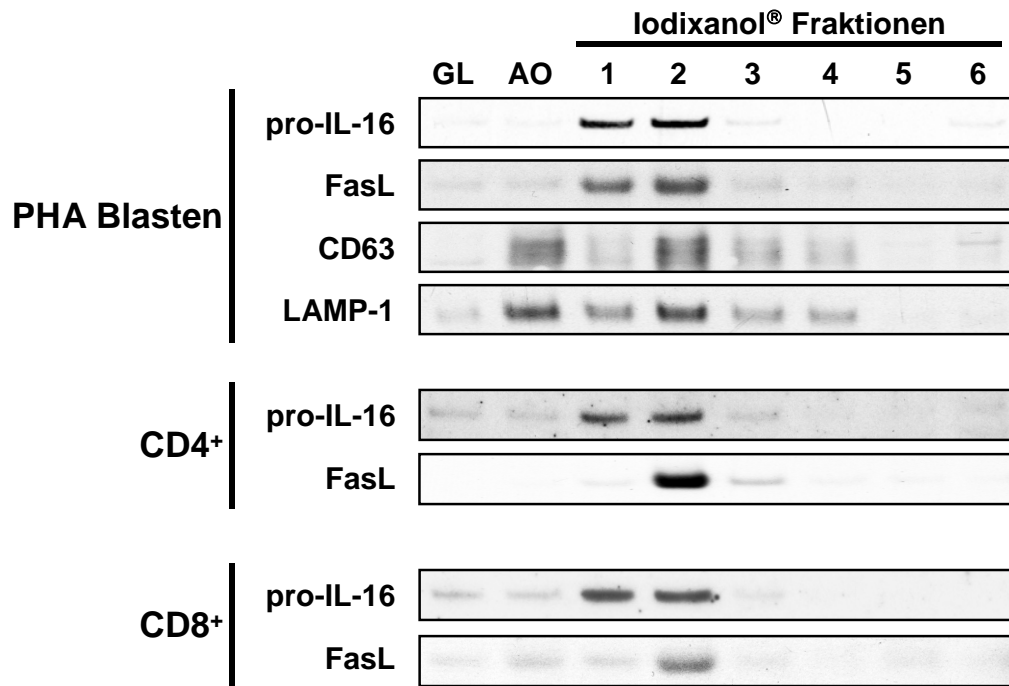


Abb. 5.8.4: Lokalisation von pro-IL-16 in subzellulären Fraktionen. Die Dichtegradientenfraktionen von PHA-Blasten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit anti-IL-16, anti-FasL und bei PHA-Blasten zusätzlich mit anti-CD63 und anti-LAMP-1 mAK gefärbt.

Des Weiteren ließ sich die Kolo-kalisation von IL-16 und FasL auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Abb. 5.8.5 A, B). Die NK-Zelllinien NKL und YTS dienten als Negativkontrollen für IL-16 und zeigten auch in diesem Experiment den bereits beschriebenen Unterschied in der FasL Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-16 bei 17 Tage expandierten NK-Zellen in den gleichen granulären Strukturen lokalisiert ist wie CD63 (Abb. 5.8.5 C).

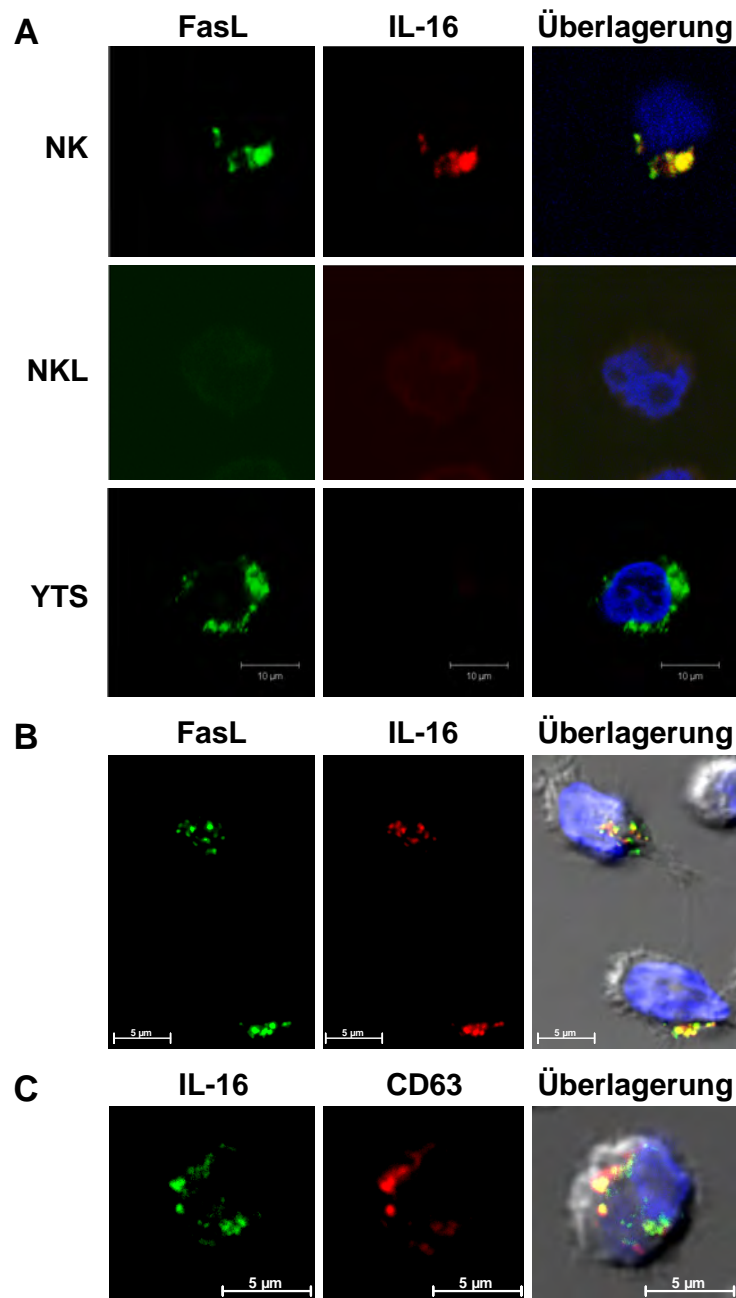


Abb. 5.8.5: In aktivierten NK-Zellen kolokalisiert IL-16 mit FasL und CD63. NK-Zellen (B, C) und NK-Zelllinien (A) wurden fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Hierbei wurde mit anti-FasL mAk NOK-1 über Nacht und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt und in einem zweiten Schritt nach intensivem Waschen mit direkt markiertem anti-IL-16-Alexa Fluor 555 gefärbt (A, B). Des Weiteren wurde anti-IL-16 über Nacht und anschließend mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Anschließend erfolgte die Färbung mit direkt markiertem anti-CD63-Alexa Fluor 555. Die in A dargestellten Proben wurden am LSM 510 und die in B und C am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 aufgenommen. In allen Aufnahmen wurden die Zellkerne mit DAPI (in B und C auch durchlichtmikroskopisch) visualisiert.

6. Diskussion

Zytotoxische Lymphozyten stellen im Immunsystem eine einzigartige Barriere für viral infizierte oder transformierte Zellen dar. Obwohl die Aktivierung der T- und NK-Zellen verschieden verläuft, sind die zytotoxischen Effektorfunktionen durch die Mobilisierung der lytischen Granula in beiden Zelltypen ähnlich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Inhalt dieser Granula definiert und Unterschiede zwischen Modellzelllinien, Subpopulationen und Reifungsstadien nachgewiesen. Diese Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

6.1 Etablierung einer effizienten Anreicherung sekretorischer Granula aus Lymphozyten

Detaillierte Proteomanalysen sekretorischer Granula erfordern eine effiziente Anreicherung dieses Kompartiments ausgehend von einer begrenzten Zellzahl. Zur Isolierung von zytotoxischen Granula aus NK- [150] und T-Zellen [151] wurden bisher meist Percoll Gradienten verwendet. Diese mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichteten Silikakolloidale haben den Nachteil, dass sie für nachfolgende Experimente durch Waschschriffe entfernt werden müssen. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit Iodixanol[®] als Dichtegradientenmedium verwendet. Das nicht-ionische Iodixanol[®] wurde zuerst 1994 von Graham und Kollegen beschrieben [152,153] und ist kommerziell als Optiprep[®] erhältlich. Es kann als isoosmotische Lösung hoher Dichte (bis 1,32 g/ml) eingesetzt werden [154].

Durch Dounce-Homogenisation und anschließende differentielle Zentrifugation gelang es Organellen anzureichern und von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zelltrümmern und assoziierten Plasmamembranen zu trennen. Dies konnte durch eine pan-Cadherin Färbung im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 5.2.1). Bei der nachfolgenden Schichtung des Dichtegradienten wurden die auf 19% Iodixanol[®] eingestellten Organellen in der Mitte des Gradienten appliziert, wodurch sich der hydrostatische Druck der sensitiveren Mitochondrien erhöhte und somit eine bessere Separation der Lysosomen ermöglicht wurde [155]. Wie bereits zuvor beobachtet [153], konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine sehr effiziente Abgrenzung von Mitochondrien (Fraktion 5) erzielt werden (Abb. 5.1.3). Die mittels Western Blot durchgeführte Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus PHA-Blasten zeigte eine deutliche Anreicherung lysosomaler (CD63, LAMP-1) als auch zytotoxischer Proteine (FasL, Perforin) in der Fraktion 2. Dennoch waren leichte

Verunreinigungen anhand des ER Markers BiP/Grp78 und des frühen Endosomenmarkers EEA-1 festzustellen. Eine Übersicht zur Verteilung der subzellulären Markerproteine ist in der folgenden Abbildung (Abb. 6.1) dargestellt.

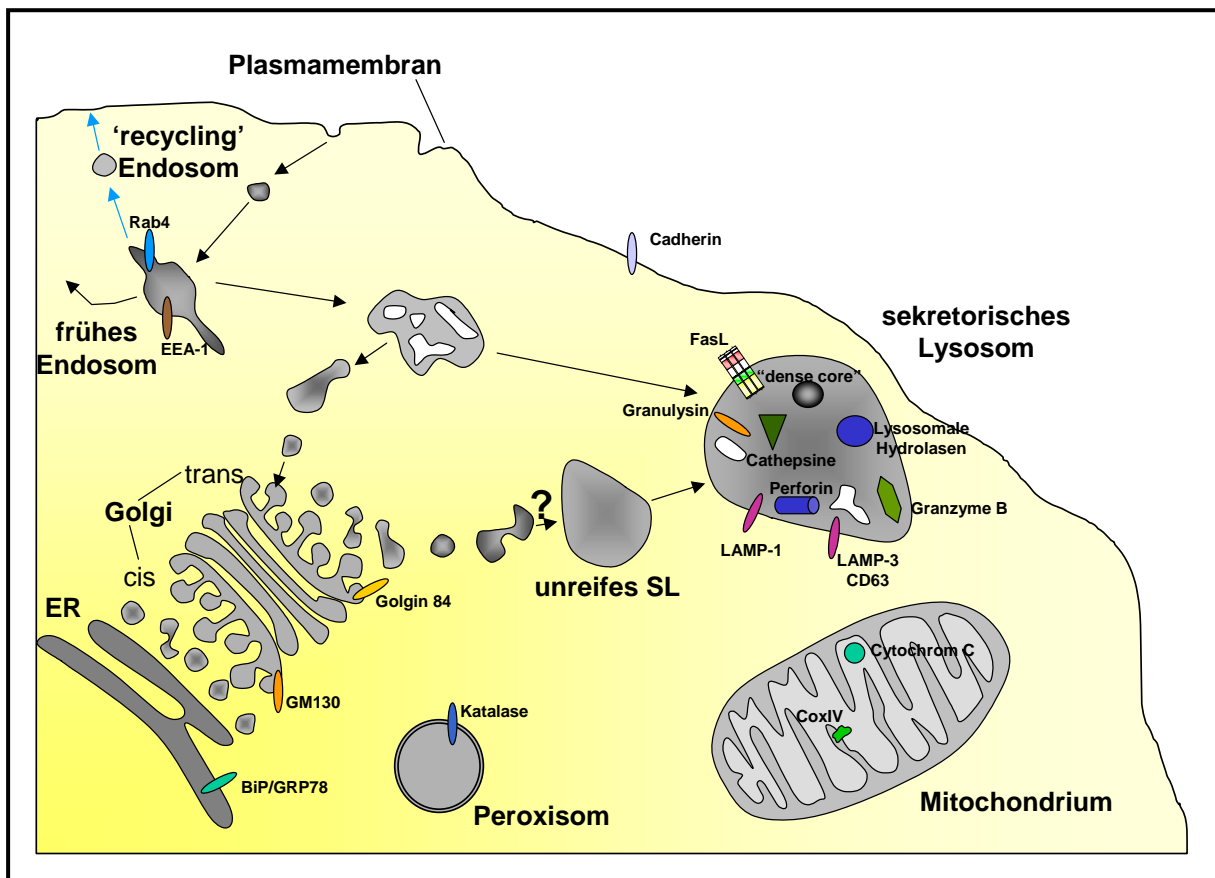


Abb. 6.1: Modell zur Lokalisation subzellulärer Markerproteine. Die in dieser Arbeit verwendeten subzellulären Marker sind zur besseren Übersicht den verschiedenen Organellen zugeordnet worden.

Bereits bei den initialen Experimenten zur Etablierung des Protokolls zur Anreicherung von sekretorischen Lysosomen (SL) wurde beobachtet, dass sich ein Großteil des Granzyme B Proteinbesatzes nicht in der FasL-Fraktion 2 wiederfand. Da jedoch die meisten in der Literatur für sekretorische Lysosomen benannten Marker in der Fraktion 2 angereichert waren, wurde diese in den nachfolgenden Proteomanalysen verwendet. Routinemäßig wurde dabei die Anreicherung des FasL überprüft. Die Eignung des FasL als Marker für SL konnte in den verwendeten Zellen zudem mittels Immunpräzipitation gezeigt werden (Abb.5.1.4). Ein weiterer Marker sekretorischer Lysosomen ist CD63 [97,156,157]. Eine exakte Kollokalisierung dieses lysosomalen Membranproteins mit FasL wurde bisher in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert [108]. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte sowohl in der NK-Zelllinie YTS als auch in isolierten und expandierten CD4⁺, CD8⁺ und CD3⁻/CD56⁺ (NK) Lymphozyten eindeutig eine Kollokalisierung des FasL mit CD63

dokumentiert werden (Abb. 5.1.4). Nach Etablierung des Protokolls zur Anreicherung lytischer Granula und deren Charakterisierung durch spezifische Marker, wurde zunächst das Proteom der Granula von humanen NK-Zellen analysiert.

6.2 Das Proteom sekretorischer Lysosomen aus NK-Zellen

6.2.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der humanen NK-Zelllinien

NK-Zellen bilden eine der ersten Verteidigungslinien bei Infektionen und werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Im peripheren Blut gesunder Spender beträgt der Anteil an NK-Zellen etwa 10%. Für die Untersuchung von biochemischen Signalwegen, aktivierungsabhängigem Vesikeltransport oder dem zytotoxischen Potential werden auch im Falle von NK-Zellen etablierte Zelllinien als Modellsysteme eingesetzt. Hier finden unter anderem die leukämischen NK-Zelllinien NKL und YTS Verwendung. NKL wurde 1996 erstmals von Robertson und Kollegen beschrieben und stammt aus dem peripheren Blut eines Patienten mit NK-Zell-Leukämie [158]. YTS ist ein Subklon der YT-Zelllinie, welche aus der perikardialen Flüssigkeit eines Patienten mit akutem lymphoblastischen Lymphom etabliert und 1985 von Yodoi und Kollegen [159] eingehend charakterisiert wurde. Diese beiden Zelllinien gehören neben NK-92 [160] zu den am häufigsten verwendeten humanen NK-Modellzelllinien [138]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NK-Zelllinien weisen mehrere phänotypische Unterschiede auf (Abb. 5.3.1). Außerdem erfordern sie verschiedene Wachstumsbedingungen [158,161] und unterschiedliche Stimulationsbedingungen für die Induktion der zytolytischen Effektorfunktion [161,162]. Auf den klonalen Ursprung der Linien deutet die Tatsache hin, dass keine der beiden Zelllinien mit dem typischen Markerprofil von IL-2 expandierten NK-Zellen übereinstimmt. Primäre NK-Zellen sind nach zwei Wochen Expansion $CD3^-$, $CD2^+$, $CD16^+$, $CD56^+$ und $NKG2D^+$. Die individuellen Profile der NK-Zelllinien sind in Abb. 5.3.1 dargestellt. Erstaunlich ist die unterschiedliche Expression klassischer NK-Zellmarker wie CD16 (fehlt bei beiden Linien) und CD56 (fehlt bei NKL) sowie das Auftreten von CD28, einem kostimulatorischen Protein auf T-Zellen, auf YTS. Diese phänotypischen Unterschiede haben nachweisbare Auswirkungen auf die Erkennung und Lyse von Zielzellen (Abb. 5.3.2). So sind YTS nicht in der Lage, K562 Zielzellen zu töten, vermutlich da diese keinen der CD28 Liganden (CD80, CD86) exprimieren, welche laut Literatur essentiell für die Aktivierung und folgende Degranulation sekretorischer

Granula aus YTS-Zellen sind [161]. Im Gegensatz dazu wird Zytotoxizität bei NKL hauptsächlich durch NKG2D vermittelt, wodurch sowohl in K562 als auch 721.221 Apoptose ausgelöst werden kann [162]. Wie zuvor von Chen und Kollegen berichtet, zeigten NKL eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber K562. Trotz dieser Unterschiede wiesen beide Zellen ein vergleichbares zytotoxisches Potential von 65-75% bei einem Effektor/Zielzell – Verhältnis von 10:1 auf [162]. Somit ist festzuhalten, dass sowohl phänotypische als auch funktionelle Charakteristika der hier verwendeten Zelllinien mit denen in der Literatur beschriebenen übereinstimmen. Außerdem legten die dargestellten Befunde nahe, dass sich möglicherweise nicht nur die Phänotypen der Zellen unterscheiden, sondern auch der Proteinbesatz des Effektorkompartimentes.

6.2.2 Anreicherung und Charakterisierung sekretorischer Granula aus NK-Zelllinien

Auch für Proteomanalysen von subzellulären Strukturen werden häufig Zelllinien verwendet, um ausreichende Proteinmengen für die folgenden Analysen zu erhalten. So wurde kürzlich die Leukämielinie YTS von Casey und Kollegen [163] verwendet, um das Membranproteom sekretorischer Vesikel von NK-Zellen zu untersuchen.

Für die Anreicherung sekretorischer Granula wurde in der vorliegenden Arbeit das zuvor beschriebene Protokoll verwendet. Da sich die NK-Zelllinien durch ihre Größe (Durchmesser ca. 10 µm) von den PHA-Blasten unterscheiden, wurde die Homogenisierung leicht modifiziert. Die erhaltenen Fraktionen wurden ebenfalls aufgrund des Vorkommens verschiedener subzellulärer Marker charakterisiert. Hierbei zeigte FasL bei YTS eine Anreicherung in der Fraktion 1 und 2, wobei nur in Fraktion 2 auch die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und CD63 angereichert waren. NKL-Zellen zeigten bei FasL, LAMP-1 und CD63 ein ähnliches Verteilungsmuster, wobei FasL ein vergleichsweise schwächeres Signal ergab. Ein weiterer Unterschied war im Vorkommen von Granzym B sichtbar. Während dieses Protein in NKL-Zellen in Fraktion 2 angereichert war, zeigte sich bei YTS eine breite Verteilung über alle Fraktionen. Dies lässt sich teilweise auf die großen Mengen an Granzym B in YTS-Zellen zurückführen. Es könnte sein, dass bei der Aufarbeitung einige zerstörte Vesikel zu einem entsprechenden Granzym B Signal im Western Blot führten. Wie auch schon bei PHA-Blasten beobachtet, zeigten *in vitro* expandierte NK-Zellen eine Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6. Neben Granzym B wies auch Granulysin eine leicht unterschiedliche Verteilung in den

Fraktionen auf. Während bei NKL und YTS sowohl die unreife (15 kDa) als auch die reife (9 kDa) Form in der Fraktion 2 angereichert waren, war in YTS-Zellen die reife Form zusätzlich auch in Fraktion 6 nachweisbar.

Auch im Falle der NK-Zellen wurde anhand der oben genannten Befunde die Fraktion 2 für die Charakterisierung des Proteinbesatzes von SL eingesetzt. Die subzelluläre Einordnung der 234 identifizierten Proteine aus den NK-Zell-Gelen ergab, dass 76,8% in lysosomen-ähnlichen Organellen, exozytotischen Vesikeln oder Melanosomen bereits vorher gefunden wurden [139,146,164]. Dies verdeutlicht neben der Verteilung der subzellulären Marker, dass die Anreicherung lytischer Granula aus leukämischen und aktivierten NK-Zellen relativ effizient war.

6.2.3 Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen

In einem nächsten Schritt sollten die individuellen Unterschiede im Proteinbesatz der angereicherten Lysosomen mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) herausgearbeitet werden. Die DIGE Analysen ergaben, dass das Gesamtproteom der angereicherten Granula aus NKL und YTS zu einem Großteil übereinstimmt. Dennoch wurden reproduzierbar signifikante Unterschiede in 9-10% der analysierten Spots ermittelt. Der in Tabelle 5.3.1 dargestellte Wechsel der Farbstoffe beim Markieren der Proteine ermöglichte zudem, CyDye-spezifische Färbeartefakte auszuschließen. 2D-Gele sind in der Regel von individuellen Laufunterschieden geprägt, deshalb wurden zusätzlich nur die differentiell eingestuft Proteine betrachtet, die in drei unabhängigen Experimenten eine Änderung von mindestens dem 3-fachen Spotvolumen aufwiesen. Da das Interesse nicht nur auf diesen Spots lag, wurden aus den 8 Gelen (Tabelle 5.3.1) insgesamt rund 1000 gestanzte Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Besonders die differentiellen Proteine wurden mehrmals identifiziert, daher ergibt sich eine endgültige Anzahl von 397 Proteinspots, die durch Isoformen und verschiedenste Modifikationen 234 individuelle Proteine repräsentieren. Wie bereits erwähnt wurden 76,8% dieser Proteine bereits in anderen lysosomalen und sekretorischen Organellen identifiziert (Abb. 5.3.3 A). Funktionell verdeutlichen Hydrolasen auf der einen Seite, Speicher- und Transportproteine auf der anderen Seite, den bifunktionellen Charakter dieses einzigartigen Organells.

Direkte Vergleiche der korrespondierenden Fraktionen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen ergaben unter anderem Unterschiede in Proteinen, die für Antigenpräsentation und zytotoxische Effektorfunktion verantwortlich sind (Abb. 5.3.2). So enthielten SL aus NKL und NK-Zellen größere Mengen an Granzym A, aber sehr viel weniger Granzym B als Vesikel aus YTS-Zellen. Wie in der Einleitung erwähnt, ist Granzym B eine zytotoxische Effektorprotease, die Polypeptide nach Aspartat spaltet und durch Prozessierung von Caspase-3 Apoptose in der Zielzelle auslöst [165]. Im Vergleich dazu ist über Granzym A relativ wenig bekannt. Es kann jedoch im Gegensatz zu Granzym B Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen [166]. Das verstärkte Vorkommen von Granzym B einerseits und die geringere Expression von Granzym A in YTS im Vergleich zu NKL andererseits, konnte durch verschiedene Methoden verifiziert werden. Die intrazelluläre FACS-Färbung zeigte eine „relative“ Erhöhung von Granzym B um 53% gegenüber NKL (Abb. 5.3.8). Ein ähnliches Bild ergab sich aus Western Blot Analysen von Gesamtlysaten und aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. In Ergänzung dazu wurde mit diesen Methoden auch das verstärkte Vorkommen von Granzym A in NKL belegt (Abb. 5.3.9).

