

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)

des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung sekretorischer Lysosomen aus humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Lisann Marie Drews

aus Hamburg

Kiel
2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ottmar Janßen
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Kellner

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.7.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Zellen des Immunsystems	1
1.2 Sekretorische Lysosomen.....	8
1.2.1 Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen.....	8
1.2.2 Charakteristika sekretorischer und konventioneller Lysosomen	9
1.2.3 Inhalt zytotoxischer Granula	11
1.2.3.1 Fas Ligand.....	12
1.2.3.2 Perforin, Granzyme und Granulysin	12
1.2.4 Biogenese sekretorischer Granula	15
1.2.5 Die immunologische Synapse	16
1.2.6 Analyse lysosomaler Kompartimente	17
1.3 Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-DIGE).....	18
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Zellen	22
2.1.2 Medien und Puffer	22
2.1.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze	22
2.1.3 Material für die Biochemie.....	24
2.1.3.1 Puffer und Reagenzien.....	24
2.1.4 Geräte und Materialien	28
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellbiologische Methoden	30
2.2.1.1 Zellkultur.....	30
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	30
2.2.1.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	30
2.2.1.4 Kultivierung von PHA- Blasten	31
2.2.1.5 Magnetische Zellseparation von Lymphozyten-Subpopulationen.....	31
2.2.1.6 Durchflusszytometrie	32
2.2.2 Biochemische Methoden	33
2.2.2.1 Immunpräzipitation	33

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	33
2.2.2.4 Western Blot.....	34
2.2.2.6 Isolierung sekretorischer Granula	37
2.2.2.7 Auftrennung und Analyse der Organellenlysate	38
3. Ergebnisse	40
3.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus PHA-Blasten	40
3.2 Charakterisierung sekretorischer Granula aus leukämischen T-Zellen.....	42
3.2.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus leukämischen T-Zell-Linien	42
3.3 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	48
3.3.2 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	51
3.4 Reifung zytotoxischer Effektor-Kompartimente.....	65
3.4.1 PHA-Blasten.....	65
3.4.2 <i>In vitro</i> expandierte CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Linien.....	66
4. Diskussion	73
4.1 Anreicherung von sekretorischen Lysosomen aus unterschiedlichen T-Zell- Populationen.....	73
4.2 Charakterisierung der individuellen Organellenfraktionen über den Nachweis bekannter Markerproteine mittels Western Blot	75
4.2.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus PHA-Blasten	75
4.2.2 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus leukämischen T-Zell-Linien	76
4.3 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	78
4.4 Reifung zytotoxischer Effektor-Kompartimente.....	82
4.4.1 PHA-Blasten.....	82
4.4.2 <i>In vitro</i> expandierte CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Linien	83
5. Zusammenfassung	87
6. Literaturverzeichnis	89
Tagungsbeiträge.....	96
Veröffentlichung.....	96
Danksagung.....	97
Curriculum vitae	98

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Adapterprotein
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
cm	Zentimeter
d.h.	das heisst
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIGE	<i>differential gel electrophoresis</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAA	Iodacetamid
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LAMP	<i>lysosomal-associated membrane protein</i>
M	molar
M6P	Mannose-6-Phosphat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related molecule</i>
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>

MVB	<i>multivesicular body</i>
MW	Molekulargewicht
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
pmol	Picomol
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
V	Volt
Vs.	Versus, gegenübergestellt
vgl.	vergleiche
Vh	Volt-Stunden
W	Watt
WL	<i>whole lysate</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ρ	Dichte

1. Einleitung

1.1 Die Zellen des Immunsystems

Auf der Stufe der Wirbeltiere hat sich im Laufe der Evolution ein hocheffizientes Abwehrsystem entwickelt, um den Körper vor eindringenden Fremdsubstanzen und Fremdorganismen zu schützen. Die Komponenten des Immunsystems setzen sich aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen und entwickeln ein komplexes Zusammenspiel zur Abwehr pathogener Substanzen. Die zelluläre Komponente des Immunsystems bilden die Leukozyten, die sich wiederum in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und Lymphozyten unterteilen lassen. Der humorale Anteil besteht aus unterschiedlichen löslichen Proteinen, welche Erreger durch Lyse direkt eliminieren können oder das interzelluläre Zusammenspiel und die Kommunikation des Abwehrsystems koordinieren. Beide Komponenten sind in unterschiedlichem Maße an der Ausbildung von unspezifischen (angeborenen) oder spezifischen (erworbenen) Immunreaktionen beteiligt. Hierbei findet eine Unterscheidung zwischen körperfremden, pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen oder Viren, und körpereigenen Strukturen statt. Darüber hinaus ist die Beseitigung von infizierten oder entarteten körpereigenen Zellen eine weitere wichtige Aufgabe des Immunsystems. Körperfremde Strukturen können über Pathogen-assoziierte Muster eine sofortige angeborene oder eine zeitversetzte humorale Immunantwort induzieren. Bei letzterer werden Lymphozyten und Antikörper gebildet, die spezifisch gegen die Oberflächenstruktur eines Pathogens – beispielsweise das Hüllprotein eines Virus – gerichtet sind. Im Rahmen dieser spezifischen Immunreaktion bilden sich Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen zu einer beschleunigten Eliminierung der Antigene beitragen.

Das angeborene Immunsystem dient der ersten Abwehr von Krankheitserregern, beispielsweise direkt nach ihrem Eindringen in den Organismus durch eine physikalische Barriere. Zellen des angeborenen Immunsystems gehören in erster Linie zur myeloiden Zellreihe. Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Langerhans-Zellen) können Pathogene auf verschiedenen Wegen aufnehmen und zerstören. Dabei werden die Pathogene meist so prozessiert, dass sie den Zellen des erworbenen Immunsystems als Antigene präsentiert werden können

(siehe unten). Zum angeborenen Immunsystem zählen weiterhin die Mastzellen, welche über Freisetzung von Substanzen wie Histamin und Serotonin eine lokale Entzündungsreaktion auslösen können und beispielsweise auch eine große Rolle bei allergischen Prozessen spielen. Darüber hinaus gibt es Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche im Gegensatz zu den Lymphozyten des angeborenen Immunsystems keine Antigen-spezifischen Rezeptoren besitzen, jedoch über ein ähnliches Arsenal lytischer Effektorproteine zur Eliminierung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen verfügen. Unterstützt werden die Zellen der unspezifischen Abwehr durch humorale Faktoren wie das Komplementsystem, Interferone und Akute-Phase-Proteine. Gleichzeitig verfügen die meisten Zellen des Immunsystems über konservierte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*Pattern Recognition Receptors = PRRs*), über die bei Erregern häufig vorkommende Merkmale (*Pathogen-Associated Molecular Patterns = PAMPs*) wie bakterielle Zellwandbestandteile oder virale DNA und RNA erkannt werden. Das spezifische Immunsystem wird von Zellen der lymphatischen Reihe gebildet. Das Immunsystem ist prinzipiell in der Lage, gegen jedes beliebige Pathogen aus der großen Vielfalt der potenziellen Krankheitserreger eine Immunantwort zu entwickeln. Dies wird durch eine zufällige Rekombination von Gensegmenten für die Antigenrezeptoren erreicht, die auf der Oberfläche der Lymphozyten exprimiert sind. Mit diesen erkennen und binden sie individuelle Antigene. Die Lymphozyten setzen sich aus B-, T- und NK-Zellen zusammen. Dabei sind im Wesentlichen B- und T-Zellpopulationen an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses und einer oft lebenslangen Immunität gegen bereits bekämpfte Krankheitserreger beteiligt. B-Zellen besitzen als Antigenrezeptoren membrangebundene Immunglobuline, über die sie Antigene erkennen und internalisieren können. Sie differenzieren nach einer initialen Antigen-Stimulation z.T. unter dem Einfluss von Mediatoren, die von T-Zellen freigesetzt werden, zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen. Die Antikörper stellen den humoralen Anteil der spezifischen Immunantwort dar. Sie initiieren durch Bindung an entsprechende Epitope der Pathogene eine Immunreaktion zur Zerstörung des Erregers. T-Zellen besitzen verschiedene Funktionen und exprimieren unterschiedliche Typen von membranständigen Antigenrezeptoren oder auch unterschiedliche akzessorische Moleküle. Als Antigenrezeptoren fungieren strukturell mit den Immunglobulinen verwandte T-Zell-Rezeptoren (TZR). Eine T-Zelle wird nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen aktiviert,

proliferiert und differenziert je nach lokalem Zytokinmilieu zu einem von mehreren Typen von T-Effektorzellen. Eine effiziente T-Zellaktivierung ist nur dann zu beobachten, wenn die T-Zell-Rezeptoren ihr spezifisches Antigen von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems präsentiert bekommen. Bei dieser Aktivierung spielen die Moleküle des körpereigenen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (*Major Histocompatibility Complex = MHC*) eine entscheidende Rolle. Derartige MHC-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen (MHC I) bzw. auf allen Antigen-präsentierenden oder aktivierten Zellen des Immunsystems (MHC II) exprimiert. T-Zellen lassen sich funktionell grob in drei Untergruppen einteilen. Zytotoxische T-Zellen sind über Freisetzung zytolytischer Effektorproteine für die Zerstörung von Zellen zuständig, die z.B. von Viren oder anderen intrazellulären Krankheitserregern befallen sind. T-Helfer-Zellen mit ihren Unterpopulationen (z.B. Th1, Th2, Th17) sind für die Kontext-abhängige Zytokin-Produktion verantwortlich und steuern dadurch lokal oder systemisch die Differenzierung nahezu aller anderen Zellpopulationen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Regulatorische T-Zellen (Treg) sind in der Lage, die Aktivität von anderen Lymphozyten zu unterdrücken und so überschießende Immunantworten oder Autoimmunität zu begrenzen (Murphy et al. 2009).

1.1.1 T-Zellreifung und -selektion

T-Zellen unterliegen in ihrer Entwicklung einem umfangreichen Selektionsprozess. Während alle lymphatischen Vorläuferzellen und auch die reifen B-Zellen im Knochenmark gebildet werden, verläuft die Differenzierung und Selektion von T-Zellen im Thymus. T-Zell-Vorläufer verlassen das Knochenmark und gelangen in den Thymus, wo sie eine Differenzierung durchlaufen, die auch die zufällige Zusammenlagerung der T-Zell-Rezeptor-Gensegmente (*VDJ-Rearrangement*) und die Expression von Signalproteinen des CD3/ ζ -Komplexes und der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 beinhaltet. Die frühen Thymozyten exprimieren noch keine dieser Oberflächenmoleküle und werden als „doppelt-negative“ (weder CD4 noch CD8) Thymozyten bezeichnet (Abb. 1.1). Im Laufe der Thymozytenreifung werden dann sowohl CD4- und CD8-Moleküle (man spricht von „doppelt-positiven“ Thymozyten) als auch die Untereinheiten des CD3/ ζ -Komplexes sowie der damit assoziierte T-Zell-Rezeptor (TZR) exprimiert. In der Regel weisen derartige Thymozyten einen $\alpha\beta$ -TZR auf, d.h. das TZR-Dimer besteht aus einer α - und einer β -Kette.

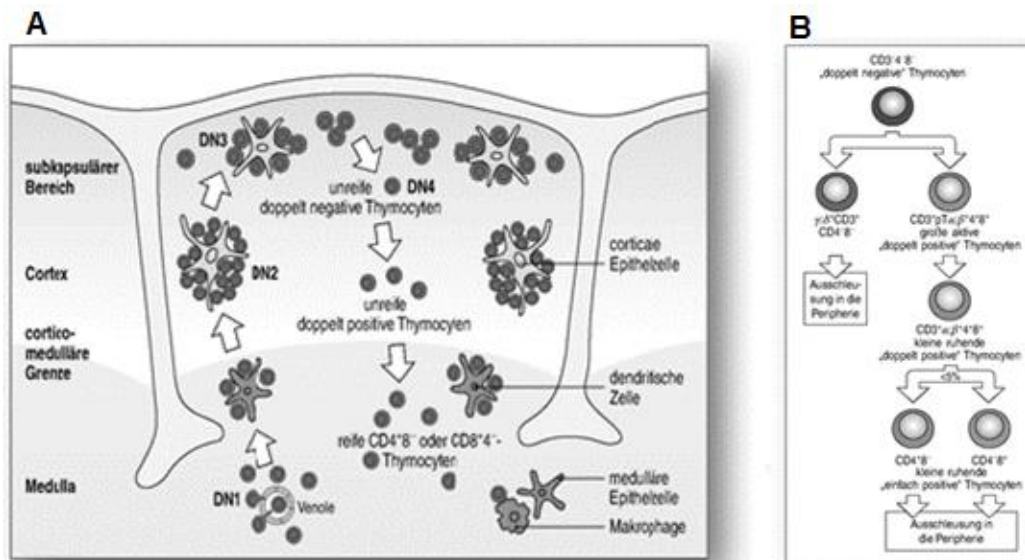


Abb. 1.1 A: Unterschiedliche Entwicklungsstadien von T-Zellen im Thymus. Vorläuferzellen wandern nahe der Kortex-Medulla-Grenze aus dem Blut über die Venolen in den Thymus ein. Die eingewanderten Zellen werden über vom Thymus exprimierte Liganden für die T-Zell-Linie vorgeprägt. Sie passieren die Kortex-Medulla-Grenze und gelangen in den äußeren Cortex, während sie die frühen doppel-negativen CD4⁻ CD8⁻-Stadien durchlaufen. Die Vorläuferzellen differenzieren weiter zum CD4⁺ CD8⁻-Stadium und die DN3-Zellen wandern über den subkapsulären Bereich weiter in den Cortex. Im Mark befinden sich schließlich nur noch reife, einfach positive T-Zellen. Sie verlassen den Thymus nach einiger Zeit und gelangen in den Blutkreislauf (aus Murphy et al. 2009, Abbildung 7.21).

B: Zwei eigenständige T-Zell-Linien im Thymus. Doppelt negative T-Zellen differenzieren einerseits zu γδ-T-Zellen, die in die Peripherie ausgeschleust werden und andererseits zu großen aktiven doppel-positiven T-Zellen. Diese differenzieren weiter zu kleinen ruhenden doppel-positiven T-Zellen und schließlich zu CD4⁺ bzw. CD8⁺ kleinen ruhenden T-Zellen. Diese gelangen dann ebenfalls in die Peripherie (aus Murphy et al. 2009, Abbildung 7.19).

Neben diesen αβ-T-Zellen gibt es eine weitere Population von T-Zellen, die einen alternativen γδ-TZR exprimieren, in der Regel weder CD4- noch CD8-Moleküle auf der Oberfläche haben und als evolutionär frühes Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem angesehen werden. Die doppel-positiven Zellen durchlaufen nun einen Selektionsprozess, bei dem etwa 95-97 % der Zellen als unbrauchbar entsorgt wird. Es überleben nur die Zellen, deren Rezeptoren an Peptid/MHC-Komplexe binden können, die aber nicht gegen körpereigene Antigene gerichtet sind. Schlussendlich wird die Expression des TZR gesteigert und die nunmehr reifen Thymocyten verlassen als fremdantigen-reaktive, CD4- oder CD8- „einfach-positive“ T-Zellen den Thymus (Abb. 1.1, Murphy et al. 2009).

1.1.2 CD8⁺ T-Zellen

Im Rahmen der humoralen Immunabwehr können Antikörper Krankheitserreger binden, die sich im Blut oder in Extrazellularräumen aufhalten. Viele Bakterien, Parasiten und vor allem Viren vermehren sich jedoch innerhalb von Zellen. Die T-Lymphozyten als zelluläre Komponenten der erworbenen Immunität haben daher die Aufgabe, auch derartige Erreger aufzuspüren und abzutöten.

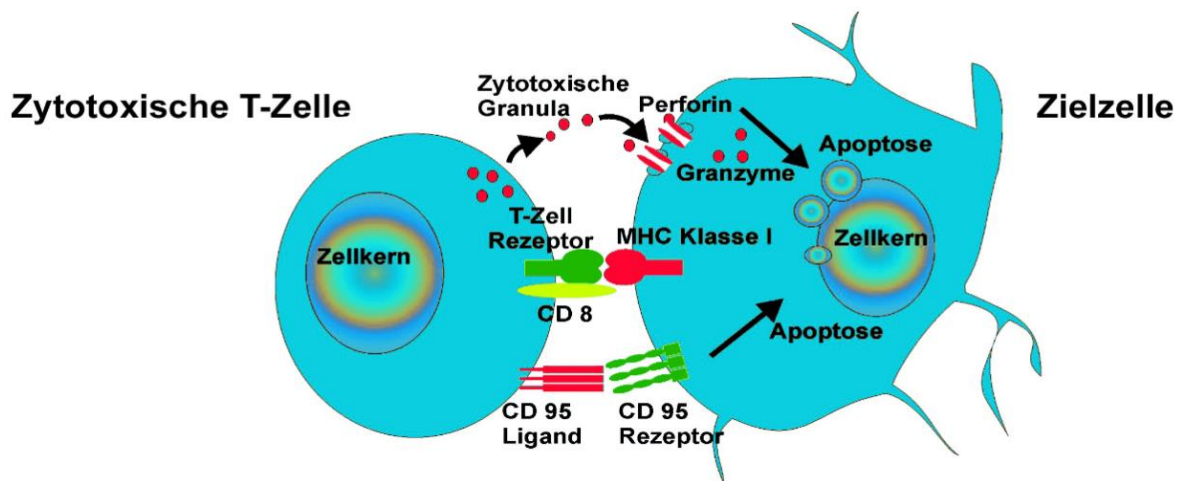


Abb. 1.2 Interaktion einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zelle mit einer Zielzelle. Der T-Zell-Rezeptor der CD8⁺ T-Zelle erkennt spezifisch ein Peptid, das von MHC-Klasse-I Molekülen einer Antigen-präsentierenden Zelle oder aber der Zielzelle präsentiert wird. Es bildet sich eine immunologische Synapse. Das T-Zell-Rezeptor-Signal führt zur Aktivierung und zur gerichteten Ausschüttung von zytotoxischen Effektorproteinen wie Perforin und Granzymen. Perforin bildet vermutlich Poren in der Zellmembran der Zielzelle und ermöglicht das Eindringen von Granzymen in die Zielzelle. Die Granzyme lösen in der Zielzelle den programmierten Zelltod aus. Zytotoxische T-Zellen können gleichzeitig oder alternativ über die Oberflächenexpression von Fas Ligand-Molekülen CD95-Todesrezeptoren auf der Zielzelle aktivieren und damit ebenfalls Apoptose in der Zielzelle induzieren.

Zytotoxische T-Zellen machen etwa 30 % der Lymphozyten im peripheren Blut aus, sind klassischerweise CD8-positiv (CD8⁺), und erkennen endogene Antigene, die z.B. von virusinfizierten oder entarteten Zellen im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert werden (Abb. 1.2). Zytotoxische T-Zellen tragen zur Infektionskontrolle bei, indem sie über verschiedene Mechanismen in infizierten oder entarteten Zellen einen immunologisch ungefährlichen Zelltod durch Apoptose induzieren. Hierfür exprimieren sie ein Arsenal an zytotoxischen Effektorproteinen, die bis zum Einsatz in speziellen lytischen Granula gespeichert werden (Abb. 1.2, Murphy et al. 2009).

1.1.3 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen werden klassischerweise als Helfer-Zellen bezeichnet und stellen mit etwa 40 % den größten Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut. Sie modulieren durch Freisetzung einer Vielzahl unterschiedlicher, stimulatorischer oder inhibitorischer Zytokine und Chemokine die Immunantwort. Während CD8⁺ T-Zellen nach Verlassen des Thymus im Wesentlichen als zytotoxische Effektorzellen fungieren, können reife, Antigen-unerfahrene CD4⁺ T-Zellen nach ihrem ersten Antigenkontakt in funktionell distinkte Zelltypen ausdifferenzieren (Abb. 1.3). Eine Sondergruppe bilden die regulatorischen T-Zellen (Treg oder T_R1 oder T_H3), die unter anderem im Thymus unter Einfluss von inhibitorischen Zytokinen wie TGF-β oder IL-10 aus dem Pool der potenziell selbstreaktiven Zellen differenzieren. Ihre wichtigste Funktion ist die Eindämmung von Immunantworten und die Verhinderung von Autoimmunität, die über eine zellkontaktabhängige oder Zytokin-vermittelte Suppression anderer Zellpopulationen erreicht wird. T_H1-Zellen entstehen unter Einfluss von IL-12 und IFN-γ und schütten als Leit-Zytokine IL-2, IFN-γ und TNF-α aus. Ihre wichtigste Funktion ist die Steuerung der zellulären Immunantwort, unter anderem durch Aktivierung von Makrophagen und anderen T-Zellen und zum Teil auch von B-Zellen. T_H1-Zellen können außerdem bestimmte intrazelluläre bakterielle Infektionen kontrollieren, zum Beispiel Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*. Mykobakterien und einige andere Bakterien vermehren sich in intrazellulären Vesikeln, entgehen aber dem durch verschiedene Enzyme und antibakteriellen Substanzen bedingten Abbauprozess in den Lysosomen. T_H1-Zellen induzieren die Fusion dieser bakteriellen Nischen mit Lysosomen, wodurch die Bakterien verdaut werden können. T_H2-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-4 und produzieren ihrerseits ebenfalls IL-4, aber auch IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die Funktion von T_H2-Zellen ist unter anderem die Steuerung der humoralen Immunantwort durch Regulation der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, sodass diese zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausreifen. Des Weiteren sind sie an der Abwehr von Parasiten beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen. T_H17-Zellen entstehen vor allem unter Einfluss von TGF-β und IL-6 und produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-17. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen beteiligt, wodurch der IL-17-Spiegel als Indikator für chronische Entzündungen, aber auch für Autoimmunerkrankungen angesehen werden kann (Abb 1.3, Murphy et al. 2009).

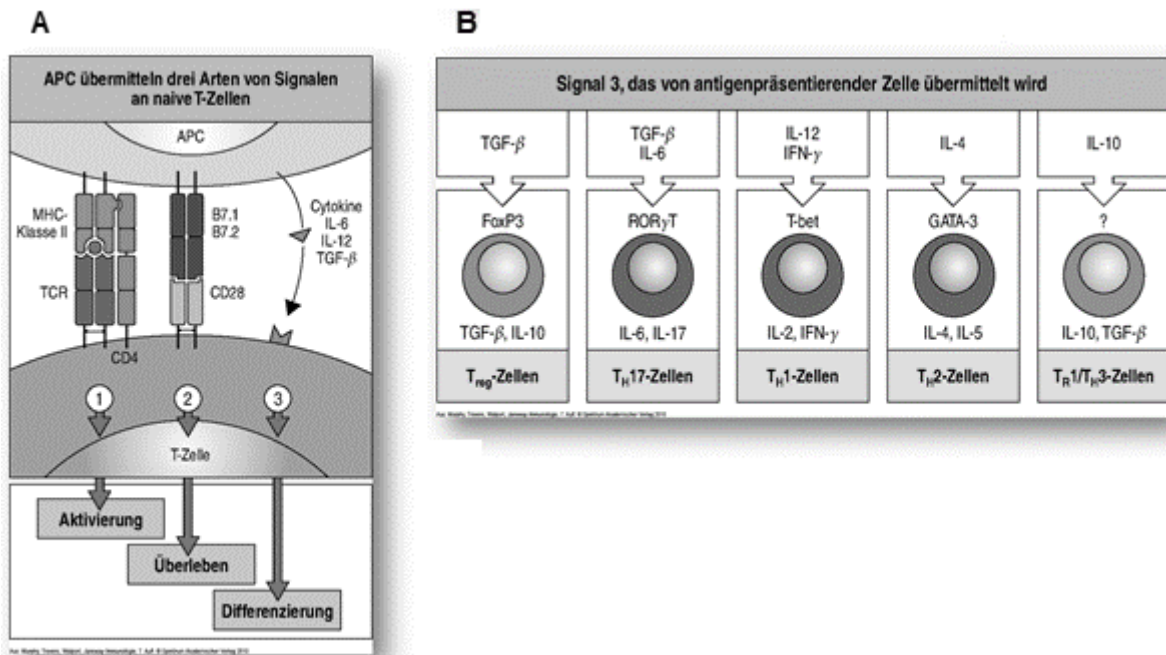


Abb. 1.3 Aktivierung und Differenzierung der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellpopulationen.

A: Drei Arten von Signalen spielen bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle. Ein Fremdpeptid-MHC-Klasse-II-Komplex bindet an den TZR/CD4-Komplex und stellt so das primäre Signal (1). Für die wirksame Aktivierung der naiven T-Zellen wird ein zweites kostimulierendes Signal benötigt, das von derselben APC stammen muss. In diesem Beispiel bindet das CD28-Molekül der T-Zelle an B7-Moleküle der APC (2). Somit kann die das erste Signal erhaltende T-Zelle überleben und proliferieren. Sogenannte Inducible T-cell Co-Stimulator (ICOS) und andere Mitglieder der CD28-Superfamilie können ebenfalls kostimulatorische Signale liefern. Unterschiedliche Signale bringen über verschiedene Differenzierungswege Untergruppen von CD4-T-Zell-Effektorzellen hervor (3). Hierbei sind u.a. Zytokine beteiligt (aus Murphy et al. 2009, Abb. 8.19).

B: Mehrere Varianten des Signals 3. Beispielsweise reagieren naive CD4⁺ T-Zellen auf spezifische Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe und auf kostimulierende Moleküle mit der Produktion von IL-2 und proliferieren daraufhin. Die verschiedenen Formen von Signal 3 hängen von den Bedingungen der Umgebung ab, vom Auftreten verschiedener Krankheitserreger etc. (aus Murphy et al. 2009, Abb.8.29).

Durch die ausgeschütteten Zytokine hemmen sich die einzelnen Helferzell-Populationen zudem gegenseitig im Sinne einer Kreuzhemmung. Dies führt dazu, dass im lokalen Mikromilieu in der Regel ein Reaktionstyp überwiegt. CD4⁺ T-Zellen erkennen über ihre TZR spezifisch Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen. Diese sogenannten exogenen Antigene stammen oft von Krankheitserregern, die von professionellen APZ aufgenommen und prozessiert wurden. Die Unterteilung in „Th1, Th2 oder Th17“ Zellen gilt in ähnlicher Weise auch für zytotoxische αβ-T-Zellen, aber auch

für $\gamma\delta$ -Zellen. Die unterschiedliche Differenzierung nach Antigen-Stimulation ist damit ein weiterer Punkt, der die Flexibilität des Immunsystems unterstreicht. In ähnlicher Weise können auch $CD4^+$ T-Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen *in vivo* und insbesondere nach Aktivierung und Expansion *in vitro* zytotoxisches Potenzial entwickeln (Shen et al. 2006, Susskind et al. 1996, Sun et al. 2002, Appay et al. 2002). Diese Zellen weisen entsprechend zytotoxische/lytische Effektor-Moleküle in intrazellulären Vesikeln auf. Im Gegensatz zu den klassischen zytotoxischen Zellen ($CD8^+$ und NK-Zellen) ist allerdings die Biogenese und die molekulare Zusammensetzung der zytotoxischen Komponenten aus $CD4^+$ Effektor-T-Zellen bisher nur in Teilaspekten untersucht (Jolly und Sattentau 2007).

1.2 Sekretorische Lysosomen

Bei Lysosomen handelt es sich im Allgemeinen um Zellorganellen mit einem charakteristisch sauren Milieu, die viele abbauende, hydrolytische Enzyme enthalten. Eine wesentliche Funktion von Lysosomen ist es beispielsweise, körperfremdes Material von durch Phagozytose aufgenommenen Endosomen (Phagolysosomen) oder auch körpereigene Stoffwechselprodukte im Kontext der Autophagie (Autophagosomen) abzubauen. In verschiedenen Zelltypen haben lysosomale Kompartimente jedoch eine zusätzliche Speicherfunktion, die häufig mit der Fähigkeit zur regulierten Freisetzung einhergeht. Bei den sogenannten „sekretorischen Lysosomen“ (SL) handelt es sich also um spezialisierte bifunktionale Organellen, welche klassisch degradative Eigenschaften mit der Freisetzung von unterschiedlichen (z.B. zytotoxischen) Effektorproteinen vereinen (Blott und Griffiths 2002).

1.2.1 Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen

Sekretorische Lysosomen finden sich in vielen lymphoiden und myeloiden hämatopoetischen Zellen. Osteoklasten, spezialisierte Zellen des mononukleären-phagozytären Systems, setzen über Fusion sekretorischer Lysosomen mit der Plasmamembran gezielt lysosomale Hydrolasen frei, die am Knochenabbau beteiligt sind (Blott und Griffiths 2002). Professionelle APZ (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) prozessieren Antigene in lysosomalen Kompartimenten, beladen dort die MHCII-Moleküle und schleusen sie über einen sekretorischen Weg zur Zelloberfläche (Peters et al. 1991). Thrombozyten nutzen sekretorische Vesikel, um Serotonin und P-

Selectin freizusetzen und damit die Gerinnungskaskade zu induzieren (McNicol und Israels 1999). Basophile Granulozyten und Mastzellen vermitteln allergische Reaktionen, indem sie nach IgE- oder chemotaktischer Stimulation Histamin und/oder Serotonin aus ihren Granula freisetzen (Marone et al. 1997).

Melanozyten stellen eine wesentliche Ausnahme bei Zellen mit sekretorischen Lysosomen außerhalb der hämatopoetischen Reihe dar. Melanozyten sind neuroektodermalen Ursprungs und fungieren als Pigmentzellen z.B. in der Haut. Das wichtigste Pigment (Melanin) wird in sogenannten Melanosomen synthetisiert und gelagert, die Charakteristika von sekretorischen Lysosomen aufweisen (Orlow 1995, Raposo et al. 2002). Befunde im Zusammenhang mit angeborenen Defekten lysosomaler Transportproteine legen nahe, dass Melanosomen als sekretorische Lysosomen angesehen werden können, da insbesondere die intrazellulären Transportmechanismen auf gleichen Prinzipien beruhen. So äußern sich verschiedene lysosomale Speicherkrankheiten (z.B. Chediak-Higashi-Syndrom, Hermansky-Pudlak-Syndrom) phänotypisch einerseits in Pigmentstörungen und partiellem Albinismus, sind aber andererseits auch mit Immundefekten assoziiert, die unter anderem die Funktion von T- und NK-Zellen betreffen (Stinchcombe et al. 2004).

1.2.2 Charakteristika sekretorischer und konventioneller Lysosomen

Sekretorische und konventionelle Lysosomen scheinen morphologisch kaum unterscheidbar und stellen vermutlich gleichermaßen Endpunkte eines endozytotischen Weges dar (Bright et al. 1997). Durch Fusion und Teilung endozytotischer und lysosomaler Kompartimente bilden sich multivesikuläre Strukturen (Luzio et al. 2000). Sekretorische Lysosomen können sich allerdings in ganz unterschiedlichen Strukturen darstellen. Einige verfügen über dichte Bereiche (z.B. in Thrombozyten), andere scheinen eher multilamellar angeordnet zu sein. In Letzteren findet beispielsweise die Prozessierung und Beladung der MHC-Moleküle mit exogenen Antigenen statt (Bunbury 2009). Andere sekretorische Lysosomen wiederum zeigen einzigartige Strukturen, z.B. die Melanosomen. Die dichten Bereiche („dense cores“) der sekretorischen Lysosomen beinhalten häufig die zu sezernierenden Produkte. In T- und NK-Zellen sind dies vermutlich Granzyme und Perforine, die in „dense cores“ durch Proteoglykane in inaktiver Form komplexiert vorliegen, um somit den Eigenverdau der Zellen zu verhindern. Andere lysosomale Kompartimente in zytotoxischen Zellen erinnern eher an

die weniger dichten sekretorischen Lysosomen von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) (Kleijmeer et al. 2001). Welchen Typus von sekretorischen Lysosomen eine bestimmte Zellpopulation aufweist, hängt vermutlich vom Zelltyp sowie vom Aktivierungs- und Reifegrad ab (Blott und Griffiths 2002).

Sekretorische und konventionelle lysosomale Kompartimente sind jedoch nicht nur morphologisch ähnlich, sie verfügen auch funktionell über einen ähnlichen Besatz an degradativen Enzymen, beispielsweise sauren Hydrolasen. Darüber hinaus weisen sie häufig ähnliche Membranproteine auf, z.B. die charakteristischen Lysosomen-assoziierten Membranproteine (LAMP). Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören LAMP-1 (CD107a) (Carlsson und Fukuda 1989), LAMP-2 (CD107b) (Cuervo und Dice 1996) und sein Paralog LAMP-3 (CD208) (Pols und Klumperman 2008). Das Tetraspanin-Molekül TSPAN-30 (CD63) wurde/wird ebenfalls als LAMP-3 bezeichnet, obwohl es strukturell nicht mit den anderen LAMP-Proteinen verwandt ist. Die Funktion der lysosomalen Membranproteine ist noch weitgehend unbekannt, sie scheinen aber unter anderem eine Rolle bei der Autophagie zu spielen (Majeski und Dice 2004, Eskelinen 2006). Spezifische Sequenzen zytosolischer Proteine werden von bestimmten Hitzeschockproteinen (z.B. Hsp70) erkannt und mithilfe der LAMP-Proteine in das Lumen der Lysosomen transportiert (Knol et al. 1991, Agarraberes et al. 1997). Die LAMP-Proteine unterscheiden sich in ihrer Struktur. LAMP-1, -2 und -3 (CD208) weisen eine Typ-1-Transmembrandomäne auf, während CD63 eine (Typ-4)-Tetraspanin-Domäne besitzt (Maecker et al. 1997). CD63 gehört zu den lysosomalen Markerproteinen (Metzelaar et al. 1991) und scheint ein verlässlicher Marker für aktivierte Basophile zu sein. Nach Stimulation von basophilen Granulozyten wird CD63 aus dem Inneren der Zelle an die Zelloberfläche gebracht (Agarraberes und Dice 2001, Monneret et al. 1999). LAMP-1 und LAMP-2 scheinen darüber hinaus auch eine Rolle bei der Adhäsion von aktivierten Leukozyten an vaskuläre Endothelien zu spielen (Kannan et al. 1996) und für LAMP-1 wurde berichtet, dass es NK-Zellen nach Freisetzung von zytolytischen Effektorproteinen vor Autolyse schützt (Cohnen et al. 2013). Außerdem dient die Aktivierungs-induzierte Oberflächenexpression von Lamp-1 als Marker zur Beurteilung der Degranulation und damit der zytotoxischen Aktivität von T- und NK-Zellen (Alter et al. 2004, Betts et al. 2003).

Die meisten Zelltypen enthalten sowohl sekretorische als auch konventionelle Lysosomen (Raposo et al. 2001). Trotz der dargestellten Gemeinsamkeiten unterscheiden

sich sekretorische und konventionelle Lysosomen jedoch wesentlich in ihrem Besatz mit Zelltyp-spezifischen Cargo- oder Effektormolekülen. Darüber hinaus ist die schnelle und gerichtete Freisetzung dieser Zelltyp-spezifischen Effektorproteine eine weitere Besonderheit von sekretorischen Lysosomen. Während sekretorische Lysosomen von Mastzellen z.B. große Mengen an Histamin und Serotonin enthalten und sekretorische Lysosomen von APZ viele beladene MHC-Moleküle, werden in T- und NK-Zellen typische Effektorproteine wie z.B. Perforin, Granzyme und der Fas Ligand gespeichert (Blott und Griffiths 2002). Die Freisetzung solcher SL bewirkt die Lyse und/oder Apoptose der Zielzellen, weshalb SL aus T- und NK-Zellen häufig auch als lytische Granula bezeichnet werden (Fowler et al. 2007).

1.2.3 Inhalt zytotoxischer Granula

Zytotoxische Granula entsprechen also modifizierten Lysosomen, in denen unterschiedliche zytotoxische Effektorproteine enthalten sein können. Dazu gehören Perforin und Granzyme, welche eine effiziente Zielzell-Lyse induzieren können sowie das Granulysin, welches antimikrobielle Aktivität aufweist und in hohen Konzentrationen ebenfalls die Apoptose der Zielzelle einleitet. Diese Proteine werden prinzipiell in einer aktiven Form gespeichert, jedoch werden sie durch die Bedingungen innerhalb der Granula in ihrer Aktivität blockiert, bis sie an die Zelloberfläche gelangen. Perforin, Granzyme und Granulysin liegen in den bereits erwähnten elektronendichten „dense cores“ der Granula vor und sind mit Chondroitinsulfat-reichen Proteoglykanen komplexiert (Masson et al. 1990). Diese negativ geladenen Proteoglykane der Seryglycin-Familie regulieren auf bislang nicht ganz verstandene Weise die Speicherung, Aktivität und Freisetzung von Perforin und Granzymen (Kolset et al. 2004, Stevens et al. 1987). In der die „dense cores“ umgebenden äußeren Membran befinden sich auch die stark glykosilierten LAMP-Proteine, die bei Lysosomen etwa 50 % der Membranproteine ausmachen. Interessanterweise ist nach bisheriger Literaturlage der Todesfaktor Fas Ligand ein weiteres Charakteristikum der SL von T- und NK-Zellen. Der FasL wird nicht im Lumen der SL gespeichert, sondern spielt als Transmembranprotein offensichtlich gleichermaßen eine Rolle beim intrazellulären Vesikeltransport wie auch bei der Zielzell-Apoptose (Bossi und Griffiths 1999).

1.2.3.1 Fas Ligand

Die meisten T-Effektorzellen exprimieren auf der Zelloberfläche Liganden oder Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF) oder TNF-Rezeptor- (TNFR-) Proteinfamilie (Suda et al. 1993). Einer der für die T-Zell-Effektorfunktion wichtigsten Vertreter ist hierbei der Fas Ligand (FasL, CD178, CD95L, TNFSF6). Der Fas Ligand bindet an den Todesrezeptor Fas (CD95) auf Zielzellen oder auf voraktivierten T-Zellen und induziert dadurch in der Regel eine Caspasen-abhängige Apoptose. Somit ist FasL nicht nur ein zytotoxisches Effektormolekül zur Beseitigung von virusinfizierten oder entarteten Zellen, sondern auch ein wesentlicher Regulator der Immunhomöostase (Janssen et al. 2000). In diesem Zusammenhang dient der Fas Ligand unter anderem dazu, die Anzahl von Lymphozyten in Organismen zu regulieren und so zum Beispiel eine Immunantwort nach Beseitigung pathogener Krankheitserreger zu beenden. Der Fas Ligand fungiert jedoch nicht nur als zytotoxisches Effektorprotein von T- und NK-Zellen. Eine FasL-Expression wird auch mit dem der Ausbildung immunprivilegierter Gewebe wie dem Trophoblasten, dem Gehirn oder dem Auge in Verbindung gebracht (Frangmyr et al. 2005, Abrahams et al. 2004, McKechnie et al. 2006). Hier führt die FasL-Expression dazu, dass in die Gewebe einwandernde aktivierte T-Zellen eliminiert werden. Einige Tumorzellen, zum Beispiel in Melanomen, machen sich diesen Mechanismus zu Nutze, um sich vor Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zu schützen. Dieser Vorgang wird auch als „tumor-counterattack“ bezeichnet (Martinez-Lorenzo et al. 2004).

1.2.3.2 Perforin, Granzyme und Granulysin

Perforin ist ein Glykoprotein, welches in Zielzellmembranen Membranporen mit einem Durchmesser von 5-20 nm bilden kann (Liu et al. 1996). Perforin ist eine wesentliche Komponente der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und von NK-Zellen. Dementsprechend weisen klassische zytotoxische Zellen (CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen) eine hohe Perforin-Expression auf, wobei jedoch auch CD4⁺ T-Zellen unterschiedliche Mengen an Perforin sezernieren können, wenn die klassische Zytotoxizität gestört oder aufgehoben ist (Voskoboinik et al. 2010, Williams und Engelhard 1997). Die Polymerisation und die Bildung von Poren erfordert Ca²⁺-Ionen (Young et al. 1988). Das Ca²⁺-assoziierte Protein Calreticulin kolokalisiert mit Perforin und wird ebenfalls bei Degranulation freigesetzt. Beide Proteine interagieren miteinander an der P-Domäne des Perforins,

welche eine hohe Affinität für Ca^{2+} Ionen besitzt. Wenn es in der Zelle zu hohen Ca^{2+} -Konzentrationen kommt, verankert sich Perforin an der Membran der Zielzelle. Hier polymerisiert es und bildet eine zylindrische Pore. Calreticulin stellt gewissermaßen ein Ca^{2+} -abhängiges Chaperon für Perforin dar, das gleichzeitig eine vorzeitige Aktivierung von Perforin verhindert (Andrin et al. 1998). Die zytolytische Aktivität von Perforin wurde in verschiedenen Modellen experimentell untersucht und wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Einer Annahme nach bilden Perforin und Granzyme zusammen multimere Komplexe mit dem Proteoglykan Serglycin, welches dabei als akzessorisches Protein fungiert. Granzyme scheinen entgegen früherer Vermutungen nicht einfach aus dem Extrazellularraum durch die Perforin-Pore zu diffundieren (Liu et al. 1995), sondern gelangen in Form multimerer Komplexe in das Zytosol der Zielzelle. Dieser Vorgang scheint dem Eindringen eines Virus zu ähneln. Der genaue Mechanismus ist nach wie vor nicht bekannt, jedoch scheint Perforin in diesem Kontext die Funktion eines „Translokators“ zu spielen, der letztendlich die Freisetzung von gebundenen Granzymen in die Zielzelle bewirkt. Ein anderes Modell besagt, dass Granzym B über die ionenabhängige Internalisierung eines Granulysin-B/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Komplexes auch unabhängig von Perforin in die Zielzelle gelangen kann (Motyka et al. 2000). Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass Granzyme durch elektrostatische Wechselwirkungen an negative Glukosaminoglykane der Zielzellmembran adhären können und somit ebenfalls Perforin-unabhängig wirken (Keefe et al. 2005). Perforin ist daher möglicherweise nicht essentiell für den Transport von Proteasen in die Zielzelle, spielt aber übereinstimmend eine große Rolle als zentraler Vermittler der Zelllyse und verfügt zudem auch über eigenständige zytotoxische Mechanismen.

Granzyme sind Serinproteasen, die von zytotoxischen Zellen produziert und sezerniert werden und beim Auslösen der Apoptosekaskade in der Zielzelle mitwirken. Es scheint mindestens fünf verschiedene humane und zehn murine Granzyme zu geben. Am häufigsten treten Granzym A und B auf, die auch am besten untersucht sind. Granzym A löst über die Hydrolyse von Proteinen mit basischen Aminosäuren unabhängig von Caspasen Apoptose aus (Beresford et al. 2001). Zielzellen, die resistent gegenüber Caspase-vermitteltem Zelltod sind, sind möglicherweise sensitiv für den apoptotischen Effekt von Granzym A. Dies scheint eine Rolle in der Immunabwehr von Tumorzellen zu spielen, die als Überlebenstrategie einen Caspase-induzierten Zelltod umgehen

können (Beresford et al. 1999). Granzym B induziert dagegen einen Caspase-abhängigen Zelltod. Es spaltet und aktiviert Caspase 3, eine Cysteinprotease, die hinter Asparaginsäure-Resten schneidet. Caspase 3 löst dann in der Zielzelle eine proteolytische Caspase-Kaskade aus, die am Ende eine Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease aktiviert. Andere von Granzym B aktivierte Signalwege führen ebenfalls zum Zelltod. Beispielsweise wird das Protein BID (*BH3-interacting domain death agonist protein*) entweder direkt durch Granzym B oder indirekt durch Caspase 3 gespalten. Dadurch wird die äußere Mitochondrienmembran beschädigt. Aus dem mitochondrialen Innenmembranraum werden dann apoptosefördernde Moleküle wie das Cytochrom c freigesetzt. Weitere Granzyme (H, K und M) fördern die Apoptose durch die Spaltung von anderen zellulären Komponenten.

Granulysin ist ein kleines zytotoxisches Protein der Saposin-Familie, welches ebenfalls in Assoziation mit zytotoxischen Granula gespeichert wird (Pena et al. 1997). Es wird zunächst als 15 kDa Vorläufer-Molekül synthetisiert und durch Proteolyse am Amino- und Carboxyterminus in die reife 9 kDa Form überführt. Nach älteren Befunden wird die 15 kDa Form in zytolytischen Granula gespeichert, während die 9 kDa konstitutiv sezerniert werden soll (Hanson et al. 1999). Die zytotoxische Wirkung von rekombinantem 9 kDa-Granulysin scheint ebenfalls von Perforin abhängig zu sein (Stenger et al. 1998). Granulysin löst eine Zellschädigung durch Bindung an negativ geladene Lipide in der Mitochondrienmembran aus. Hierdurch kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom c, AIF (Apoptosis-inducing factor), Caspasen und Endonukleasen (Latinovic-Golic et al. 2007, Kaspar et al. 2001, Pardo et al. 2001). Neben seiner zytolytischen Aktivität hat Granulysin auch chemotaktische und proinflammatorische Wirkungen (Deng et al. 2005).

1.2.4 Biogenese sekretorischer Granula

Die zytotoxischen Effektorproteine von T- und NK-Zellen erreichen ihre Speicherorganellen auf unterschiedliche Weise (Abb. 1.4) Granzym A und B gelangen über den Mannose-6-Phosphat-Weg aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk zu den „dense cores“ der zytolytischen Granula.

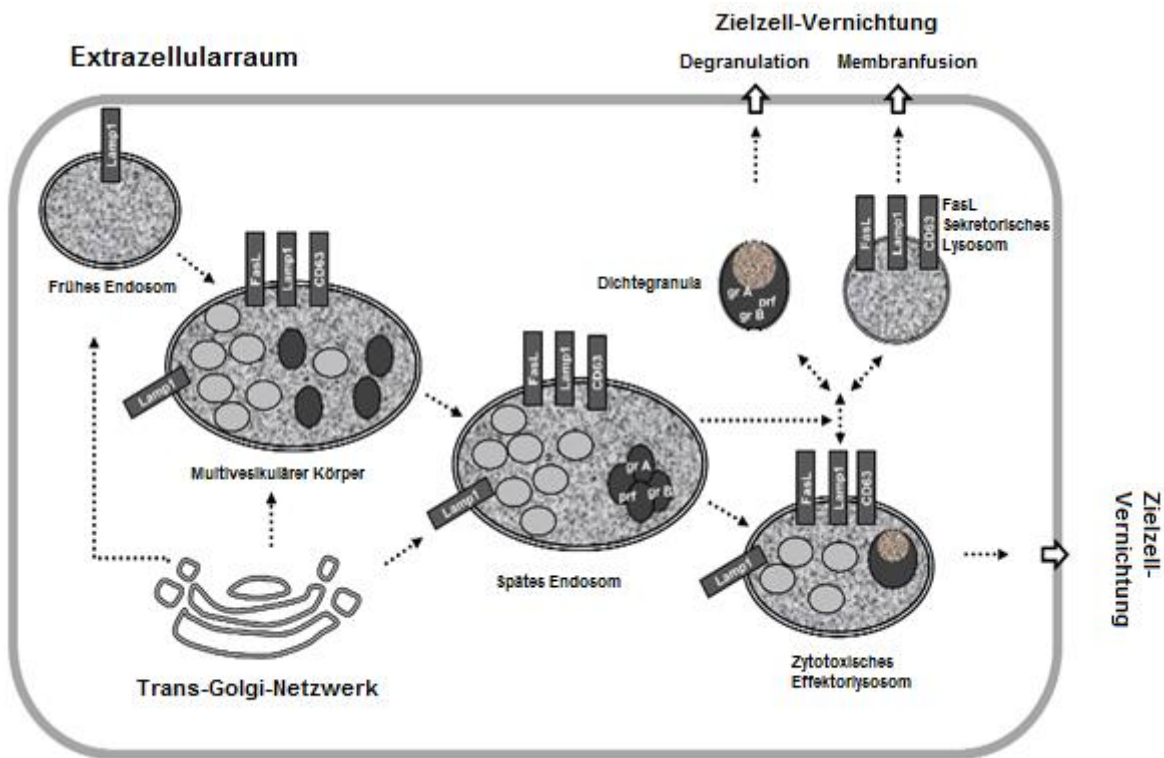


Abb.1.4 Intrazelluläre Reifung, Transport und Degranulation zytotoxischer Effektorproteine. Die löslichen Effektorproteine werden vom *trans*-Golgi-Netzwerk zu frühen Endosomen transportiert, welche sich zu späten Endosomen weiterentwickeln. Durch den Mechanismus des ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) kommt es zur Ausbildung luminaler Vesikel. SL, welche degradative Eigenschaften konventioneller Lysosomen mit der Speicherung und Freisetzung von Effektorproteinen verbinden, scheinen aus späten Endosomen zu entstehen und sind durch lysosomale Markerproteine (z.B. LAMP-1 und CD63) und zellspezifische Effektorproteine (u.a. Perforin und Granzyme) gekennzeichnet. Bei Zielzell-Kontakt werden diese Bestandteile zur immunologischen Synapse transportiert, um mit der Plasmamembran zu fusionieren und lösliche Effektorproteine freizusetzen, wobei LAMP-1, Fas-L und CD63 auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Lettau et al. 2015).

Während ihrer Biosynthese werden Granzyme mit einem Mannose-6-Phosphat-Rest ausgestattet, was den Transport in die Endosomen über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) erlaubt (Griffiths und Isaza 1993). Wegen des sauren pH-Wertes im Lumen der späten Endosomen dissoziiert der M6PR von seinen Liganden und kehrt in das *trans*-Golgi-Netzwerk zurück. Der M6PR findet sich nur im Bereich der zytotoxischen Granula, nicht jedoch in klassischen Lysosomen; zytotoxische Granula scheinen sich also in einem „prä-lysosomalen“ Stadium zu befinden (Burkhardt et al. 1990). Der

M6PR ist auch am Transport weiterer löslicher lysosomaler Proteine, z.B. saurer Hydrolasen, in die multivesikulären Bereiche der Granula beteiligt.