Als weitere zytotoxische Effektormoleküle wurden FasL und Perforin genaueren Analysen unterzogen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Western Blot Analysen ergaben eine deutlich geringere Menge dieser Proteine in den NKL-Zellen (Abb. 5.3.7). Für Perforin wurde dies mittels einer intrazellulären FACS-Färbung verifiziert. NKL ist aber trotz der offensichtlichen Reduktion verschiedener zytolytischer Effektorproteine sehr wohl in der Lage, effektiv Zielzellen zu töten [167,168]. YTS und expandierte NK-Zellen zeigten einen starken „zytotoxischen Phänotyp“, der neben FasL auch durch das verstärkte Vorkommen von Perforin gekennzeichnet war. Perforin ist ein Ca^{2+} -abhängiges Poren formendes Protein, dass an der Zytolyse der Zielzellen beteiligt ist [169].

Das erhöhte Vorkommen von MHC Klasse-II Molekülen in Vesikeln aus NKL-Zellen war überraschend, da NK-Zellen nicht zu den klassischen Antigen-präsentierenden Zellen gehören. MHC Klasse-II Proteine auf APZ präsentieren üblicherweise prozessierte Antigene den CD4^+ T-Zellen. Diese Funktion wurde jedoch kürzlich auch im Zusammenhang einer akzessorischen Antigenpräsentation bei aktivierten NK-Zellen beschrieben [170]. Die Lagerung von MHC Klasse-II Proteinen in sekretorischen Granula wurde auch für Mastzellen [171,172], Monozyten [35] und

auch auf Proteomebene für die NK-Zelllinie YTS beschrieben [163]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden α und β Ketten der MHC Klasse-II Proteine in YTS identifiziert, jedoch im Vergleich zu NKL jedoch in sehr geringen Mengen (Abb. 5.3.8). Intrazelluläre FACS Färbungen ergaben eine etwa 10-fach höhere Expression in NKL. Im Einklang damit steht auch die verstärkte Expression von Cathepsin S, einer lysosomalen Cysteinprotease, die durch Degradation der invarianten Kette der MHC Klasse-II Proteine deren Antigenpräsentation kontrolliert [141,173,174]. Diese starken Unterschiede in der Lagerung von MHC Klasse-II Proteinen spiegelten sich jedoch nicht in der Oberflächenexpression (Abb. 5.3.8 C) der beiden Zelllinien wieder. So konnten Hanna und Kollegen auch MHC Klasse-II Proteine in Proteomanalysen der Zellmembran von YTS und ebenfalls durchflußzytometrisch nachweisen [175].

Im Gegensatz zu den leukämischen NK-Zelllinien waren bei aktivierten und expandierten NK-Zellen weder in den DIGE-Analysen, noch in der intrazellulären FACS-Färbung MHC Klasse-II Proteine zu ermitteln. Dieser Befund steht teilweise im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hanna und Kollegen [170], die in weiteren Versuchen in PHA-aktivierten NK-Zellen aus dem peripheren Blut MHC Klasse-II Expression nachweisen konnten, die mit der Funktion als antigenpräsentierende Zellen korrelierte [176]. Jedoch wurde hierbei ein breiteres Spektrum der HLA Haplotypen durch anti-HLA DR/DP/DQ Antikörper abgedeckt. Eine *in vivo* Relevanz der Antigenpräsentation durch NK-Zellen lässt sich nur schwer untersuchen, da beispielsweise aktivierte, murine NK-Zellen nicht als antigenpräsentierende Zellen fungieren sollen [177,178]. Neue Befunde weisen darauf hin, dass im Menschen auch nur eine kleine Subpopulation von zirkulierenden NK-Zellen eine HLA-DR Expression aufweist [179].

Wie HLA-DR, zeigte auch Moesin eine 24-70-fache Erhöhung im Spotvolumen aus NKL Lysosomen im Vergleich zu YTS. Dieses Protein gehört zu der Familie der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteine, die als Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem Aktin-Zytoskelett oder assoziierten Vesikeln dienen [180-182]. Des Weiteren spielt Moesin eine wichtige Rolle bei der Bildung der immunologischen Synapse [183,184] und könnte so am Transport der lytischen Granula zur Effektor-Zielzell-Kontaktzone beteiligt sein.

Zu den differentiellen Proteinen gehörten auch zwei Mitglieder der Serin Protease Inhibitor (Serpine) Superfamilie. Eines davon, der 42 kDa Leukozyten Elastase

Inhibitor Serpin B1 oder auch MNEI genannt, inhibiert Cathepsin G in azurophilen Granula, welche die sekretorischen Vesikel der Neutrophilen darstellen [185]. Nach Freisetzung von Cathepsin G durch Neutrophile, ist diese Protease in der Lage, unter anderem an NK-Zellen zu binden [186]. Dort induziert Cathepsin G den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Durch die gesteigerte Degranulation erhöht sich auch die NK-Zell Zytotoxizität [187]. Es ist daher zu vermuten, dass Serpin B1 von den lytischen Vesikeln freigesetzt wird, um die NK-Zelle vor der Cathepsin G Protease-Aktivität zu schützen und eine weitere Stimulation zu verhindern.

Das zweite Mitglied dieser Serin Protease Superfamilie ist Serpin B9 oder PI-9. PI-9 ist der einzig bekannte intrazelluläre Inhibitor der Granzym B Aktivität [188] und der Granzym B vermittelten Apoptose [189]. PI-9 ist an der zytosolischen Seite der Membran Granzym B tragender-Vesikel von T- und NK-Zellen lokalisiert. Es schützt möglicherweise die Zellen vor der Selbstzerstörung, da Granzym B in den Vesikeln als aktive Form gespeichert wird [190]. Unkontrollierte Freisetzung von Granzym B aus Vesikeln oder aus der immunologischen Synapse könnte zum Tod der zytotoxischen Zelle führen [191]. Die verstärkte Expression von PI-9 in YTS-Zellen ist somit auch im Einklang mit dem verstärkten Vorkommen von Granzym B in diesen Zellen.

Ebenfalls wurde das β -Galaktosid-bindende Lektin Galectin-3 mit einem erhöhten Vorkommen in YTS mittels DIGE und Westen Blot Analysen identifiziert. Die Proteine dieser Lektin-Familie zeichnen sich durch ihre Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (CRD) aus, Galectin-3 besitzt zusätzlich noch eine Prolin- und Glycin-reiche N-terminale Domäne, wodurch es Oligomere bilden kann. Galectin-3 wurde in verschiedensten Zelltypen und Kompartimenten gefunden. Neben der intrazellulären Lokalisation im Zellkern und im Zytoplasma wurde auch eine Sekretion beschrieben [192]. Für Galectin-3 wurde eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen beschrieben. Welche dieser Funktionen in YTS-Zellen relevant ist, ist derzeit nur schwer einzuschätzen. Für Galectin-3 ist eine Bindung an die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und 2 beschrieben, was die Assoziation mit lytischen Granula erklären würde [193].

Neben diesen deutlichen Unterschieden zwischen den leukämischen Zelllinien, gab es auch einige Proteine, die mit einem verstärkten Vorkommen nur in aktivierten und expandierten NK-Zellen gefunden wurden. Hierzu gehörte auch eine Isoform des Cathepsin D. Diese Aspartatpeptidase [194] ist ein Hauptbestandteil lysosomaler Kompartimente und wurde in den NK-Zellen verstärkt in den Spots #65, 67 und 68

bei ca. 30 kDa (Abb. A1 im Anhang) identifiziert. Die 42 kDa Form von Cathepsin D kann unter reduzierenden Bedingungen in ein 30 und 14 kDa Fragment gespalten werden. Die Western Blot Analysen von Gesamtllysaten zeigten die 42 kDa Bande bei allen drei Zellen auf leicht unterschiedlicher Höhe, was an unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen in den einzelnen Zellen liegen könnte. Bei dem 30 kDa Fragment waren keine Migrationsunterschiede nachzuweisen. In den NK-Zellen war jedoch eine mögliche Doppelbande zu erkennen, die vermutlich zwei Isoformen des Cathepsin D repräsentiert. An diesem Beispiel lässt sich der Vorteil einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese bei der Detektion von unterschiedlichen Isoformen gut verdeutlichen.

6.2.4 Interleukin-16 wird von NK-Zellen exprimiert und mit FasL in lysosomalen Granula gespeichert

Interleukin-16 (IL-16) wurde sowohl im Proteom der Fraktion 2 aus T-, als auch NK-Zellen identifiziert. IL-16 war das erste Protein, für das eine chemotaktische Wirkung auf humane T-Zellen nachgewiesen wurde. Daher wurde es 1982 auch zunächst als „Lymphocyte chemoattractant factor“ (LCF) bezeichnet [195,196]. Es war bereits bekannt, dass IL-16 in T-Lymphozyten und bronchialen Epithelzellen zunächst als ein 631 AS großes Vorläufer-Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa synthetisiert wird [197]. Enzymatische Spaltung durch Caspase-3 an Serin 511 resultiert in einer 121 AS umfassenden, bioaktiven Form [198].

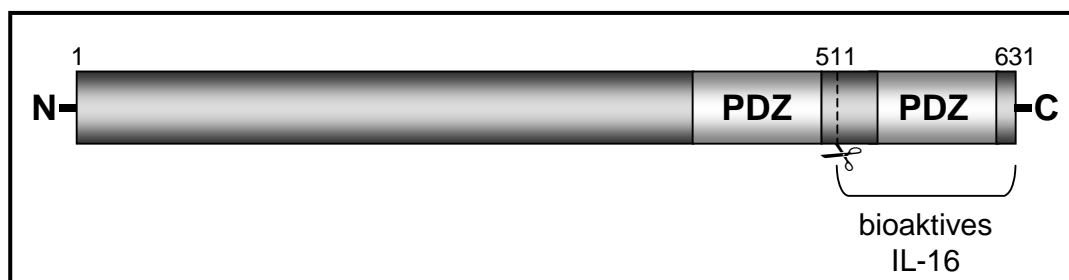


Abb. 6.1.1.: Schematische Darstellung des IL-16 Proteins. IL-16 beinhaltet zwei je 86 AS umspannende PDZ (Disc-large homology repeats) Domänen und kann durch Caspase-3 Spaltung in das bioaktive IL-16 transformiert werden.

Obwohl die Caspase-3-Aktivität hauptsächlich mit Apoptose in Verbindung steht, kann die Freisetzung von bioaktivem IL-16 auch ohne programmierten Zelltod stattfinden [199]. Über den Mechanismus der Freisetzung ist allerdings wenig bekannt, da sezerniertes IL-16 keine sekretorische Signalsequenz aufweist. CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, vier Stunden nach Stimulation mit Histamin oder Serotonin

IL-16 freizusetzen. Dies geschieht auch bei Inhibition der Proteinbiosynthese, was auf eine intrazelluläre Speicherung von IL-16 hindeutet [200]. Es wurde bereits gezeigt, dass in unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vergleichbare Mengen an pro-IL-16 vorliegen [201]. Dieser Befund konnte durch die hier vorliegende Arbeit bestätigt werden, da keine offensichtlichen Unterschiede zwischen naiven T-Zellen (E⁺) und stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisbar waren (Abb. 5.8.3). Obwohl die IL-16 Expression für viele Zelltypen, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, epitheliale Zellen [202], Eosinophile [203], Mastzellen [204], Dendritische Zellen [205] und synoviale Fibroblasten [206] gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit IL-16 erstmals in NK-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren konnte es auch in $\nu\delta 1^+$ und $\nu\delta 2^+$ T-Zellen immunbiochemisch ermittelt werden, wenn auch in vergleichsweise geringeren Mengen als in $\alpha\beta$ T-Zellen. Neben dem Nachweis von pro-IL-16 in NK-Zellen, wurde auch das bioaktive Fragment des IL-16 in vergleichbarer Menge wie bei CD8⁺ T-Zellen festgestellt. Für CD8⁺ T-Zellen, Eosinophile und Mastzellen konnte bereits eine Speicherung von aktivem IL-16 gezeigt werden [200, 203, 207]. Hierbei ist anzumerken, dass diese Zelltypen durch reife sekretorische Granula charakterisiert sind. CD4⁺ Zellen generieren sezernierbares IL-16 erst nach Stimulation durch Mitogene oder spezifische Antigene. Im Gegensatz zu CD8⁺ führte bei CD4⁺ T-Zellen eine Inhibition der Biosynthese auch zur Inhibition der IL-16 Sekretion [199]. In den hier untersuchten NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass pro-IL-16 bereits in nicht stimulierten CD56⁺/CD3⁻ Zellen vorlag. Nach Stimulation durch einen „Feeder-Cocktail“ und Entfernung desselbigen nach 5 Tagen konnte ein deutlicher Rückgang in der pro-IL-16 Expression verzeichnet werden. Anschließend (ab Tag 7) erfolgte ein stetiger Anstieg der Expression, was mit dem Verlauf der FasL-Expression korrelierte (Abb. 5.8.4). Diese Expressionskinetik von pro-IL-16 deckt sich mit den Ergebnissen von Chupp und Kollegen [201], die ebenfalls wie Wilson und Kollegen eine Prozessierung des pro-IL-16 nach T-Zell-Stimulation beobachteten [208].

Die Interaktion von IL-16 mit dem Signalrezeptor CD4 führt zu einer Signalkaskade, die neben der Migration der CD4⁺ Immunzellen auch eine Zellproliferation induziert [209]. Neben den konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimieren auch weitere periphere Immunzellen wie Monozyten [210], Eosinophile [211] und Dendritische Zellen [205] CD4 auf ihrer Oberfläche. Kürzlich konnte sogar gezeigt werden, dass eine NK-Zellsubpopulation aus dem Lymphknoten CD4 in relativ hohem Maße exprimiert und damit in der Lage ist, chemotaktisch in Richtung eines IL-16 Gradienten zu migrieren

[212]. Ein Beispiel für die Sekretion immunregulatorischer Zytokine ist die CD56^{bright} NK-Zellpopulation, die konstitutiv den hoch-affinen IL-2 Rezeptor und Zytokine (wie IFN- γ , TNF, GM-CSF, IL-10, IL-8) exprimieren. Diese CD56^{bright} NK-Zellen sind sowohl zu 5-10% im peripheren Blut [213], als auch in Lymphknoten vorhanden [214], wo sie in unmittelbarem Kontakt zu den IL-2 sezernierenden T-Zellen stehen. Basierend auf diesen Befunden und den hier gezeigten Ergebnissen, lassen sich die dynamischen Interaktionen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zeigen.

Neben der Expression von IL-16 in NK-Zellen konnte auch dessen Speicherung in FasL-reichen Granula gezeigt werden. Sowohl im Dichtegradienten (Abb. 5.8.5), als auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.8.6) korrelierte das Vorkommen von IL-16 mit dem von FasL und CD63 und damit mit einer Kolokalisation in sekretorischen Lysosomen. Als Negativkontrolle für die FasL bzw. IL-16 Färbung dienten die NK-Zelllinien NKL und YTS, die beide keine meßbaren Mengen an IL-16 aufwiesen. In T-Zellen wurde von Wilson und Kollegen auch ein „granuläres“ Vorkommen von IL-16 gezeigt, dieses jedoch nicht näher analysiert [208]. Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Arbeit IL-16 in T-Zellsubpopulationen und NK-Zellen nachgewiesen werden und auch eine Kolokalisation mit FasL und CD63 in sekretorischen Lysosomen gezeigt werden.

6.3 Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode der Proteomforschung. Neben dem Vorteil, einzelne Isoformen und/oder posttranslationale Modifikationen zu ermitteln, erhält man auch Informationen über den isoelektrischen Punkt und das Molekulargewicht des Proteins. Darin liegen aber auch die Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese. Auf einem 2D Gel kann nur eine begrenzte Anzahl an Proteinen dargestellt werden (hier ca. 2000). So fehlen vor allem Proteine, die sehr hohe (>200 kDa) oder geringe (<10 kDa) Molekulargewichte aufweisen. Ebenfalls entgehen extrem saure oder basische Proteine den Analysen. Das größte Problem stellt allerdings die Löslichkeit von sehr hydrophoben Proteinen dar, unter anderem also auch von membranständigen Molekülen. So ist es auch zu erklären, dass keines der membranständigen, lytischen Granulamarkerproteine (FasL, CD63, LAMP-1) im 2D Gel identifiziert werden konnte. Dennoch gab es auch Proteine, wie CD97, das trotz seiner 7 Transmembrandomänen [215] eindeutig im 2D Gel identifiziert werden konnte.

6.4 Proteomanalysen sekretorischer Granula (Fraktion 2) aus T-Zellsubpopulationen

Neben dem Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten auch das Proteom lytischer Vesikel aus T-Zellen bestimmt werden. Innerhalb der $\alpha\beta$ T-Zellen existieren $CD4^+$ und $CD8^+$ Subpopulationen. Dabei stellen $CD8^+$ Zellen die klassischen zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) dar, während die $CD4^+$ Zellen hauptsächlich immunregulatorische und Helferzell-Aufgaben (Zytokinfreisetzung) haben. Jedoch können auch $CD4^+$ T-Zellen unter *in vitro* Stimulation zytotoxische Effektorfunktionen übernehmen [2]. Derzeit wird angenommen, dass $CD4^+$ ZTL eher FasL-vermittelt und $CD8^+$ ZTL und NK-Zellen eher durch Granzym/Perforin zytotoxisch aktiv sind [216,217]. Neuere Befunde zeigten jedoch, dass auch $CD4^+$ ZTL unter bestimmten Stimulationsbedingungen (CD3/CD46) Granzym B exprimieren [218]. Die *in vivo* Relevanz der $CD4^+$ ZTL ist noch weitestgehend unbekannt, da sie nur 2% der $CD4^+$ Gesamtpopulation ausmachen sollen. Ihnen wird jedoch eine Rolle bei chronischen viralen Infektionen zugeschrieben [219].

Sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen entwickeln sekretorische Organellen, die nach Stimulation degranulieren [2,51]. Im Vergleich zu $CD8^+$ ZTL, bei denen die SL relativ gut charakterisiert sind, ist bei $CD4^+$ Zellen bis auf deren Existenz nicht viel bekannt [50]. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten, dass allostimulierte $CD4^+$ und $CD8^+$ ZTL erstaunlicherweise keine Unterschiede in der mRNA Expression zytolytischer Proteine (Granulysin, Granzym A+B, Perforin) zeigten [220]. Eine Aussage zu Expressionsunterschieden auf Proteinebene konnte hierbei aber nicht getroffen werden, da die lytischen Proteine in Granula gespeichert werden und so der Transkriptomanalyse entgehen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch vergleichende Proteomanalysen der sekretorischen Lysosomen umgangen. Zunächst wurde anhand von angereicherten SL aus $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen eine Proteomkarte erstellt. SL von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen wurden, analog zu NK-Zellen, über den FasL, CD63 und LAMP-1 definiert und in den Dichtegradientenfraktionen deutlich von anderen Organellen (z.B. Mitochondrien) getrennt (Abb. 5.4.2). Der Anteil Lysosomen- und Exozytose-assoziiierter Proteine in der Dichtegradientenfraktion 2 belief sich nach der bioinformatischen Analyse der Proteine im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation auf 68,2% (Abb. 5.4.4). Ebenfalls wurden die für

Lysosomen klassischen Cathepsine B, D, H und S und andere lysosomale Hydrolasen in der angereicherten Fraktion 2 gefunden [221].

6.4.1 Proteom FasL-reicher Granula (Fraktion 2)

Differentielle Proteomanalysen erfordern eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Probenvorbereitung und der zwei-dimensionalen Auftrennung. In initialen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung über die Dichtegradientenzentrifugation hoch reproduzierbar war. Auch vergleichende Analysen von Granula aus CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern zeigten ein sehr ähnliches Proteinmuster (>95% identisch, Abb. 5.2.1). Eventuelle spenderspezifische Expressionsprofile konnten durch die „biologische Variationsanalyse“ ausgeschlossen werden. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% konnten so subpopulationsspezifische und spenderunabhängige Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen nachgewiesen werden.

Unterschiede zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese zeigte Unterschiede im Proteinbesatz der sekretorischen (FasL-reichen) Granula der verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf. Der Vergleich von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellgranula aus vier verschiedenen Spendern ergab im Gegensatz zu den dargestellten Experimenten der NK-Zellen nur geringe Unterschiede. So beliefen sich die stärksten Änderungen auf das 2,2-fache Spotvolumen (Tab. 5.4.2). Neben Cathepsin B, welches eine Erhöhung in CD4⁺ T-Zellen aufwies, war auch Cathepsin H um das 1,8-fache verstärkt. Beide Proteine sind lysosomale Proteasen. Für Cathepsin B wurde eine schützende Rolle bei der Perforin-vermittelten Zytotoxizität beschrieben. Cathepsin B lagert sich an die Membran der degranulierten ZTL und schützt diese, indem es Perforin degradiert. Dieser Mechanismus würde auch erklären, warum ZTL beispielsweise andere ZTL töten können, ohne dabei selbst eliminiert zu werden [222].

Auf der anderen Seite war in CD8⁺ T-Zellen als einzige Munc18 Isoform Munc18-1 signifikant in allen Spendern erhöht. Dieses Protein bindet an Syntaxin 1 und vermittelt die Exozytose. Bisher wurde für Munc18-1 nur eine Funktion in neuronalen Synapsen beschrieben. Dagegen spielt Munc18-4, welches in keinem der untersuchten Proteome identifiziert werden konnte, eine Rolle in der Fusion zytolytischer Granula mit der Plasmamembran [121,144]. Die Bedeutung der

beschriebenen Unterschiede im Proteinbesatz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen könnte durch funktionelle Versuche zukünftig aufgeklärt werden.

Unterschiede zwischen v δ 1⁺ und v δ 2⁺ T-Zellen

Die v δ 1⁺ und v δ 2⁺ Subpopulationen der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten eine gewebsspezifische Verteilung im Organismus. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind v δ 2⁺ T-Zellen hauptsächlich im peripheren Blut und v δ 1⁺ T-Zellen in epithelialen Geweben vertreten [7]. Die biologischen Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen werden derzeit intensiv erforscht. Für beide Zelltypen konnten zytotoxische Eigenschaften beobachtet werden [223,224]. Die Analysen der lysischen Granula dieser beiden Subpopulationen aus je zwei Spendern zeigten ebenfalls Unterschiede im Proteinbesatz. Die Differenzen zwischen v δ 1⁺ und v δ 2⁺ T-Zellen (Tabelle 5.4.3) waren hierbei größer als beim Vergleich der $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen. Neben den bereits beschriebenen Cathepsinen B und H war auch Granzym A in v δ 2⁺ T-Zellen erhöht. Diese globuläre Serinprotease kann in der Zielzelle Apoptose auslösen und trägt somit zu den zytotoxischen Eigenschaften der $\gamma\delta$ T-Zellen bei. Auf der anderen Seite war das aktinbindende „Gelsolin like capping Protein“ in v δ 1⁺ T-Zellen erhöht. Dieses Kalzium-sensitive Protein kann Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett regulieren, indem es die Enden der Aktinfilamente blockiert. Eine mögliche funktionelle Bedeutung in v δ 1⁺ T-Zellen lässt sich ohne weitere Untersuchungen noch nicht zuordnen.