Der Transportweg des Perforins in die Granula ist nicht in allen Einzelheiten verstanden. Der niedrige pH-Wert in den Granula sorgt dafür, dass Perforin nicht an Ca^{2+} bindet und polymerisiert. Somit wird sichergestellt, dass gespeichertes Perforin inaktiviert bleibt, damit die Zelle nicht vor der Freisetzung in die immunologische Synapse geschädigt wird (Voskoboinik et al. 2005). Der Transport der LAMP-Proteine beruht auf Tyrosin- oder Dileucin-basierten Motiven, welche direkt mit zytoplasmatischen Adapterprotein-(AP-) Komplexen interagieren (Feng et al. 1999). Während zahlreiche lysosomale Proteine folglich über AP zu den sekretorischen Lysosomen gelangen, ist der Transport des Fas Liganden vermutlich über die Prolin-reiche Region in seinem N-terminalen (intrazellulären) Anteil reguliert. Prolin-reiche Strukturen bind häufig an Proteine mit Src-Homologie-3 (SH3) Domänen. Die Bindung an SH3-Domänen scheint im Falle des FasL einen direkten Transport zu den Granula zu gewährleisten (Qian et al 2006, Baum et al. 2005). Dieser regulierte Transport ist auch deswegen wichtig, da der Fas Ligand ein sehr potenter Apoptose-Aktivator ist und daher sicher und kontrolliert vom *trans*-Golgi-Netzwerk in die sekretorischen Lysosomen transportiert werden muss, um nicht eine lokale Apoptose in der FasL- produzierenden Zelle zu induzieren (Blott et al. 2001).

1.2.5 Die immunologische Synapse

Nach dem Erkennen einer Zielzelle und der Aktivierung der T-Zelle über den TZR bildet sich am Ort des interzellulären Kontakts eine immunologische Synapse aus, die durch eine komplexe molekulare Mikroarchitektur gekennzeichnet ist. Ein zentraler Bereich enthält unter anderem den T-Zell-Rezeptor und Korezeptoren und wird als zentraler supramolekularer Aktivierungscluster (cSMAC, *central supramolecular activation cluster*) bezeichnet. Adhäsionsmoleküle wie z.B. das Integrin LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*), welches an das auf der Zielzelle exprimierte ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) bindet, umschließen den zentralen Bereich und bilden so zusammen mit weiteren Proteinen den peripheren supramolekularen Aktivierungscluster (pSMAC) (Monks et al. 1998, Murphy et al. 2009). Im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-induzierten Umorganisation des Zytoskeletts wird die Effektorzelle polarisiert und das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) transloziert zum Ort des

interzellulären Kontakts. Die sekretorischen Lysosomen/zytotoxischen Granula werden durch Dynein-Motorproteine entlang der Mikrotubuli zum MTOC und damit zur immunologischen Synapse transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren (Peters et al. 1989). Dabei werden die löslichen zytotoxischen Effektoren in die IS entlassen, während die Granula-assoziierten Transmembranproteine lokal auf der Zielzelloberfläche exponiert werden. Die sekretorische Region, in die die lytischen Granula ihren Inhalt freisetzen, liegt dabei im cSMAC (Stinchcombe et al. 2001). Die immunologische Synapse gewährleistet so, dass die zytotoxische Aktivität auf die spezifisch erkannte Zielzelle beschränkt bleibt. In diesem Prozess scheinen sich die Signalanforderungen zur Mobilisierung unterschiedlicher Marker- und Effektorproteine allerdings zu unterscheiden. In murinen T-Zellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Freisetzung von gespeichertem Fas Ligand Ca^{2+} -unabhängig verläuft, während für die Degranulation und Freisetzung von Granzymen und Perforin ein Ca^{2+} -Signal notwendig ist. Ebenso scheint die Stärke des TZR-Signals die Mobilisierung von Effektorproteinen zu beeinflussen. So wurde nach schwachem Signal eher eine Fas Ligand-abhängige Apoptose eingeleitet, während ein starkes Signal eher zu einer Perforin/Granzym-vermittelten Zytotoxizität führte (He und Ostergaard 2007). Des Weiteren scheinen unterschiedliche Zytoskelett-Proteine an der Fas Ligand-Exposition oder der Perforin/Granzym-Degranulation beteiligt zu sein, was womöglich einen unabhängigen Transport ermöglichen könnte (Kessler et al. 1998). Obwohl in fluoreszenzmikroskopischen Studien meist eine Kollokalisierung des Fas Liganden mit anderen klassischen lytischen Proteinen beobachtet werden konnte, wurde aufgrund der unterschiedlichen Mobilisierung postuliert, dass nicht alle Effektorproteine im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sein können (Kassahn et al. 2009).

1.2.6 Analyse lysosomaler Kompartimente

Da der Proteinbesatz lysosomaler Strukturen ein weites Spektrum unterschiedlicher Proteine umfasst, kann eine quantitative Proteomanalyse von gereinigten/angereicherten Granula Aufschluss über die unterschiedlichen lysosomalen Organellen bringen. In den 1980er Jahren wurde die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) etabliert, die unabhängig von immunologischen oder enzymatischen Nachweisen eine Identifikation einzelner Proteine ermöglichte. Um diese Methode für die Analyse lysosomaler Kompartimente zu nutzen, ist eine effiziente

Anreicherung der Lysosomen essenziell. Dies wird in der Regel durch eine differentielle Zentrifugation von Zellhomogenaten mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation erreicht. Die separierten subzellulären Strukturen können in der Folge biochemisch oder hinsichtlich ihres Proteingehaltes untersucht werden.

1.3 Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Das Verfahren der 2D-Gelelektrophorese ermöglicht eine Separation von Proteinen anhand ihrer isoelektrischen Punkte in der ersten und ihrer Molekulargewichte in der zweiten Dimension. Im Gegensatz zur konventionellen 2D-Gelelektrophorese werden bei der differentiellen 2D-Gelelektrophorese (*2D-difference gel electrophoresis* = 2D-DIGE) die zu untersuchenden Proteingemische vor der Separation mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe im Probengemisch können Unterschiede im Proteinbesatz der einzelnen Proben in einem Gel detektiert und quantifiziert werden. Dies ermöglicht eine statistische Analyse der differentiell abundanten Proteine. Dabei können verschiedene Proben auf demselben Gel direkt miteinander verglichen werden, was Unterschiede in der Durchführung der Gelelektrophorese minimiert. Nach Ausstanzen der (differentiellen) Protein-Spots können diese gegebenenfalls über eine anschließende massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden mittels Annotation identifizierter Protein-Spots in sogenannten Master-Gelen bereits Proteomkarten für verschiedene sekretorische Effektor-Vesikel aus NK-Zellen (Schmidt et al. 2008) und T-Zellen (Schmidt et al. 2011b) erstellt. Dabei wurden angereicherte Organellen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert. Western-Blot-Analysen und elektronenmikroskopische Untersuchungen der erhaltenen Fraktionen hatten ergeben, dass es sich bei den Fraktionen 2 und 6 um zwei verschiedene lysosomale Effektor-Kompartimente handelt. In Fraktion 2 war als Markerprotein der Fas Ligand nachweisbar sowie die lysosomalen Membranproteine LAMP-1, LAMP-3 (CD63) und die 15 kDa-Form des Effektorproteins Granulysin. Als weitere spezifische Proteine dieser Fraktion waren zudem in verschiedenen Arbeiten CD26, ADAM10 und ADAM17 detektiert worden (Ebsen et al. 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass Vesikel der Fraktion 2 mit dem Adapterprotein Nck und unterschiedlichen Aktin-regulierenden Faktoren assoziiert sind. Elektronenmikroskopische Analysen ergaben eine klare Segregation dieses Kompartiments von Mitochondrien, die im Wesentlichen in

Fraktion 5 angereichert waren. Dieser Befund wurde mittels Western Blot über den Nachweis des mitochondrialen Markerproteins COX IV in Fraktion 5 verifiziert. Außerdem ließen sich die Organellen der Fraktion 2 ebenfalls klar von denen der Fraktion 6 unterscheiden. Western Blot-Analysen ergaben für die Organellen der Fraktion 6 eine hohe Abundanz von Perforin, Granzym B und der 9 kDa-Form von Granulysin. Diese Granula zeigten eine Assoziation mit den Zytoskelett-Elementen Myosin IIA und Dynamin. Im Elektronenmikroskop waren in Fraktion 6 deutlich elektronendichtere Vesikel zu erkennen als in Fraktion 2. Diese Befunde widersprachen zum Teil dem von Gillian Griffiths und Kollegen postulierten Modell eines einzigen lysosomalen Effektor-kompartimentes, in dem alle Effektormoleküle gemeinsam gespeichert werden (Lettau et al. 2015).

Basierend auf den massenspektrometrischen Analysen individueller Spots aus zahlreichen 2D-Gelelektrophorese-Experimenten konnte letztendlich die erste umfassende Proteomkarte für „sekretorische Lysosomen“ (= Fraktion 2) von NK-Zellen erstellt werden. Etwa 75 % der benannten Proteine waren laut Datenbanken als „Lysosomen-assoziiert“ einzustufen. Der Vergleich der Vesikel aus verschiedenen leukämischen NK-Zellen und Primärisolaten ergab insgesamt eine große Übereinstimmung, jedoch zeigte sich dabei ein auffälliger Unterschied im Besatz mit funktional relevanten Proteinen wie MHC-Proteinen und MHC-prozessierenden Molekülen (z.B. Cathepsin S) und ebenso zytotoxischen Effektorproteinen (z.B. Granzym A und B) in den individuellen Zell-Linien (Schmidt et al. 2008). Die Analyse von Vesikeln aus PHA-Blasten bestätigte in der Folge die Existenz unterschiedlicher lysosomaler Effektor-kompartimente. Dabei zeigte das Proteom von Fraktion 2 bzw. Fraktion-6-Vesikeln ein erstaunlich geringes Ausmaß von Spendervariabilität. Zur Erstellung der Proteom-Karten für die beiden Kompartimente wurden im Falle der 2. Fraktion 397 individuelle Proteine aus 742 separaten Spots massenspektrometrisch identifiziert, von denen 70 % bereits als Lysosomen-assoziiert klassifiziert waren. Im Falle der 6. Fraktion konnten 240 individuelle Proteine anhand von 379 identifizierten Spots annotiert werden, von denen wiederum 66.7 % als Lysosomen-assoziiert klassifiziert waren.

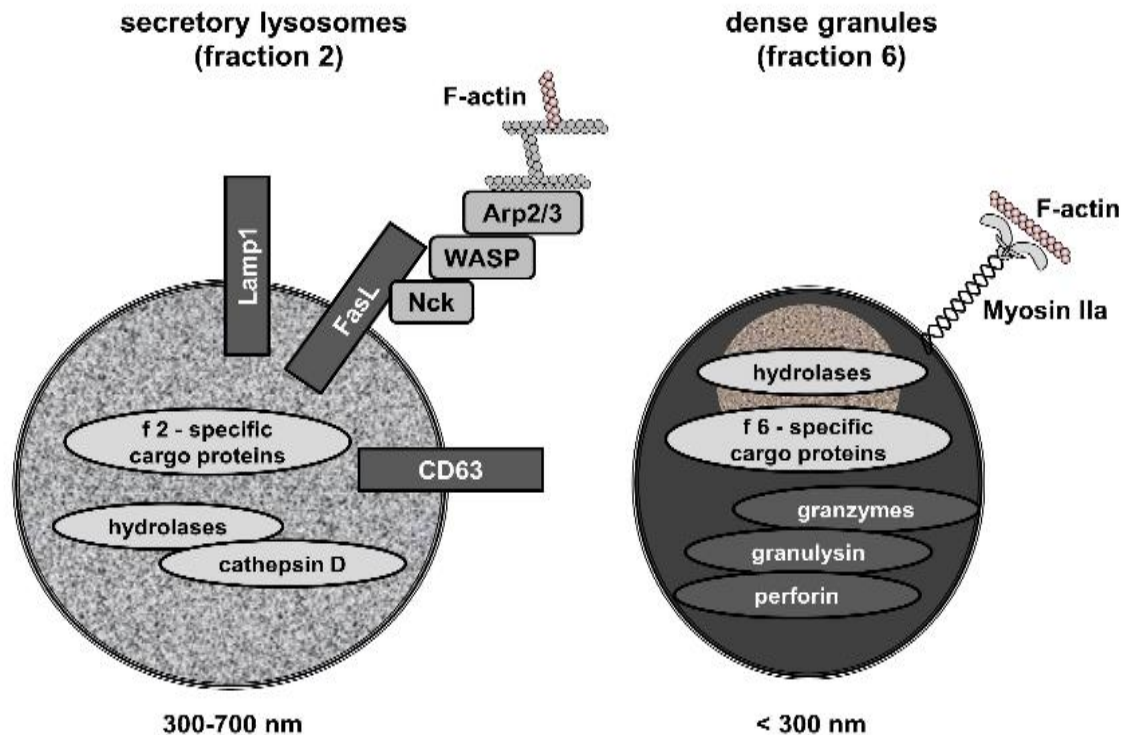


Abb. 1.5 Darstellung des Proteoms zweier verschiedener Spezies von T-Zell-Organellen, welche mithilfe eines Dichtegradienten separiert und dargestellt werden konnten. Fas-L, LAMP-1, CD63 und Cathepsin-D konnten in der Fraktion 2, welche sog. Sekretorische Lysosomen beinhaltet, angereichert und nachgewiesen werden (links). Die Proteine Granzym A und B, Perforin und die reife Form des Granulysin erschienen vermehrt in der Fraktion 6 (rechts), aus Lettau et al. 2015.

Das Vorkommen von verzweigten Aktinfilamenten in Fraktion 2 und der Besatz mit dem Motorprotein Myosin-IIa in Fraktion 6 scheint zu implizieren, dass abgesehen vom unterschiedlichen Proteinbesatz beide Kompartimente durch unterschiedliche zytoskeletale Elemente mobilisiert werden oder mit ihnen verbunden sind.

Diese Befunde dokumentierten, dass es sich bei den separierten Vesikeln um zwei biochemisch und morphologisch unterscheidbare lysosomale Kompartimente handelt. Fas Ligand konnte als Marker für die (sekretorischen) Lysosomen der Fraktion 2 angesehen werden, ebenso wie weitere lysosomale Markerproteine (LAMP-1, CD63 und Cathepsin-D). In der dichten Fraktion 6 zeigte sich dagegen eine deutliche Anreicherung von zytotoxischen Effektorproteinen wie Perforin, Granzym B und reifem (9 kDa) Granulysin (Lettau et al. 2007, Schmidt et al. 2008, Schmidt et al. 2009). Somit konnte ein Modell entwickelt werden, dass diese unterschiedlichen Kompartimente und ihren Proteinbesatz beschreibt. Außerdem schien eine Assoziation zu unterschiedlichen Elementen des Zytoskeletts zu bestehen, was darauf hindeutete, dass beide Vesikel unterschiedlich mobilisiert werden (Abb.1.5).

1.4 Fragestellung

T- und NK-Zellen eliminieren Zielzellen über die Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen wie Fas Ligand, Perforin, Granulysin und Granzyme. Diese Effektormoleküle werden in sekretorischen lysosomalen Organellen gespeichert und bei Bedarf in die immunologische Synapse freigesetzt. Neben den klassischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen haben auch CD4⁺ T-Zellen lytisches Potenzial, insbesondere *in vitro* aktivierte und expandierte CD4⁺ T-Zell-Blasten oder -Klone. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass sich die aus unterschiedlichen T-Zell-Populationen isolierten lysosomalen Effektorkompartimente (sowohl sekretorische Lysosomen der Fraktion 2 als auch dichte Granula der Fraktion 6) zum Teil hinsichtlich ihrer Proteinbeladung unterscheiden. Des Weiteren wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass sich der Proteinbesatz, die Differenzierung und die Reifung von Effektor-Vesikel im Laufe der T-Zell-Aktivierung verändern (Schmidt 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese beiden Beobachtungen im Wesentlichen über biochemische Verfahren verifiziert werden. Dazu sollten, basierend auf der in Schmidt et al. 2009 beschriebenen Methodik, intakte Vesikel aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen angereichert und hinsichtlich ihres Proteinprofils analysiert werden. Zur Etablierung der Methodik wurden zudem erste Analysen von isolierten Organellen leukämischer Zellen durchgeführt.

Zielsetzung im Einzelnen:

1. Adaptation/Etablierung eines Protokolls zur Anreicherung von sekretorischen Lysosomen aus unterschiedlichen T-Zell-Populationen
2. Charakterisierung der individuellen Organellenfraktionen über den Nachweis bekannter Markerproteine mittels Western Blot
3. 2D-DIGE-Analysen zum Vergleich des Proteinbesatzes lysosomaler Vesikel aus leukämischen T-Zell-Linien und aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen
4. Benennung der als differentiell abundant detektierten Proteine anhand von vorhandenen Mastergelen
5. Darstellung der Reifung zytotoxischer Granula nach Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen über den Nachweis verschiedener Markerproteine mittels Western Blot

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einerseits verschiedene T-Zell-Leukämie/Lymphom-Linien verwendet, andererseits angereicherte T-Lymphozyten-Populationen aus dem peripheren Blut gesunder Spender. Ausgangsmaterial für die Anreicherung der humanen T-Zellen waren Leukozyten-Kegel, die vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein bezogen wurden (Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät vom 30.09. 2014 unter AZ 485/14).

Folgende T-Zell-Leukämie/Lymphom-Linien wurden verwendet:

Jurkat E6-1	(ATCC TIB 152 – akute T-Zell Leukämie)
HuT-78	(ATCC TIB 161 – T-Zell Lymphom), sowie die
J16-Rapo	Jurkat-Derivat „resistant to apoptosis“ (Lettau et al. 2006)
JFL 39.1	Jurkat-Derivat; stabile hFasL-Transfektante von J16-Rapo

2.1.2 Medien und Puffer

2.1.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze

- RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin Invitrogen, Karlsruhe
- FCS (*fetal calf serum*) Invitrogen, Karlsruhe
- Penicillin/Streptomycin (10000 U) / (10000 µg) Biochrom AG, Berlin

Das Zellkulturmedium wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung und Zell-Linien-spezifisch mit 5-10 % FCS (hitzeinaktiviert bei 56° C für 30 min und steril filtriert) versetzt und bei 4° C gelagert. Vor der Anwendung wurde das Medium auf 37° C erwärmt.

- PBS (*Phosphate-buffered saline*) PBS/DULBECCO Biochrom AG, Berlin
- Phytohämagglutinin (PHA, HA16) Remel, Dartford, UK
in PBS (0,5 mg/ml)
- Interleukin-2 (Proleukin S®), 10⁵ U/ml Novartis, Nürnberg

- Trypan Blau Lösung (0,1 % Trypanblau in PBS) Sigma, Steinheim

2.1.2.2 Medien und Puffer für die Zellseparation

- Ficoll (1,077 g/ml) Biochrom AG
- MACS-Waschpuffer
BSA (bovines Serumalbumin) 0,5 % (w/v) Serva, Heidelberg
EDTA 2 mM Merck, Darmstadt
- CD4⁺ T-Zell-Isolationskit, MicroBeads, human Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
- CD8⁺ T-Zell-Isolationskit, MicroBeads, human Miltenyi Biotec

2.1.2.3 Puffer und Antikörper für die Durchflusszytometrie

- FACS-Waschpuffer
BSA (bovines Serumalbumin) 1 % (w/v) Serva
NaN₃ 0,1 % (w/v) Merck
Lösen in PBS, Lagerung 4° C
- Fixierungspuffer
PFA (Paraformaldehyd) 1 % (w/v) Merck
Lösen in PBS, Lagerung 4° C
- Antikörper

Für durchflusszytometrische Analysen der Zellpopulationen wurden folgende FITC- oder PE-markierten Primärantikörper der Firma ImmunoTools (Friesoythe) in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt: IgG1-FITC und IgG2b-PE als Isotyp-Kontrollen, CD2-FITC, CD3-FITC, CD3-PE, CD4-FITC und CD8-PE zur Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen, CD14-PE als Marker für Monozyten/Makrophagen, CD19-FITC zum Nachweis von B-Zellen sowie CD56-PE als Marker für NK-Zellen.

2.1.3 Material für die Biochemie

2.1.3.1 Puffer und Reagenzien

- **NP40-Lysepuffer**

Nonidet P-40	1% (v/v)	Sigma-Aldrich
Tris-Puffer	20 mM	Merck
NaCl	0,15 M	Carl Roth
EDTA	5 mM	Serva

- **Inhibitoren**

Aprotinin	2 µg / mL	Sigma-Aldrich
Leupeptin	2 µg / mL	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	2 µg / mL	Sigma-Aldrich
Phenylmethyly-Sulfonyl-Fluorid	1 mM	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	1 mM	Merck
Natriumfluorid	10 mM	Merck
Natriumpyrophosphat	1 mM	Sigma-Aldrich

- **2D-DIGE-Lysepuffer**

Harnstoff	7 M	GE Healthcare
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4 % (w/v)	Merck
Tris	30 mM	Fluka
Protease Inhibitor (40x)	2,5 % (v/v)	Roche, Penzberg

Vor der Zugabe von CHAPS wurde ein pH von 8,5 eingestellt. Der Puffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

- **Proteinbestimmung**

<i>Coomassie-Protein-Assay-Reagent</i>	Thermo Scientific
Photometer Smart Spec 3000	Bio Rad
Küvetten, REF 67.742	Sarstedt, Nümbrecht

- **Protein-Molekulargewicht-Standards**

<i>Precision Plus Protein™ All blue</i>	Bio Rad
<i>Low range SDS-PAGE Standard (20x)</i>	Bio Rad

Der *Low range* Marker wurde mit *NuPage sample buffer* (+β-Mercaptoethanol) verdünnt.

- **SDS-Page**

NuPAGE- System (Invitrogen)

NuPage®-MES SDS Laufpuffer (20x)		Life Technologies
Probenpuffer (3x)		
SDS	6 % (w/v)	Serva
Glycerin	30 % (v/v)	Carl Roth
Tris-Puffer	1 M, pH 6,8 200 mM	Merck
Bromphenolblau	0,005 % (w/v)	Merck
β-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)	Merck

Ettan Dalt Six (GE Healthcare)

Trenngel 12,5 %

Acrylamid, Methylen- bisacrylamid, 37,5 : 1	166,7 mL	Carl Roth
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	100 mL	Merck
SDS (10 % in ddH ₂ O)	4 mL	Merck
ddH ₂ O	127 mL	Braun, Melsungen
APS (20 % in ddH ₂ O)	1 mL	Merck
TEMED	111 µL	GE Healthcare

Die Komponenten wurden zusammengegeben und vor der Zugabe von APS und TEMED intensiv (>1 h) entgast.

Verdrängungslösung

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

Equilibrierungslösungen

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

Low-melting Agarose

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

- **Western Blot**

Transfer-Puffer (Lagerung 4° C)

Tris	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Carl Roth
Methanol	20 % (v/v)	Carl Roth
SDS	0,015 % (v/v)	Merck

Protein-Färbe-Lösung

Ponceau S	Sigma Aldrich
-----------	---------------

Waschpuffer (TBST)

Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Tween20	0,05 % (v/v)	Merck

BSA-Blockierungslösung (steril filtriert, Lagerung 4°C)

Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
BSA	5 % (w/v)	Serva, Heidelberg
NaN ₃	0,01 % (w/v)	Merck

Milchpulver-Blockierungslösung (frisch angesetzt)

Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Trockenmilchpulver 5 % (w/v)		Frema-Reform

Tabelle 2.1: Antikörper für Western Blots

Zielprotein	MW (kDa)	Klon	Spezies	Firma	Einsatzkonz.
Cathepsin D	34, 52	CTD-19	Maus	Sigma	1:2500
CD63/LAMP-3	40-60	MEM-259	Maus	Acris	1:1000
COX IV	17	MS-408	Maus	Abcam	1:1000
FasL	45	G247-4	Maus	BD	1:1000
Granulysin	9,15		Ziege	R&D	1:1000
Granzym B	32	2C5/F5	Maus	BD	1:1000
Lamp-1	110	25	Maus	BD	1:2000
Perforin	70	B-D48	Maus	Abcam	1:500
α-mouse IgG-HRP			Schaf	GE	1:7500
α-goat IgG-HRP			Esel	GE	1:7500

Stripping-Lösung

Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM	Merck
β-Mercaptoethanol	0,7 % (v/v)	Merck
SDS	6,9 % (w/v)	Merck

Transfer-Membranen

Whatman 3 mm Filterpapier	GEHealthcare
Protran™ Supported 0,2 µm NC	GE Healthcare
Protran™ Supported 0,45 µm NC	GE Healthcare

• 2D-Gelelektrophorese

2D-Lysepuffer

Tris	30 mM	Merck
Harnstoff (Urea)	7 M	GEHealthcare
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4 % (w/v)	Merck

2D-Probenpuffer (2fach)

Harnstoff (Urea)	7 M	GE Healthcare
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4 % (w/v)	Merck

Vor Gebrauch zu 500 µL Aliquot hinzufügen:

Dithiothreitol	130 mM	GE Healthcare
<i>IPG-buffer</i> entsprechend pH	2 % (w/v)	GE Healthcare

Rehydrierungslösung

DeStreak-Lösung		GE Healthcare
<i>IPG-buffer</i>	0,5 % (v/v)	GE Healthcare
Dry Strip Cover Fluid		GE Healthcare

2D-Equilibrierungspuffer

Tris	75 mM	Merck
Harnstoff	6 M	GE Healthcare
Glycerin	30 % (v/v)	Carl Roth
SDS	70 mM	Serva
Bromphenolblau	1 Spatelspitze	Merck

2D-Reduktionspuffer

2D-Equilibrierungspuffer		
Dithiothreitol (DTT)	1 % (w/v)	GE Healthcare

2D-Alkylierungspuffer

2D-Equilibrierungspuffer		
Iodacetamid (IAA)	2,5 % (w/v)	Merck

2D-Laufpuffer

Tris	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Carl Roth
SDS	3,5 mM	Serva

CyDye-Färbelösungen

CyDye (2,3,5)
DMF

400 pmol / μ L

GE Healthcare
Merck

Puffer und Reagenzien für die Lysosomen-Isolierung

Lysosome-Isolation-Kit

Sigma-Aldrich

Der Kit enthält 5fach Extraktionspuffer, der mit ddH₂O verdünnt und wenn nötig mit Proteaseinhibitoren versetzt wird; 20x Optiprep® Verdünnungspuffer, der ebenfalls mit ddH₂O verdünnt wird; das Optiprep® Dichtegradienten-Medium, welches einer 60%igen (w/v) Iodixanol-Lösung in Wasser entspricht; sowie eine 2,3 M Sukrose-Lösung.