Unterschiede zwischen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

In diesen DIGE-Analysen wurden die Granula der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Granula der v δ 1⁺ T-Zellen verglichen. Von den 31 differentiellen Spots, die eine mehr als 3,5-fache Änderung im Spotvolumen aufwiesen, konnten 29 identifiziert werden. Der Anteil der verstärkt exprimierten Proteine in $\alpha\beta$ T-Zellen belief sich nur auf 4 von 31 Proteinspots (Tab. 5.4.6). Darunter war mit einer 4,7-fachen Änderung im Spotvolumen das Mikrotubuli-destabilisierende Stathmin 1 [147]. Sowohl Granzym A als auch B zeigten, wie auch MHC Klasse-II und das damit funktionell assoziierte Cathepsin S eine deutliche Erhöhung in der $\gamma\delta$ Zelllinie. Des Weiteren war auch Interleukin-25 (IL-25) um das 4,5-fache in diesen Zellen erhöht. IL-25 ist ein Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie und initiiert eine Typ 2 Immunantwort, indem es die Expression von Typ 2 Zytokinen wie IL-5 und IL-13 steuert [225]. Neueste

Ergebnisse zeigten, dass IL-25 die entzündungsfördernde Rolle von T_H17 Zellen bei Autoimmunerkrankungen supprimieren kann [226]. Bisher waren als IL-25 Produzenten nur T_H2 und Mastzellen beschrieben worden [227,228]. Jedoch konnte in den Proteomanalysen von Vesikeln aus $\alpha\beta$ Zellen, als auch besonders in $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen eine IL-25 Expression nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in den Reifungsstudien (siehe unten), dass die Proteinmenge von IL-25 in aktivierten Lymphozyten dreimal so hoch war, wie in naiven Lymphozyten. Dementsprechend könnte IL-25 auch von $\gamma\delta$ T-Zellen sezerniert werden, wie dies für aktivierte Mastzellen beschrieben wurde [228].

6.4.2 Relevante Proteine der FasL-Granula

Eine Erhöhung der Sensitivität in den massenspektrometrischen Analysen durch optimierte Probenpräparation ermöglichte auch Identifikationen von niedrig abundanten Proteinen und somit die Erstellung einer detaillierteren Proteomkarte der lysosomalen Granula aus T-Zellen. Auf einige funktionell relevante und bedeutende Proteine, die nicht bereits schon bei den NK-Zellen genauer beschrieben wurden, soll im Folgenden eingegangen werden (Tab. A2, Abb. A2).

Extended Synaptotagmin 1 (E-Syt1) wurde in den Spots Nr. 155 und 156 der Fraktion 2 aus T-Zellen identifiziert. Dieses Protein wurde erstmalig von Min und Kollegen im Jahr 2007 beschrieben [229]. E-Syt1 setzt sich aus einer N-terminalen Transmembranregion und fünf C-terminalen C₂-Domänen zusammen, von denen die erste Ca²⁺ in einem Phospholipid Komplex binden kann. Während die homologen Proteine E-Syt2 und E-Syt3 aus drei C₂-Domänen bestehen und in der Plasmamembran lokalisiert sind, ist E-Syt1 nur in vesikulären Strukturen zu finden, die jedoch bisher nicht weiter charakterisiert wurden. E-Syt1 könnte allerdings eine ähnliche Funktion ausüben wie das homologe Synaptotagmin VII. Dieses ist in lytischen Granula von ZTL lokalisiert und an der Regulation der Perforin-vermittelte Zytotoxizität beteiligt [44].

N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment Protein alpha (α -SNAP) wurde in den FasL-angereicherten Fraktionen der T- und NK-Zellen identifiziert (Spot Nr. 652 bzw. 262). SNAP- α ist ein Kofaktor, der im Komplex mit Syntaxinen und VAMPs (vesicle associated membrane protein) eine Bindung an membranständige SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor) Proteine ermöglicht und so bei humanen Thrombozyten die Sekretion der

Granula vermittelt [230]. α -SNAP bindet dabei direkt an Syntaxin und aktiviert NSF, welches auch in den hier vorliegenden Ergebnissen identifiziert wurde. Bei Mutation von α -SNAP geht die Bindung verloren und die stimulierte Exozytose wird verhindert [231]. Die Bedeutung dieser exozytotischen Maschinerie konnte bereits für sekretorische Granula von Thrombozyten und Mastzellen gezeigt werden [230,232,233].

Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV, CD26) wurde in den Spots # 67, 77, 81 und # 83-88 identifiziert und ist ein evolutionär hoch konserviertes Typ II Transmembran-Glykoprotein, das in der Regel als Homodimer mit einer molekularen Masse von 220-240 kDa auftritt [234,235]. Funktionell ist neben der Peptidase-Aktivität und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix auch eine kostimulatorische Aktivität in T-Zellen beschrieben [236,237]. Außer in T-Zellen, wurde CD26 auch in aktivierten B und NK-Zellen nachgewiesen [238]. Bis zu 70% der peripheren Blutlymphozyten exprimieren CD26 [239]. Im Thymus ist die höchste Expressionsrate bei vollständig differenzierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zu beobachten [240]. Es wurde auch gezeigt, dass eine irreversible, spezifische Inhibition von CD26 die Proliferation und Zytokinproduktion von Mitogen-stimulierten, humanen PBMZ supprimiert [241,242]. Der natürliche Ligand für CD26 ist noch nicht bekannt.

Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass sich DPPIV in mindestens 9 Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten und einem mittleren Molekulargewicht von 120 kDa darstellt (Abb. A2 A). Kähne und Kollegen [243] haben ebenfalls bei Mitogen-aktivierten T-Lymphozyten bis zu 11 Isoformen identifiziert, die im pH Bereich 3,5-5,9 migrierten. Interessanterweise änderte sich bei isolierten Membranen durch Aktivierung das Expressionsmuster. Bei diesen Versuchen wurde jedoch kein Unterschied zwischen der äußeren Plasmamembran und intrazellulären Membranen gemacht. Neben der Lokalisation in der Plasmamembran, ist auch ein Vorkommen von DPPIV in lysosomalen Membranen von Ratten-Hepatozyten [122,244] und sekretorischen Organellen von Langerhans-Zellen [245] und der NK-Zelllinie YTS beschrieben worden [163]. Kyouden und Kollegen [244] stellten des Weiteren fest, dass die Kohlenhydratketten und der Großteil des Proteins ins Lumen der Lysosomen orientiert waren. Die Lokalisation von DPPIV in sekretorischen Granula von T-Lymphozyten wurde nach den derzeit verfügbaren Informationen noch nicht gezeigt.

Es konnte hier gezeigt werden, dass DPPIV in isolierten FasL, LAMP-1 und CD63 angereicherten Granula aus naiven E⁺ Lymphozyten nur in geringen Mengen

vorhanden war. Nach Aktivierung und Expansion für 14 Tage wurde eine 2,7-5,3-fache Erhöhung festgestellt. Dieses Ergebnis konnte auch in Western Blot Analysen bestätigt werden (Abb. 5.7.5). Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass DPPIV hauptsächlich in FasL-tragenden Granula angereichert war (Abb. 5.7.5). Der Vergleich verschiedener T-Zellsubpopulationen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen PHA-Blasten oder expandierten CD4⁺, CD8⁺ bzw. $\nu\delta 1^+$ T-Zellen, jedoch war DPPIV in $\nu\delta 2^+$ T-Zellen im Vergleich zu $\nu\delta 1^+$ T-Zellen um das 2,9-3,2 fache erhöht. Ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Expression von DPPIV in den Lysosomen der T-Zellen und der Expressionskinetik von CD26 auf der Plasmamembran nach Aktivierung ist nahe liegend, muss aber durch weitere Versuche bestätigt werden.

Eine Auswahl funktionell bedeutender Proteine, die in den Proteomanalysen der Fraktion 2 gefunden wurden ist in dem folgenden Modell dargestellt (Abb. 6.4.1). Die dargestellten möglichen Interaktionen mit dem Zytoskelett beruhen auf den Befunden der Literatur [246-248].

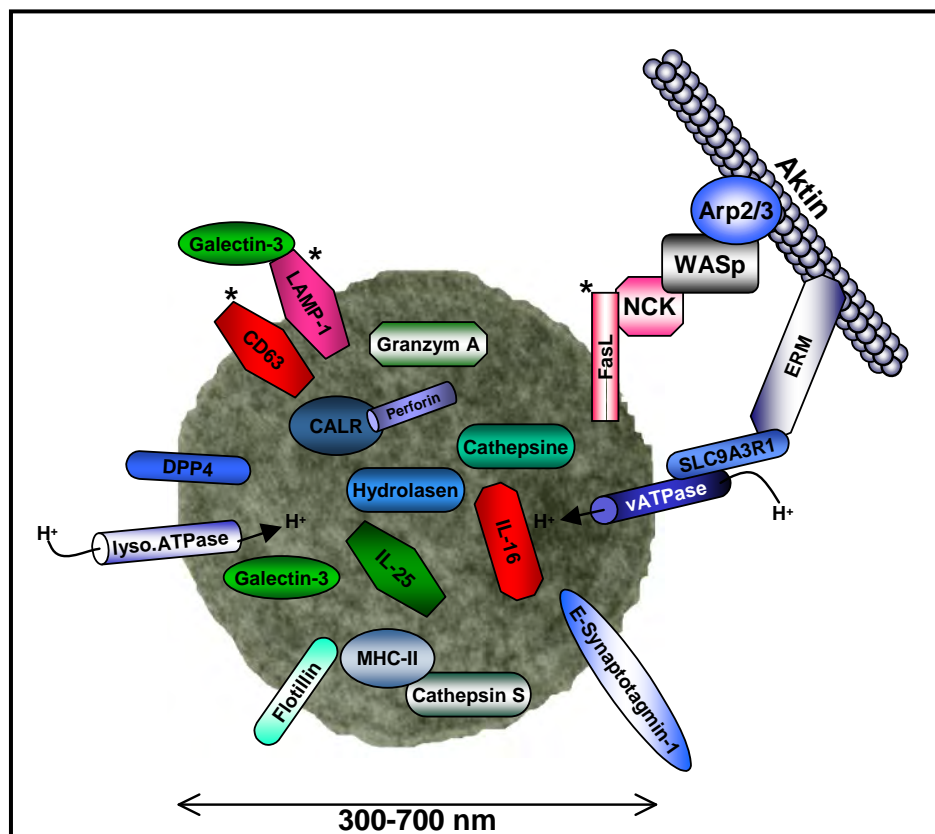


Abb. 6.4.1: Hypothetisches Modell der sekretorischen Lysosomen aus Fraktion 2. Das vereinfachte Modell basiert auf den Befunden aus den Proteom- und Western Blot (*) Analysen der Dichtegradientenfraktion 2. Es sind vor allem funktionell bedeutende Proteine dargestellt, wobei laut Literatur interagierende Proteine sich überlappen. Abkürzungen für Proteine lauten wie folgt: DPP4, Dipeptidylpeptidase IV; SLC9A3R1, Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory factor 1; WASP, Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein; Arp 2/3, Actin related protein 2/3; vATPase, vakuoläre ATPase 56 kDa; CALR, Calreticulin; ERM Ezrin/Radixin/Moesin.

6.5 Das Proteom Perforin/Granzym B-reicher Granula (Frakt. 6)

Das bestehende Modell für die FasL-vermittelte Zytotoxizität beschreibt dessen Akkumulation in aktivierten T-Zellen in granulären Strukturen. Ausserdem soll FasL unabhängig von der Proteinneusynthese nach Restimulation freigesetzt werden [51,97,249]. Diese FasL tragenden Granula wurden als „sekretorische Lysosomen“ bezeichnet. In ihnen kolokalisiert der FasL mit LAMP-1, CD63, Perforin und Granzymen [51,97]. In eigenen fluoreszenzmikroskopischen Versuchen konnte eine nahezu vollständige Kolokalisation von FasL mit CD63 und Granzymen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich bei der Vesikelanreicherung im Dichtegradienten eine andere Verteilung dieser Proteine. So wurde FasL zusammen mit CD63 und LAMP-1 in der weniger dichten Fraktion 2 und Granzym B hauptsächlich in der sehr dichten Fraktion 6 angereichert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten sehr elektronendichte Granula von etwa 300 nm Größe. Neben der Anreicherung von Granzym B und Perforin wurde auch die reife Form (9 kDa) des **Granulysins** festgestellt. Wie erwähnt kann Granulysin neben verschiedenen Bakterien und Pilzen auch andere Pathogene wie *Plasmodium falciparum* und Mykobakterien lysieren [92,250,251]. Besonders interessant ist der Befund, dass $\nu\gamma 9/\nu\delta 2$ T-Lymphozyten in der Lage sind, intrazelluläre *M. tuberculosis* Bakterien durch granuläre Exozytose von Granulysin zu töten [252]. Die zytotoxische Aktivität des Granulysins bildet sich erst durch posttranslationale Prozessierung am N- als auch am C-Terminus, wofür eine Ansäuerung der Granulysin tragenden Granula notwendig ist [253]. Hierdurch entsteht aus der 15 kDa Vorform das aktive 9 kDa Granulysin [88]. Die Analysen der Dichtegradientenfraktionen ergaben, dass in FasL-reichen Granula beide Proteinformen zu finden waren. Dagegen dominierte die lytisch aktive 9 kDa Form in der Fraktion 6, zusammen mit Perforin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Perforin die lytische Aktivität von Granulysin steigern kann [254]. Die Verteilung der zwei Reifungsformen des Granulysins war nicht nur bei PHA-Blasten (Abb. 5.1.2), sondern bei allen untersuchten T-Zellsubpopulationen festzustellen (Abb. 5.5.1). Des Weiteren ergaben mikroskopische Aufnahmen eine nahezu 100%-ige Kolokalisation von Granulysin mit den Granzymen A und B in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Hierbei konnte jedoch nicht zwischen den beiden Proteinformen unterschieden werden. Da diese Ergebnisse teilweise eine Diskrepanz zum bestehenden Modell der FasL-Kolokalisation mit lytischen Proteinen im selben Organell darstellten, sollte eine detaillierte Proteomanalyse der Fraktion 6 Aufschluss über deren Proteinbesatz geben. Im Vergleich zur Fraktion 2 aus demselben Dichtegradienten ergab sich ein

sehr unterschiedliches Proteinmuster auf dem 2D-Gel (Abb. 5.5.6). Trotz der Nähe zu den angereicherten Mitochondrien im Dichtegradienten, konnten 50% der Proteine einer bereits beschriebenen, lysosomalen oder sekretorischen Lokalisation zugeordnet werden (Abb. 5.5.7). Neben den sekretorischen Komponenten wie Granzym A / B und Perforin wurden auch viele lysosomale Proteasen identifiziert und dies, obwohl in dieser Fraktion LAMP-1 und CD63 im Western Blot kaum nachgewiesen werden konnten (Abb. 5.1.2). Neben verschiedenen lysosomalen Hydrolasen in der Fraktion 6, weckte die Dipetidylpeptidase II (DPPII) besonderes Interesse.

Die **Dipeptidylpeptidase II** (DPPII, DPP7, QPP) [255] ist wie auch DPPIV eine glykosylierte Protease, die nach X-Prolin schneidet. Sie wurde erstmals 1966 von McDonald und Kollegen beschrieben [256]. Obwohl die eigentliche physiologische Rolle von DPPII noch weitgehend unbekannt ist, wurden verschiedene Funktionen vorgeschlagen. So scheint das Protein in Zelldifferenzierung, Schutz vor Apoptose und Degradation von Kollagen, Myofibrillen und kurzen Neuropeptiden involviert [257]. Im Gegensatz zu DPPIV, die sowohl in der Plasmamembran als auch in Lysosomen lokalisiert ist, befindet sich DPPII exklusiv in lysosomalen Organellen [258-260]. In Mastzellen wurde DPPII auch in sekretorischen Granula gefunden [261]. Hier kann es durch induzierte Exozytose auch extrazelluläre Funktionen übernehmen. DPPII wurde in 60-80% humaner Lymphozyten nachgewiesen, jedoch wurde im Gegensatz zu DPPIV keine Steigerung der Proteinmenge nach Stimulation z.B. in T-Zelllinien beobachtet [262]. Interessanterweise konnten in Jurkat T-Zellen DPPII-reiche Vesikel identifiziert werden, die eine höhere Dichte als LAMP-1 tragende Organellen aufwiesen und nicht zum trans-Golgi Netzwerk (TGN) gehörten. Des Weiteren zeigte der Proteinase K Verdau eine Lokalisation innerhalb dieser Vesikel, die nach Ca^{2+} -Freisetzung das funktionell aktive DPPII sezernieren [263]. In der vorliegenden Arbeit wurde DPPII ebenfalls nur in den elektronendichten Granzym B^+ / LAMP-1 $^-$ / CD63 $^-$ Vesikeln (Fraktion 6) von expandierten Lymphozyten identifiziert (Spot #206) (Anhang: Tab. A3, Abb. A3). Da es sich in den 2D-Analysen als ein niedrig abundantes Protein darstellte, bedarf der Nachweis einer Anreicherung in Fraktion 6 einer immunbiochemischen Verifizierung.

Neben DPPII wurden auch Perforin und Granzym B in größeren Mengen in Fraktion 6 identifiziert. Diese Proteine werden ebenfalls nach Ca^{2+} -Freisetzung sezerniert [264]. Diese Befunde deuteten an, dass es sich um zwei distinkte Organellenpopulationen handelt, die auch in unterschiedlicher Abhängigkeit vom

Ca²⁺-Signal degranulieren und einen unterschiedlichen Besatz an zytotoxischen Effektorproteinen speichern bzw. transportieren.

Der Vergleich zwischen der Fraktion 2 und 6 ergab auch erhebliche Unterschiede im Proteinbesatz Zytoskelett-assoziiierter Proteine. Während β -Aktin und Aktin-interagierende Proteine verstärkt in der Fraktion 2 auftraten, wurde in Fraktion 6 vor allem **Myosin IIA** (#62,63) und Myosin light chain (#615) nachgewiesen. Andzelm und Kollegen zeigten, dass gezielte Inhibition von Myosin IIA (Myosin 9) zur Blockierung der Granzym B Sekretion und somit zur Verminderung der Zytotoxizität von NK-Zellen führte. Dabei waren von der Inhibition weder die Zielzellkonjugation, noch die Aktin-Ringbildung (pSMAC) an der immunologischen Synapse oder die Reorganisation des MTOC und die FasL-Freisetzung betroffen [102]. Auf der anderen Seite zeigten Ostergaard und Kollegen [105] sowie Befunde der eigenen Arbeitsgruppe [265], dass die FasL-Freisetzung in zwei Wellen erfolgt. Hierbei ist die erste Welle (10-15 min) auf der Aktin-abhängigen und Mikrotubuli-unabhängigen Exozytose gespeicherten FasL zurückzuführen, während die zweite Welle (nach 2 h) auf der *de novo* Synthese des FasL beruht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die schnelle Freisetzung von gespeichertem FasL Ca²⁺-unabhängig verläuft, wohingegen die Expression von neu synthetisiertem FasL Ca²⁺-abhängig ist [105]. Die Konzentration an Ca²⁺ ist dabei von der Stärke des TZR Signals abhängig [266,267]. So konnte in zwei unabhängigen Studien eine FasL Freisetzung bei schwachem und eine FasL *de novo* Synthese und Degranulation (Granzym A Freisetzung) bei starkem TZR Signal gezeigt werden [106,107].

Diese Daten stützen ebenfalls die Hypothese, dass FasL in distinkten Granula gespeichert und auch freigesetzt wird. Wie in Abb. 5.4.2 A dargestellt, befinden sich Granzym B und Perforin in CD8⁺ ZTL zum Teil in dichteren Fraktionen als FasL. Dieser Unterschied ließ sich allerdings nicht in der konfokalen Mikroskopie nachweisen, da eine Auflösung dieser feinen Strukturen nicht möglich war. Ostergaard und Kollegen konnten jedoch keine Kolo-kalisation von FasL mit Perforin und Granzym B in murinen ZTL feststellen. Allerdings waren auch Cathepsin D und LAMP-1 nicht in den FasL Granula zu finden. Dies steht eindeutig im Gegensatz zu den Befunden der eigenen Arbeitsgruppe und auch den Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Dieser Widerspruch könnte auf spe-zies- und/oder aktivierungsspezifische Unterschiede zurückzuführen sein oder aber auf unterschiedliche Interpretationen der mikroskopischen Aufnahmen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kassahn und Kollegen wurde ebenfalls mit Mauszellen

durchgeführt. Auch hier konnte eine Ca^{2+} -unabhängige Oberflächentranslokation des FasL gezeigt werden. Latrunculin B, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation blockierte den Transport des FasL zur immunologischen Synapse [108]. Befunde der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass das Adapterprotein NCK den FasL bindet und mit WASP verknüpft [246]. WASP ist wiederum ein Aktivator der Aktinpolymerisation [268]. Sowohl WASP, als auch NCK wurden in den Proteomanalysen der Fraktion 2, jedoch nicht in der Fraktion 6 gefunden. Dies könnte auf einen exklusiven Transportmechanismus für FasL Granula hindeuten, der unabhängig von einer Perforin/Granzym B Degranulation verläuft.

Die Hypothese einer unterschiedlichen Assoziation mit dem Zytoskelett wird auch durch die verstärkt in Fraktion 2 auftretenden Proteine, **β -Aktin** und **α -Aktinin 4** gestützt (Abb. 5.5.8 B). α -Aktinin-4 bündelt Aktin und trägt somit unter anderem zur Regulation der durch das Aktinzytoskelett vermittelten Exozytose bei [269]. **Cathepsin W** (oder Lymphopain) war ein weiteres Protein, welches ein exklusives Vorkommen in den elektronendichten Organellen aufwies (Abb. 5.5.8 A). Cathepsin W ist eine putative Cysteinprotease mit unbekannter Funktion, deren Expression auf NK-Zellen und CD8^+ ZTL begrenzt ist. Obwohl Cathepsin W in diesen potenten, zytotoxischen Zellen bei Zielzellkontakt sezerniert wird, ist die Protease anscheinend für die Eliminierung der Zielzellen nicht essentiell [270].

In der nachfolgenden Abbildung ist ein vereinfachtes, hypothetisches Modell zu diesem außergewöhnlichen Organell dargestellt (Abb. 6.5.1).

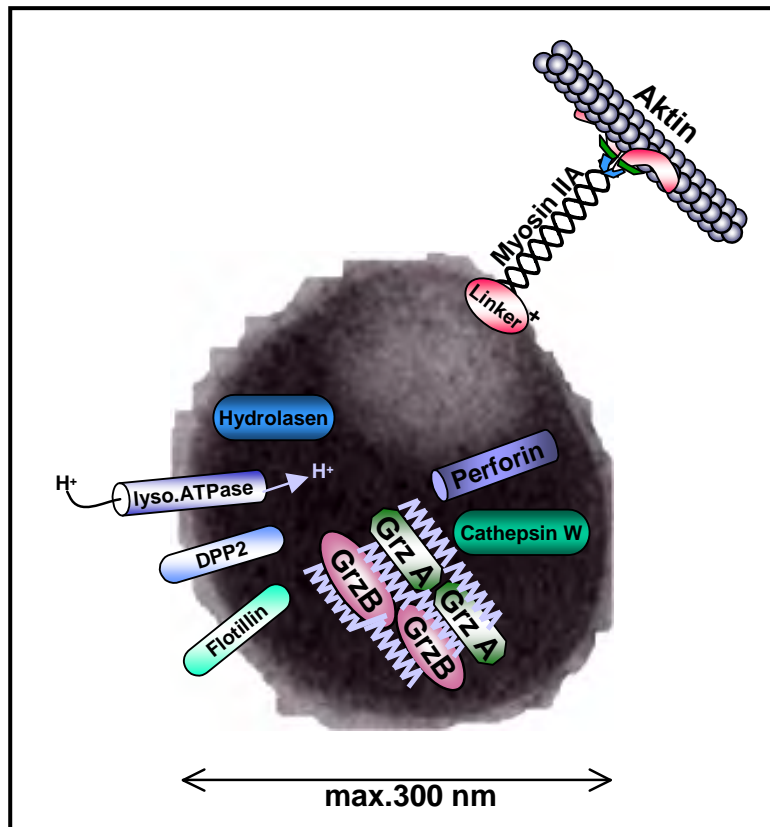


Abb. 6.5.1: Modell zur Fraktion 6 in einer vereinfachten Darstellung. Die Proteomanalyse der elektronendichten Vesikel zeigte einige Proteine auf, die ebenfalls in den FasL-reichen Vesikeln identifiziert wurden (Flotillin, lysosomale ATPase, Hydrolasen). Jedoch wurde bei einigen Proteinen ein nahezu exklusives Vorkommen in diesen Granula nachgewiesen. Hierzu zählten: DPP2, Granzym B, Perforin, Cathepsin W, Myosin IIA. Ein potentielles Verbindungsprotein zwischen der Vesikelmembran und Myosin IIA ist als Linker dargestellt (+).