2.1.4 Geräte und Materialien

Neubauer improved, Zählkammer	Optik Labor, Lancing, UK
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Zellkulturflaschen cell-star®	Greiner Bio
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Osterode
MACS Separator, quadro MACS	Miltenyi Biotec
MACS <i>separation columns</i> , 25 LS	Miltenyi Biotec
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Sicherheits-Sterilbank	Heraeus
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 15 R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Ultrazentrifuge xL-80 Rotor SW60Ti Ausschwingrotor SW60	Beckman Coulter
Centrifuge Avanti J-25 I Rotor JA10	Beckman Coulter

96-Loch-Spitzbodenplatte
Gelkammer, Cell Sure Lock
Heizblock Dri-Block®DB-3A
Wipptisch Rocky
Typhoon-Trio, Fluoreszenzscanner
Ettan IPGphor

Thermo Fisher Scientific
Invitrogen
Techne
Fröbel Labortechnik, Lindau
GE Healthcare
GE Healthcare

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen fand in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ in Standard-Zellkulturflaschen statt. Die Tumorzelllinien HuT-78, JE6-1, J16, JFL wurden in RPMI-1640-Medium mit 5 % FCS expandiert, PHA-Blasten und isolierte T-Zell-Populationen in Medium mit 10 % FCS. In der Regel wurde die Zelldichte bei Mediumwechsel auf 10⁶ Zellen/mL eingestellt. Die Zelldichte wurde alle 2-3 Tage kontrolliert und die Zellen wurden je nach Bedarf reduziert/expandiert. Zur Überprüfung der Zellpopulationen erfolgte wie unten beschrieben periodisch eine Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurde eine Vitalfärbung durchgeführt. Hierfür wurden mindestens 10 µL der jeweiligen Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau (entsprechend einer 1:10 Verdünnung) resuspendiert. Der Farbstoff dringt bei Membranschädigung in das Zytoplasma der Zellen ein und färbt tote Zellen selektiv an. Die Zellen wurden direkt in eine Neubauer-Zählkammer überführt und gezählt. Beim Auszählen wurde die Zellzahl in mindestens zwei Eckquadraten der Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde nach folgender Gleichung berechnet: Zellzahl/Anzahl der gezählten Eckquadrate x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor = Zellzahl/mL. Die Gesamtzellzahl wurde durch Multiplikation mit dem Volumenwert in mL berechnet.

2.2.1.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die verwendeten Leukozytenkonzentrate wurden vom Institut für Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) wurden mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Dazu wurden die Leukozytenkegel (25-30 ml) mit 100 ml PBS verdünnt. Jeweils 25 ml dieser Verdünnung wurde vorsichtig mit 15 ml Ficoll-Hypaque (d = 1,077 g/ml) unterschichtet und anschließend bei 2000 rpm (20 Minuten, ohne Bremse) zentrifugiert. Hierbei werden die Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer Dichte in der Interphase

zwischen Plasma- und Thrombozyten-Überstand und der Ficoll-Lösung angereichert. Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen befinden sich im Sediment. Nach dem Zentrifugieren wurde der Leukozytenring, mit einer Pipette abgenommen und in ein separates Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit Kulturmedium gewaschen (erster Waschschrift bei 1600 rpm, 5 Minuten, weitere Schritte bei 1000 rpm, 10 Minuten). Durch das Waschen wurden Thrombozyten, Serum und Ficoll-Rückstände aus der Suspension entfernt. Zuletzt wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und gezählt.

2.2.1.4 Kultivierung von PHA- Blasten

PBMZ wurden nach der Anreicherung in einem entsprechenden Volumen an Kulturmedium mit 10 % FCS aufgenommen und mit dem T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA, 0,5 µg/mL) aktiviert. Drei bis fünf Tage nach der Stimulation erfolgte eine erneute Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation zur Entfernung toter Zellen. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit von rekombinantem IL-2 (100 U/mL) weiter expandiert.

2.2.1.5 Magnetische Zellseparation von Lymphozyten-Subpopulationen

Die Isolierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte meist nach dem Prinzip der Positiv-Selektion mittels magnetischer Separation. Hierbei wurden aus Leukozytenkegeln präparierte PBMZ mit spezifischen Antikörpern versetzt, sodass die gewünschten Zellen magnetisch aus der Zellsuspension angereichert werden konnten. Zunächst wurde die Anzahl der Zellen bestimmt und das Pellet in 80 µL MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen. Dazu wurden 15 µL der jeweiligen magnetischen Microbeads (anti-CD4 oder anti-CD8) pro 10⁷ Zellen beigefügt und durchmischt. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 2 - 8 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 mL MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten, 1000 rpm). Das Pellet wurde in 0,5 - 1 mL MACS-Puffer aufgenommen. Die Säulen am magnetischen Separator wurden vor der Nutzung mit 3 mL MACS-Puffer equilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam durch die magnetisierte Säule gegeben und dreimal mit jeweils 3 mL MACS-Puffer gespült. Die in der magnetischen Säule zurückgehaltenen Zellen konnten nach Entfernung der Säule aus dem Separator mittels 5 mL MACS-Puffer und einem Kolben herausgespült werden.

Die Zellen wurden gezählt und in Kulturmedium mit 10 % FCS aufgenommen. Die Reinheit der Zellpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und die Zellen in der Folge mit einem sogenannten „Feeder-Cocktail“ stimuliert. Dieser bestand aus 10^6 bestrahlten (40 Gy) PBMZ und 10^5 bestrahlten (60 Gy) EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL,) pro mL. Zusätzlich zu den bestrahlten Zellen wurden IL-2 (final 100 U/mL) und PHA (0,5 µg/mL) hinzugegeben. Die isolierten T-Zellen wurden mit 10^6 Zellen/mL in Kulturmedium mit 10 % FCS und mit einem Zehntel des Volumens an „10fach Feeder-Cocktail“ versetzt.

Eine Zellseparation über Negativ-Selektion wurde analog durchgeführt, jedoch wurden hierbei die gewünschten Zellen nicht markiert. Zunächst wurden 10 µL eines entsprechenden Antikörpergemisches aus biotinylierten Antikörpern pro 10^7 Zellen hinzugegeben und für 5 Minuten bei 2-8 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 30 µL MACS-Puffer pro 10^7 Zellen hinzugegeben sowie 20 µL der anti-Biotin Microbeads pro 10^7 Zellen. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen durch die Säulen gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen, analysiert und gegebenenfalls aktiviert und expandiert.

2.2.1.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet, die spezifisch an Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene binden. Mit Hilfe der Lichtstreuung der Zellen können gleichzeitig Zellgröße und Granularität analysiert werden. Somit kann die Zellzusammensetzung der isolierten T-Zellen überprüft und Verunreinigungen mit unerwünschten Populationen wie z.B. Monozyten und B- oder NK-Zellen dargestellt werden. 5×10^5 Zellen wurden in jeweils eine Kavität einer 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte pipettiert und bei 1000 rpm und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zell-Pellets mit 100 µL gekühltem FACS-Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit direkt konjugierten Antikörpern (in einer 1:5-Verdünnung mit FACS-Waschpuffer) bzw. geeigneten Isotypkontrollen gleicher Konzentration in einem Volumen von 12 µL suspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit jeweils 100 µl Waschpuffer wurden die Zellen in einer 1 %-igen PFA-Lösung fixiert. Die Analyse am Durchflusszytometer erfolgte in

der Regel innerhalb von 24-48 Stunden.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Immunpräzipitation

Pro Immunpräzipitation wurden 10 - 50 x 10⁶ Zellen aus der Kultur entnommen, mit PBS gewaschen und in einem geeigneten Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden nach 15 - 20-minütiger Inkubation auf Eis für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und die Überstände in neue Gefäße transferiert. Anschließend wurden 2 µg der gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper und 60 µL Protein-G-Sepharose-Beads (50 % (v/v) in PBS oder Lysepuffer) zugegeben. Das Gemisch rotierte für zwei Stunden bei 4 °C. Danach wurden die Beads zentrifugiert, viermal mit kaltem Lysepuffer gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht (5 min, 100 °C). Die Präzipitate wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtlysaten erfolgte mit einem auf Coomassie G-250-basierenden Reagenz (Bradford) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Konzentrationsmessung am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt, dass die Proteine eine konstant negative Ladungsverteilung aufweisen und nach Denaturierung quasi linearisiert werden. Dies erlaubt eine Auftrennung nach der Größe bzw. Molekülmasse. Optional können Disulfidbrücken durch Thiole wie β-Mercaptoethanol (2-ME) oder Dithiothreitol (DTT) reduziert werden. Da einige der eingesetzten Antikörper laut Herstellerangaben bei Western Blots nur mit nicht reduzierten Proteinen reagieren sollten, wurden entsprechende Proben in einem Probenpuffer ohne 2-ME oder DTT aufgenommen.

Die SDS-PAGE wurde standardmäßig mit dem NuPAGE-System von Invitrogen durchgeführt. In der Regel wurden 4 - 12% Bis-Tris-Fertiggele mit 10 oder 15 Taschen in einem MES-Puffersystem verwendet. 3 - 7 µg der Proteinproben wurden mit einem Drittel des Endvolumens NuPAGE-Probenpuffer mit oder ohne β-Mercaptoethanol versetzt. Das Endvolumen betrug bei 10-*well*-Gelen 60 µL und bei 15-*well*-Gelen 30 µL. Die Proben wurden nachfolgend für 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht, kurz zentrifugiert und in die Geltaschen überführt. In die erste Tasche wurde als Molekulargewicht-Standard 6 µl des *All Blue* Markers und in die letzte Tasche 10 µl des *Low Molecular Weight* Marker pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für etwa 60 Minuten.

2.2.2.4 Western Blot

Der Transfer der mittels Gelelektrophorese separierten Proteine auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte im Tank-Blot-Verfahren. Die unterschiedlichen Komponenten wurden zunächst in Western-Blot-Transferpuffer equilibriert. Die Transferkassette wurde von der Kathode zur Anode folgendermaßen zusammengesetzt:

- Schwamm
- zwei Whatman-Papiere
- Gel aus der Elektrophorese
- Nitrozellulosemembran
- zwei Whatman-Papiere
- Schwamm

Bei Verwendung von NuPage-Gelen erfolgte der Transfer unter Verwendung kleiner Gelkassetten bei 100 V unter Eiskühlung für eine Stunde. Im Anschluss wurden die Membranen kurz mit Wasser gewaschen und mit Ponceau S gefärbt, sodass die Proteine auf der Membran sichtbar wurden und der erfolgreiche Transfer der Proteine dokumentiert werden konnte. Anschließend wurde die Membran mit TBS entfärbt und mit 5 % BSA oder Milchpulver (in TBS) für eine Stunde blockiert. Dann wurde die Membran mit dem Primärantikörper (in TBST verdünnt) inkubiert. Die Inkubation erfolgte je nach eingesetztem Antikörper für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Blots für 45-60 Minuten mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (1:7500 in TBST) inkubiert und anschließend erneut mit TBST gewaschen. Nach Inkubation mit ECL-Detektionsreagenz (1 min) wurden Proteinbanden durch Belichtung von Hyperfilm-ECL-Filmen visualisiert. Die Membran wurde bei 56 °C mit

einer Stripping-Solution inkubiert, sodass die Antikörper von der Membran entfernt und gegen weitere zu detektierende Proteine eingesetzt werden konnten.

2.2.2.5 2D-Gelelektrophorese

Vorbereitung

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrer spezifischen Eigenladung, dem isoelektrischen Punkt (pI), und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (MW) aufgetrennt. Bei der 2D Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) können mehrere Proben in einem Gel analysiert werden, indem sie vorher einzeln mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Für analytische Proben (Proteinmenge < 250 µg) wurden in der vorliegenden Arbeit Fokussier-Streifen mit einem in einer Acrylamidmatrix immobilisierten pH-Gradienten (z.B. *Immobiline DryStrip* pH 3-11NL) mit einem der Streifengröße angepassten Volumen *DeStreak*-Lösung (z.B. 450 µL für 24 cm) mit 0,5 % Ampholyten rehydriert. Während der etwa 10-stündigen Rehydratation wurden die Streifen in der Quellschale mit je 3 ml Mineralöl überschichtet, um einer möglichen Austrocknung und Oxidation vorzubeugen. Für 2D-DIGE Experimente wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) in Form einer Minimalmarkierung verwendet. Diese Farbstoffe könne über einen reaktiven N-Hydroxysuccinimid-(NHS-)Ester kovalent an primäre Amine binden. Bei der Minimalmarkierung werden lediglich durchschnittlich 3 % der Proteine markiert. Die Molmasse der Farbstoffe führt demnach kaum zu einer veränderten Wanderung der Gesamt-Proteine im Gel. Da jedoch die markierten Proteine selbst ein teilweise verändertes Laufverhalten aufweisen, empfiehlt sich nach dem Lauf eine Überprüfung der Proteinverteilung mittels Flamingo Pink oder ähnlichen Farbstoffen. Die lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoffe (CyDyes) wurden als 1 mM Lösung in DMF (Dimethylformamid) rekonstituiert. 50 µg Protein wurden mit 400 pmol CyDye bei einem pH von 8,5 für 30 Minuten auf Eis markiert. Die Reaktion wurde mit 1 µL (10 mM Lysin) abgestoppt, wodurch die übrigen reaktiven CyDyes abgesättigt wurden. Die einzeln markierten Proben wurden nach 10-minütiger Inkubation auf Eis vereinigt und isoelektrisch fokussiert.

Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Bei analytischen Gelen wurden die Proben mittels Napf-Beladung (*cup loading*) appliziert. Dabei wurden sie zunächst mit dem gleichen Volumen an 2-fach 2D-Probenpuffer (2 % (v/v) Ampholyte, 2 % (w/v) DTT) für 10 Minuten auf Eis inkubiert und zuletzt bei 18.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Entsprechend der Barcode-Markierungen wurden die IPG-Streifen auf dem Keramikblock der IPGphor ausgerichtet und arrangiert und an den Enden jeweils mit einem mit Wasser befeuchteten Papierstreifen abgedeckt. Hierauf wurden die Elektroden angebracht. Der Keramikblock wurde mit Öl überschichtet und die isoelektrische Fokussierung (IEF) gestartet. Das Limit für die angelegte Stromstärke wurde meist auf 75 μ A pro Streifen eingestellt. Die Fokussierung lief bei 24 cm Streifen in der Regel bis durchschnittlich 65-70 kV/h erreicht waren.

SDS-Page (zweite Dimension)

Bei Verwendung des Ettan Dalt Six Systems (GE Healthcare) konnte/musste die Acrylamidkonzentration des Trenngels der gewünschten Auftrennung angepasst werden. Die Acrylamidlösung wurde zunächst für mindestens ein bis zwei Stunden entgast, sodass sie luftblasenfrei durch die Rinne des „Gelcasters“ bis 1 cm vor Plattenende gegossen werden konnte. Eine durch Auspolymerisieren entstehende Hitzeentwicklung am Boden der Kammer wurde durch das Zugeben von 1,5 mL Verdrängungslösung verhindert. Somit konnte eine homogene Acrylamid-Matrix entstehen. Die erforderliche TEMED- und APS-Konzentration waren in Vorarbeiten empirisch bestimmt worden, um ein langsames, homogenes Polymerisieren zu erreichen. Die Gele wurden abschließend mit fein vernebeltem destilliertem Wasser überschichtet. Zum vollständigen Auspolymerisieren wurde die Kammer mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem die isoelektrische Fokussierung beendet war, wurden die Streifen für 15 Minuten reduziert und für 15 Minuten alkyliert. Daraufhin wurden die Streifen in 2-fachem Laufpuffer abgespült, in die Geltasche für die SDS-PAGE überführt und mit Hilfe von bei niedriger Temperatur schmelzender Agarose in den vorher mit destilliertem Wasser gewaschenen Geltaschen fixiert. Die untere Pufferkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt, die obere mit doppelt konzentriertem Laufpuffer. Die Elektrophorese lief zunächst für eine Stunde bei 10 mA/Gel und anschließend bei 12-14 mA/Gel über

Nacht. Das Gel wurde dabei konstant bei 20°C gehalten. Nach Beendigung des Laufs konnten die Gele am Typhoon Trio Laserscanner gescannt und analysiert werden.

2.2.2.6 Isolierung sekretorischer Granula

Zur Isolierung sekretorischer Vesikel wurde eine zuvor im Labor etablierte Kombination aus differentieller Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation angewandt (Schmidt et al. 2009). Zunächst erfolgte der schonende Aufschluss der Zellen, bei dem die Zellorganellen möglichst unbeschädigt erhalten bleiben sollten. Bei der anschließenden differentiellen Zentrifugation wurden die Organellen angereichert und intakte Zellen sowie Zellkerne entfernt. Die folgende Dichtegradientenzentrifugation diente der Separation und Anreicherung der unterschiedlichen subzellulären Organellen.

Zur Durchführung der Organellenpräparation wurden je nach Zelltyp 4-20 x 10⁸ Zellen eingesetzt/benötigt. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und das Volumen des Zellpellets abgeschätzt. Das Pellet wurde daraufhin noch einmal mit Extraktionspuffer gewaschen und im 2,7-fachen Volumen Extraktionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit Hilfe eines Pistills mit geringem Spaltmaß vorsichtig aufgeschlossen. Hierbei war meist eine Anzahl von 20-50 Zügen erforderlich. Der Zellbruch wurde regelmäßig nach 15-20 Zügen mittels Trypanblau-Färbung unter dem Lichtmikroskop überprüft. Die Homogenisation wurde bei etwa 80 % Trypanblau-positiven Zellen gestoppt. Zugegebene Proteaseinhibitoren schützten hierbei vor möglicher Proteindegradation. Das Homogenat wurde nun in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 x g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit den angereicherten Organellen abgenommen und für 20 Minuten und 4°C bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Organellen-Pellet in einem geringen Volumen (500 µl bzw. 1000 µl) aufgenommen. Ein Teil des Gesamthomogenats sowie der angereicherten Organellen wurde z.B. für die weitere Analyse mittels Western Blot in NP-40-Lysepuffer aufgenommen. Um den Dichtegradienten aufzubauen, wurde die Probe mit den angereicherten Organellen wie folgt vorbereitet: 288 µL 60 % Optiprep und 156,8 µL 20-fach Optiprep-Verdünnungslösung wurden zu 456,2 µl Probe zugegeben. Somit wurde eine Konzentration von 19 % Optiprep eingestellt.

Der Gradient wurde auf Eis in Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen in folgender Reihenfolge von unten nach oben geschichtet:

Optiprep	Volumen	
27,0 %	0,3 mL	
22,5 %	0,7 mL	
19,0 %	0,9 mL	Probe
16,0 %	0,9 mL	
12,0 %	0,8 mL	
8,0 %	0,9 mL	

Die einzelnen Gradientenstufen wurden mit 2,5 M Saccharoselösung auf 230 mOsm angeglichen. Die Zentrifugenröhrchen wurden in vorgekühlte Ausschwingbecher überführt und ohne Bremse bei 4°C für 4 Stunden mit 38.000 rpm zentrifugiert. Die hierbei entstandenen Interphasen wurden sequenziell von oben abgenommen und in einzelne Reaktionsgefäße überführt.

2.2.2.7 Auftrennung und Analyse der Organellenlysate

Proben für die 2D-Gelelektrophorese

Die abgenommenen Fraktionen wurden einzeln in Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Die gereinigten Organellen wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 38.000 rpm und 4°C konzentriert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 40 µL 2D-Lysepuffer aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 14 000 rpm, 4°C zentrifugiert und. Der Überstand wurde eingefroren oder direkt für die 2D-Gelelektrophorese verwendet. Eventuell wurde vor dem Einfrieren noch eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Proben für Western Blot

Zur Analyse der einzelnen Fraktionen mittels Western Blots wurden die gereinigten Organellen ebenfalls mittels Ultrazentrifugation in Homogenisierungspuffer konzentriert. Das Pellet wurde in 20-50 µL NP40-Lysepuffer aufgenommen, ebenfalls 20 Minuten auf Eis inkubiert und bei 14.000 rpm für 10 Minuten, 4°C, zentrifugiert. Aus dem

Überstand erfolgte eine Proteinbestimmung und anschließend die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE.

Dokumentation und 2D-Gelanalyse

Die Fluoreszenzintensität der bei der 2-dimensionalen Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) verwendeten Farbstoffe (Cy5, Cy3, Cy2) korreliert über einen weiten dynamischen Bereich mit der tatsächlichen Menge an markiertem Protein. Die spezifischen Emissionswellenlängen der mit den Farbstoffen gefärbten Proteine im Gel wurden mit dem Fluoreszenzscanner „Typhoon Trio“ quantifiziert. Mittels DIA (*Differential In-gel-Analysis*)-Software lassen sich die Scans der einzelnen Kanäle und der Überlagerung visualisieren. Hiermit konnten nun die Proteinspots analysiert und nach bestimmten Kriterien (Fluoreszenzintensität, Steilheit, Tiefe) in die nachfolgende Gelanalyse einbezogen werden. Unter Berechnung eines bestimmten Schwellenwertes wurden die differentiellen Spots festgelegt und aufgelistet. Nun wurden die einzelnen differentiellen Spots mit den Lokalisationen der Proteine in einem zuvor erstellten „Master Gel“ verglichen (Schmidt et. al 2011b) und konnten somit benannt werden. Mit Hilfe der BVA (*Biological Variation Analysis*)-Software konnten die differentiellen identifizierten Proteine zudem statistisch analysiert und somit Unterschiede zwischen den eingebrachten Proben dargestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus PHA-Blasten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Proteinzusammensetzung sekretorischer Lysosomen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verglichen werden. Daher mussten diese zunächst effizient und möglichst frei von anderen subzellulären Strukturen angereichert werden. Ein entsprechendes Protokoll war zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelt worden (Schmidt et al. 2009). Die Organellenseparation wurde über einen mehrschichtigen Iodixanol-Dichtegradienten durchgeführt. Für die ersten Pilot-Experimente wurden zunächst PBMZ mit PHA stimuliert und als „PHA-Blasten“ in Anwesenheit von IL-2 expandiert. An Tag 14 wurden die Zellen geerntet und homogenisiert und die Organellen mittels differentieller Zentrifugation angereichert und auf 19 % Optiprep eingestellt. Diese angereicherten Organellen wurden in die Mitte des diskontinuierlichen Dichtegradienten pipettiert und ultrazentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation waren in der Regel 6 Fraktionen sichtbar (Abb. 3.1), die von oben nach unten abgenommen und deren Proteinmenge bestimmt wurde.

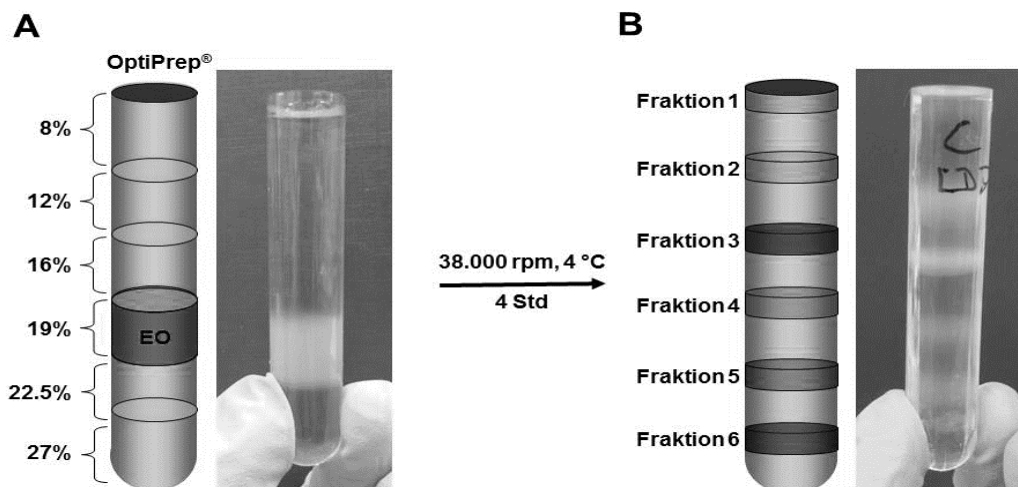


Abb. 3.1 Subzelluläre Fraktionierung über einen diskontinuierlichen Optiprep-Gradienten. Die Schichtung des Gradienten erfolgte mit den angegebenen Optiprepkonzentrationen. Die angereicherten Organellen (*enriched organelles* = EO) wurden in der Mitte des Gradienten platziert (links). Während der 4-stündigen Zentrifugation bei 38.000 rpm erfolgte eine Auftrennung der Organellen in sechs distinkte Fraktionen (rechts). Grafik aus Schmidt et al. 2009, Aufnahmen von eigenen Gradienten.