6.6 Die Reifung sekretorischer Lysosomen

6.6.1 Expression zytolytischer Proteine in Lymphozyten und deren Subpopulationen

Die Aktivierung ruhender T-Lymphozyten erfolgt durch die Stimulation über den TZR und kostimulatorische Moleküle (z.B. CD28). Ruhende T-Lymphozyten sind klein (ca. 5 μm) und rund und besitzen nur wenig Zytoplasma und Organellen. Einige Stunden bis Tage nach Aktivierung transformieren sie zu größeren „Blasten“, einhergehend mit der Ausdehnung des Zytoplasmas. Neben der Initiation der Zellteilung, erfolgt auch die Ausbildung und Reifung sekretorischer Lysosomen. Ein erneute Erkennung über den TZR führt neben der bereits beschriebenen Degranulation der zytolytischen Granula auch zur erneuten Aktivierung und der damit verbundenen Proteinsynthese und Organellenreifung. Ohne eine erneute Aktivierung ähneln die T-Lymphozyten phänotypisch nach ungefähr 28 Tagen wieder unstimulierten Zellen [271].

Während der Reifung der Lysomen erfolgt eine Akkumulation lysosomaler Proteine (wie z.B. LAMP-1 und β -Glukoronidase) in elektronendichten Strukturen. Zur Biogenese lytischer Proteine und der damit verbundenen Zytotoxizität gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten. So zeigte eine mit murinen ZTL durchgeführte Studie ein Maximum in der zytolytischen Aktivität bereits 36-42 Stunden nach Aktivierung [2]. Dagegen wurde bei einem humanen CD8⁺ ZTL Klon das Maximum erst nach 10 Tagen bestimmt [271]. Wie bereits in eigenen Proteomanalysen für NK-Zellen gezeigt werden konnte, spiegeln Modellzelllinien nicht immer den Gehalt vieler zytotoxischer Proteine in normalen (nicht maligne transformierten) Zellen wieder [272]. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Reifung der sekretorischen Lysosomen auf Proteomebene verfolgt.

In initialen Experimenten konnte die Kinetik der Expression von zytolytischen Proteinen, wie FasL, Perforin und Granulysin bei PHA-Blasten durch Western Blot Analysen beobachtet werden. Hierbei war insgesamt eine Steigerung der Expression der genannten Proteine zu verzeichnen, wobei FasL die geringste Änderung zeigte (Abb. 5.6.1.A). Diese Ergebnisse deckten sich mit den Befunden aus aktivierten Maussplenozyten [148]. Bei diesen Experimenten wurde jedoch außer Acht gelassen, dass die Lymphozytensubpopulationen möglicherweise unterschiedlich expandieren. Bei gleichzeitiger Probenentnahme aus der Alloantigen-stimulierten Zellkultur konnte in der vorliegenden Arbeit in FACS-Analysen eine Erhöhung der CD8⁺ Population um 50% und eine deutliche Reduktion der CD4⁺ Population festgestellt werden (Abb.5.6.1 B). Des Weiteren wurde auch eine signifikante Erhöhung (~3-fach) von NKT-Zellen ermittelt, die sowohl den NK-Zellmarker CD56, als auch CD3 tragen. Die Verschiebung im Lymphozytenverhältnis konnte reproduzierbar bei vier verschiedenen Spendern beobachtet werden.

Es stellte sich die Frage, inwieweit diese Änderung der Subpopulationen einen Einfluss auf die Expression der zytolytischen Moleküle hatte. Um diese Frage zu beantworten, wurden in einem nächsten Schritt die einzelnen Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺, NK) isoliert betrachtet. Durch negative Selektion wurde ein möglicher stimulatorischer Effekt durch die Isolierung ausgeschlossen. Die Analyse individueller zytotoxischer Proteine in separierten Subpopulationen ergab in der Tat ein differentielles Muster. So zeigten CD8⁺ T-Zellen direkt nach der Isolation aus PBMZ die stärkste Perforinexpression, die im Vergleich zu naiven CD4⁺ T-Zellen ebenfalls deutlich erhöht schien (Abb. 5.6.2 B). Ähnliche Befunde wurden auch von Ortaldo et al. berichtet [273]. Dieser Pool an Perforin scheint sowohl in CD8⁺ T-Zellen als

auch in NK-Zellen zurückzugehen, um dann ab Tag 11 nach Stimulation aufgefüllt zu werden. Selbst nach 18 Tagen Zellkultur wurde das Ausgangsniveau jedoch nicht wieder erreicht. Einen ähnlichen Verlauf zeigte auch Granulysin. Dieses ebenfalls zytolytische Protein war in großen Mengen in naiven CD8⁺ T-Zellen vorhanden und wies, nach Rückgang auf ein nicht mehr meßbares Level, erst ab Tag 11 eine Zunahme auf. Der Rückgang dieser beiden lytischen Proteine deutet auf eine initiale Degranulation der lytischen Granula hin. Erstaunlicherweise korrelierte die Kinetik von Granzym B nicht mit dem beschriebenen Verlauf. Das Maximum der Expression wurde an Tag 4 nach Primärstimulation verzeichnet. Diese Kinetik war reproduzierbar in isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von vier untersuchten Spendern (Abb. 5.6.3) und deutet auf eine Speicherung von Granulysin und Perforin in zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen hin, während die Expression von Granzym B erst nach Aktivierung hochreguliert wird. Eine mögliche substituierende Rolle durch Granzym A wurde nicht untersucht. NK-Zellen zeigten ein ähnliches Expressionsprofil, jedoch war hier das Expressionsmaximum von Granzym B zu einem noch späteren Zeitpunkt (Tag 17).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die klassischen zytotoxischen Zellen (NK- und CD8⁺) bereits große Mengen lytischer Proteine wie Perforin, FasL und Granulysin enthalten, jedoch Granzym B erst nach Aktivierung oder „Priming“ (bei NK-Zellen) hochreguliert wird. Es ist allerdings zu beachten, dass die Expression zytotoxischer Effektorproteine keineswegs mit der zytolytischen Kapazität der Zellen einhergehen muss. In murinen Milzzellen aus denen nach TZR-Aktivierung CD8⁺ T-Zellen isoliert wurden, konnte ein Expressionsmaximum von Perforin und Granzym B nach 16-42 Stunden beobachtet werden, während in naiven CD8⁺ T-Zellen keine Detektion möglich war [2]. Diese Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch den unterschiedlichen Reife/Aktivierungszustand der ZTL in Milz und Blut erklären.

6.6.2 Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula

Die Biogenese sekretorischer Granula wurde bisher nur auf morphologischer und funktioneller Ebene verfolgt [271,274]. Dies wahrscheinlich nicht zuletzt, weil Proteomanalysen subzellulärer Fraktionierungen eine ausreichende Menge an Probenmaterial erfordern. So war es in der vorliegenden Arbeit notwendig, isolierte Lymphozyten aus vier verschiedenen Spendern zu vereinen, um eine entsprechende subzelluläre Fraktionierung durchzuführen zu können. Nach der Literaturlage und aufgrund der eigenen Reifungsstudien wurden diese ruhende Zellen mit 14 Tage

expandierte Lymphozyten (PHA-Blasten) verglichen. Bereits die initiale Analyse der subzellulären Fraktionen zeigte eine deutliche Zunahme der Perforinexpression, während die FasL-Expression kaum beeinflusst war (Abb. 5.6.1 A). Dieser Befund bestätigte die dargestellten Western Blot Ergebnisse (Abb. 5.7.2). Nachfolgend wurden nun in DIGE Experimenten die Fraktion 2 bzw. 6 von unstimulierten mit stimulierten Lymphozyten miteinander verglichen.

Die Reifung der FasL-tragenden Granula

Der direkte Vergleich der Fraktionen 2 in DIGE Experimenten ergab ein differentielles Proteinprofil zwischen den Granula aus naiven und aktivierten Zellen (Abb. 5.7.3). Zu den Proteinen, die erst in aktivierten Zellen zu beobachten waren, gehörten unter anderem: Die v-Typ Protonen ATPase, die Protonen in das Lumen der Lysosomen transportiert und somit eine Ansäuerung bewirkt; MHC Klasse-II Komplexe und das funktionell assoziierte Cathepsin S; Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) und Interleukin-25, deren Funktionen bereits oben beschrieben wurden und schließlich Granzym A, welches ebenfalls eine deutliche Erhöhung in den gereiften Granula zeigte (Abb. 5.7.4). Für VDAC-1 (voltage dependent anion channel 1) wurde sowohl eine Lokalisation in der äußeren Mitochondrienmembran [275], als auch in synaptischen Vesikeln des Rattenhirns beschrieben [276]. Die Änderungen im Spotvolumen sind somit schwierig zu interpretieren. Auf der anderen Seite waren Annexin A1, der intrazelluläre Chloridkanal 1 und der ARP 2/3 Komplex in den naiven Zellen deutlich erhöht. Die Verringerung der Expression des Anionenkanals steht wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit der Ansäuerung des Lysosoms. Der ARP 2/3 Komplex ist an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Annexin A1 gehört zur Gruppe der Kalzium- und Phospholipid-bindenden Annexin Superfamilie und wurde bereits in anderen exozytotischen Vesikeln nachgewiesen [277]. Funktionell, scheint Annexin A1 eine Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu spielen [278]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand der Änderung des Proteinprofils sowohl die funktionell wichtige Ansäuerung, als auch die Beladung mit immunmodulatorischen (MHC Klasse-II Komplexe, IL-25) und zytotoxischen Effektormolekülen (Granzym A) beobachtet werden konnte.

Die Reifung der Granzym B-tragenden Granula

Wie sich in den oben beschriebenen Analysen der Gradientenfractionen herausstellte, war in der Fraktion 6 von aktivierten und expandierten Zellen das stärkste Vorkommen an Granzym B und Perforin zu verzeichnen (Abb. 5.5.1). Diese Ergebnisse deckten sich mit den DIGE Analysen zur Reifung dieser Vesikel. Während in Organellen aus naiven Lymphozyten noch kein Granzym B und Perforin festgestellt werden konnte, wiesen die Granula der expandierten Zellen große Mengen dieser Proteine auf (Abb. 5.7.7). Ebenfalls war auch das bereits erwähnte Myosin IIA deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu war beispielsweise Septin 2 in den gereiften Granula nicht mehr nachweisbar. Septine sind zytosolische GTPasen und wichtig für die Zytokinese und Exozytose [279]. Es konnte gezeigt werden, dass Septin 2 direkt an Myosin IIA bindet und hierbei für die volle Aktivierung von Myosin IIA in sich teilenden Zellen verantwortlich ist [280]. Eine Rolle von Septin 2 in der Exozytose wurde noch nicht beschrieben, allerdings kann das 60% homologe Septin 5 kompetitiv zu α -SNAP exozytotisch relevante Syntaxine binden und dadurch die Exozytose inhibieren [281].

In dieser Fraktion konnte ebenfalls eine Beladung der Granula mit zytotoxischen Proteinen beobachtet werden, jedoch wurden im Gegensatz zur Fraktion 2 nicht nur Granzym A, sondern auch Granzym B und Perforin in größeren Mengen als in unstimulierten Zellen nachgewiesen.

7. Zusammenfassung

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) sind in der Lage entartete und virusinfizierte Zellen gezielt zu eliminieren. Hierzu werden zytolytische Moleküle in spezialisierten bifunktionellen Granula gespeichert. Diese zytotoxischen Granula vereinen degradative Eigenschaften konventioneller Lysosomen mit sekretorischen Funktionen und werden deshalb als sekretorische Lysosomen bezeichnet. Für die Proteomanalysen sekretorischer Lysosomen war es notwendig ein Protokoll zur Anreicherung intakter Vesikel zu etablieren. Separierte Organellen konnten anhand von Markerproteinen individuellen Fraktionen zugeordnet werden. Zur vergleichenden Proteomanalyse der lysosomalen Fraktionen wurde eine Plattform für zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) etabliert, die eine robotergestützte Probenvorbereitung und -prozessierung für die folgende massenspektrometrische Identifizierung individueller Proteine erlaubte. Die massenspektrometrischen Analysen wurden in enger Kooperation mit Dr. Christoph Gelhaus in der Abteilung Zoophysiology des Zoologischen Instituts der CAU (Leitung von Prof. Dr. Matthias Leippe) durchgeführt.

Die erarbeitete Methodologie wurde zunächst an polyklonalen T-Zellsubpopulationen verschiedener Spender validiert. In der Folge wurde eine Proteomkarte angereicherter sekretorischer Lysosomen aus NK-Zelllinien (NKL, YTS) und primären NK-Zellen erstellt. Hierbei wurden 397 Proteine identifiziert. Über 2D-DIGE identifizierte Unterschiede im Expressionsprofil einzelner funktionell relevanter Proteine in leukämischen und nicht transformierten NK-Zellen wurden mit biochemischen, mikroskopischen und durchflußzytometrischen Methoden verifiziert. Darüber hinaus wurde erstmalig das Chemokin Interleukin-16 in primären NK-Zellen (nicht aber in leukämischen Zelllinien) nachgewiesen.

Anschließend wurde das Proteom von sekretorischen Lysosomen aus T-Lymphozyten analysiert. Es wurde eine Proteomkarte mit 751 identifizierten Proteinen erstellt, die eine vergleichende Analyse der sekretorischen Vesikel aus $\alpha\beta$ ($CD4^+$ und $CD8^+$) und $\gamma\delta$ ($v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$) T-Zellen erlaubte. Entgegen den eigenen Befunden zur Reifung sekretorischer Granula innerhalb der einzelnen Subpopulationen, waren nur relativ geringe Unterschiede im Proteinbesatz sekretorischer Vesikel von expandierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen festzustellen.

Die weiterführenden Analysen deuteten darauf hin, dass einige lytische Proteine (Granzym B, Granulysin) vorzugsweise in distinkten, elektronendichten Organellen gespeichert werden, die in der Fraktionierung von den FasL-tragenden sekretorischen Lysosomen separieren. Die Fraktion dieser dichten Granula wurde über die Identifizierung von 392 Proteinen charakterisiert. Der Proteinbesatz der beiden Fraktionen korrelierte mit den vorgenannten Befunden und deutet auf eine unterschiedliche Verknüpfung der beiden Arten von Granula mit dem Zytoskelett hin. Die Reifung der beiden Granulatypen wurde auf Proteomebene vergleichend analysiert. Dabei wurden neben der Anreicherung lytischer Proteine auch Unterschiede in der Verteilung von Proteinen identifiziert, die für die Ansäuerung und Funktionalisierung der lytischen Kompartimente verantwortlich sein könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das luminale Proteom sekretorischer Lysosomen charakterisiert. Die vergleichenden Analysen der unreifen und reifen Vesikel bilden die Grundlage für geplante Untersuchungen zur Funktionalität dieses lysosomalen Kompartiments in NK-Zellen und verschiedenen T-Zellsubpopulationen.

8. Summary

Cytotoxic T cells and Natural Killer cells (NK) are able to directly eliminate transformed or virus-infected cells. To this end, cytolytic molecules are stored in specialized bi-functional organelles that combine properties of conventional lysosomes and exocytotic vesicles. These organelles have therefore been termed “secretory lysosomes”. In the course of this PhD work, a protocol for the enrichment of intact vesicles was established to subsequently perform proteomic analyses of secretory lysosomes. Separated fractions were allocated to individual organelles using specific marker proteins. For comparative proteome analyses a two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) platform was established in the laboratory for Molecular Immunology. This robot-based platform enables us to prepare and process samples for mass-spectrometry in a high-throughput manner. All mass-spectrometric analyses were done in cooperation with Dr. Christoph Gelhaus in the department of Zoophysiology at the Zoological Institute of the Christian-Albrechts University (head: Prof. Dr. Matthias Leippe).

The developed methodology was initially validated with polyclonal T cell subpopulations of different donors. Subsequently, a proteomic map with 397 identified proteins of enriched secretory lysosomes of NK cell lines (NKL, YTS) and primary NK cells was established. Differences in the expression-profile of functionally relevant proteins in leukemic and non-transformed NK cells were verified by biochemical, microscopical and flow cytometrical assays. In this context, the chemokine Interleukin-16 was detected for the first time in primary (but not in leukemic) NK cells.

Subsequent proteomic analyses of secretory lysosomes of T cells resulted in an extended proteome map with 751 identifications, and allowed the comparative analyses of secretory vesicles of $\alpha\beta$ ($CD4^+$ and $CD8^+$) and $\gamma\delta$ ($v\delta1^+$ and $v\delta2^+$) Overall, only minor but reproducible differences in the expression profile of secretory vesicles in expanded $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were detected. Further analyses including experiments to follow the activation dependent maturation in T cells, pointed to a storage of some lytic proteins (e.g. Granzyme B, Granulysin) in distinct, electron-dense organelles which separated during fractionation from FasL-carrying secretory lysosomes. The proteome of these dense granules was characterized by the identification of 392 proteins. Protein profiles of the two fractions correlated with aforementioned granular peculiarities and also pointed to a different connection of

the two granular compartments to the cytoskeleton. The maturation of both types of vesicles were also compared at the proteome level showing an enrichment of select lytic proteins. Furthermore, within the two fractions, proteins for acidification and functionalization of lytic compartments differed to some extent.

With the present study, the luminal proteome of different cytotoxic effector populations was characterized for the first time. The comparative analyses of mature and immature vesicles within different subpopulations of T cells and NK cells will enable a better understanding of the compositional functionality of this effector compartment within immune cells.

9. Literaturverzeichnis

1. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S: Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008, 9: 503-510.
2. Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S: Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* 2006, 80: 827-837.
3. Jolly C, Sattentau QJ: Regulated secretion from CD4+ T cells. *Trends Immunol* 2007, 28: 474-481.
4. Hayday A, Tigelaar R: Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003, 3: 233-242.
5. Carding SR, Egan PJ: Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 336-345.
6. Kabelitz D, Wesch D, Hinz T: gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999, 21: 55-75.
7. Holtmeier W, Pfander M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF: The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2001, 116: 275-280.
8. Gertner J, Wiedemann A, Poupot M, Fournie JJ: Human gammadelta T lymphocytes strip and kill tumor cells simultaneously. *Immunol Lett* 2007, 110: 42-53.
9. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E *et al.*: The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 2007, 220: 169-182.
10. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A *et al.*: In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 2007, 121: 258-265.
11. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH: Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol* 2004, 172: 864-870.
12. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K: Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989, 170: 1757-1761.
13. Long EO: Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* 2007, 26: 385-387.
14. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A: Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007, 26: 503-517.
15. Lee SH, Miyagi T, Biron CA: Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* 2007, 28: 252-259.
16. Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989, 47: 187-376.
17. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986, 319: 675-678.
18. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH: Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001, 413: 165-171.
19. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H *et al.*: Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* 2002, 3: 83-90.
20. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM: Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002, 195: 335-341.
21. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H: Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 2007, 26: 593-604.
22. van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, gli-Esposti MA: Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity* 2006, 25: 835-848.

23. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A *et al.*: Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004, 5: 1260-1265.
24. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtroy PJ: Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985, 101: 2210-2222.
25. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S: Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989, 245: 855-857.
26. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ: Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991, 349: 669-676.
27. McNicol A, Israels SJ: Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 1999, 95: 1-18.
28. Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M: Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997, 114: 207-217.
29. Orlow SJ: Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 1995, 105: 3-7.
30. Raposo G, Fevrier B, Stoorvogel W, Marks MS: Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct Funct* 2002, 27: 443-456.
31. Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM: Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* 2004, 305: 55-59.
32. Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM, Luzio JP: Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are reformed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci* 1997, 110 (Pt 17): 2027-2040.
33. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC: Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 2000, 113 (Pt 9): 1515-1524.
34. Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P *et al.*: Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 2001, 155: 53-63.
35. Bunbury A, Potolicchio I, Maitra R, Santambrogio L: Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. *FASEB J* 2009, 23: 164-171.
36. Carlsson SR, Fukuda M: Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem* 1989, 264: 20526-20531.
37. Cuervo AM, Dice JF: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 1996, 273: 501-503.
38. Pols MS, Klumperman J: Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2008.
39. Majeski AE, Dice JF: Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36: 2435-2444.
40. Eskelinen EL: Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 2006, 27: 495-502.
41. Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF: An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* 1997, 137: 825-834.
42. Agarraberes FA, Dice JF: A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 2001, 114: 2491-2499.
43. Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS: Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 2001, 152: 809-824.
44. Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW: Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol* 2007, 178: 1498-1504.
45. Masson D, Peters PJ, Geuze HJ, Borst J, Tschopp J: Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry* 1990, 29: 11229-11235.

46. Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K *et al.*: Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* 2002, 277: 49523-49530.
47. Kolset SO, Prydz K, Pejler G: Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 2004, 379: 217-227.
48. Stevens RL, Otsu K, Weis JH, Tantravahi RV, Austen KF, Henkart PA *et al.*: Co-sedimentation of chondroitin sulfate A glycosaminoglycans and proteoglycans with the cytolytic secretory granules of rat large granular lymphocyte (LGL) tumor cells, and identification of a mRNA in normal and transformed LGL that encodes proteoglycans. *J Immunol* 1987, 139: 863-868.
49. Hunziker W, Simmen T, Honing S: Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* 1996, 17: 347-350.
50. Iida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H *et al.*: Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol* 2000, 165: 5062-5068.
51. Bossi G, Griffiths GM: Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 1999, 5: 90-96.
52. Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O: Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett* 2007, 108: 10-19.
53. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993, 75: 1169-1178.
54. Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D: Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 2000, 301: 85-99.
55. Frangmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L: Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005, 11: 35-41.
56. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G: First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004, 10: 55-63.
57. McKechnie NM, King BC, Fletcher E, Braun G: Fas-ligand is stored in secretory lysosomes of ocular barrier epithelia and released with microvesicles. *Exp Eye Res* 2006, 83: 304-314.
58. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL: Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 1010-1020.
59. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P *et al.*: The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 2004, 295: 315-329.
60. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ *et al.*: Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 1993, 151: 3489-3499.
61. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG *et al.*: A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987, 328: 267-270.
62. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ: CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 1997, 185: 393-403.
63. Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991, 266: 3239-3245.
64. Pfistershammer K, Majdic O, Stockl J, Zlabinger G, Kirchberger S, Steinberger P *et al.*: CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J Immunol* 2004, 173: 6000-6008.
65. Masson D, Tschopp J: Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* 1985, 260: 9069-9072.
66. Podack ER, Young JD, Cohn ZA: Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82: 8629-8633.

67. Liu CC, Perussia B, Cohn ZA, Young JD: Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. *J Exp Med* 1986, 164: 2061-2076.
68. Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J: The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177: 1-7.
69. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ *et al.*: 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. *J Biol Chem* 2005, 280: 8426-8434.
70. Langhans B, Ahrendt M, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U: Comparative study of NK cell-mediated cytotoxicity using radioactive and flow cytometric cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 2005, 306: 161-168.
71. Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D *et al.*: Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* 1998, 37: 10386-10394.
72. Chavez-Galan L, renas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R: Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009, 6: 15-25.
73. Liu CC, Walsh CM, Young JD: Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995, 16: 194-201.
74. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M *et al.*: Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000, 103: 491-500.
75. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T *et al.*: Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 2005, 23: 249-262.
76. Shi L, Keefe D, Durand E, Feng H, Zhang D, Lieberman J: Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J Immunol* 2005, 174: 5456-5461.
77. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML *et al.*: Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 2001, 276: 43285-43293.
78. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J: Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003, 112: 659-672.
79. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B *et al.*: The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 2006, 23: 133-142.
80. Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J: Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem* 2001, 276: 3683-3690.
81. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Trapani JA: Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 2006, 84: 72-78.
82. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM *et al.*: Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 2003, 160: 875-885.
83. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC *et al.*: Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2001, 276: 12060-12067.
84. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Zhang Q, Hua G, Lu H *et al.*: Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ* 2007, 14: 489-499.
85. Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS: Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J* 2007, 26: 2148-2157.
86. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA *et al.*: Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem* 2004, 279: 22236-22242.
87. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ *et al.*: NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol* 2008, 180: 8184-8191.

88. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM: Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 1997, 158: 2680-2688.
89. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U: Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol* 2007, 8: 9.
90. Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A *et al.*: A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 2001, 167: 350-356.
91. Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA *et al.*: A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 2001, 167: 1222-1229.
92. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ *et al.*: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998, 282: 121-125.
93. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005, 174: 5243-5248.
94. Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S: The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 1988, 52: 329-341.
95. Griffiths GM, Isaaz S: Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 1993, 120: 885-896.
96. Robinson MS, Bonifacino JS: Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13: 444-453.
97. Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM: Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 2001, 114: 2405-2416.
98. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998, 395: 82-86.
99. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001, 15: 751-761.
100. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M *et al.*: Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99: 11351-11356.
101. Peters PJ, Geuze HJ, Van der Donk HA, Slot JW, Griffith JM, Stam NJ *et al.*: Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1469-1475.
102. Andzelm MM, Chen X, Krzewski K, Orange JS, Strominger JL: Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med* 2007, 204: 2285-2291.
103. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM *et al.*: Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol* 2001, 152: 825-834.
104. Menager MM, Menasche G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M *et al.*: Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 2007, 8: 257-267.
105. He JS, Ostergaard HL: CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol* 2007, 179: 2339-2348.
106. Berg NN, Puente LG, Dawicki W, Ostergaard HL: Sustained TCR signaling is required for mitogen-activated protein kinase activation and degranulation by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1998, 161: 2919-2924.
107. Kessler B, Hudrisier D, Schroeter M, Tschopp J, Cerottini JC, Luescher IF: Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas- but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *J Immunol* 1998, 161: 6939-6946.
108. Kassahn D, Nachbur U, Conus S, Micheau O, Schneider P, Simon HU *et al.*: Distinct requirements for activation-induced cell surface expression of preformed Fas/CD95 ligand and cytolytic granule markers in T cells. *Cell Death Differ* 2009, 16: 115-124.
109. Barak Y, Nir E: Chediak-Higashi syndrome. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987, 9: 42-55.
110. Kaplan J, De D, I, Ward DM: Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008, 15: 22-29.

111. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA: Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, 9: 359-386.
112. Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT: Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays* 2004, 26: 616-628.
113. Feng L, Seymour AB, Jiang S, To A, Peden AA, Novak EK *et al.*: The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* 1999, 8: 323-330.
114. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS: Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* 1999, 3: 11-21.
115. Enders A, Zieger B, Schwarz K, Yoshimi A, Speckmann C, Knoepfle EM *et al.*: Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. *Blood* 2006, 108: 81-87.
116. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G *et al.*: Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 2003, 4: 1111-1120.
117. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S *et al.*: Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 2000, 25: 173-176.
118. Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N *et al.*: Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 1997, 16: 289-292.
119. Desnos C, Huet S, Darchen F: 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* 2007, 99: 411-423.
120. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le DF, Bhawan S, Certain S, Mathew PA *et al.*: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999, 286: 1957-1959.
121. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C *et al.*: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003, 115: 461-473.
122. Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW: Lysosomal membrane proteomics and biogenesis of lysosomes. *Mol Neurobiol* 2005, 32: 27-41.
123. Unlu M, Morgan ME, Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997, 18: 2071-2077.
124. Miller I, Crawford J, Gianazza E: Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006, 6: 5385-5408.
125. Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K *et al.*: Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003, 3: 1181-1195.
126. Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL: Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. *Cell Immunol* 1991, 135: 454-470.
127. Lamanda A, Zahn A, Roder D, Langen H: Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* 2004, 4: 599-608.
128. Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van DA, Lunardi J: A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 2001, 1: 699-704.
129. Xu Y, Wong SH, Tang BL, Subramaniam VN, Zhang T, Hong W: A 29-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. *J Biol Chem* 1998, 273: 21783-21789.
130. Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL: Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem* 1999, 274: 2953-2962.
131. Nakagawa M, Miranda AF: A monoclonal antibody against cytochrome c oxidase distinguishes cardiac and skeletal muscle mitochondria. *Exp Cell Res* 1987, 168: 44-52.

132. Yokota S, Fahimi HD: The peroxisome (microbody) membrane: effects of detergents and lipid solvents on its ultrastructure and permeability to catalase. *Histochem J* 1978, 10: 469-487.
133. Ting J, Lee AS: Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA* 1988, 7: 275-286.
134. Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL *et al.*: EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 1995, 270: 13503-13511.
135. Xie J, Techritz S, Haebel S, Horn A, Neitzel H, Klose J *et al.*: A two-dimensional electrophoretic map of human mitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: a prerequisite to study mitochondrial disorders in patients. *Proteomics* 2005, 5: 2981-2999.
136. Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ *et al.*: Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* 2002, 13: 1071-1082.
137. Hrebicek T, Durrschmid K, Auer N, Bayer K, Rizzi A: Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis* 2007, 28: 1161-1169.
138. Drexler HG, Matsuo Y: Commentary: what is an 'NK-precursor cell line'? *Leuk Res* 2002, 26: 297-299.
139. Hu ZZ, Valencia JC, Huang H, Chi A, Shabanowitz J, Hearing VJ *et al.*: Comparative Bioinformatics Analyses and Profiling of Lysosome-Related Organelle Proteomes. *Int J Mass Spectrom* 2007, 259: 147-160.
140. Hoffmann R, Valencia A: A gene network for navigating the literature. *Nat Genet* 2004, 36: 664.
141. Bania J, Gatti E, Lelouard H, David A, Cappello F, Weber E *et al.*: Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 6664-6669.
142. Susskind B, Shornick MD, Iannotti MR, Duffy B, Mehrotra PT, Siegel JP *et al.*: Cytolytic effector mechanisms of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Hum Immunol* 1996, 45: 64-75.
143. Sun Q, Burton RL, Lucas KG: Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* 2002, 99: 3302-3309.
144. Burgoyne RD, Barclay JW, Ciufo LF, Graham ME, Handley MT, Morgan A: The functions of Munc18-1 in regulated exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1152: 76-86.
145. Mishra VS, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Southwick FS: The human actin-regulatory protein cap G: gene structure and chromosome location. *Genomics* 1994, 23: 560-565.
146. Chi A, Valencia JC, Hu ZZ, Watabe H, Yamaguchi H, Mangini NJ *et al.*: Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 2006, 5: 3135-3144.
147. Cassimeris L: The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14: 18-24.
148. Huang LP, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice. *J Immunol* 2007, 178: 77-84.
149. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM: Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 2000, 67: 757-766.
150. Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, Henkart PA: Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol* 1984, 132: 3197-3204.
151. Podack ER, Konigsberg PJ: Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med* 1984, 160: 695-710.
152. Graham J, Ford T, Rickwood D: The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal Biochem* 1994, 220: 367-373.
153. Graham JM: Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* 2001, Chapter 3: Unit.
154. Ford T, Graham J, Rickwood D: Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* 1994, 220: 360-366.

155. Wattiaux R, Wattiaux-De CS: *Iodinated Density Gradient Media - a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford University Press; 1983.
156. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J *et al.*: Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991, 173: 1099-1109.
157. Blott EJ, Griffiths GM: Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 122-131.
158. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J: Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 1996, 24: 406-415.
159. Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, Fukui K, Noma T, Honjo T *et al.*: TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J Immunol* 1985, 134: 1623-1630.
160. Gong JH, Maki G, Klingemann HG: Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994, 8: 652-658.
161. Chen X, Allan DS, Krzewski K, Ge B, Kopcow H, Strominger JL: CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103: 10346-10351.
162. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL: Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 6329-6334.
163. Casey TM, Meade JL, Hewitt EW: Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6: 767-780.
164. Basur V, Yang F, Kushimoto T, Higashimoto Y, Yasumoto K, Valencia J *et al.*: Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res* 2003, 2: 69-79.
165. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC: Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995, 377: 446-448.
166. Lieberman J, Fan Z: Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003, 15: 553-559.
167. Ko YH, Park S, Jin H, Woo H, Lee H, Park C *et al.*: Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 2007, 87: 241-250.
168. Mahrus S, Craik CS: Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol* 2005, 12: 567-577.
169. Pipkin ME, Lieberman J: Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007, 19: 301-308.
170. Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI *et al.*: Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* 2004, 114: 1612-1623.
171. Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaynard C: Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997, 8: 2631-2645.
172. Vincent-Schneider H, Thery C, Mazzeo D, Tenza D, Raposo G, Bonnerot C: Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. *J Cell Sci* 2001, 114: 323-334.
173. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL *et al.*: Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996, 4: 357-366.
174. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ *et al.*: Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999, 10: 197-206.
175. Hanna J, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Heller M, Gonen-Gross T *et al.*: Proteomic analysis of human natural killer cells: insights on new potential NK immune functions. *Mol Immunol* 2005, 42: 425-431.
176. Roncarolo MG, Bigler M, Haanen JB, Yssel H, Bacchetta R, de Vries JE *et al.*: Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J Immunol* 1991, 147: 781-787.
177. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M *et al.*: Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006, 12: 207-213.

178. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M *et al.*: A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006, 12: 214-219.
179. Burt BM, Plitas G, Nguyen HM, Stableford JA, Bamboat ZM, Dematteo RP: Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Hum Immunol* 2008, 69: 469-474.
180. Mangeat P, Roy C, Martin M: ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999, 9: 187-192.
181. Tsukita S, Yonemura S: Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 1999, 274: 34507-34510.
182. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D: ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16: 113-143.
183. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN: Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 2001, 15: 691-701.
184. Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A *et al.*: ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 2004, 5: 272-279.
185. Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, Schechter NM, Remold-O'Donnell E: The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry* 2001, 40: 15762-15770.
186. Yamazaki T, Aoki Y: Cathepsin G binds to human lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997, 61: 73-79.
187. Yamazaki T, Aoki Y: Cathepsin G enhances human natural killer cytotoxicity. *Immunology* 1998, 93: 115-121.
188. Sun J, Bird CH, Sutton V, McDonald L, Coughlin PB, De Jong TA *et al.*: A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 1996, 271: 27802-27809.
189. Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S *et al.*: Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 6387-6398.
190. Pham CT, Ley TJ: Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 8627-8632.
191. Hirst CE, Buzza MS, Bird CH, Warren HS, Cameron PU, Zhang M *et al.*: The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol* 2003, 170: 805-815.
192. Dumic J, Dabelic S, Flogel M: Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1760: 616-635.
193. Dong S, Hughes RC: Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J* 1997, 14: 267-274.
194. Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H: Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 376: 5-9.
195. Center DM, Cruikshank W: Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* 1982, 128: 2563-2568.
196. Cruikshank W, Center DM: Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J Immunol* 1982, 128: 2569-2574.
197. Baier M, Bannert N, Werner A, Lang K, Kurth R: Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 5273-5277.
198. Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan J, Andrews DW *et al.*: Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem* 1998, 273: 1144-1149.
199. Wu DM, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM *et al.*: Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J Immunol* 1999, 162: 1287-1293.
200. Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM: Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 1996, 156: 310-315.

201. Chupp GL, Wright EA, Wu D, Vallen-Mashikian M, Cruikshank WW, Center DM *et al.*: Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J Immunol* 1998, 161: 3114-3119.
202. Bellini A, Yoshimura H, Vittori E, Marini M, Mattoli S: Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92: 412-424.
203. Laberge S, Pinsonneault S, Ernst P, Olivenstein R, Ghaffar O, Center DM *et al.*: Phenotype of IL-16-producing cells in bronchial mucosa: evidence for the human eosinophil and mast cell as cellular sources of IL-16 in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999, 119: 120-125.
204. Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, Prussin C, Kirshenbaum AS, Davis TA *et al.*: Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol* 1997, 159: 2904-2910.
205. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW *et al.*: A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol* 1999, 163: 3232-3238.
206. Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrtz F, Neidhart M, Aicher WK *et al.*: Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1998, 28: 2661-2671.
207. Berman JS, McFadden RG, Cruikshank WW, Center DM, Beer DJ: Functional characteristics of histamine receptor-bearing mononuclear cells. II. Identification and characterization of two histamine-induced human lymphokines that inhibit lymphocyte migration. *J Immunol* 1984, 133: 1495-1504.
208. Wilson KC, Cattel DJ, Wan Z, Rahangdale S, Ren F, Kornfeld H *et al.*: Regulation of nuclear P/interleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes. *Cell Immunol* 2005, 237: 17-27.
209. Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M *et al.*: Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J Immunol* 1998, 160: 2115-2120.
210. Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM: Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1987, 138: 3817-3823.
211. Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF: CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* 1991, 173: 1521-1528.
212. Bernstein HB, Plasterer MC, Schiff SE, Kitchen CM, Kitchen S, Zack JA: CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. *J Immunol* 2006, 177: 3669-3676.
213. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T *et al.*: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001, 97: 3146-3151.
214. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M *et al.*: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003, 101: 3052-3057.
215. Kwakkenbos MJ, Kop EN, Stacey M, Matmati M, Gordon S, Lin HH *et al.*: The EGF-TM7 family: a postgenomic view. *Immunogenetics* 2004, 55: 655-666.
216. Hahn S, Gehri R, Erb P: Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995, 146: 57-79.
217. Stalder T, Hahn S, Erb P: Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994, 152: 1127-1133.
218. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ: Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004, 104: 2840-2848.
219. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A *et al.*: Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 2002, 168: 5954-5958.
220. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Halloran PF: The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4(+) CTL, CD8(+) CTL and NK cells. *Am J Transplant* 2008, 8: 627-636.
221. Bohley P, Seglen PO: Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 1992, 48: 151-157.

222. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA: Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002, 196: 493-503.
223. Faure F, Jitsukawa S, Miossec C, Hercend T: CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. *Eur J Immunol* 1990, 20: 703-706.
224. Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Minato N: Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol* 2001, 166: 5508-5514.
225. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR *et al.*: Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006, 203: 843-849.
226. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM *et al.*: IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007, 204: 161-170.
227. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S *et al.*: IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001, 15: 985-995.
228. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A *et al.*: Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003, 101: 3594-3596.
229. Min SW, Chang WP, Sudhof TC: E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 3823-3828.
230. Polgar J, Chung SH, Reed GL: Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* 2002, 100: 1081-1083.
231. Barnard RJ, Morgan A, Burgoyne RD: Domains of alpha-SNAP required for the stimulation of exocytosis and for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) binding and activation. *Mol Biol Cell* 1996, 7: 693-701.
232. Sander LE, Frank SP, Bolat S, Blank U, Galli T, Bigalke H *et al.*: Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol* 2008, 38: 855-863.
233. Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z *et al.*: VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008, 111: 3665-3674.
234. Fleischer B: CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today* 1994, 15: 180-184.
235. Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J *et al.*: Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol* 1992, 149: 481-486.
236. Boonacker E, Van Noorden CJ: The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003, 82: 53-73.
237. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C: Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008, 13: 2299-2310.
238. De M, I, Korom S, Van DJ, Scharpe S: CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 1999, 20: 367-375.
239. Klemann C, Schade J, Pabst R, Leitner S, Stiller J, von HS *et al.*: CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol* 2009, 155: 357-365.
240. Ruiz P, Zacharievich N, Hao L, Viciano AL, Shenkin M: Human thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny. *Clin Immunol Immunopathol* 1998, 88: 156-168.
241. Reinhold D, Bank U, Buhling F, Lendeckel U, Faust J, Neubert K *et al.*: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997, 91: 354-360.
242. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Born I, Faust J, Neubert K *et al.*: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones. *J Neuroimmunol* 1998, 87: 203-209.
243. Kahne T, Kroning H, Thiel U, Ulmer AJ, Flad HD, Ansorge S: Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol* 1996, 170: 63-70.

244. Kyouden T, Himeno M, Ishikawa T, Ohsumi Y, Kato K: Purification and characterization of dipeptidyl peptidase IV in rat liver lysosomal membranes. *J Biochem* 1992, 111: 770-777.
245. Grondin G, Hooper NM, LeBel D: Specific localization of membrane dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV in secretion granules of two different pancreatic islet cells. *J Histochem Cytochem* 1999, 47: 489-498.
246. Lettau M, Qian J, Linkermann A, Latreille M, Larose L, Kabelitz D *et al.*: The adaptor protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103: 5911-5916.
247. Reczek D, Berryman M, Bretscher A: Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 1997, 139: 169-179.
248. Brdickova N, Brdicka T, Andera L, Spicka J, Angelisova P, Milgram SL *et al.*: Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2001, 507: 133-136.
249. Wasem C, Fruttschi C, Arnold D, Vallan C, Lin T, Green DR *et al.*: Accumulation and activation-induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* 2001, 167: 2936-2941.
250. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M: Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur J Immunol* 2004, 34: 2248-2256.
251. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S *et al.*: T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 2001, 7: 174-179.
252. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Krensky AM, Bonneville M *et al.*: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001, 184: 1082-1085.
253. Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM: Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 1999, 36: 413-422.
254. Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner CA *et al.*: Perforin enhances the granulysin-induced lysis of Listeria innocua in human dendritic cells. *BMC Immunol* 2007, 8: 14.
255. Maes MB, Lambeir AM, Gilany K, Senten K, Van d, V, Leiting B *et al.*: Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). *Biochem J* 2005, 386: 315-324.
256. McDonald JK, Ellis S, Reilly TJ: Properties of dipeptidyl arylamidase I of the pituitary. Chloride and sulfhydryl activation of seryltyrosyl-beta-naphthylamide hydrolysis. *J Biol Chem* 1966, 241: 1494-1501.
257. Maes MB, Scharpe S, De M, I: Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta* 2007, 380: 31-49.
258. McDonald JK, Reilly TJ, Zeitman BB, Ellis S: Dipeptidyl arylamidase II of the pituitary. Properties of lysylalanyl-beta-naphthylamide hydrolysis: inhibition by cations, distribution in tissues, and subcellular localization. *J Biol Chem* 1968, 243: 2028-2037.
259. Smith RE, Dean PN: A study of acid phosphatase and dipeptidyl aminopeptidase II in monodispersed anterior pituitary cells using flow cytometry and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1979, 27: 1499-1504.
260. Sannes PL, McDonald JK, Allen RC, Spicer SS: Cytochemical localization and biochemical characterization of dipeptidyl aminopeptidase II in macrophages and mast cells. *J Histochem Cytochem* 1979, 27: 1496-1498.
261. Struckhoff G, Heymann E: Rat peritoneal mast cells release dipeptidyl peptidase II. *Biochem J* 1986, 236: 215-219.
262. Scott CS, Stark AN, Minowada J, Drexler HG: Quantitative and qualitative studies of leukaemic cell dipeptidylpeptidases II and IV. *Leuk Res* 1988, 12: 129-134.
263. Chiravuri M, Agarraberes F, Mathieu SL, Lee H, Huber BT: Vesicular localization and characterization of a novel post-proline-cleaving aminodipeptidase, quiescent cell proline dipeptidase. *J Immunol* 2000, 165: 5695-5702.
264. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A: Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity* 2001, 15: 847-859.

265. Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O: Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal Transduction* 2004, 4: 206-211.
266. Glass A, Walsh CM, Lynch DH, Clark WR: Regulation of the Fas lytic pathway in cloned CTL. *J Immunol* 1996, 156: 3638-3644.
267. Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P: TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995, 181: 781-786.
268. Miki H, Takenawa T: Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem* 2003, 134: 309-313.
269. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H *et al.*: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998, 140: 1383-1393.
270. Stoeckle C, Gouttefangeas C, Hammer M, Weber E, Melms A, Tolosa E: Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol* 2009, 37: 266-275.
271. Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM: Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. *Traffic* 2000, 1: 435-444.
272. Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Watzl C, Kabelitz D *et al.*: 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics* 2008, 8: 2911-2925.
273. Ortaldo JR, Wiltrout TA, Sayers TJ, Yagita H, Winkler-Pickett RT: Characterization of a non-granule associated pore-forming protein in agranular lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1995, 57: 897-903.
274. Olsen I, Bou-Gharios G, Abraham D: The activation of resting lymphocytes is accompanied by the biogenesis of lysosomal organelles. *Eur J Immunol* 1990, 20: 2161-2170.
275. Ujwal R, Cascio D, Colletier JP, Faham S, Zhang J, Toro L *et al.*: The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 17742-17747.
276. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D *et al.*: Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006, 127: 831-846.
277. Cao Z, Li C, Higginbotham JN, Franklin JL, Tabb DL, Graves-Deal R *et al.*: Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7: 1651-1667.
278. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD *et al.*: Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* 2007, 109: 1095-1102.
279. Martinez C, Sanjuan MA, Dent JA, Karlsson L, Ware J: Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochem J* 2004, 382: 783-791.
280. Joo E, Surka MC, Trimble WS: Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev Cell* 2007, 13: 677-690.
281. Beites CL, Campbell KA, Trimble WS: The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem J* 2005, 385: 347-353.