Für die folgenden Western Blot Analysen wurden 4-7 µg Protein aus den einzelnen Fraktionen aufgetragen. Wie zuvor beschrieben (Schmidt et al. 2009) konnte in PHA-Blasten eine deutliche Anreicherung der Markerproteine Fas Ligand und LAMP-1 in

den Fraktionen 1 und 2 nachgewiesen werden (Abb. 3.2). In einigen Experimenten waren diese Proteine vermehrt in Fraktion 1 nachweisbar, in anderen in Fraktion 2. Auch diese Beobachtung hatten verschiedene Mitglieder der Arbeitsgruppe im Vorfeld bereits gemacht, ohne eine Erklärung für diese Verschiebungen geben zu können. Granzym B war in den hier durchgeführten Experimenten kaum in Fraktion 1, wenig in Fraktionen 2 und 3, aber deutlich in den schweren Fraktionen und insbesondere in Fraktion 6 nachweisbar (Abb. 3.2). LAMP-1 war wiederum insbesondere in den ersten beiden Fraktionen detektierbar. Im in Abb. 3.2. gezeigten Experiment war eine deutliche LAMP-1-Bande auch in Fraktion 4 zu sehen. Die Fraktionen 3 und 5 zeigten eine geringe und die Fraktion 6 eine schwache LAMP-1 Reaktivität. Wie zuvor beschrieben waren Mitochondrien, hier analysiert über Antikörper gegen das mitochondriale Markerprotein COX IV, insbesondere in Fraktion 5 angereichert.

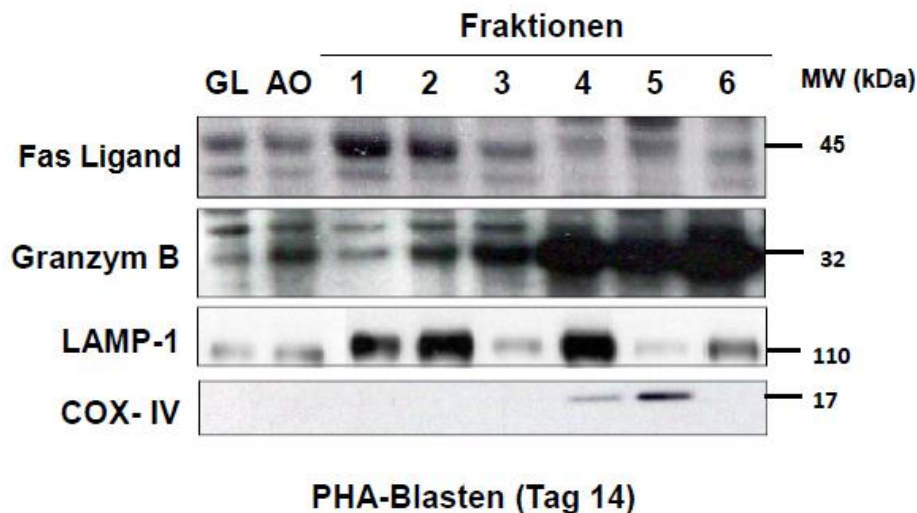


Abb. 3.2.: Verteilung lysosomaler, zytotoxischer und mitochondrialer Proteine in unterschiedlichen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. Die PHA-Blasten wurden nach 14-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert und je 5 µg jeder Fraktion sowie des Gesamthomogenisats (GL) und der angereicherten Organellen-Fraktion (AO) mittels SDS-PAGE separiert. Die genannten Proteine wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten insbesondere hinsichtlich einer reproduzierbaren Homogenisierung des Zellmaterials konnte mit dem Pilot-Experiment die zuvor beschriebene Auftrennung der Zellorganellen aus PHA-Blasten im Wesentlichen reproduziert werden. Dies galt als Voraussetzung für die geplanten Versuche mit angereicherten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

3.2 Charakterisierung sekretorischer Granula aus leukämischen T-Zellen

In weiteren Vorexperimenten sollten zytotoxische Effektor-Vesikel aus verschiedenen leukämischen T-Zell-Linien (Jurkat E6-1, J16-Rapo, JFL 39.1 und HuT-78) angereichert und hinsichtlich des Proteingehaltes miteinander verglichen werden.

3.2.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus leukämischen T-Zell-Linien

Die Zell-Linien wurden auf jeweils $5 - 10 \times 10^8$ Zellen expandiert, abzentrifugiert, gewaschen und mittels Dounce-Homogenisator schonend aufgeschlossen, bis lichtmikroskopisch etwa 80 % Trypanblau-positive Zellen zu erkennen waren. Die Organellen wurden aus den Zellhomogenaten wie beschrieben mittels differentieller Zentrifugation angereichert und dieses Material im Dichtegradienten ultrazentrifugiert. In folgenden Western Blots wurde die Auftrennung beispielsweise anhand des mitochondrialen Markers COX IV überprüft.

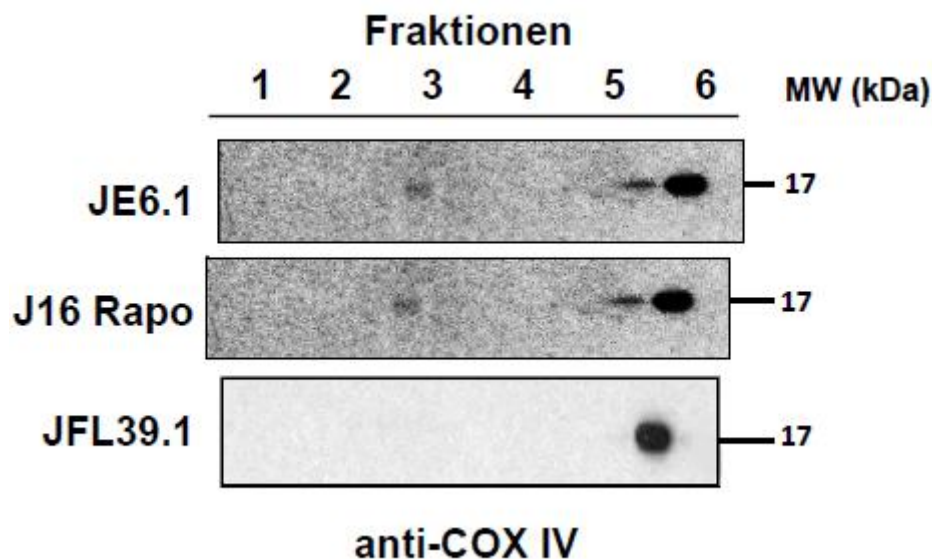


Abb. 3.3: Nachweis des mitochondrialen Markerproteins COX IV in unterschiedlichen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. Die Tumorzelllinien wurden nach Expansion subzellulär fraktioniert und 4 μ g von J16-Rapo und Jurkat E6-1, 6 μ g von HuT-78 und 8 μ g von JFL 39.1 jeder Fraktion gelelektrophoretisch separiert.

COX IV wurde in den Jurkat-Varianten immer in der 5. Fraktion detektiert, deutlich in Jurkat E6-1 und JFL 39.1, schwächer in J16-Rapo und unter gleichen Bedingungen sehr schwach bis gar nicht in HuT-78 (daher in Abbildung 3.3 nicht dargestellt). Die

Organellen-Präparationen aus den Jurkat-Varianten erschienen somit erfolgreich, während die Proteinmenge der Präparation aus HuT-78 möglicherweise zu gering war. Dennoch wurden die 2. Fraktionen für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet, da mit diesen Präparationen gleichzeitig die Methodik erprobt werden sollte.

3.2.2 2D-DIGE-Analysen angereicherter Vesikel aus leukämischen T-Zell-Linien

Nachdem die Organellenpräparationen in Western Blots überprüft worden sind, wurden die angereicherten sekretorischen Lysosomen aus der Fraktion 2 und angereicherte dichte Granula der Fraktion 6 aus verschiedenen Zelllinien gemeinsam auf zweidimensionalen Gelen aufgetrennt. Dabei wurden Jurkat E6-1 mit HuT-78 und J16-Rapo mit JFL 39.1 verglichen. Jurkat E6-1 und HuT-78 entsprechen nicht verwandten Linien aus unterschiedlichen leukämischen Entitäten, während sich J16-Rapo von JFL 39.1 prinzipiell nur in der unterschiedlichen Expression des Fas Liganden unterscheidet. Tabelle 3.1 fasst das experimentelle Setup und die Ergebnisse des Vergleiches von J16-Rapo mit JFL 39.1 zusammen.

Tabelle 3.1 Experimentelles Setup und Ergebnisse für den direkten Vergleich der Fraktion 2 und 6 Präparationen aus J16-Rapo und JFL 39.1. Die Spotanzahl entspricht den detektierten und berücksichtigten Proteinen, die Angaben über die differentiell exprimierte Proteine wurden den Statistiken im DeCyder-Software-Paket entnommen.

Fraktion	Farbstoff			DIA - Statistik			
	Cy5	Cy3	Cy2	Spots	ähnlich	geringer in JFL 39.1	erhöht in JFL 39.1
2 (Abb. 3.4)	J16-Rapo	JFL 39.1	mix	1799	1649 (91,7 %)	101 (5,6 %)	49 (2,7 %)
6 (Abb. 3.5)	J16-Rapo	JFL 39.1	-	1976	1783 (90,2 %)	98 (5 %)	95 (4,8 %)
6	J16-Rapo	JFL 39.1	-	1113	918 (85,1 %)	132 (10,1 %)	63 (4,8 %)

Der Vergleich von J16-Rapo und der stabilen hFasL-Transfektante JFL 39.1 zeigte bei 1799 bzw. 1976 detektierten Proteinen eine ähnliche Abundanz für 91,7 % der Proteine in Fraktion 2 und 90,2 % in Fraktion 6. Es konnte im Rahmen der vorliegenden

Arbeit nur ein Vergleich der 2. Fraktionen durchgeführt werden. Im Falle der 6. Fraktionen konnten zwei DIGE-Experimente ausgewertet werden, wobei im 2. Fall deutlich weniger Proteine (1113) in die Statistik mit einbezogen werden konnten. Tendenziell zeigte sich eher eine geringere Abundanz der berücksichtigten Proteine in beiden Fraktionen der JFL 39.1 Zellen. Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen exemplarisch die entsprechenden *Scans* zu den in der Tabelle gelisteten Experimenten.

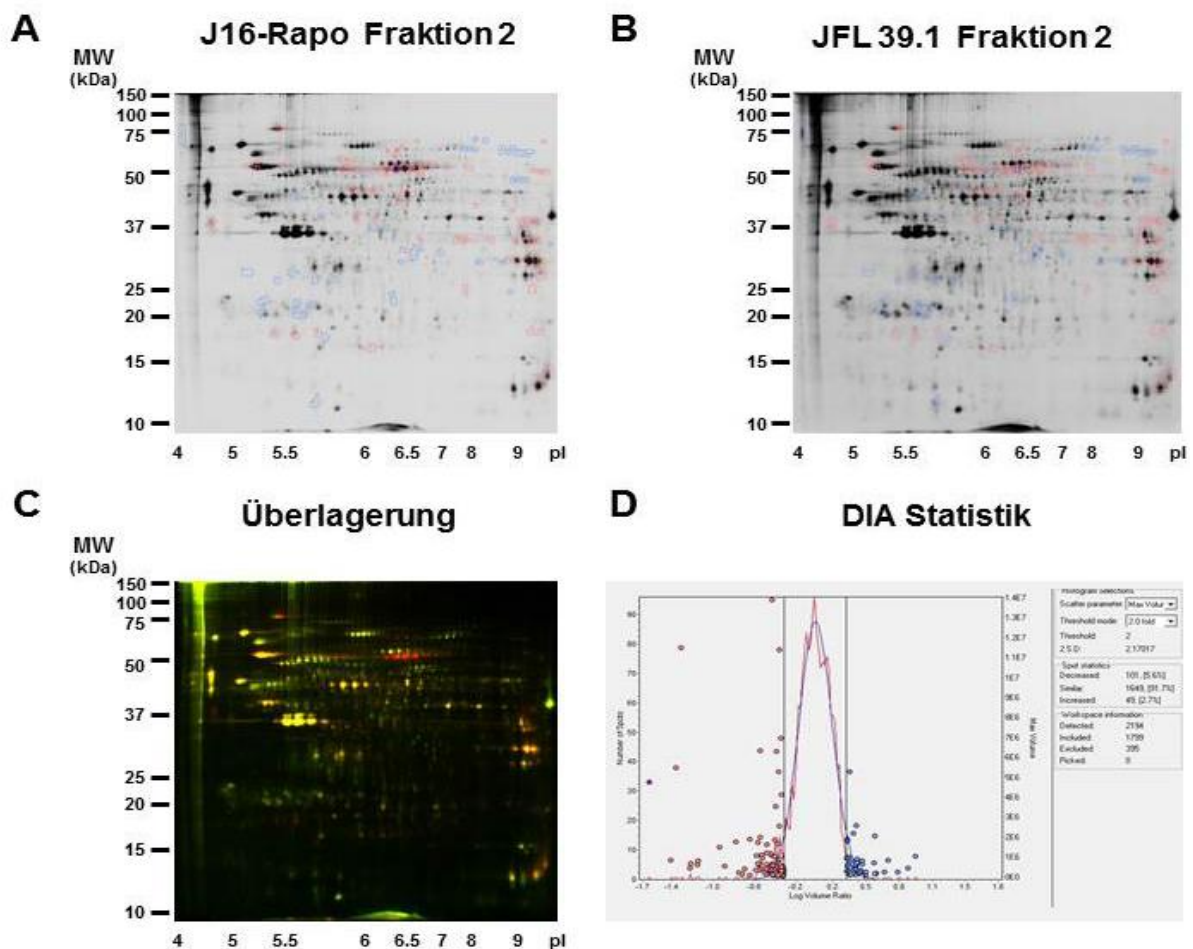


Abb. 3.4: 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion 2 aus den Tumorzelllinien J16-Rapo und JFL 39.1. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion-2-Vesikel von JFL 39.1 mit Cy3 bzw. von J16-Rapo mit Cy5 markiert und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Graustufenbilder zu den beiden individuellen Kanälen sind in A und B gezeigt, die Überlagerung beider Kanäle (Cy3 grün, Cy5 rot) in C. D zeigt die über die *Differential In-Gel Analysis (DIA)* errechnete Statistik (siehe Tabelle 3.1).

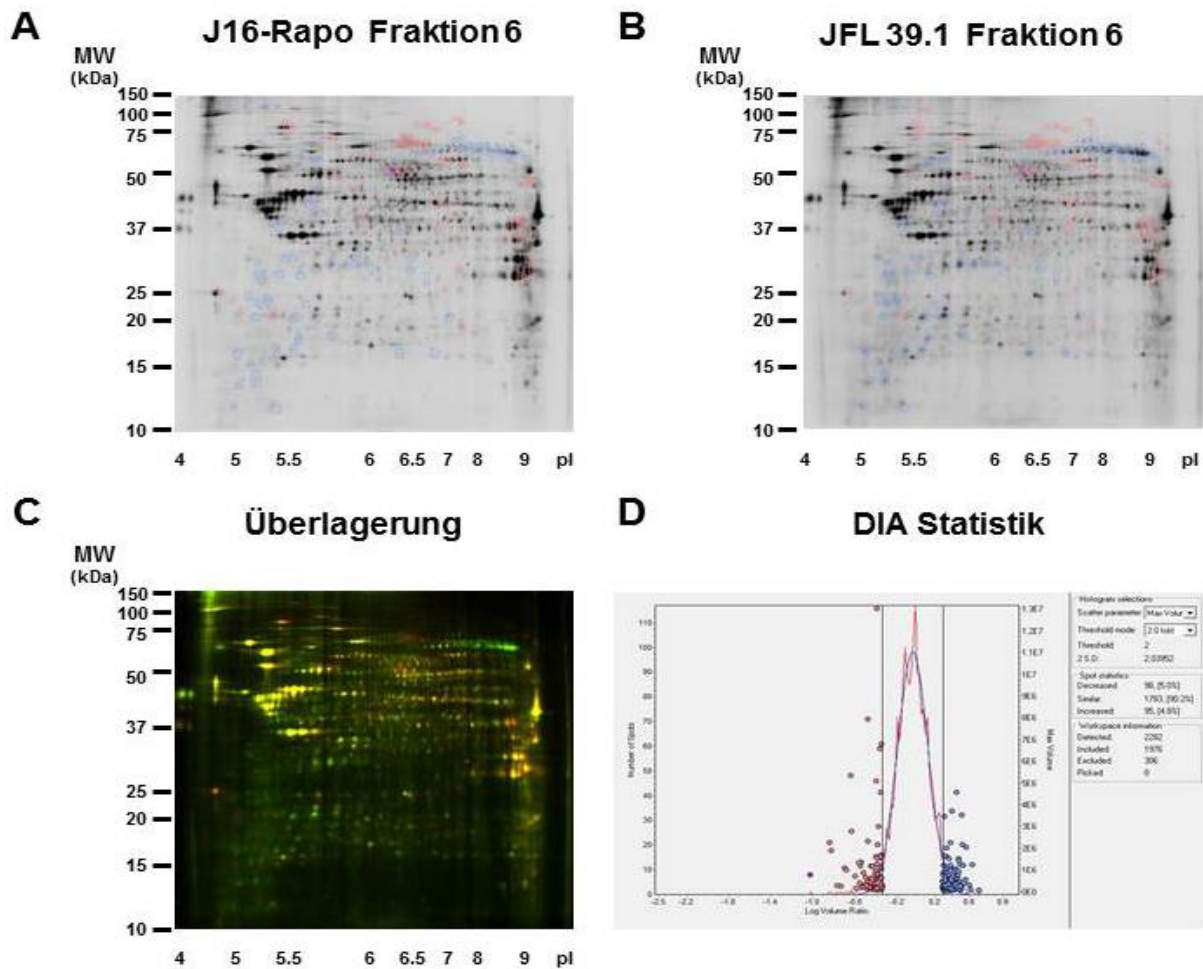


Abb. 3.5 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion 6 aus den Tumorzelllinien J16-Rapo und JFL 39.1. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion-6-Vesikel von JFL 39.1 mit Cy3 bzw. von J16-Rapo mit Cy5 markiert und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Graustufenbilder zu den beiden individuellen Kanälen sind in A und B gezeigt, die Überlagerung beider Kanäle (Cy3 grün, Cy5 rot) in C. D zeigt die über die *Differential In-Gel Analysis (DIA)* errechnete Statistik (s. Tabelle 3.1).

Der Vergleich der Zelllinien Jurkat E6-1 und HuT-78 zeigte nur eine minimal größere Varianz in der Proteinexpression (Tabelle 3.2). Hier waren bei 1754 bzw. 1542 der in der Statistik berücksichtigten Proteinspots 88,1 % der Proteine in Fraktion 2 und 84,5 % der Proteine in Fraktion 6 ähnlich abundant. Fraktion 6 Präparationen wurden auch in dieser Konstellation in zwei Experimenten analysiert.

Tabelle 3.2 Experimentelles Setup und Ergebnisse für den direkten Vergleich der Fraktion 2 und 6 Präparationen aus Jurkat E6-1 und HuT-78. Die Spotanzahl entspricht den detektierten und berücksichtigten Proteinen; die Angaben über die differentiell exprimierte Proteine wurden den Statistiken im DeCyder-Software-Paket entnommen.

Fraktion	Farbstoff			DIA - Statistik			
	Cy5	Cy3	Cy2	Spots	ähnlich	geringer	erhöht in HuT-78
2 (Abb. 3.6)	JE6-1	HuT-78	mix	1754	1545 (88,1 %)	124 (7,1 %)	85 (4,8 %)
6 (Abb. 3.7)	JE6-1	HuT-78	-	1542	1308 (84,8 %)	111 (7,2%)	123 (7,9 %)
6 (Abb. 3.8)	HuT-78	JE6-1	-	1458	1292 (88,6 %)	102 (7,0 %)	64 (4,4 %)

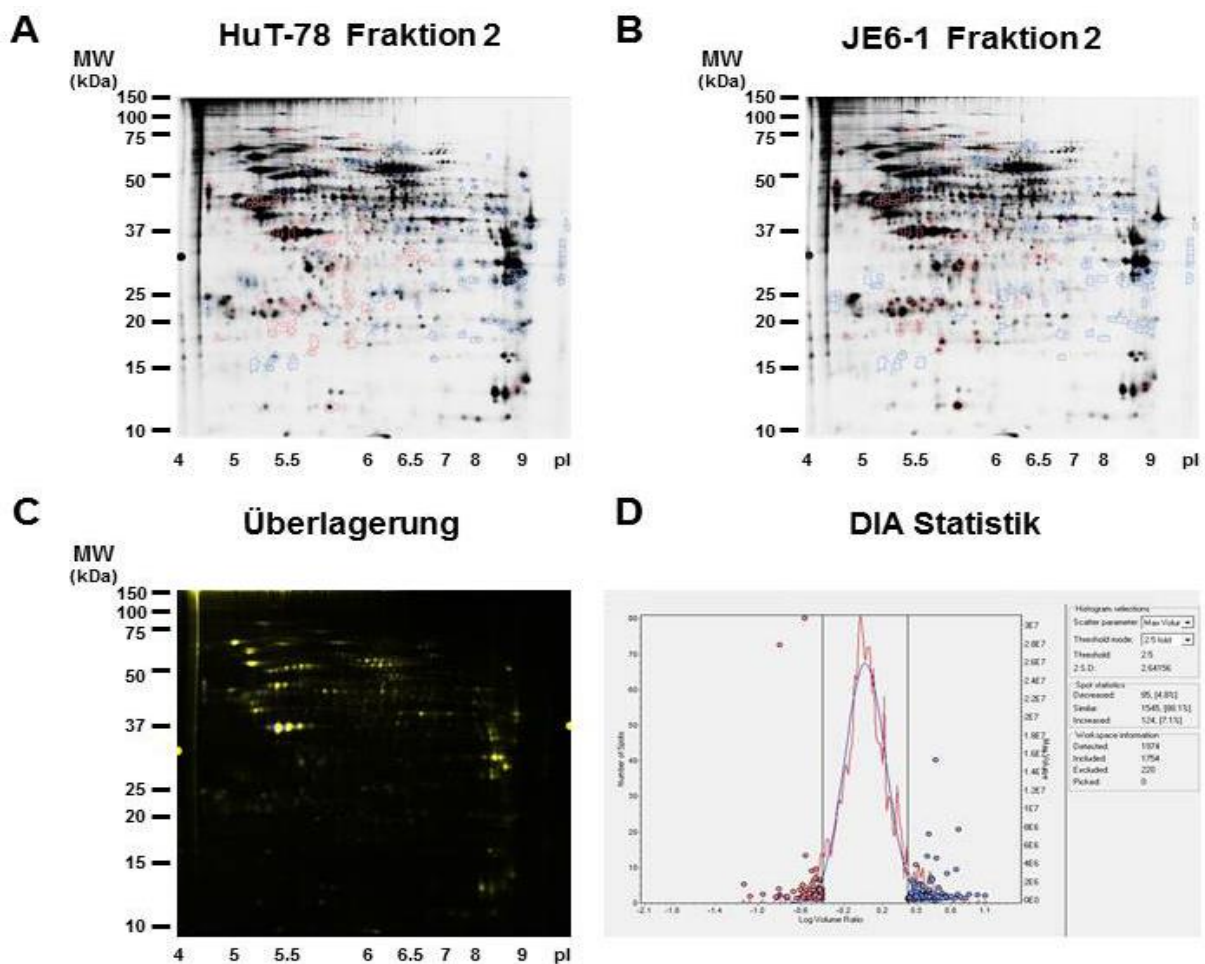


Abb. 3.6 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion 2 aus den Tumorzelllinien HuT-78 und JE6-1. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion-2-Vesikel von JE6-1 mit Cy3 bzw. von HuT-78 mit Cy5 markiert und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Graustufenbilder zu den beiden einzelnen Kanälen sind in A und B gezeigt, die Überlagerung beider Kanäle (Cy3 grün, Cy5 rot) in C. D zeigt die über die *Differential In-Gel Analysis (DIA)* errechnete Statistik (s. Tabelle 3.2).