10. Anhang: Proteindaten

10.1 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen (siehe S. 166)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten sekretorischen Lysosomen aus NKL, YTS und primären NK-Zellen in Tabelle A1
- annotiertes Gel zur Tabelle A1 mit einem direkten Vergleich von NKL und YTS in Abbildung A1
- detaillierte MASCOT Daten zu jeder einzelnen Identifikation sind auf der beiliegenden CD enthalten

10.2 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 2 (siehe S. 175)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Tabelle A2
- annotiertes Gel zur Tabelle A2 in Abbildung A2

10.3 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 6 (siehe S. 190)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten lytischen Granula (Fraktion 6) aus humanen Lymphozyten in Tabelle A3
- annotiertes Gel zur Tabelle A3 in Abbildung A3

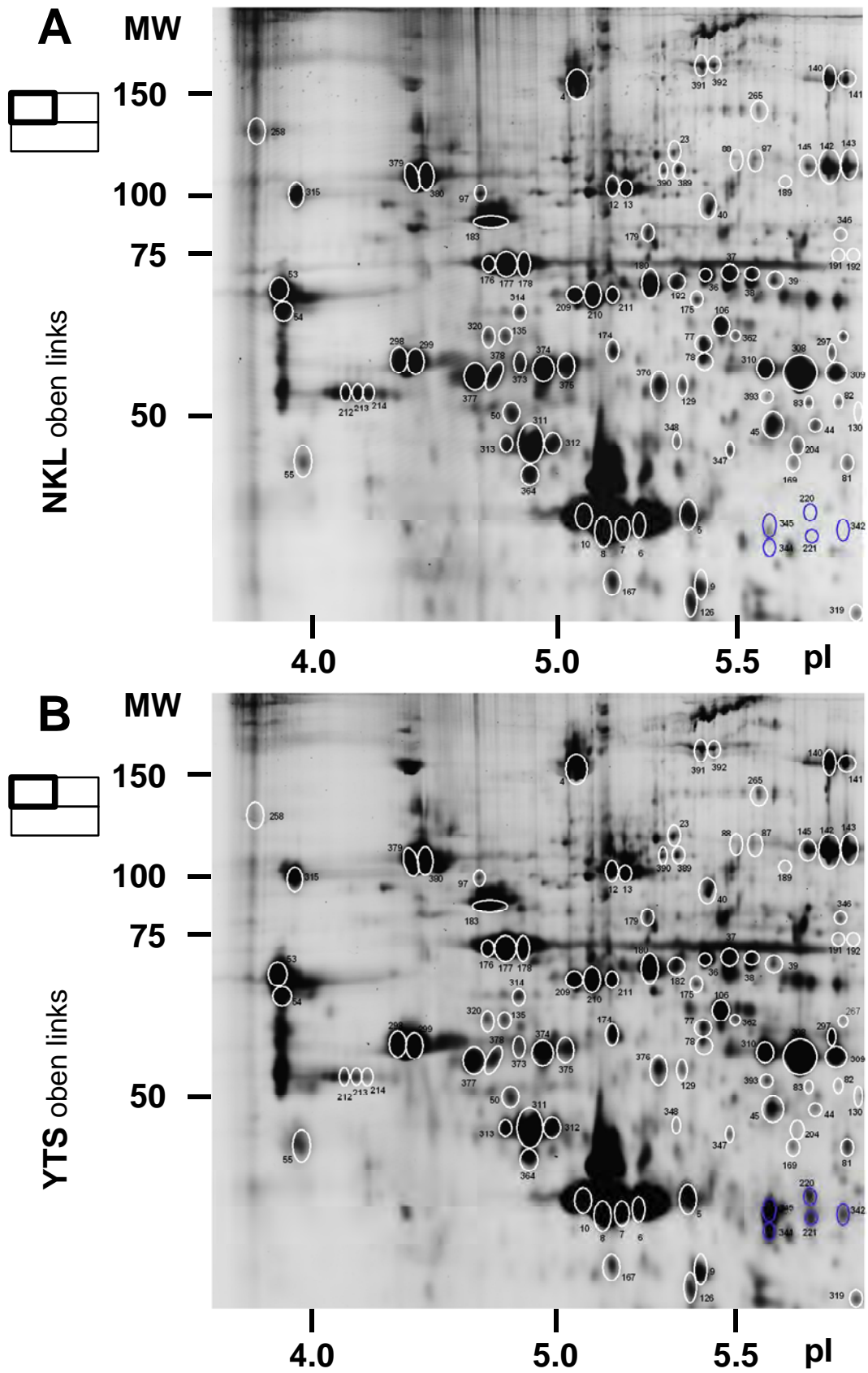


Abb. A1

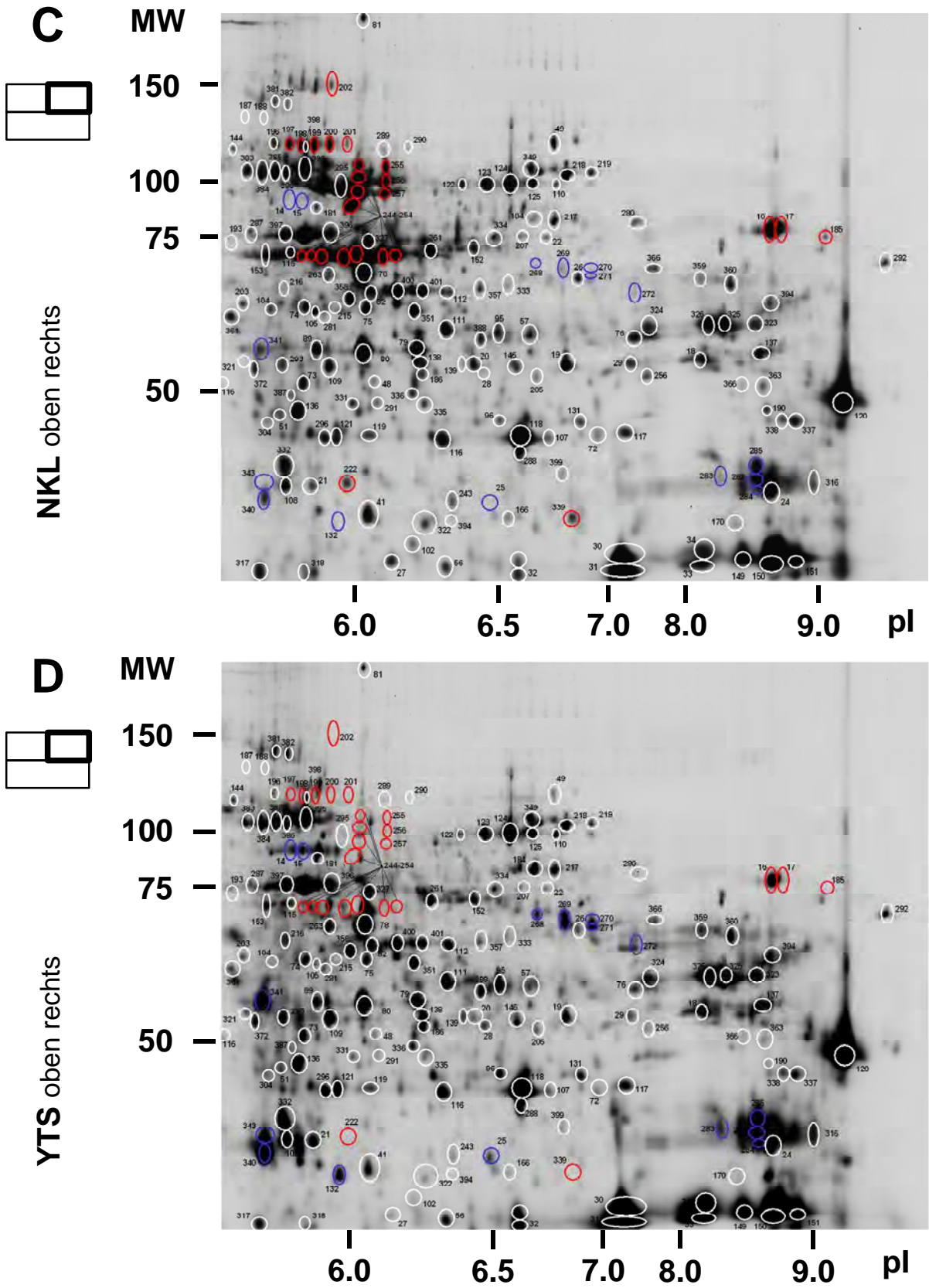


Abb. A1

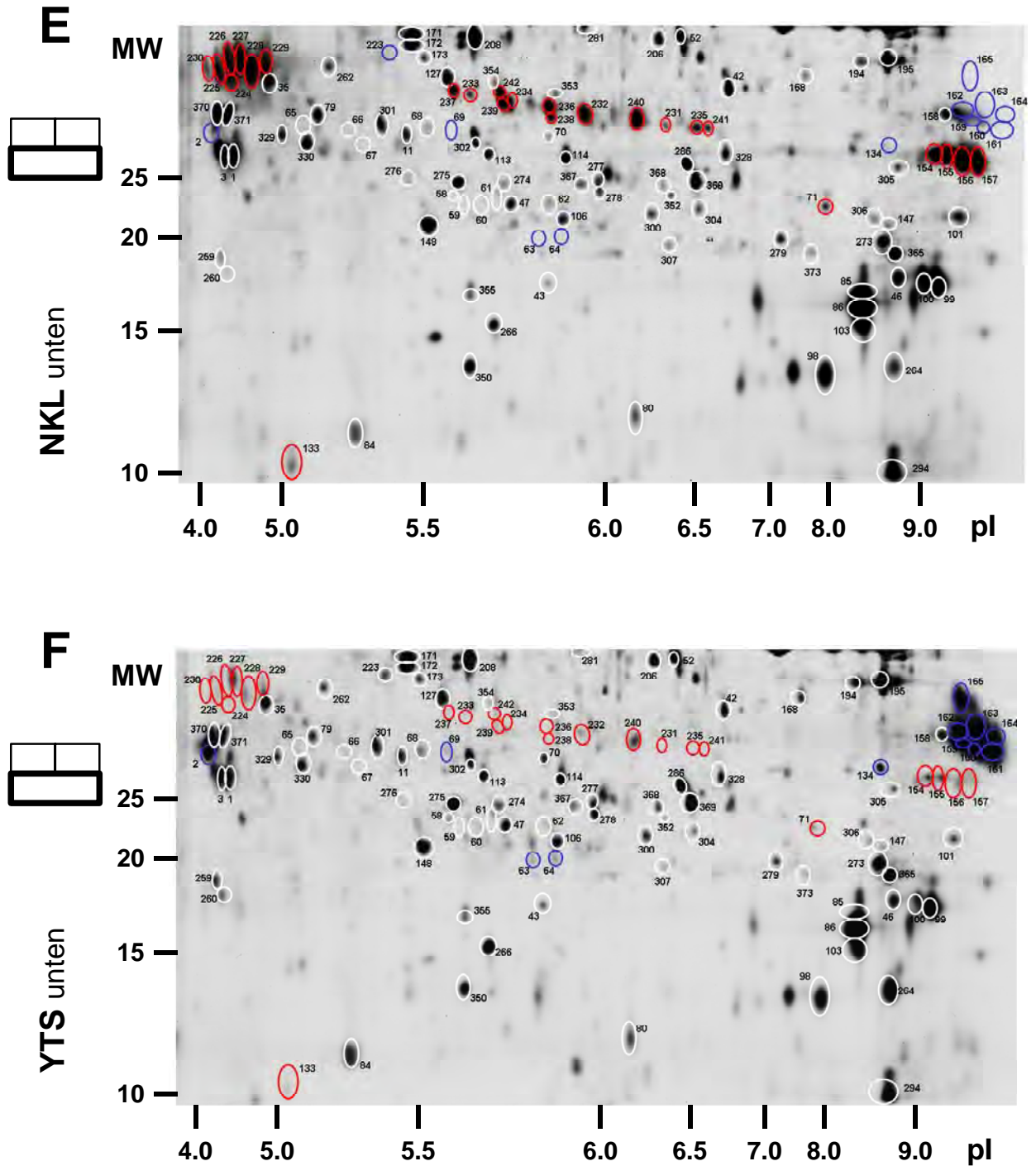


Abb. A1: Proteinkarte sekretorischer Granula aus NKL (A,C,E) und YTS (B,D,F) Zellen. Identifizierte Proteine aus 8 Experimenten wurden in diese Karte implementiert. Die Abbildungen der oben linken (A, B) und unten rechten (C, D) Quadranten stammen aus Experiment 1 (Tab. 5.3.1), die unteren Abschnitte dagegen aus Experiment 3. Identifizierte, differentielle Proteine wurden mit rot für eine verminderte und mit blau für eine verstärkte Expression in YTS im Vergleich zu NKL markiert. Der Grenzwert der Volumenverhältnisse wurde auf eine 3-fache Änderung gesetzt. Die Einteilung des pI basiert auf der durch den Hersteller angegebenen pH-Verteilung in nicht-linearen IPG Streifen, pH 3-11.

X. ANHANG

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen-bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
253	1	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor	ECHA	gi 20127408	P40939	83688	9.2	5	126	metabolism	PL, MT
256	1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_c	PABPC1	gi 119612222	P11940	47647	9.0	5	270	metabolism	ER,EN,ME,PL
259	2	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	nd	gi 5729877	Q53GZ6	71082	5.4	23	517	chaperone	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
260	1	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	nd	gi 5729877	Q53GZ6	71082	5.4	19	382	chaperone	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
261	1	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	28	353	trafficking	MT,EX,ME,ER
262	2	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	39	524	trafficking	MT,EX,ME,ER
263	2	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	37	552	trafficking	MT,EX,ME,ER
264	1	syntaxin binding protein 3	STXBP3	gi 2810993	O00186	68386	8.3	6	170	trafficking	ME,PL
265	1	lysosomal acid alpha-mannosidase	MAN2B1	gi 1658374	O00754	111986	6.7	3	77	hydrolases	LY,ME
266	1	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	33	838	actin binding	CY
267	1	L-plastin variant	nd	gi 62898171	Q53F11	70785	5.2	24	427	cytoskeleton	unknown
268	2	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	27	585	actin binding	CY
269	1	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	28	440	actin binding	CY
272	1	L-plastin variant	nd	gi 62087548	Q59GX5	56196	5.2	1	105	cytoskeleton	unknown
273	2	alkylldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	AGPS	gi 119631462	O00116	60804	6.0	6	172	biosynthesis	PE
274	2	zeta-chain associated protein kinase 70kDa isoform 1	ZAP70	gi 31455611	P43403	70796	7.8	5	161	signal trans.	CY
275	1	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	27	544	actin binding	CY
276	5	transketolase	TKT	gi 31417921	P29401	50335	8.0	12	376	unclassified	ME,EN
277	2	zeta-chain associated protein kinase 70kDa	ZAP70	gi 149242795	P43403	70122	7.8	22	363	signal trans.	CY
278	2	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	gi 5123454	P08107	70280	5.5	24	422	chaperone	ER,EN,ME,EX,MT
280	1	perforin-1	PERF	gi 35386	P14222	62495	8.1	6	163	Immunity	SL
281	2	syntaxin binding protein 3	STXBP3	gi 118600975	O00186	68633	8.0	8	198	trafficking	ME,PL
284	1	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gi 4507909	P42768	53108	6.2	3	148	cytoskeleton	CY
286	3	calreticulin precursor variant	CALR	gi 62897681	P27797	47061	4.3	14	351	chaperone	ER,ME,NG,EX,PL,MT
287	5	calreticulin precursor variant	CALR	gi 62897681	P27797	47061	4.3	15	458	chaperone	ER,ME,NG,EX,PL,MT
291	1	syntaxin binding protein 3, isoform CRA_b	STXBP3	gi 119576735	O00186	38947	8.9	2	121	trafficking	ME,PL
292	3	MAGUK p55 subfamily member 7	MPP7	gi 55958705	Q5T2T1	36102	9.1	6	246	protein binding	PL
294	1	syntaxin binding protein 3 variant	STXBP3	gi 62897901	Q53FW1	68599	8.0	17	321	trafficking	ME,PL
297	1	WD repeat-containing protein 1 isoform 1 variant	WDR1	gi 62897087	Q53H17	66870	6.2	18	257	cytoskeleton	EN,ME,EX
298	2	WD repeat-containing protein 1 isoform 1 variant	WDR1	gi 62897087	Q53H17	66870	6.2	19	495	cytoskeleton	EN,ME,EX
299	2	WD repeat-containing protein 1 isoform 1 variant	WDR1	gi 62897087	Q53H17	66870	6.2	18	296	cytoskeleton	EN,ME,EX
300	2	WD repeat domain 1, isoform CRA_d	WDR1	gi 119613095	O75083	58579	6.4	9	176	cytoskeleton	EN,ME,EX
302	4	syntaxin binding protein 2	STXBP2	gi 12804033	Q9BU65	66553	6.1	28	616	trafficking	EX,PL
303	1	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	WDR1	gi 9257257	O75083	66836	6.2	15	150	cytoskeleton	EN,ME,EX
304	1	WD repeat domain 1	WDR1	gi 12652891	O75083	66822	6.2	25	657	cytoskeleton	EN,ME,EX
305	1	syntaxin binding protein 1	STXBP1	gi 62087940	P61764	67568	6.5	8	166	trafficking	ME,NG,EX,PL,SY
306	2	asparaginyl-tRNA synthetase	NARS	gi 119583453	O43776	63687	5.9	3	167	biosynthesis	ME
307	1	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	gi 671527	P49368	60862	6.2	10	223	chaperone	CY
308	1	ERO1L	ERO1L	gi 6272557	Q96HE7	45319	5.4	10	169	redox proteins	ME,ER
309	3	leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	gi 119617964	P09960	63481	5.7	5	193	hydrolases	CY
310	1	copine I	CPNE1	gi 48145697	Q99829	59677	5.5	10	232	trafficking	ME
311	2	ERO1L	ERO1L	gi 119586051	Q96HE7	54839	5.6	15	348	redox proteins	ME,ER
312	2	ERO1L	ERO1L	gi 119586051	Q96HE7	54839	5.6	14	304	redox proteins	ME,ER
313	2	dihydropyrimidinase-like 2	DPYL2	gi 4503377	Q16555	62711	6.0	5	206	signal trans.	SY
314	1	syntrophin, beta 1	NTN1	gi 119612414	Q13884	58383	8.8	2	68	trafficking	CY
315	1	nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_d	NAP1L1	gi 119617726	P55209	40154	4.6	3	112	cell proliferation	ME,PL,NU
316	2	phosphatase 2a	PPP2R1A	gi 149243188	P30153	65232	5.1	12	227	multifunctional	MT
317	1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 isoform 1 variant	nd	gi 62898990	Q53EL0	67966	7.7	15	202	hydrolases	unknown
318	1	soc-2 suppressor of clear homolog	SHOC2	gi 41281398	Q9UQ13	65304	8.7	3	105	unclassified	CY
319	2	dihydropyrimidinase-like 2	DPYL2	gi 4503377	Q16555	62711	6.0	17	479	signal trans.	SY
320	1	copine I variant	CPNE1	gi 62089240	Q59E14	57352	5.5	6	144	trafficking	ME
321	1	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gi 4507909	P42768	53108	6.2	5	141	cytoskeleton	CY
322	1	vacuolar protein sorting 45A stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	VPS45	gi 18105063	Q9NRW7	65435	8.4	6	284	trafficking	LY,EN
323	mix	Wiskott-Aldrich syndrome protein	STIP1	gi 5803181	P31948	63227	6.4	17	156	chaperone	ME,PL,SY
324	1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 12804207	P42768	54422	6.4	6	191	cytoskeleton	CY
325	2	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 557900	P29350	67924	7.3	5	95	signal trans.	CY,NU
326	2	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 82407989	P29350	60638	6.1	10	115	signal trans.	CY,NU
326	2	bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	gi 119590931	P31939	65075	6.3	23	401	multifunctional	ME,PL
327	3	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gi 12804207	P42768	54422	6.4	4	174	cytoskeleton	CY
328	1	adenylyl cyclase-associated protein variant	CAP1	gi 62896585	Q10518	51899	8.1	5	103	trafficking	PL,ME
329	1	ezrin	EZR	gi 340217	P15311	68233	5.8	8	94	cytoskeleton	ME,EX,MT
331	1	T-complex polypeptide 1	TCPA	gi 36796	P17987	60869	6.0	6	162	chaperone	ER,EN,ME,EX
332	1	DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1	OXR1	gi 33150628	O95747	32518	6.9	5	172	kinase	ME
335	2	nucleobindin 1 variant	Q53GX6	gi 62897169	Q53GX6	53874	5.2	22	482	unclassified	unknown
337	1	prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit	P4HA1	gi 190786	P13674	61075	5.7	2	85	redox	ER,ME
338	2	chaperonin (HSP60)	CH60	gi 306890	P10809	61157	5.7	21	413	chaperone	ME,NG,EX,SY,MT
339	3	chaperonin containing TCP1, subunit 5ε	CCT5	gi 24307939	P48643	60089	5.5	15	262	chaperone	EX,PL
340	1	copine III	CPNE3	gi 4503015	O75131	60947	5.6	4	93	trafficking	ME,EX,PL
341	1	EH-domain containing 1	EHD1	gi 30240932	Q9HAM9	60646	6.4	13	236	trafficking	ER,LY,EN,EX,PL