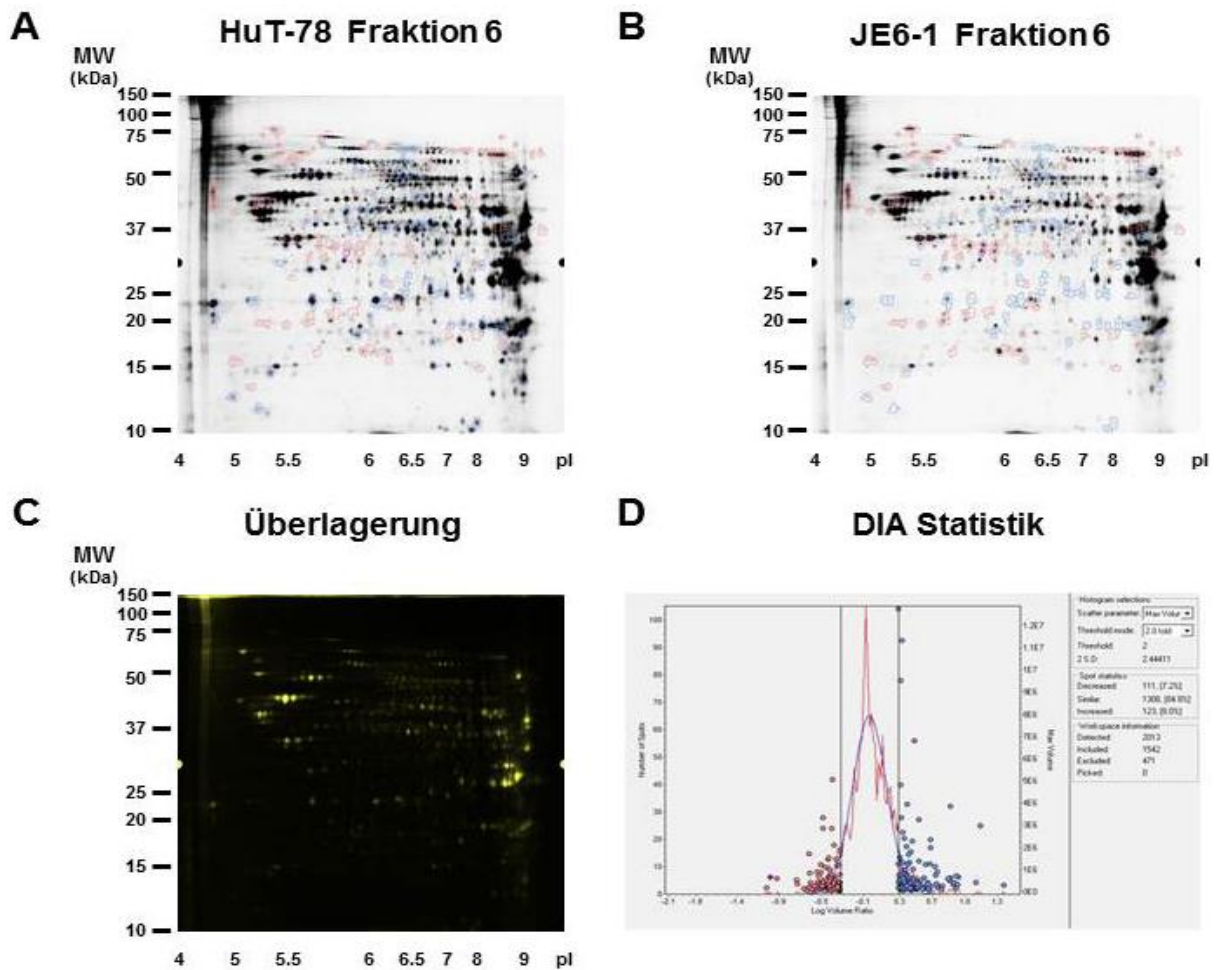


Abb. 3.7 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion 6 aus den Tumorzelllinien HuT-78 und JE6-1. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion-6-Vesikel von JE6-1 mit Cy3 bzw. von HuT-78 mit Cy5 markiert und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Graustufenbilder zu den beiden einzelnen Kanälen sind in A und B gezeigt, die Überlagerung beider Kanäle (Cy3 grün, Cy5 rot) in C. D zeigt die über die *Differential In-Gel Analysis (DIA)* errechnete Statistik (s. Tabelle 3.2).

Gleichzeitig wurde eine andere Farbstoffkombination verwendet („Dye Swap“), um eventuelle Farbstoff-abhängige Unterschiede der Proteinfärbung zu beurteilen. Die Abbildungen 3.6 bis 3.8 zeigen die entsprechenden Scans und Auswertungen mittels *Differential In-Gel Analysis (DIA)* zu den in der Tabelle dargestellten Werten. Insgesamt zeigen die Experimente, dass es in den verglichenen Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Dichtgranula und lysosomaler Proteine gibt.

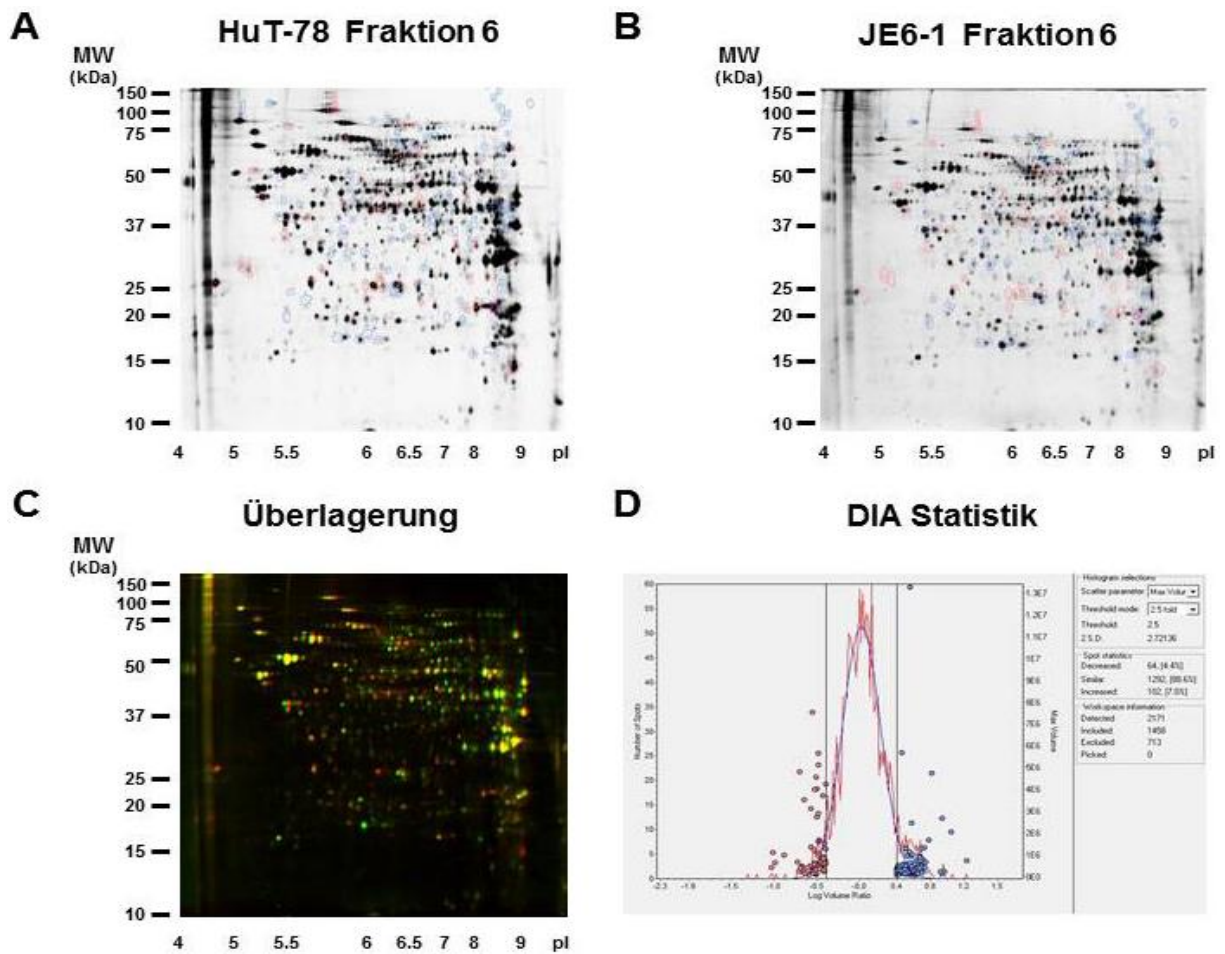


Abb. 3.8 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion 6 aus den Tumorzelllinien HuT-78 und JE6-1 (Dye swap zu Abb. 3.7). Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion-6-Vesikel von HuT-78 mit Cy3 bzw. von JE6-1 mit Cy5 markiert und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Graustufenbilder zu den beiden einzelnen Kanälen sind in A und B gezeigt, die Überlagerung beider Kanäle (Cy3 grün, Cy5 rot) in C. D zeigt die über die *Differential In-Gel Analysis* (DIA) errechnete Statistik (s. Tabelle 3.2).

3.3 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Eines der wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit war der Vergleich von (CD4⁺) T-Helferzellen und (CD8⁺) zytotoxischen T-Zellen hinsichtlich der Ausbildung, Reifung und Zusammensetzung der unterschiedlichen Effektor-Vesikel. Dabei sei noch einmal darauf hingewiesen, dass auch CD4⁺ T-Lymphozyten zytotoxisches Potential entwickeln, insbesondere wenn sie *in vitro* expandiert werden (Susskind et al. 1996, Sun et al. 2002). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergaben zudem, dass der Fas Ligand auch in CD4⁺ T-Zellen als Markerprotein für zytotoxische Vesikel (und mutmaßlich auch für sekretorische Lysosomen) angesehen werden kann. Um dies näher zu untersuchen, sollten intakte Organellen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien mittels differentieller und Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert und mittels Western

Blot und/oder 2D-DIGE miteinander verglichen werden.

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden über magnetische Zell-Separation (MACS) aus PBMZ angereichert. Die Zellen wurden anschließend für 14 Tage expandiert, bevor sie erneut durchflusszytometrisch analysiert wurden (Abb. 3.9, Tabelle 3.3).

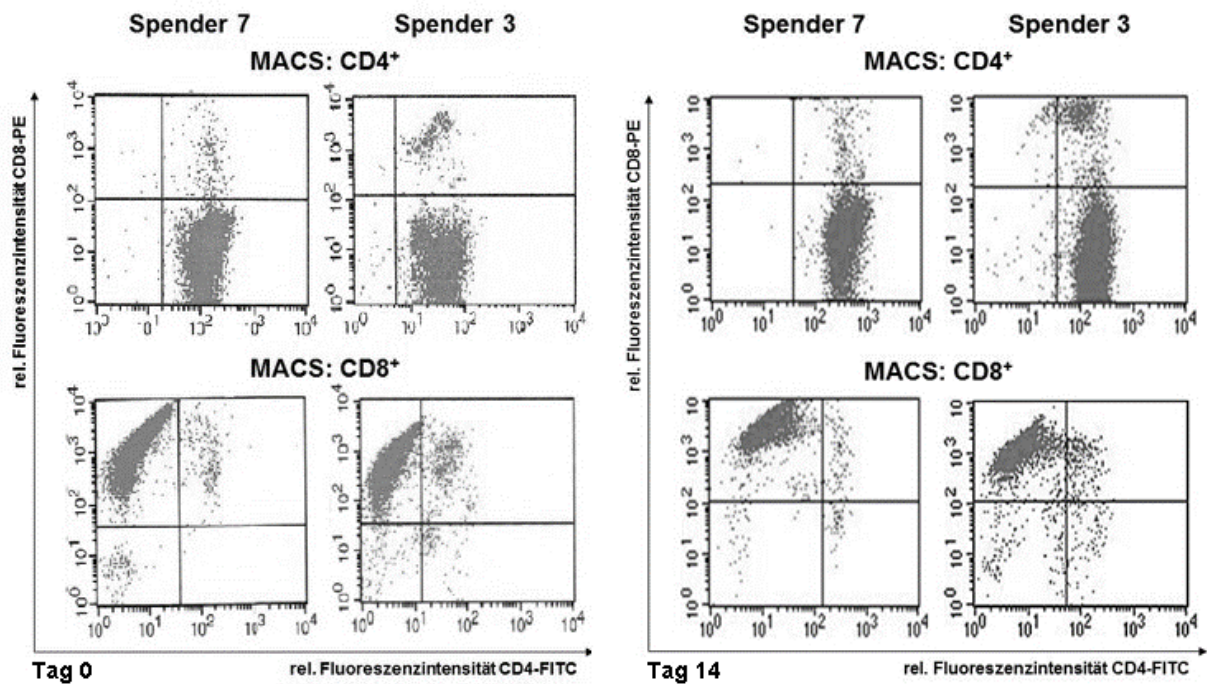


Abb. 3.9 FACS Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien nach magnetischer Zellseparation (Tag 0) und nach 14tägiger Expansion. Die Zellen wurden aus der Kultur mit anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Exemplarische Darstellung der Zelllinien von 2 Spendern (#3 und #7).

Tabelle 3.3: Durchflusszytometrische Analysen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien nach magnetischer Zellseparation (Tag 0). Zur Phänotypisierung wurden die Zellen mit CD4 FITC/CD8 PE, CD19 FITC/CD14 PE und CD3 FITC/CD56 PE gefärbt.

Spender	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD14 ⁺	CD56 ⁺
CD4⁺ Zell-Linien						
1	87,80 %	0,01 %	12,16 %	0,28 %	0,03 %	0,10 %
2	98,60 %	0,06 %	1,26 %	0,25 %	0,06 %	0,00 %
3	96,59 %	0,06 %	3,13 %	0,01 %	9,64 %	0,00 %
4	97,84 %	0,41 %	0,81 %	0,00 %	16,58 %	0,00 %
5	98,01 %	0,09 %	1,32 %	0,01 %	2,75 %	0,10 %
6	98,83 %	0,07 %	0,78 %	0,02 %	1,47 %	0,06 %
7	97,45 %	0,10 %	2,31 %	0,97 %	0,31 %	0,00 %
8	98,85 %	0,02 %	1,09 %	0,04 %	0,20 %	0,00 %
9	95,14 %	0,23 %	2,56 %	0,24 %	2,41 %	0,02 %
CD8⁺ Zell-Linien						
1	0,14 %	90,62 %	9,10 %	0,13 %	0,41 %	9,53 %
2	0,03 %	97,10 %	2,73 %	0,30 %	0,37 %	0,45 %
3	0,99 %	92,67 %	4,86 %	0,04 %	1,71 %	0,78 %
4	0,25 %	96,89 %	2,37 %	0,00 %	0,35 %	0,21 %
5	0,55 %	95,96 %	2,49 %	0,00 %	0,35 %	15,17 %
6	0,94 %	96,24 %	1,91 %	0,01 %	0,70 %	0,10 %
7	0,03 %	96,17 %	2,60 %	0,02 %	0,08 %	0,02 %
8	0,05 %	98,67 %	1,19 %	0,05 %	0,03 %	0,03 %
9	0,15 %	96,26 %	2,60 %	0,64 %	0,23 %	0,04 %

Abb. 3.9 und die Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen deutlich, dass am Ende der 14tägigen Expansionsphase bis auf eine Ausnahme relativ saubere Linien mit in der Regel über 95-97 % Anteil an CD4⁺ oder CD8⁺ generiert worden waren. Insbesondere der Anteil an CD19⁺ B-Zellen, CD14⁺ Monozyten/Makrophagen oder CD56⁺ NK-Zellen war meist vernachlässigbar.

Tabelle 3.4 Durchflusszytometrische Analysen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien nach 14tägiger Expansion. Zur Phänotypisierung wurden die Zellen mit CD4 FITC/CD8 PE, CD19 FITC/CD14 PE und CD3 FITC/CD56 PE gefärbt.

Spender	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD14 ⁺	CD56 ⁺
CD4⁺ Zell-Linien						
1	77,82 %	0,15 %	21,71 %	0,06 %	0,02 %	n.b.
2	96,56 %	0,04 %	3,34 %	0,05 %	0,00 %	n.b.
3	92,97 %	0,05 %	6,84 %	0,07 %	0,01 %	0,01 %
4	97,50 %	0,04 %	2,29 %	0,07 %	0,03 %	0,03 %
5	98,22 %	0,13 %	1,44 %	0,48 %	0,13 %	0,00 %
6	97,07 %	0,03 %	2,77 %	0,00 %	0,06 %	0,01 %
7	97,80 %	0,07 %	2,12 %	0,43 %	0,00 %	0,01 %
8	92,67 %	0,28 %	4,40 %	0,07 %	0,47 %	0,21 %
9	97,27 %	0,03 %	2,59 %	0,63 %	0,00 %	0,00 %
CD8⁺ Zell-Linien						
1	1,12 %	91,70 %	2,91 %	0,00 %	0,38 %	n.b.
2	0,02 %	96,11 %	0,13 %	0,00 %	0,03 %	n.b.
3	1,10 %	93,62 %	4,34 %	0,07 %	0,01 %	0,13 %
4	0,15 %	98,66 %	1,12 %	0,01 %	0,01 %	0,36 %
5	17,72 %	78,14 %	3,45 %	0,00 %	0,04 %	0,10 %
6	0,14 %	99,12 %	0,56 %	0,02 %	0,08 %	0,00 %
7	0,46 %	98,08 %	1,12 %	0,02 %	0,03 %	0,08 %
8	0,01 %	91,82 %	1,06 %	0,00 %	0,28 %	0,01 %
9	0,01 %	99,10 %	0,63 %	0,24 %	0,34 %	0,08 %

3.3.2 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen

Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien wurden während der Expansionsphase jeweils gleichzeitig mit rIL-2 bzw. mit frischem Medium versorgt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen geerntet, gezählt und jeweils mindestens 10-20 x 10⁸ Zellen pro Linie wie oben beschrieben homogenisiert. Die Organellen wurden mittels differentieller Zentrifugation angereichert und anschließend über einen Iodixanol-Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Die Auftrennung der Organellen wurde wie in Abb. 3.10 exemplarisch dargestellt jeweils mittels Western Blots unter Verwendung von Antikörpern gegen Fas Ligand, Perforin, Granzym B, Granulysin, Cathepsin D, LAMP-1 sowie CD63 (LAMP-3) – alles Proteine, welche in lysosomalen Kompartimenten zu erwarten sind – überprüft.

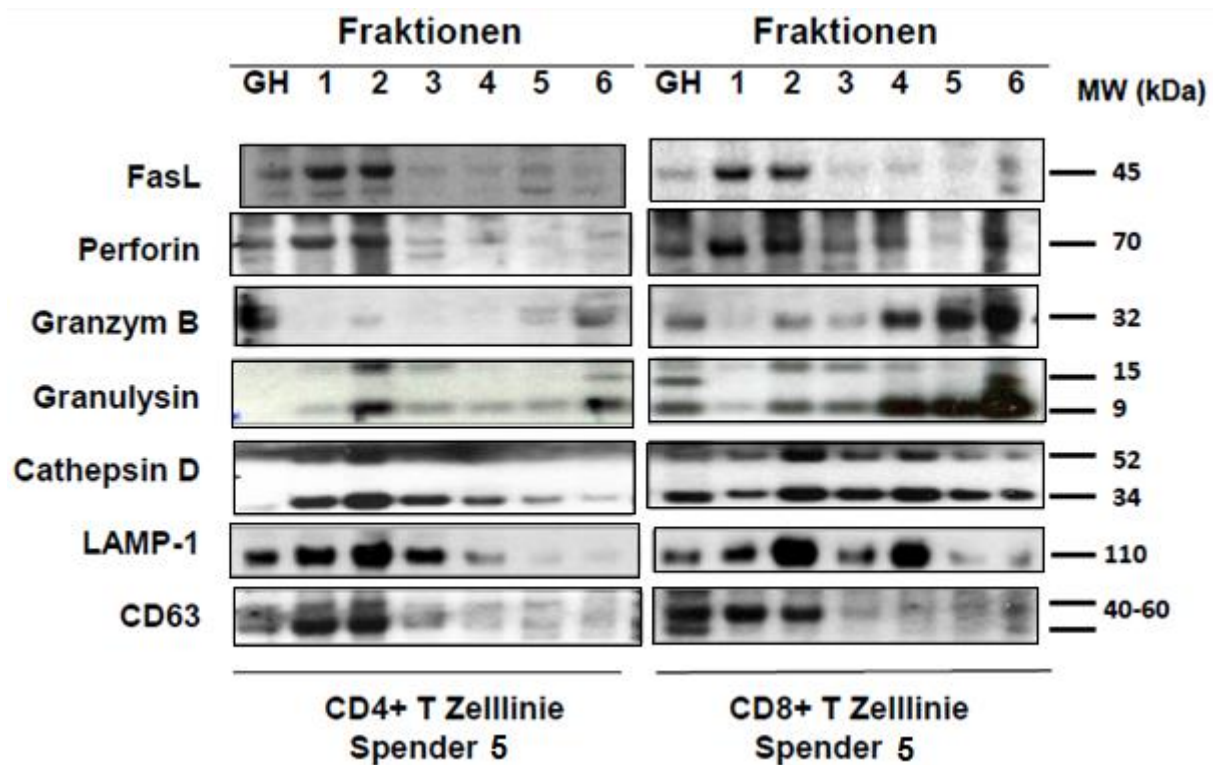


Abb. 3.10 Nachweis von lysosomalen Markerproteinen in individuellen Fraktionen mittels Western Blot. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien wurden nach Expansion homogenisiert und die Homogenate subzellulär fraktioniert. Je 4 µg jeder Fraktion sowie der entsprechender Gesamtlysate (GL) wurden mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und mit entsprechenden Antikörpern auf das Vorhandensein der genannten Markerproteine getestet.

Die Western Blot-Analysen der Fraktionen ergaben Ähnlichkeiten, aber auch einige Unterschiede hinsichtlich der Proteinverteilung/-abundanz in den individuellen Fraktionen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Fas Ligand als Markerprotein für sekretorische Lysosomen, fand sich bei beiden Zellpopulationen erneut in den leichten Fraktionen 2 und 1. Interessanterweise war Perforin in CD4⁺ T-Zellen auch nahezu ausschließlich in den beiden ersten Fraktionen nachweisbar, während in CD8⁺ T-Zellen zusätzlich eine deutliche Färbung in Fraktion 6 zu sehen war. Granzym B als Markerprotein der dichten Granula, war in CD4⁺ T-Zellen bei vergleichbarer Belichtungszeit nur sehr schwach in der Fraktion 2 und etwas intensiver in Fraktion 6 detektierbar, während in CD8⁺ T-Zellen eine massive Anreicherung in den schweren Fraktionen und vor allem in Fraktion 6 zu erkennen war. Granulysin zeigt im Allgemeinen zwei Banden (9 und 15 kDa), von denen die 9 kDa Bande der prozessierten (reifen) Form entspricht. In CD4⁺ T-Zellen waren beide Formen in Fraktion 2 und 6 nachweisbar, wobei in Fraktion 6 die 9 kDa Form überwog. Wie zuvor

bereits für unseparierte PHA-Blasten beschrieben, war in CD8⁺ T-Zellen insbesondere in den schweren Fraktionen (und sehr deutlich in Fraktion 6) eine deutliche Anreicherung von reifem 9 kDa Granulysin zu beobachten. Die unreife 15 kDa Form des Granulysin war in beiden Zellpopulationen am deutlichsten in Fraktion 2. Cathepsine (beispielsweise Cathepsin D) werden häufig als klassische lysosomale Hydrolasen zur Klassifizierung lysosomaler Kompartimente nachgewiesen. Wie in Abb. 3.10 zu erkennen, war Cathepsin D in fast allen Fraktionen vorhanden, wobei in CD4⁺ T-Zellen eine Tendenz zu leichteren Fraktionen, insbesondere Fraktion 2, zu erkennen war, während in CD8⁺ T-Zellen die Banden in verschiedenen Fraktionen (2, 3, 4) ähnlich intensiv waren. LAMP-1 war in beiden Subpopulationen eher in den leichten Fraktionen angereichert und hier insbesondere in Fraktion 2. Bei der in Abb. 3.8 gezeigten Präparation war auch eine intensive Bande in Fraktion 4 aus CD8⁺ T-Zellen zu beobachten. Interessanterweise war LAMP-1 offensichtlich in den Fraktionen 5 und 6 beider Zelltypen nur in geringen Mengen vorhanden. Der CD63 (LAMP-3) Western Blot ergab hinsichtlich der Fraktionen und der Intensität eine dem Fas Liganden vergleichbare Verteilung. Anhand des Gesamtlysats wurde gleichzeitig überprüft, ob die jeweiligen Proteine in vergleichbaren Mengen in den 14 Tage expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien vorhanden waren. Näherungsweise ist anhand des gezeigten Experiments festzustellen, dass Granulysin und Cathepsin D in CD4⁺ T-Zellen schwächer exprimiert sind als in CD8⁺ T-Zell-Linien. Alle anderen Proteine zeigen bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen um Expansionstag 14 in einer definierten Menge an Gesamtlysat eine ähnliche Abundanz.

Für den Proteom-weiten Vergleich wurden in sechs Experimenten die Proteinmuster aus angereicherten sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) nach Ultrazentrifugation jeweils aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien desselben Spenders mittels 2D-DIGE direkt miteinander verglichen (Tabelle 3.4 sowie Abb. 3.11 - 3.14).

Tab. 3.4 2D-DIGE-Experimente zum Vergleich der 2. Fraktionen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Angabe der verwendeten CyDyes, Anzahl der analysierten Spots, der 2-fachen Standardabweichung und Anzahl und Anteil in Prozent der in CD8⁺ Zellen in ihrer Abundanz verringerten bzw. erhöhten Spots (* markierte Zellpopulationen wurden für 2D-DIGE-Analysen verwendet)

Spender	Farbstoff			DIA - Statistik			
	Cy5	Cy3	Cy2	Spots	2 x SD	geringer in CD8 ⁺	erhöht in CD8 ⁺
1	CD4 ⁺	CD8 ⁺	mix	501	1,43	7 (1,4 %)	9 (1,8 %)
2	CD8 ⁺	CD4 ⁺	mix	651	1,59	32 (4,9 %)	15 (2,3 %)
3* Abb. 3.11	CD4 ⁺	CD8 ⁺	mix	1138	1,40	19 (1,4 %)	53 (3,8 %)
5* Abb. 3.12	CD4 ⁺	CD8 ⁺	mix	1541	1,93	120 (7,8 %)	14 (0,9 %)
6* Abb. 3.13	CD4 ⁺	CD8 ⁺	mix	1348	2,33	25 (1,9 %)	154 (11,4 %)
7 Abb. 3.14	CD4 ⁺	CD8 ⁺	--	1315	1,69	73 (5,6 %)	71 (5,4 %)

Die Fraktion-2- Proteine wurden wie in Tabelle 3.4. angegeben mit Cy5 bzw. Cy3 markiert und zweidimensional aufgetrennt. Zusätzlich wurde in einigen Fällen auch ein Gemisch der Proben aus den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und als interner Standard mit Cy2 markiert. Dies diente dazu, spenderspezifische Unterschiede ausfindig zu machen und in die anschließende vergleichende Berechnung mit einzubeziehen. In der Tabelle ist die Anzahl der Spots angegeben, die nach der Software-basierten Bereinigung den eingestellten Kriterien (Fluoreszenzintensität, Steilheit, Fläche) entsprachen und in die Analysen einbezogen werden konnten. Warum bei den ersten beiden Experimenten nur so wenig Spots detektierbar waren, ist unklar. Die beiden Experimente sind dennoch der Vollständigkeit halber aufgeführt. Als Grenze für die Ähnlichkeit der Spotvolumina in den beiden Fluoreszenzkanälen Cy5 und Cy3 wurde jeweils die von der Software vorgegebene 2-fache Standardabweichung gesetzt (2 x SD; eine Standardabweichung von 1 würde einem zu 100 % identischen Gel entsprechen). Mit Hilfe der differentiellen „In-Gel“-Analyse (DIA) ergaben sich damit außerhalb dieses Grenzbereiches die in der Tabelle angegebenen Unterschiede hinsichtlich der individuellen Proteinabundanz. Die Abbildungen enthalten jeweils unter D eine zusammenfassende Darstellung der DIA-

Statistik. Die in der Tabelle gekennzeichneten Experimente sind in den folgenden Abbildungen 3.11 bis 3.14 zusammengefasst.

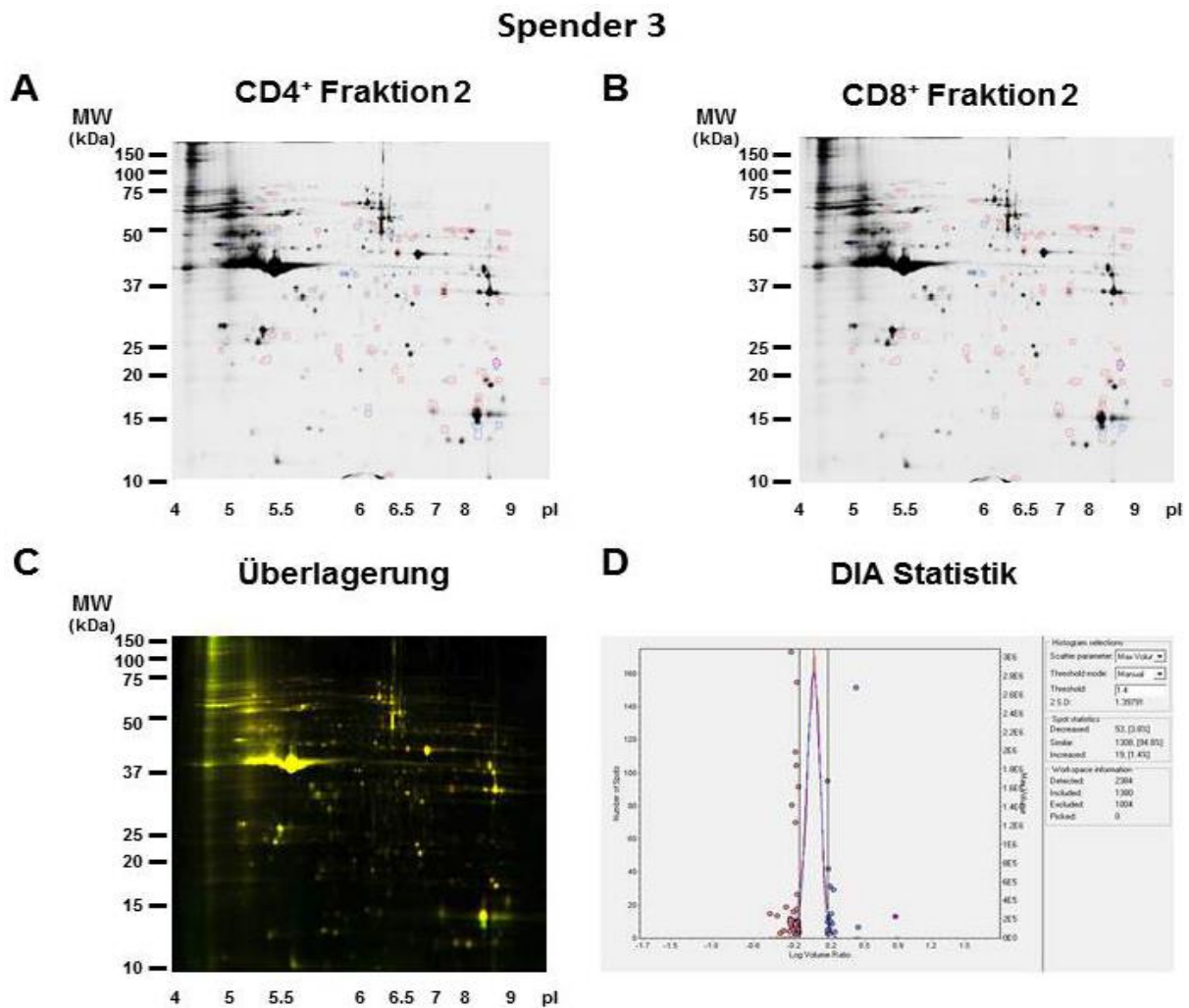


Abb. 3.11 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion-2-Vesikel aus expandierten CD4⁺ und CD8⁺ Zell-Linien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 von CD4⁺ T-Zellen mit Cy5 und von CD8⁺ T-Zellen mit Cy3 markiert und in einem 24 cm Streifen mit einem nicht linearen pH-Gradienten von 3 - 11 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine mit dem Streifen auf 12,5 % Laemmli Gele geladen und in der 2. Dimension aufgetrennt. A. Graustufenbild Cy5 Kanal (CD4⁺ T-Zellen), B. Graustufenbild Cy3 Kanal (CD8⁺ T-Zellen), C. Überlagerung (rot Cy5, grün Cy3), D. Screenshot zur Dokumentation der DIA-Statistik. (Spender 3 aus Tabelle 3.4).

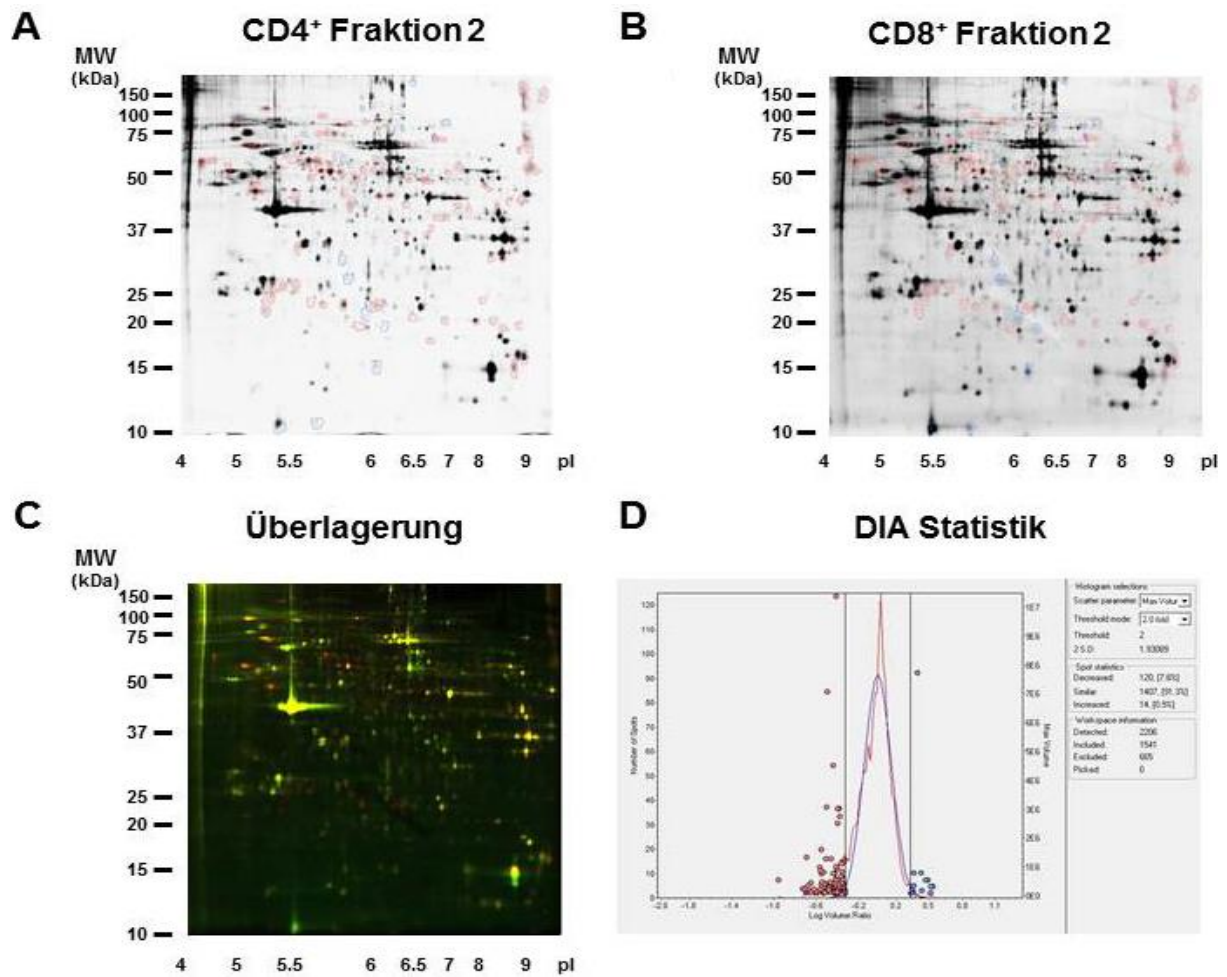


Abb. 3.12 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion-2-Vesikel aus expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 von CD4⁺ T-Zellen mit Cy5 und von CD8⁺ T-Zellen mit Cy3 markiert und in einem 24 cm Streifen mit einem nicht linearen pH-Gradienten von 3 - 11 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine mit dem Streifen auf 12,5 % Laemmli Gele geladen und in der 2. Dimension aufgetrennt. A. Graustufenbild Cy5 Kanal (CD4⁺ T-Zellen), B. Graustufenbild Cy3 Kanal (CD8⁺ T-Zellen), C. Überlagerung (rot Cy5, grün Cy3), D. Screenshot zur Dokumentation der DIA-Statistik. (Spender 5 aus Tabelle 3.4).

Spender 6

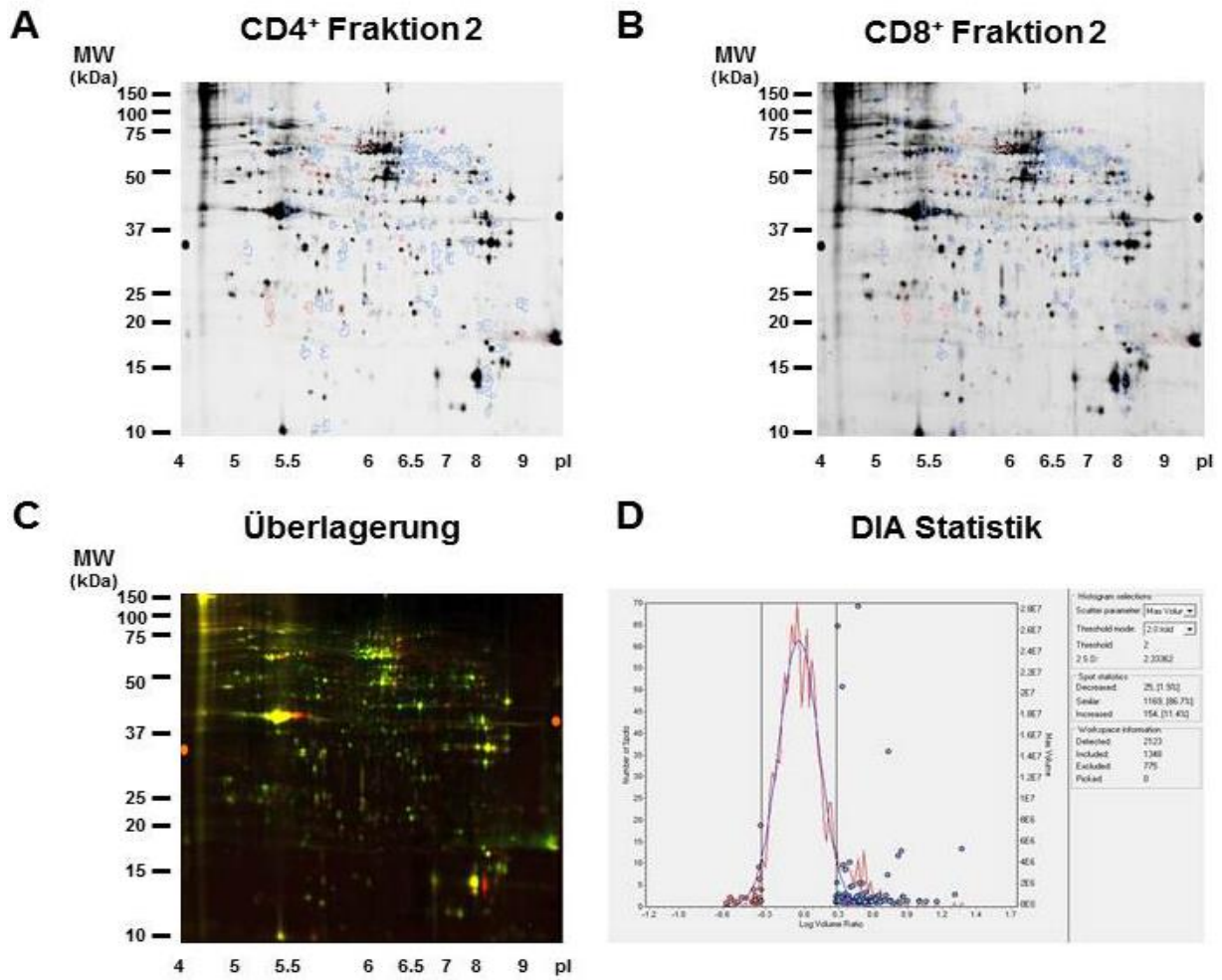


Abb. 3.13 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion-2-Vesikel aus expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 von CD4⁺ T-Zellen mit Cy5 und von CD8⁺ T-Zellen mit Cy3 markiert und in einem 24 cm Streifen mit einem nicht linearen pH-Gradienten von 3 - 11 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine mit dem Streifen auf 12,5 % Laemmli Gele geladen und in der 2. Dimension aufgetrennt. A. Graustufenbild Cy5 Kanal (CD4⁺ T-Zellen), B. Graustufenbild Cy3 Kanal (CD8⁺ T-Zellen), C. Überlagerung (rot Cy5, grün Cy3), D. Screenshot zur Dokumentation der DIA-Statistik. (Spender 6 aus Tabelle 3.4).

Spender 7

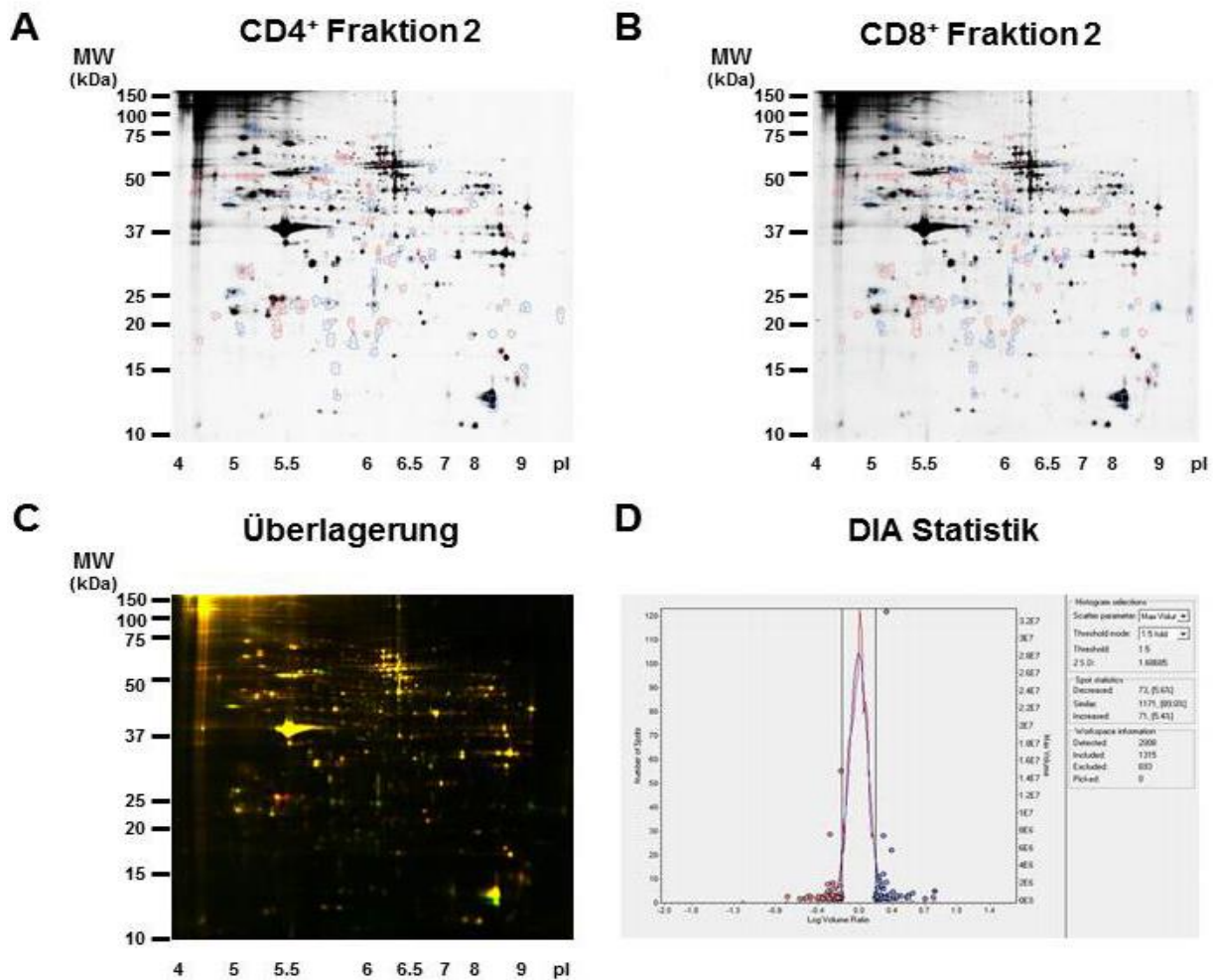


Abb. 3.14 2D-DIGE-Analyse der angereicherten Fraktion-2-Vesikel aus expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 von CD4⁺ T-Zellen mit Cy5 und von CD8⁺ T-Zellen mit Cy3 markiert und in einem 24 cm Streifen mit einem nicht linearen pH-Gradienten von 3 - 11 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine mit dem Streifen auf 12,5 % Laemmli Gele geladen und in der 2. Dimension aufgetrennt. A. Graustufenbild Cy5 Kanal (CD4⁺ T-Zellen), B. Graustufenbild Cy3 Kanal (CD8⁺ T-Zellen), C. Überlagerung (rot Cy5, grün Cy3), D. Screenshot zur Dokumentation der DIA-Statistik. (Spender 7 aus Tabelle 3.4)

In den Abbildungen 3.11 bis 3.14 sind die durchgeführten 2D-DIGE-Experimente dargestellt. Hierbei sind die Proteine aus CD4⁺ T-Zellen rot und aus CD8⁺ T-Zellen grün dargestellt. Die Proben sind insgesamt sehr homogen, weisen aber auch charakteristische Unterschiede auf. Die entsprechenden Histogramme aus der DIA-Software sind in Abb. 3.15 noch einmal separat dargestellt.

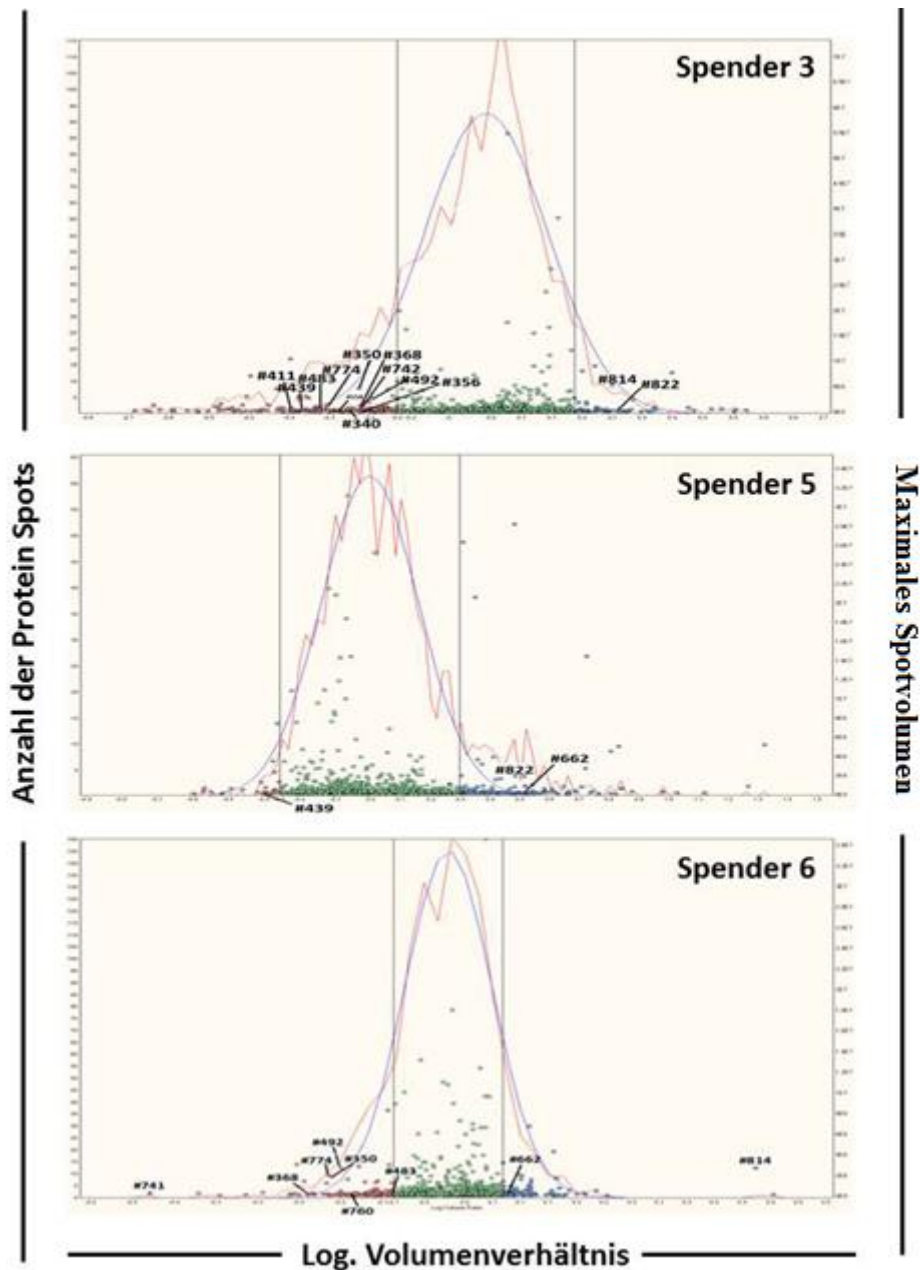


Abb. 3.15 Statistische Analyse des Vergleichs von Fraktion-2-Vesikeln aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien der Spender 3, 5 und 6. Jeder Punkt repräsentiert einen berücksichtigten Protein-Spot. Die Höhe der Punkte repräsentiert das maximale Spotvolumen. Die rote Kurve zeigt die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen, woraus eine Gauß'sche Regressionskurve (blau) berechnet wurde. Die vertikalen Linien zeigen die 6-fache Änderung des Volumenverhältnisses (CD4⁺/ CD8⁺) als Grenzbereich an. Weitere Erklärungen finden sich im Text. Die angegebenen Spotnummern entsprechen denen in Tabelle 3.5.

Hierbei wird jeweils die Anzahl der Spots in Relation zum maximalen Spotvolumen und Volumenverhältnis dargestellt dargestellt, also die Proteinkonzentration. Dies ist erforderlich, um die Experimente miteinander vergleichen zu können, da das Gelvolumen der Spots Schwankungen zwischen den Experimenten unterliegt. Der Vergleich der Konzentrationen zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen, erlaubt damit

möglicherweise Rückschlüsse auf ein unterschiedliches Proteinexpressionsprofil, beispielsweise in sekretorischen Lysosomen.

Die gezackte Kurve zeigt die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen. Die Gauß'sche Regressionskurve wird durch die ovalförmige Kurve wiedergegeben. Die Höhe der Punkte zeigt das maximale Spotvolumen jedes analysierten Spots. Die vertikalen Linien stellen den Grenzbereich dar (hier eine 6-fache Änderung des Volumenverhältnisses von CD4⁺/ CD8⁺).