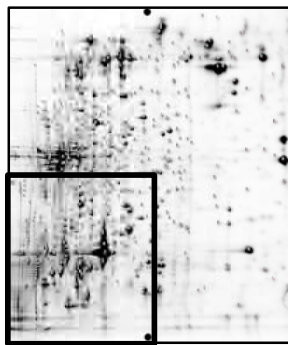
Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen-bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
596	2	aldose 1-epimerase (BLOCK25)	GALM	gij20530221	Q96C23	24185	5.6	7	245	metabolism	CY
598	1	GIPC1 protein	GIPC1	gij33872740	O14908	32792	5.9	5	99	protein binding	SY,CY
599	2	V-type proton ATPase subunit d 1	ATP6V0D1	gij542837	P61421	32083	5.2	4	138	channel	LY,EN,ME,SY
600	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	PPP1CB	gij54696354	P62140	37945	5.8	6	120	hydrolases	ME,PL
601	2	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gij4506003	P62136	38229	5.9	14	343	hydrolases	EX
602	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gij4506003	P62136	38229	5.9	7	127	hydrolases	EX
603	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gij4506003	P62136	38229	5.9	18	543	hydrolases	EX
604	1	annexin A1	ANXA1	gij4502101	P04083	38918	6.6	9	453	trafficking	ME,MT
605	1	calcium binding protein 39	CAB39	gij42543739	Q9Y376	39834	6.3	4	117	unclassified	EX
606	1	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	gij1584035	Q14847	30185	6.1	11	303	adapter protein	ER,EN,ME,PL
607	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gij31645	P04406	36202	8.3	16	552	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
608	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gij67464043	P04406	36483	8.6	12	508	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
609	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gij67464043	P04406	36483	8.6	15	567	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
610	4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gij31645	P04406	36202	8.3	16	667	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
611	3	F-actin capping protein alpha-1 subunit	CAPZA1	gij5453597	P52907	33073	5.5	10	709	actin binding	ER,EN,ME
612	1	carboxyl terminal LIM domain protein	LDB1	gij1905874	Q14847	36604	6.8	6	185	cytoskeleton	ER,ME,PL,EN
615	2	annexin A1	ANXA1	gij4502101	P04083	38918	6.6	16	668	trafficking	ME,MT
616	3	F-actin capping protein alpha-2 subunit	CAPZA2	gij119603918	P47755	31898	6.5	7	398	cytoskeleton	ER,EN,ME,PL
617	4	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	PPP1CB	gij54696354	P62140	37945	5.8	8	460	hydrolases	ME,PL
618	1	annexin A2	ANXA2	gij119597993	P07355	32600	5.9	12	445	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
620	1	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	ARPC1B	gij5031601	O15143	41722	8.7	10	343	trafficking	ME,PL
621	2	serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	PP2AA	gij122921196	P67775	34186	5.1	5	209	signal trans.	MT
622	2	calcium binding protein 39	CAB39	gij7706481	Q9Y376	40015	6.4	16	378	unclassified	EX
623	1	F-actin capping protein alpha-1 subunit variant	CAPZA1	gij62898013	P52907	33057	5.5	3	128	actin binding	ER,EN,ME
625	4	annexin A2	ANXA2	gij56966699	P07355	38866	6.9	21	597	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
626	3	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	gij49259209	P07195	36801	5.9	11	448	redox	ME,EX,PL,SY,MT
627	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gij4506003	P62136	38229	5.9	7	120	hydrolases	EX
628	3	annexin A2	ANXA2	gij56966699	P07355	38866	6.9	11	232	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
629	1	gamma-glutamyl hydrolase	GGH	gij4503987	Q92820	36340	6.7	2	99	hydrolase	LY,ME,NG,PL
630	3	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	gij1584035	Q14847	30185	6.1	10	266	adapter protein	ER,EN,ME,PL
631	3	annexin A2	ANXA2	gij119597993	P07355	32600	5.9	21	759	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
632	1	axin interactor, dorsalization associated protein	AIDA	gij52545806	Q96BJ3	34954	6.2	11	531	signal trans.	unknown
633	1	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	gij5453710	Q14847	30097	6.6	5	121	adapter protein	ER,EN,ME,PL
634	1	GNB1 protein	GNB1	gij91992949	Q1RMY8	37073	5.6	4	65	signal trans.	EN,ME,EX,PL,SY
635	2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2 isoform 2	KCAB2	gij27436969	Q13303	39547	8.8	15	360	channel	CY
636	2	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	gij49259209	P07195	36801	5.9	8	129	redox	ME,EX,PL,SY,MT
637	1	otubain 1	OTUB1	gij109148508	Q96FW1	31493	4.9	5	175	hydrolases	ME
638	1	G protein beta subunit	GNB2	gij306785	P62879	38061	5.8	12	510	signal trans.	ME,MT
639	1	chromatin modifying protein 4B	CHM4B	gij28827795	Q9H444	24935	4.8	2	90	transport	ME,EX
640	1	COP9 complex subunit 4	CSN4	gij5410300	Q9BT78	46454	5.6	4	115	signal trans.	CY,NU
642	2	cytosolic malate dehydrogenase	MDHC	gij5174539	P40925	36631	6.9	9	223	metabolism	ME,EX,PL,SY,MT
643	1	L-lactate dehydrogenase	LDHA	gij62897717	P00338	36951	7.6	8	253	metabolism	ME,EX,SY
644	2	L-lactate dehydrogenase	LDHA	gij13786849	P00338	36819	8.5	8	142	metabolism	ME,EX,SY
645	2	L-lactate dehydrogenase	LDHA	gij13786849	P00338	36819	8.5	19	554	metabolism	ME,EX,SY
646	2	G protein beta subunit	GNB2	gij306785	P62879	38061	5.8	10	298	signal trans.	ME,MT
647	1	calponin 2	CNN2	gij119589975	Q99439	31829	7.6	9	169	cytoskeleton	CY
648	1	esterase D/formylglutathione hydrolase	ESTD	gij55957280	P10768	25695	6.4	2	131	Hydrolase	ME
649	1	G protein beta subunit	GNB2	gij306785	P62879	38061	5.8	7	314	signal trans.	ME,MT
650	1	MHC class II antigen DR alpha chain	HLA-DRA	gij3212400	P01903	20548	4.9	3	113	Immunity	ME
651	2	CNN2 protein	CNN2	gij49456577	Q6FHE4	34086	7.0	18	480	unknown	unknown
652	1	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	NAPA	gij47933379	P54920	33667	5.2	13	368	trafficking	ME,NG,PL
653	1	glyoxalase domain containing 4	GLOD4	gij16198390	Q9HC38	33536	5.4	6	150	unclassified	MT
654	1	pyrophosphatase 1	IPYR	gij11056044	Q15181	33095	5.5	3	136	hydrolase	ME,MT
656	3	esterase D/formylglutathione hydrolase	ESTD	gij55957281	P10768	28607	6.3	7	233	Hydrolase	ME
657	1	voltage-dependent anion channel 2	VDAC2	gij55664661	P45880	30842	8.0	2	72	channel	SY,MT
658	2	voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	gij4507879	P21796	30868	8.6	8	357	channel	:R,LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
659	1	annexin A5	ANXA5	gij809185	P08758	35840	4.9	2	145	trafficking	MT,EX,ME,SY
660	2	annexin A5	ANXA5	gij809185	P08758	35840	4.9	18	624	trafficking	MT,EX,ME,ER
662	1	F-actin capping protein beta subunit	CAPZB	gij4826659	P47756	30952	5.7	4	100	actin binding	ER,EN,ME
663	1	F-actin capping protein beta subunit	CAPZB	gij4826659	P47756	30952	5.7	7	333	actin binding	ER,EN,ME
664	1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1, isoform CRA_d	GNB2L1	gij119574080	P63244	30942	7.0	6	275	signal trans.	ER
665	1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	MAPRE1	gij6912494	Q15691	30151	5.0	3	199	cytoskeleton	ME,PL
666	1	Cbr1 In Complex With Hydroxy-Pp	CBR1	gij66360348	P16152	30510	8.6	8	247	redox protein	ME
668	2	annexin A4	ANXA4	gij1703319	P09525	36088	5.8	8	398	signal trans.	MT,EX,ME,SY
669	2	MHC class II antigen	HLA-DRB1	gij77019293	Q3LAB6	21042	6.1	5	270	Immunity	ME
670	3	nucleoside phosphorylase	PNPH	gij157168362	P00491	32325	6.5	13	481	cell proliferation	CY,PL

X. ANHANG

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen-bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
1051	1	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	6	134	cytoskeleton	ME,PL
1052	2	actinin, alpha 4	ACTN4	gi 119577215	O43707	104555	5.2	16	277	cytoskeleton	ME,NU,CY
1053	1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 82407989	P29350	60638	6.1	6	69	signal trans.	CY,NU
1054	1	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 48145549	P00558	44973	8.3	14	390	metabolism	ME,EX,SY,MT
1055	1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2, isoform CRA_d	GNAI2	gi 119585458	B4E2X5	20295	5.5	5	168	GTPases	EX
1056	1	afatoxin aldehyde reductase AFAR	ARK72	gi 2736256	O43488	37024	6.2	3	157	redox	PL,GO
1057	1	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	10	179	trafficking	MT,EX,ME,ER
1058	1	protein disulfide isomerase-associated 4	PDIA4	gi 4758304	P13667	73229	5.0	3	78	chaperone	ER,ME,PL
1059	2	formin-binding protein 1	FBP17	gi 119608323	Q96RU3	87380	5.9	2	92	adapter	SL,LY,CY
1060	1	protein disulfide isomerase-associated 4	PDIA4	gi 4758304	P13667	73229	5.0	3	79	chaperone	ER,ME,PL
1061	1	kinase/transmembrane domain fusion protein	STK4/SLC36AL	gi 28372404	Q86YK3	28640	4.4	2	68	unclassified	unknown
1062	1	opa-interacting protein OIP3	KPYM	gi 2815606	unknown	18244	9.6	2	66	metabolism	ME,EX,SY
1063	1	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	8	251	cytoskeleton	ME,PL
1064	2	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	7	165	cytoskeleton	ME,PL
1065	1	tubulin fragment	TUBB	gi 16198437	Q96B85	30625	4.8	6	99	cytoskeleton	CY
1066	1	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	14	220	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
1067	1	vacuolar sorting protein 33A	VPS33A	gi 119618724	Q96AX1	56346	6.7	4	114	trafficking	EN,LY
1069	1	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	gi 5107682	P62826	23307	9.0	5	68	transport	ME,EX
1069	1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2	gi 13959394	Q13576	181071	5.4	5	150	signal trans.	EN
1070	1	lin 7 homolog c	LIN7C	gi 6755973	Q9NUP9	21935	8.5	7	320	exocytosis	SY
1071	1	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	20	398	cytoskeleton	EN,ME,PL
1072	1	histocompatibility (minor) HA-1	HMHA1	gi 40807045	Q92619	125785	5.8	4	188	GTPases	unknown
1073	1	histocompatibility (minor) HA-1, isoform CRA_c	HMHA1	gi 119589959	Q92619	108894	5.5	4	143	GTPases	unknown
1074	2	histocompatibility (minor) HA-1	HMHA1	gi 40807045	Q92619	125785	5.8	5	135	GTPases	unknown
1076	1	pyruvate kinase 3 isoform 2	PKM2	gi 67464392	P14618	60277	8.2	15	332	metabolism	ME,EX,SY
1077	1	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	27	556	cytoskeleton	EN,ME,PL
1078	1	aldo-keto reductase family 1, member A1	AK1A1	gi 5174391	P14550	36892	6.3	10	213	metabolism	PL,SY
1079	1	actin, gamma 1 propeptide	ACTG1	gi 4501887	P63261	42108	5.3	10	257	cytoskeleton	ME,EX,PL,SY
1080	1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 variant	nd	gi 62897899	Q53FW2	35355	6.3	9	249	biosynthesis	unknown
1081	1	SH3-containing protein, Endophilin-B1	SH3GLB1	gi 7705773	Q9Y371	41056	5.8	4	130	apoptosis	CY,GO,MT
1082	1	poly(rC) binding protein 1	PCBP1	gi 5453854	Q15365	38015	6.7	11	359	unclassified	ME,CY,NU
1083	2	MHC class II antigen DR52	HLA-DRB3	gi 6715261	P01913	27220	6.8	6	178	Immunity	ME

^{a)} Anzahl der unabhängigen Identifikationen aus verschiedenen 2D Gelen

A Fraktion 2



MW
(kDa)

150—

100—

75—

50—

37—



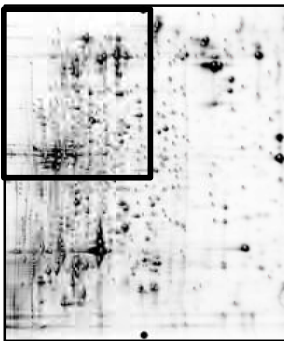
pI

5,5

5,0

4,0

B Fraktion 2



MW

(kDa)

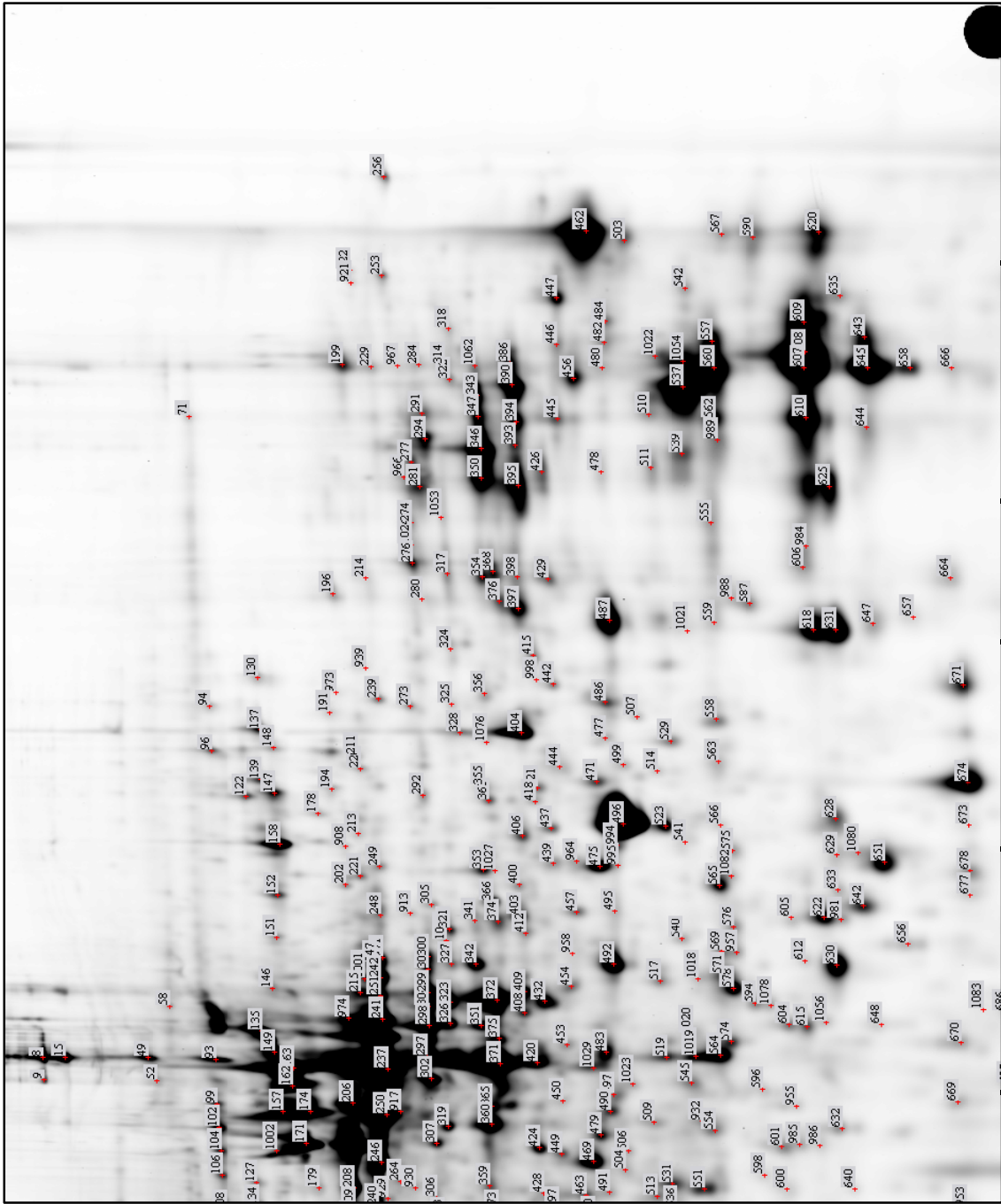
150

100

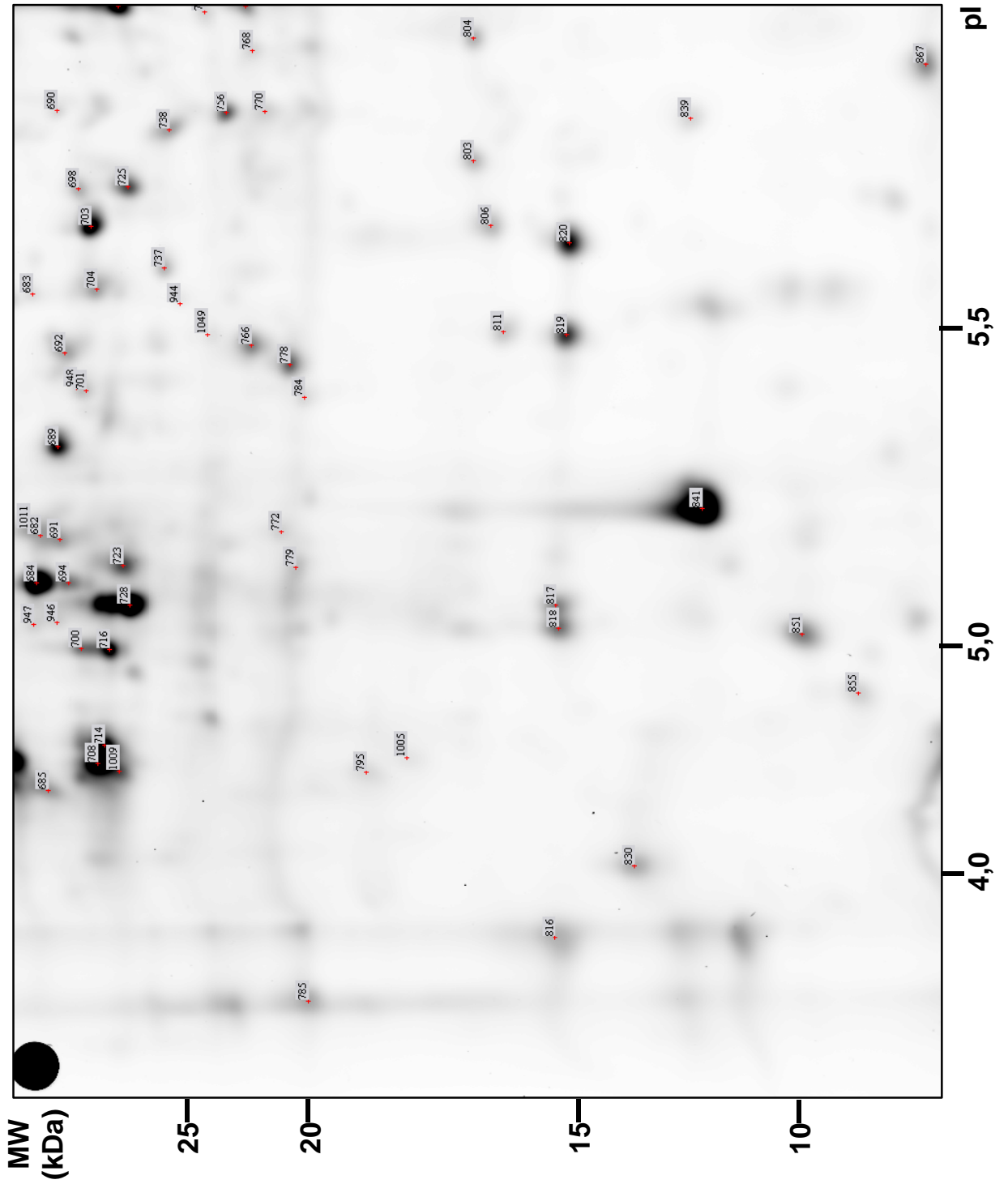
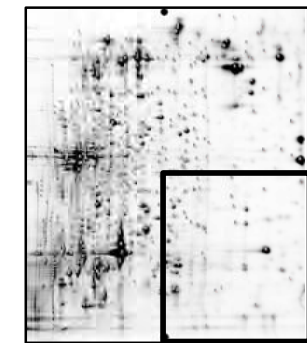
75

50

37



C Fraktion 2



D Fraktion 2

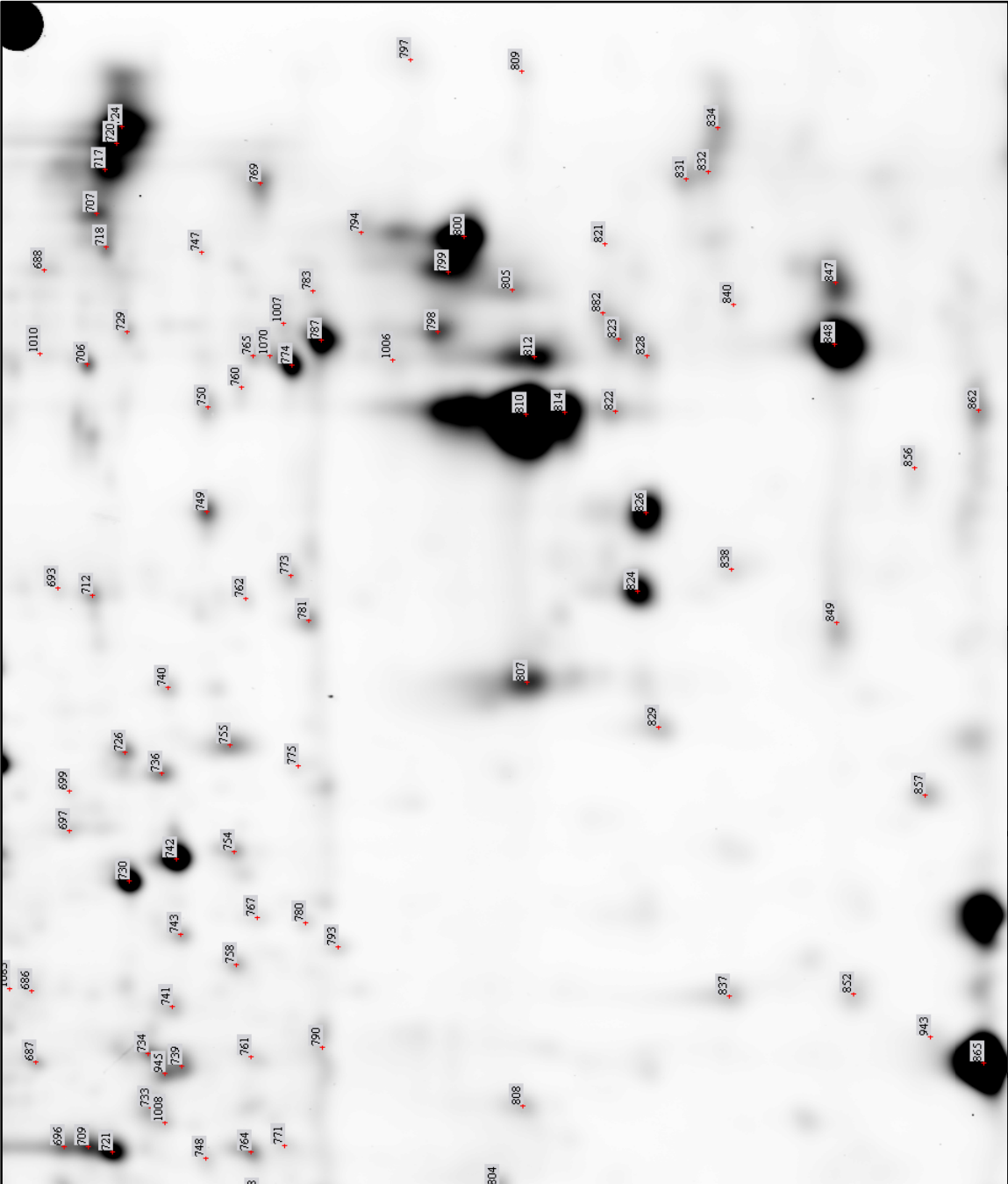
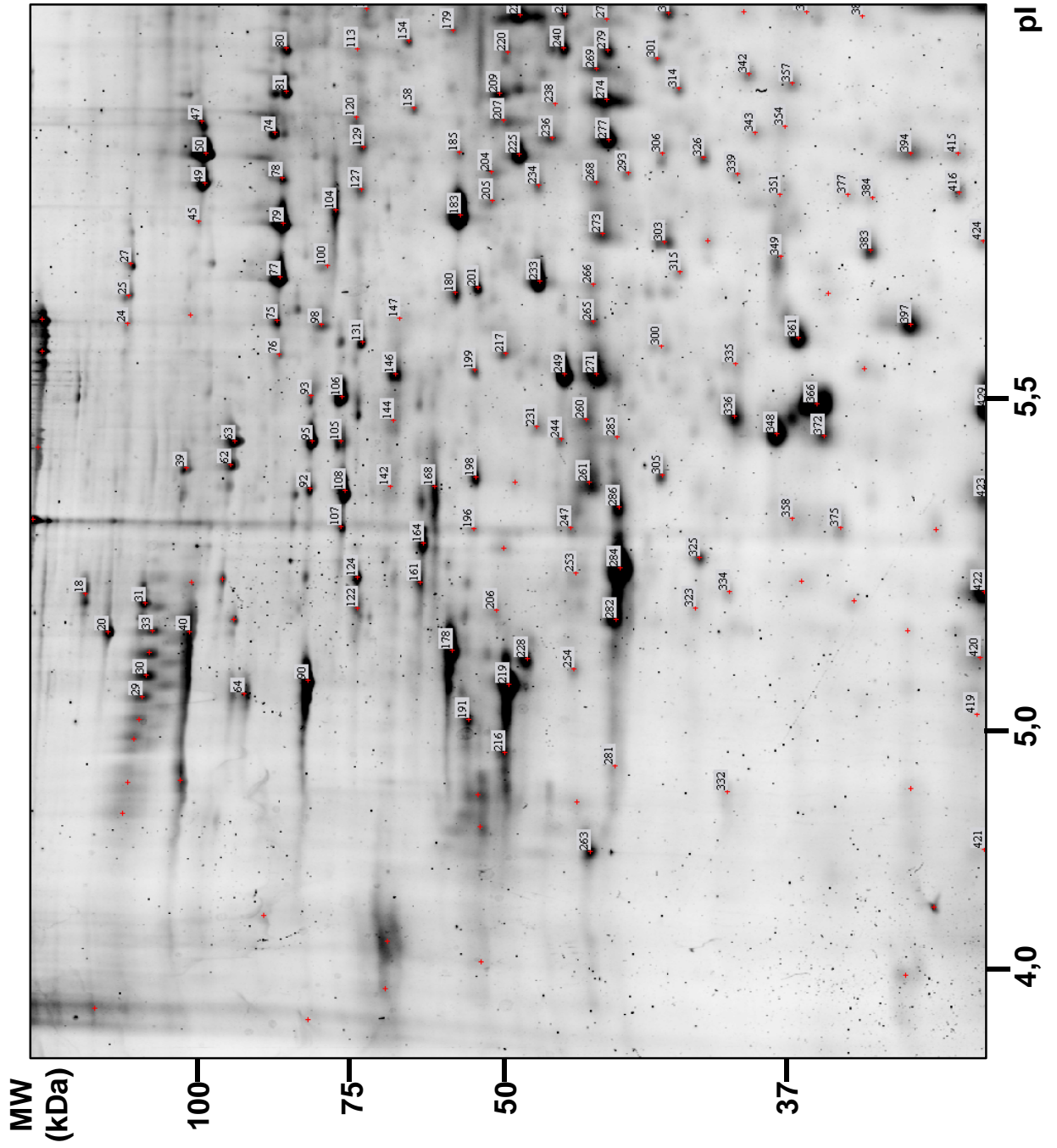
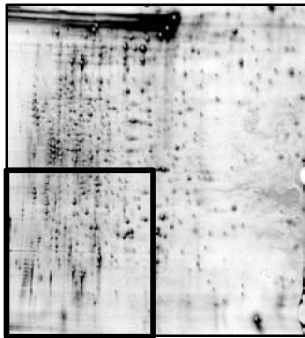


Abb. A2: Annotierte Proteinkarte der sekretorischen Granula (Fraktion 2) aus CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen. Es wurden insgesamt 751 Proteinspots annotiert (Tab. A2) und in vier vergrößerten Abschnitten (A-D) des Gesamtgels dargestellt.

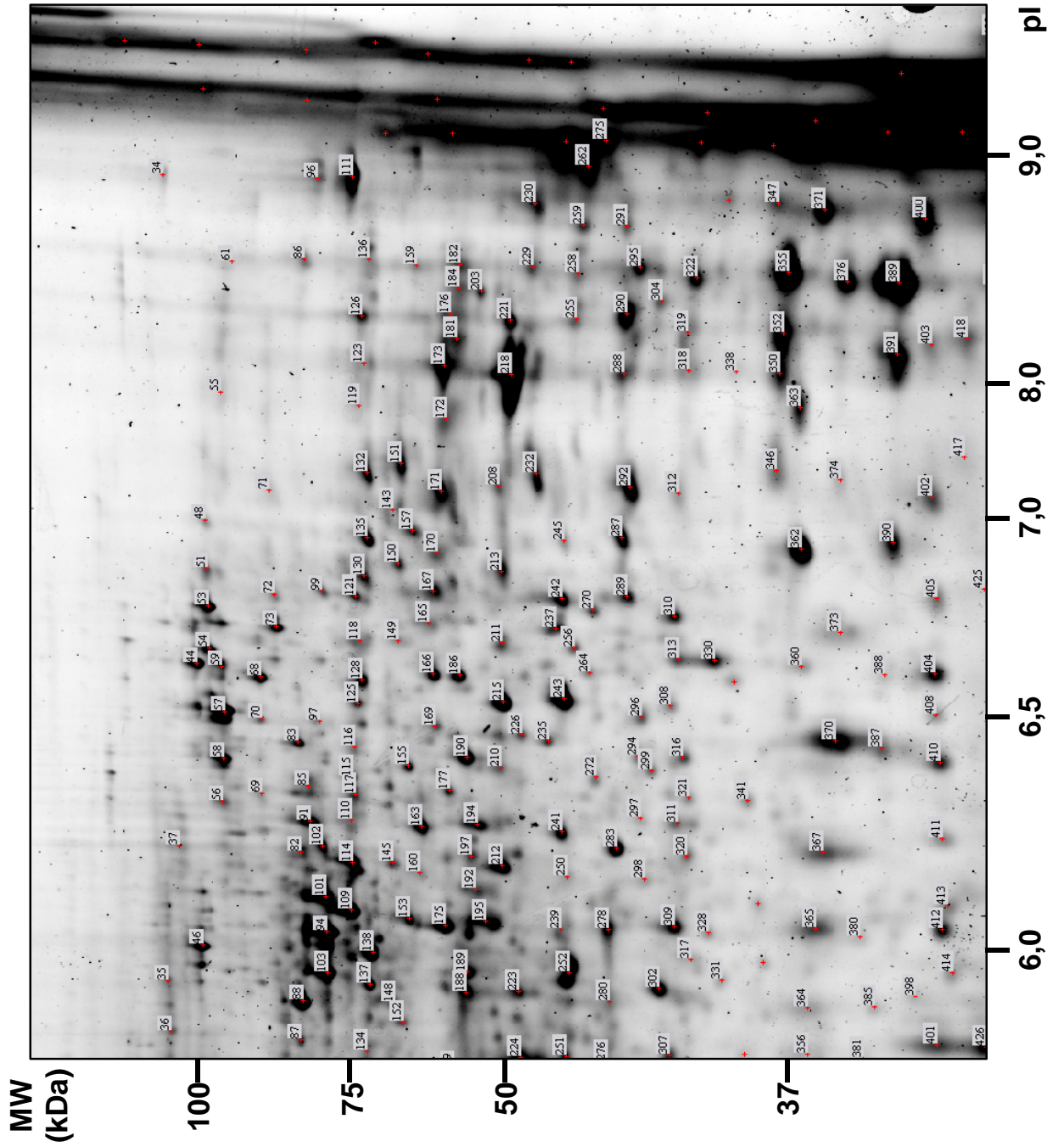
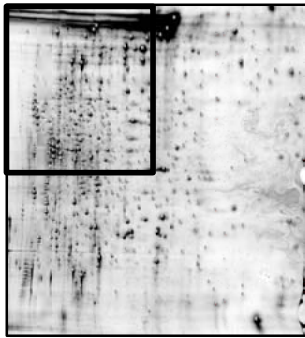
Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen-bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
601	1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1 isoform a preproprotein	ASAH1	gij189011548	A8K0B6	45087	7.5	4	86	unknown
605	1	mitogen-activated protein kinase scaffold protein 1	MAPKSP1	gij11496277	Q9UHA4	13671	6.7	2	68	LY
610	1	hemoglobin subunit alpha	HBA1	gij9256890	P69905	30476	8.9	3	157	SY,ER,MT
614	2	beta-2-microglobulin	HLA-Cw	gij6730518	P61769	11767	5.8	4	90	EN,ME,PL
615	1	smooth muscle myosin light chain	MYL	gij189017	unknown	11753	4.5	2	103	ME

^{a)} Anzahl der unabhängigen Identifikationen aus verschiedenen 2D Gelen

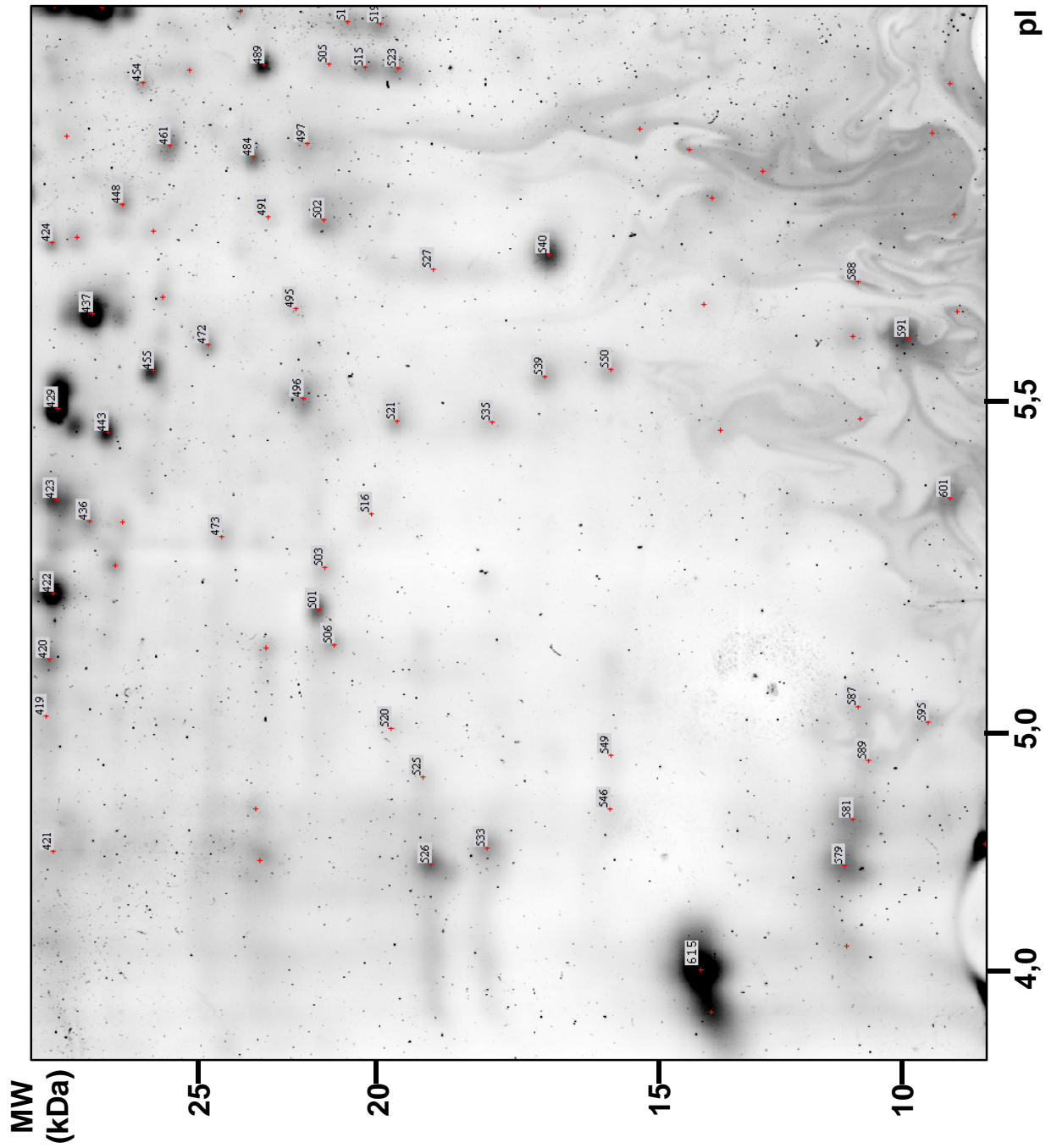
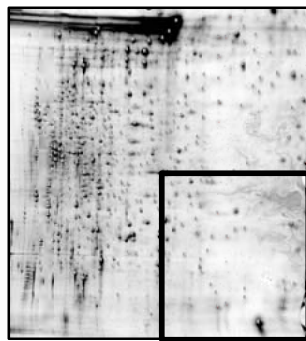
A Fraktion 6



B Fraktion 6



C Fraktion 6



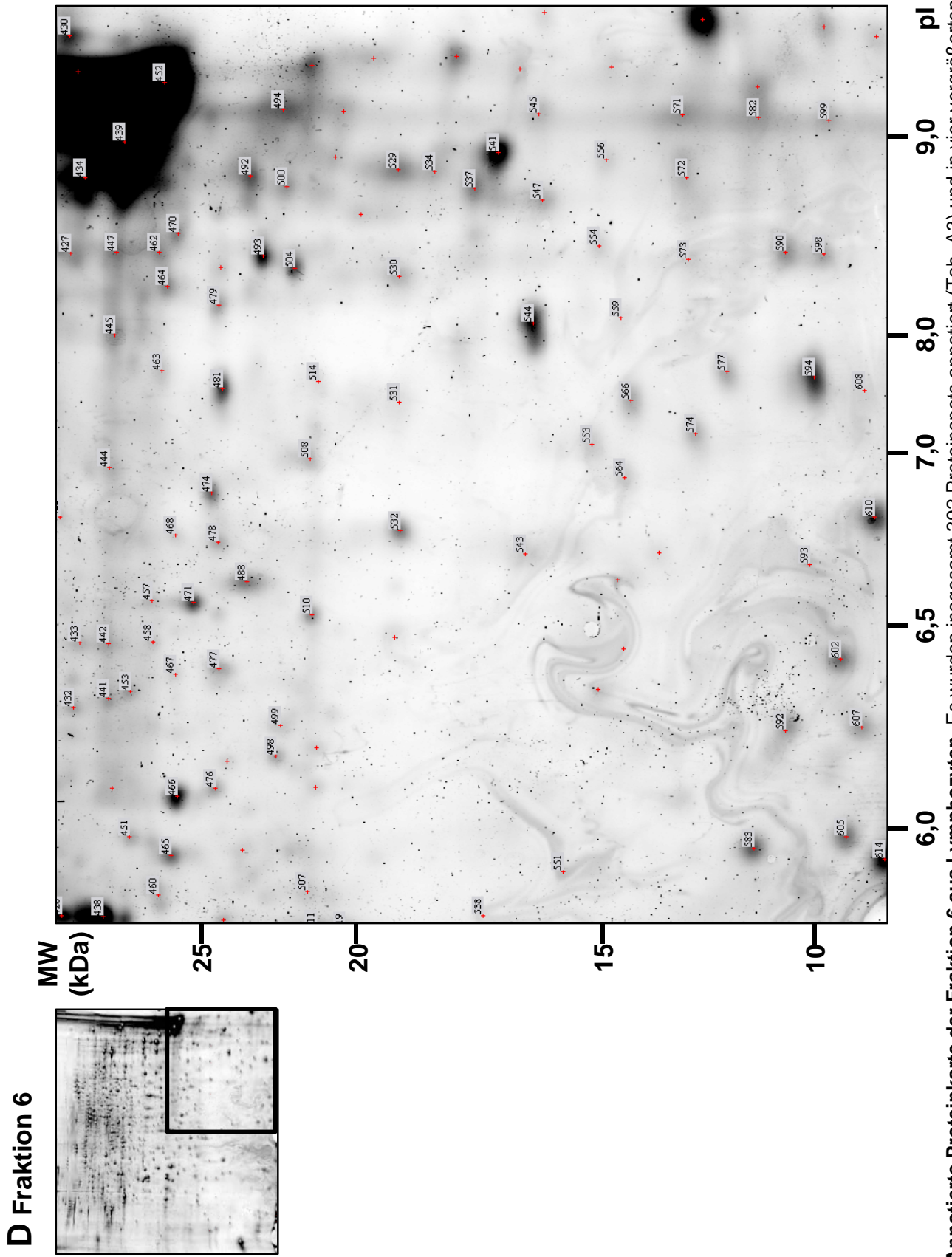


Abb.A3: Annotierte Proteinkarte der Fraktion 6 aus Lymphozyten. Es wurden insgesamt 392 Proteinspots annotiert (Tab. A3) und in vier vergrößerten Abschnitten (A-D) des Gesamtbilds dargestellt.

1.4 Identifikationsliste von Proteinen aus Granula der $\gamma\delta$ T Zellen

Tabelle A4: Identifikationen aus den 2D Gelen der $\gamma\delta$ T Zellen: 36702, 36703, 36696

Spot Nr.	Protein Name	NCBI.Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Gel Nr.
69	hypothetical protein DKFZp547A1913	gi 12224840	31705	5.8	2	93	36702
389	annexin A11, isoform CRA_a	gi 119600805	26961	6.9	6	108	36702
895	MHC class I antigen	gi 118721276	30727	5.2	7	178	36702
76	hypoxia up-regulated 1 precursor	gi 5453832	111494	5.2	32	704	36703
77	HYOU1 protein	gi 116283339	73229	5.7	5	132	36703
561	protein disulfide isomerase-related protein 5	gi 1710248	46512	5.0	10	420	36703
853	protein ARMET precursor	gi 23503040	20700	8.7	3	119	36696
684	MHC class II antigen	gi 5823139	10539	5.3	2	72	36696
689	MHC class II antigen	gi 22121727	10020	4.9	2	83	36696

1.5 Identifikationsliste von Proteinen zur Reifung sekretorischer Lysosomen

Tabelle A5: Identifikationen aus den 2D Gelen zur Reifung der Granula: 36836, 36839

Spot Nr.	Protein Name	NCBI.Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Gel Nr.
769	histocompatibility antigen HLA-DR	gi 836628	19850	4.8	2	97	36836
789	histocompatibility antigen HLA-DR	gi 836628	19850	4.8	3	99	36836
878	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	69	36836
880	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	78	36836
881	nuclear chloride channel	gi 4588526	27249	5.0	13	321	36836
902	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	80	36836
1023	peroxiredoxin-2	gi 1617118	18486	5.2	4	86	36836
1152	hemoglobin beta subunit variant	gi 6003532	14069	6.5	2	44	36836
1159	alpha-hemoglobin	gi 183801	3284	8.5	2	89	36836
1653	septin 2	gi 119591666	18259	6.2	3	70	36839
1642	actin	gi 194376310	38950	5.2	3	99	36839
1946	granzyme A	gi 33357774	26328	9.1	5	141	36839
1952	granzyme A	gi 33357774	26328	9.1	3	65	36839
1865	granzyme B	gi 13096242	25894	9.6	8	104	36839
1872	granzyme B	gi 13096242	25894	9.6	10	100	36839
695	myosin light chain	gi 189017	11753	4.5	2	103	36839

11. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz danken, für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit im Institut für Immunologie des UK-SH Kiel durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rose-John danke ich recht herzlich für die Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe für die Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit der Proteinanalyse am MALDI-Gerät der Zoophysiologie. In dem Zusammenhang gilt der größte Dank Dr. Christoph Gelhaus für die MALDI-Analysen, die in Schnelligkeit und Präzision unübertroffen sind. Diese Doktorarbeit wäre ohne die großartige Kooperation mit der Zoophysiologie in dem vorliegenden Umfang nicht realisierbar gewesen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Ralph Lucius vom Institut für Anatomie (CAU Kiel) für die EM-Aufnahmen und Saskia Heppner vom Institut für Zoophysiologie für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Axio Imager.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, einschließlich jener hier nicht Genannten, möchte ich für jedwede Unterstützung und die Vermittlung eines angenehmen Arbeitsklimas danken.

Ganz besonders danke ich auch Melanie Nebendahl und Alyn Gerneth für die Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung und der angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich natürlich auch allen weiteren Mitgliedern der AG Janssen, Marcus Lettau, Maren Paulsen und Signe Valentin. Maren und Marcus möchte ich auch noch für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit danken.

Meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit danken.

Und ein ganz besonderer Dank gebührt natürlich Dorothee für ihre Geduld und die kulinarische Unterstützung während des Zusammenschreibens.

12. Curriculum vitae

Hendrik Schmidt

Knooper Weg 48

24103 Kiel

e-mail: h_schmidt@gmx.de

Geburtsdatum: 18.12.1980

Geburtsort: Schwerin

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Hochschulausbildung

- 01/2006 – 08/2009 Promotion bei Prof. Dr. Ottmar Janssen am Institut für Immunologie, UK-Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- 11/2005 Diplom in Biochemie und Molekularbiologie
- 10/2004 – 06/2005 Diplomarbeit bei PD Dr. Christoph Plieth zum Thema: 'Entwicklung fluoreszierender Redoxindikatoren und deren gezielte Expression in pflanzlichen Organellen', Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, CAU Kiel
- 10/2000 – 11/2005 Studium der 'Biochemie und Molekularbiologie' (BCM) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hauptstudium BCM mit den Nebenfächern:
Pharmazeutische Chemie, Mikrobiologie und Immunologie

Auslandspraktika

- 06/2005 – 10/2005 ,Construction and screening of cDNA libraries for cloning and characterization of yet unidentified luminescent and fluorescent proteins from terrestrial and deep-sea animals' Prolume Ltd. (Dr. Bruce Bryan), Pinetop, Arizona, USA
- 02/2004 – 04/2004 'Molecular Signaling in *Arabidopsis*'
Dr. M. Knight, Plant Science Department, University of Oxford, GB.

Wehrpflicht

- 09/1999 – 07/2000 Wehrdienst beim Panzergrenadierbataillon 401, Hagenow

Schulbildung

- 08/1992 – 07/1999 Abitur: Gymnasium Gadebusch

Preise und Stipendien

2007	GBM Innovation Award For Young Scientists
2007	Posterpreis, Signal Transduction Meeting, Weimar
2007	Reisestipendium der DGfI
2006	Reisestipendium der STS
2005	Reisestipendium des DAAD (USA Aufenthalt)

13. Publikationsliste

Originalarbeiten

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Lettau M., Watzl C., Leippe M. and Janssen O. 2D-DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK-cells. *Proteomics* 2008, 8:2911-2925.

Schmidt H., Gelhaus C., Latendorf T., Nebendahl M., Petersen A., Krause S., Leippe M., Becker W.M and Janssen O. 2D-DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. *Proteomics* 2009, im Druck

Krause S., Latendorf T., **Schmidt H.**, Darcan-Nicolaisen Y., Reese G., Petersen A., Janssen O. and Becker W.M. Peanut varieties with reduced Ara h 1 content indicating no reduced allergenicity. *Molecular Nutrition and Food Research* 2009, im Druck

Biller L., **Schmidt H.**, Krause E., Gelhaus C., Handal G., Lotter H., Janssen O., Tannich E. and Bruchhaus I. Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics*, im Druck

Schmidt H., Gelhaus C., Lucius R., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunology*, in Revision

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Lettau M., Wesch D., Leippe M., Janssen O. Comparative 2D-DIGE analyses of enriched secretory lysosomes from human T cell populations. in Vorbereitung

Ammerpohl O., **Schmidt H.**, Gelhaus C., Xu X., Heydari P., Pilarsky C., Olempska-Müller M., Martin-Subero JI., Leippe M., Siebert R., Janssen O., and Kalthoff H. Comparative analysis of the genome, transcriptome and proteome of malignant and the benign variants of the A818-6 PDAC cell line. in Vorbereitung

Noack A., Häsler R., **Schmidt H.**, Gelhaus C., Janssen O., Kalthoff H., Trauzold A. Inhibition of microRNA-197 modulates proliferation and apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC). in Vorbereitung

Sellami N., Adam-Klages S., Paulsen M., Lettau M., **Schmidt H.**, Nebendahl M., Kruse M.L., Gelhaus C., Buck F., Harder S., Reza Parwaresch R., Janssen O. and Heidebrecht HJ. First insights into the function of the cancer/testis antigen 45 (CT45). in Vorbereitung

Übersichtsartikel

Lettau M., **Schmidt H.**, Kabelitz D., and Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T- and NK-cells. *Immunology Letters* 2007 15;108(1):10-19

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Schmidt H., Nebendahl M., Latendorf T., Lettau M., Riecken S., Becker W.M. and Janssen O. 2D-DIGE A powerful tool for proteome comparison of isolated lysosomes, peanut extracts and more. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen 2006* Nov 17; 29:16

Riecken S., **Schmidt H.**, Darcan Y., Janssen O. und Becker W.M. Allergenspektrum verschiedener Erdnussvarietäten. *19. Mainzer Allergieworkshop 2006*

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M. and Janssen O. Differences in the proteome of enriched secretory lysosomes obtained from leukemic NK-cell lines and activated human NK-cells. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen 2007* Nov 16; 30:18

Riecken S., **Schmidt H.**, Darcan Y., Latendorf T., Janssen O. and Becker W.M. The allergen spectrum of different peanut varieties. *XXVI European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2007*

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Janssen O. Proteome analysis of enriched secretory lysosomes of human NK cells by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) *Signal Transduction 2007*

Schmidt H., Gelhaus C., Lettau M., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. 2D-DIGE analysis of enriched secretory lysosomes of human T and NK cells. *Wiener klinische Wochenschrift 120, Heft 15-16 (2008)*

Schmidt H., Gelhaus C., Lettau M., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. Proteomic profiling of secretory granules of different T cell subpopulations. *Signal Transduction 2008*

14. Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janssen selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Teile dieser Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den 25. Mai 2009

Hendrik Schmidt