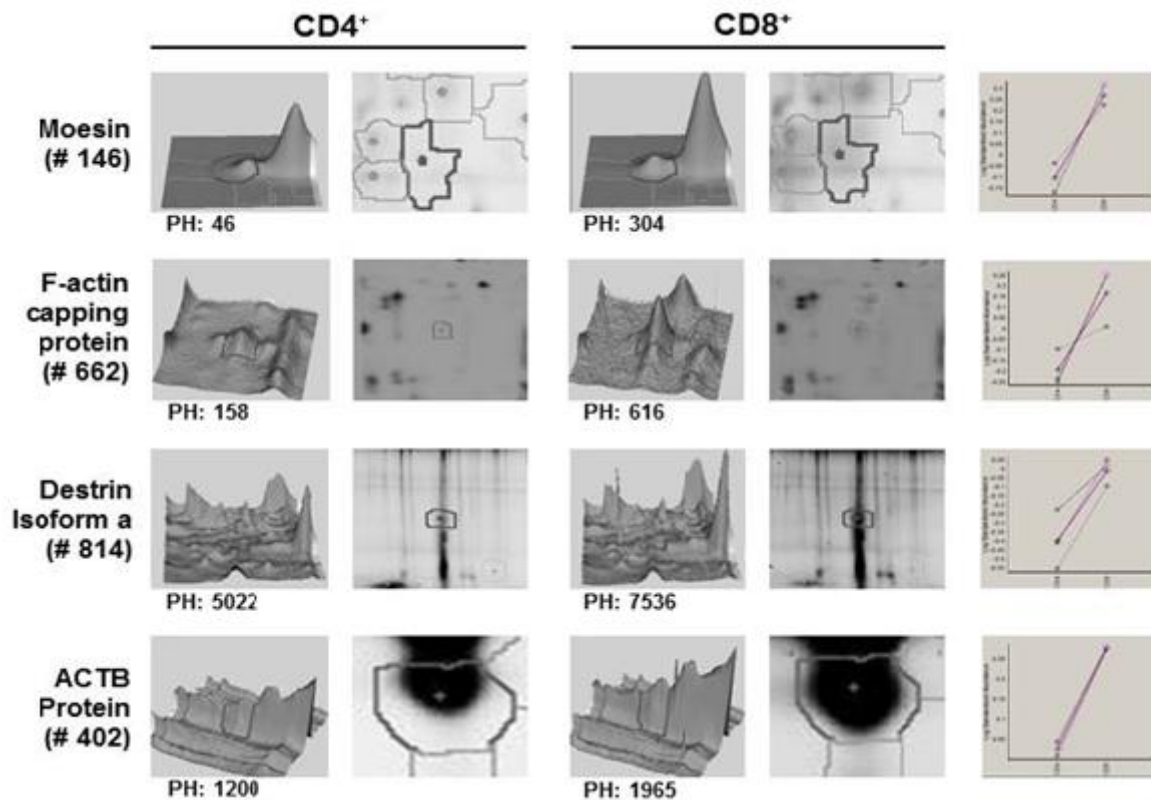
Unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien sollte nachfolgend versucht werden, wiederkehrende Unterschiede in der Verteilung einzelner Proteine ausfindig zu machen. Die Gele der beiden ersten Experimente wichen unter anderem hinsichtlich der Anzahl zu berücksichtigender Proteinspots zu sehr von den anderen Gelen ab, so dass sie nicht in die Berechnung mit einbezogen wurden. Im Experiment 7 reichte die Proteinmenge der Fraktion 2 nicht aus, um einen Cy2 Standard mitlaufen zu lassen, wodurch der statistische Vergleich dieses Gels mit den anderen nicht möglich war. Damit blieben die Gele aus 3 Experimenten (Spender 3, 5 und 6, in der Tabelle mit * markiert) übrig, die entsprechend einer „biologischen Varianzanalyse“ (BVA) unterzogen werden konnten. Mit Hilfe der jeweiligen Standards (Cy2 markiertes Probengemisch) konnten durch die implementierten Wahrscheinlichkeitsberechnungen spenderspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden. Es wurde folglich eine Varianzanalyse durchgeführt (t-Test), die diejenigen Spots identifizierte, die bei allen 3 Spendern mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit ein ähnliches differentielles Profil aufwiesen. Ein weiterer Faktor war das durchschnittliche Volumenverhältnis, welches größer als 1,5 (- 1,5 oder +1,5) sein sollte. Die Berücksichtigung aller Kriterien ergab schließlich 22 über drei Spender gleichermaßen unterschiedliche Protein-Spots in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Achtzehn dieser Spots konnten mithilfe eines in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe für die Fraktion-2-Vesikel aus PHA-Blasten erstellten „Master Gels“ (Schmidt et al. 2011b) provisorisch benannt werden (Tabelle 3.5). Hiervon wurden 5 Proteine in CD8⁺ T-Zellen stärker exprimiert und 13 Proteine konnten in CD4⁺ T-Zellen verstärkt nachgewiesen werden. In die Histogramme in Abb. 3.15 wurden nach der Auswertung die benannten Proteine eingetragen (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Benannte Spots mit gleicher Expressionstendenz in mindestens 3 Fraktion-2-Präparationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien. Aufgelistet sind Spots, die ein durchschnittliches Volumenverhältnis von > 1,5 bzw. < -1,5 und einen t-Test Wert von $p < 0,05$ aufwiesen. Die Proteine (Spotnummern aus den aktuellen Experimenten) wurden mithilfe eines im Labor erstellten Master-Gels benannt (Spotnummer Mastergel, Proteins-Name und -ID sowie annotierte Funktion).

Spot-Nr. Exp.	Spot-Nr. Master	Protein-Name		Funktion	t-Test	Volumen-Verhältnis CD4 ⁺ /CD8 ⁺
mehr in CD8⁺ T-Zell-Linien						
429	146	Moesin (MSN)		Zytoskelett	0.04197	2.3623
1327	662	F-actin capping protein beta subunit (CABZB)		Zytoskelett	0.01837	2.3501
1514	814	Dextrin Isoform a		Zytoskelett	0.02032	2.3467
888	402	ACTB Protein		Zytoskelett	0.004845	1.7734
1518	822	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		Zytoskelett	0.03784	1.7330
mehr in CD4⁺ T-Zell-Linien						
943	439	Adenylosuccinatlyase		Biosynthese	0.03513	-2.0740
901	411	Transfer RNA-Trp Synthetase		Biosynthese	0.04686	-1.9519
487	189	STAT 1, 91 kDa, isoform CRA_d		Signal-transduktion	0.03587	-1.8911
782	340	Copine III		Transport	0.04409	-1.7517
842	356	M2-Typ Pyruvatkinase		Metabolismus	0.05047	-1.7386
836	350	Pyruvatkinase 3 Isoform 2		Metabolismus	0.006055	-1.7343
825	368	Pyruvatkinase 3 Isoform 2		Metabolismus	0.003844	-1.7230
1043	483	Enolase 1 Variante		Metabolismus	0.04778	-1.7015
1168	558	Septin-9 Delta		Zytoskelett	0.03279	-1.6818
1052	492	Enolase 1 Variante		Metabolismus	0.005272	-1.6596
1480	774	Peroxiredoxin 1		Redoxprotein	0.02165	-1.6537
1472	760	Proteasom Untereinheit, Betatyp, 1		Hydrolase	0.01315	-1.5566
1442	741	programmed cell death protein 10		Apoptose	0.02448	-1.5209

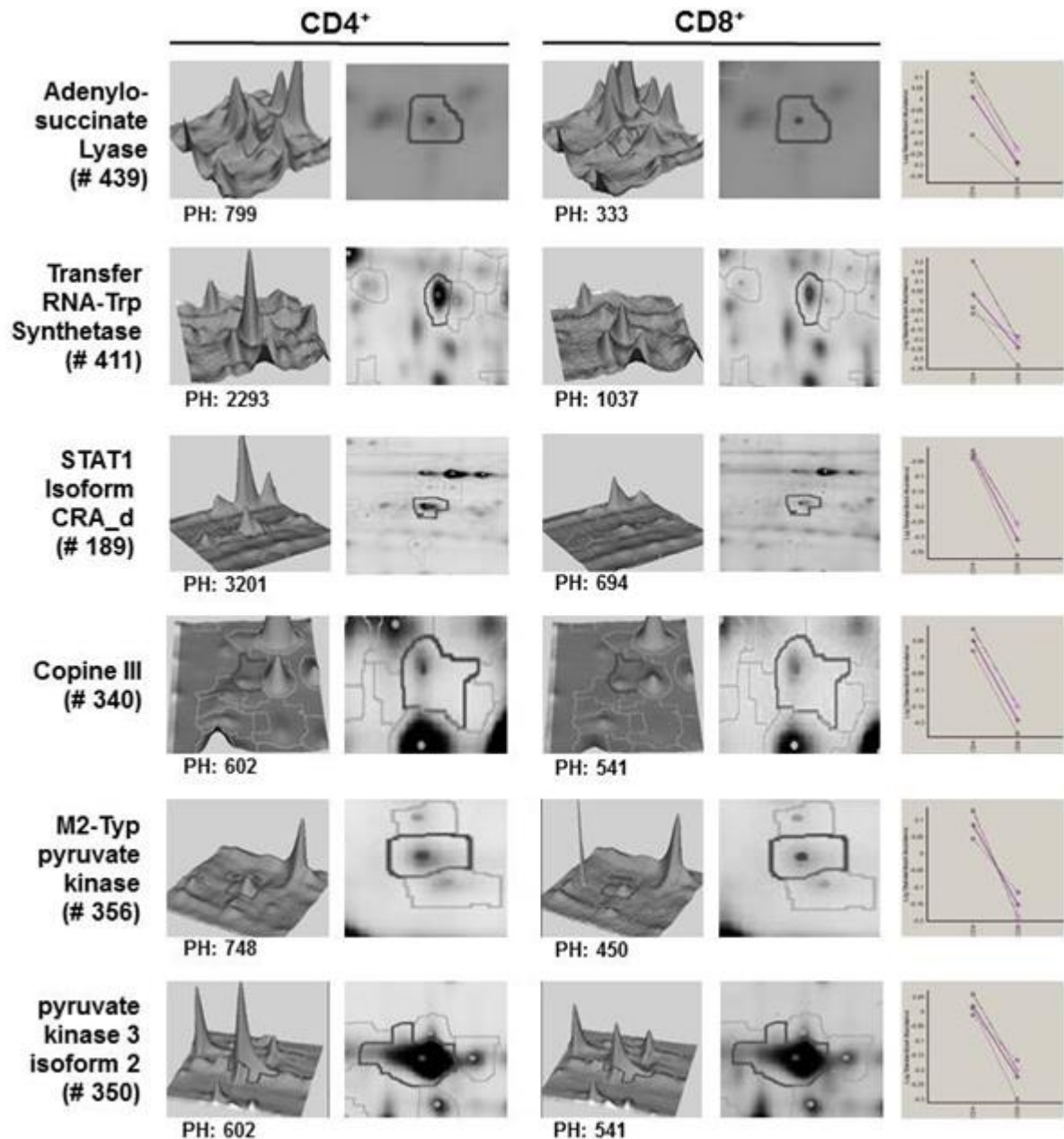
Spot 125 (1.5627fach höher in CD8⁺ T-Zellen, $p=0.02809$) konnte anhand des Master-Gels nicht eindeutig benannt werden, ebenso nicht die Spots 1434 (4.3381fach höher in CD4⁺ T-Zellen, $p=0.0115$), 1431 (2,5087fach höher in CD4⁺ T-Zellen, $p=0.03258$)

und 1031 (1.5428fach höher in CD4⁺ T-Zellen, p=0.01448). Die individuellen Plots zu den benannten Proteinen sind in Abb. 3.16 (mehr in CD8⁺ T-Zellen) und Abb. 3.17 und 3.18 (mehr in CD4⁺ T-Zellen) dargestellt.

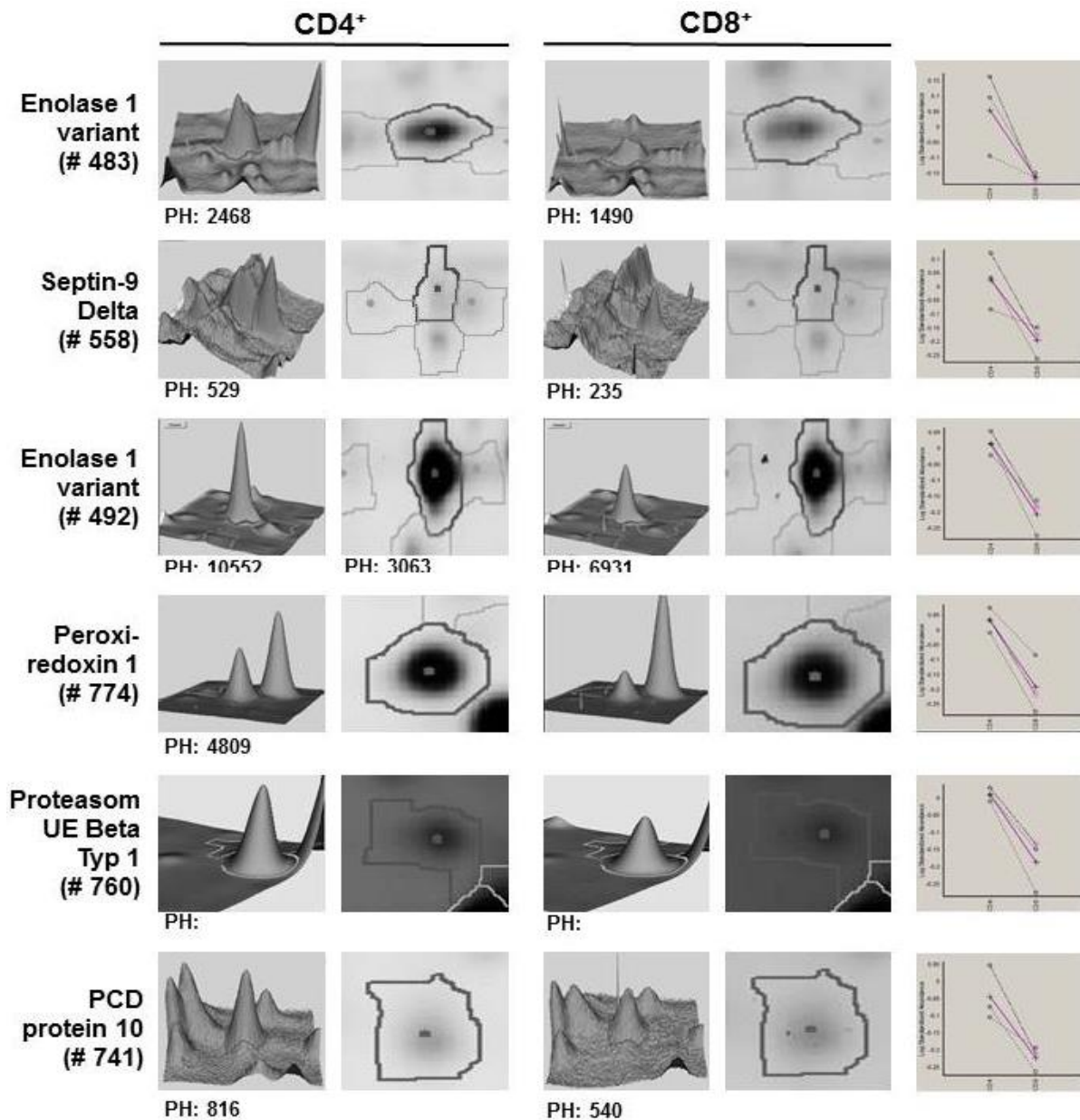


Abbildungen 3.16: Proteine mit höherer Abundanz in Fraktion-2-Vesikeln aus CD8⁺ T-Zellen. Die Gelausschnitte zeigen die Position der benannten Proteine, die korrespondierenden 3D-Profile zeigen die Konturen der umrandeten Spots. Mit der Höhe der Spitzen (peak height, PH) wird die Änderung des Spotvolumens der Proteine angegeben. An der rechten Seite ist jeweils die Grafik aus der biologischen Varianzanalyse (BVA) gezeigt, die dokumentiert, dass der entsprechende Spot in den Fraktionen aller drei Spender eine vergleichbare Tendenz in CD4⁺ (links) und CD8⁺ Zell-Linien zeigt.

Die in Abb. 3.16 repräsentierten Proteine waren in den Fraktion-2-Proben der drei verglichenen Spender jeweils in den CD8⁺ T-Zellen höher exprimiert (siehe BVA-Statistik am rechten Bildrand). Im Gegensatz dazu waren die in den beiden folgenden Abbildungen (3.17 und 3.18) gezeigten Proteine in Vesikeln aus CD4⁺ T-Zellen angereichert. Den Spots #822 (Glycerinaldehyd-3-phosphatase) und #368 (Pyruvatkinase 3 Isoform 2) konnten keine Abbildungen der Software entnommen werden.



Abbildungen 3.17: Proteine mit höherer Abundanz in Fraktion-2-Vesikeln aus CD4⁺ T-Zellen. Die Gelausschnitte zeigen die Position der benannten Proteine, die korrespondierenden 3D-Profile zeigen die Konturen der umrandeten Spots. Mit der Höhe der Spitzen (peak height, PH) wird die Änderung des Spotvolumens der Proteine angegeben. An der rechten Seite ist jeweils die Grafik aus der biologischen Varianzanalyse (BVA) gezeigt, die dokumentiert, dass der entsprechende Spot in den Fraktionen aller drei Spender eine vergleichbare Tendenz in CD4⁺ (links) und CD8⁺ Zell-Linien zeigt.



Abbildungen 3.18: Proteine mit höherer Abundanz in Fraktion-2-Vesikeln aus CD4⁺ T-Zellen. Die Gelausschnitte zeigen die Position der benannten Proteine, die korrespondierenden 3D-Profile zeigen die Konturen der umrandeten Spots. Mit der Höhe der Spitzen (peak height, PH) wird die Änderung des Spotvolumens der Proteine angegeben. An der rechten Seite ist jeweils die Grafik aus der biologischen Varianzanalyse (BVA) gezeigt, die dokumentiert, dass der entsprechende Spot in den Fraktionen aller drei Spender eine vergleichbare Tendenz in CD4⁺ (links) und CD8⁺ Zell-Linien zeigt.

Mithilfe des Protokolls zur Anreicherung und Separation verschiedener Zellorganellen gelang es bis zum Abschluss der experimentellen Phase dieser Arbeit nicht, eine für die Analyse der Organellen aus Fraktion 6 ausreichende Proteinmenge zu erhalten. Für die zweidimensionale Gelelektrophorese ist ein Minimum von ca. 50 µg Protein pro Probe nötig. Auch nach wiederholten Organellenpräparationen ausgehend von einer Anzahl von 10⁹ Zellen konnte die erforderliche Proteinmenge in der Fraktion 6

der Dichtegradienten nicht erreicht werden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit der Proteinbesatz der Fraktion 6 nicht mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese untersucht werden. Wie zuvor beschrieben, reichten die geringen Proteinmengen in den Fraktion-6-Isolaten aus PHA-Blasten jedoch für eine Analyse mittels Western Blot (siehe Abschnitt 3.1).

3.4 Reifung zytotoxischer Effektor-Kompartimente

3.4.1 PHA-Blasten

Um einen Einblick in der Reifung der zytotoxischen Kompartimente zu erhalten, wurde ein indirekter Weg gewählt. Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe schien es nicht sinnvoll, zu jedem Zeitpunkt angereicherte Vesikel zu vergleichen, sondern es sollte die Abundanz einiger Effektorproteine als Hinweis für die Entwicklung der zytotoxischen Eigenschaften (und Vesikel) überprüft werden. Entsprechend wurden Gesamt-Zelllysate der Linien vor und an bestimmten Tagen nach Stimulation und ohne vorherige Auftrennung in Fraktionen mittels Western Blot auf verschiedene zytotoxische Markerproteine untersucht. In den ersten Pilot-Experimenten wurden ruhende PBMZ und daraus durch PHA-Stimulation generierte PHA-Blasten miteinander verglichen. Die Zellen wurden nach anfänglicher Aktivierung durch PHA in Anwesenheit von exogenem IL-2 expandiert.

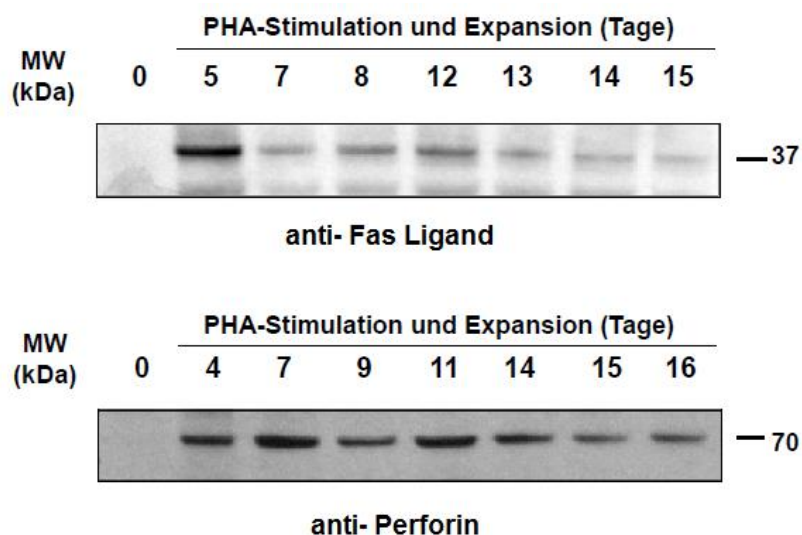


Abb. 3.19 Nachweis von Fas Ligand und Perforin in ruhenden PBMZ und PHA-aktivierten T-Zell-Blasten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 10^7 Zellen entnommen, lysiert und bei -20°C gelagert. Für die Western Blots wurden die Lysate aufgetaut und je 7-8 μg Protein mittels SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Färbung erfolgte mit den in Kapitel 2 aufgelisteten Antikörpern gegen Fas Ligand und Perforin.

In PHA-Blasten zeigte sich im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen eine deutliche Induktion der Expression von Fas Ligand und Perforin an Tag 4/5 nach PHA-Stimulation. In dem in Abb. 3.19 gezeigten Experiment zeigte sich im Rahmen der weiteren Expansion unter Zugabe von IL-2 zudem eine relative Reduktion des Fas Liganden in den Gesamt-Lysaten. Die Perforin-Expression blieb bis Tag 14 nach initialer Stimulation relativ konstant. Die beiden durchgeführten Experimente mit PHA-Blasten unterschiedlicher Spender ergaben eine vergleichbare Kinetik.

3.4.2 *In vitro* expandierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien

Im Rahmen der in 3.1 bis 3.3 beschriebenen Experimente wurden ebenfalls Untersuchungen zur Reifung zytotoxischer Effektor-Proteine durchgeführt. Hierfür wurden wie oben beschrieben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels Negativselektion aus PBMZ isoliert. Zur Beurteilung der Reinheit/Zusammensetzung der Populationen wurden direkt nach Anreicherung sowie zu mehreren Zeitpunkten der Expansion FACS-Analysen durchgeführt. Dabei wurden keine wesentlichen Kontaminationen durch unerwünschte Zellpopulationen festgestellt und nach 14 Tagen ergab sich eine Reinheit von > 95 % für CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (siehe Tabelle 3.3). Die in der Tabelle angegebenen Werte sind daher auch für die hier dargestellten Ergebnisse gültig (vergleiche Spendernummern). Nachdem 10-20 x 10⁶ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Kontrolle (Tag 0) abgenommen waren, wurden die Zellen wie beschrieben mit einem „Feeder-Cocktail“ stimuliert, der jedoch an Tag 4-5 mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) weitgehend entfernt wurde. Das Medium wurde in den folgenden Tagen nach einem strikten Zeitschema gewechselt, um die einzelnen Experimente vergleichbarer zu machen. Auch die Entfernung von toten Zellen erfolgte stets am selben Tag nach Aktivierung durch erneute Ficoll-Separation. Nach 6, 10, 14, 15 und 16 Tagen wurde jeweils ein Teil der Zellen abgenommen und lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Blots mit Antikörpern gegen Fas Ligand (Abb. 3.20), CD63 (Abb. 3.21), LAMP-1 (Abb. 3.22) sowie gegen Perforin (Abb. 3.23), Granzym B, Granulysin und Cathepsin D (Abb. 3.24) und gegen COX IV (Abb. 3.25) gefärbt. Insgesamt waren die Ergebnisse der Western Blot-Analysen nicht so reproduzierbar wie erwartet. Bezüglich der Expression von Fas Ligand, LAMP-1 und CD63 in CD4⁺ T-Zellen ergab sich eine sehr schwache Färbung vor Stimulation

(Tag 0), wobei aber ausgeprägte spenderabhängige Unterschiede beobachtet wurden. Tendenziell waren Fas Ligand und LAMP-1 in CD8⁺ T-Zellen auch ohne Stimulation nachweisbar. CD63 schien auch in CD8⁺ T-Zellen an Tag 0 weniger abundant, war jedoch immer noch vergleichsweise stärker exprimiert als in CD4⁺. Perforin zeigte an Tag 0 eine geringe Expression in beiden Zellpopulationen, wobei die Expression in CD8⁺ T-Zellen tendenziell vor Stimulation höher war. Erst nach Stimulation konnte Perforin eindeutig detektiert werden, in CD8⁺ T-Zellen war die Expression generell höher.

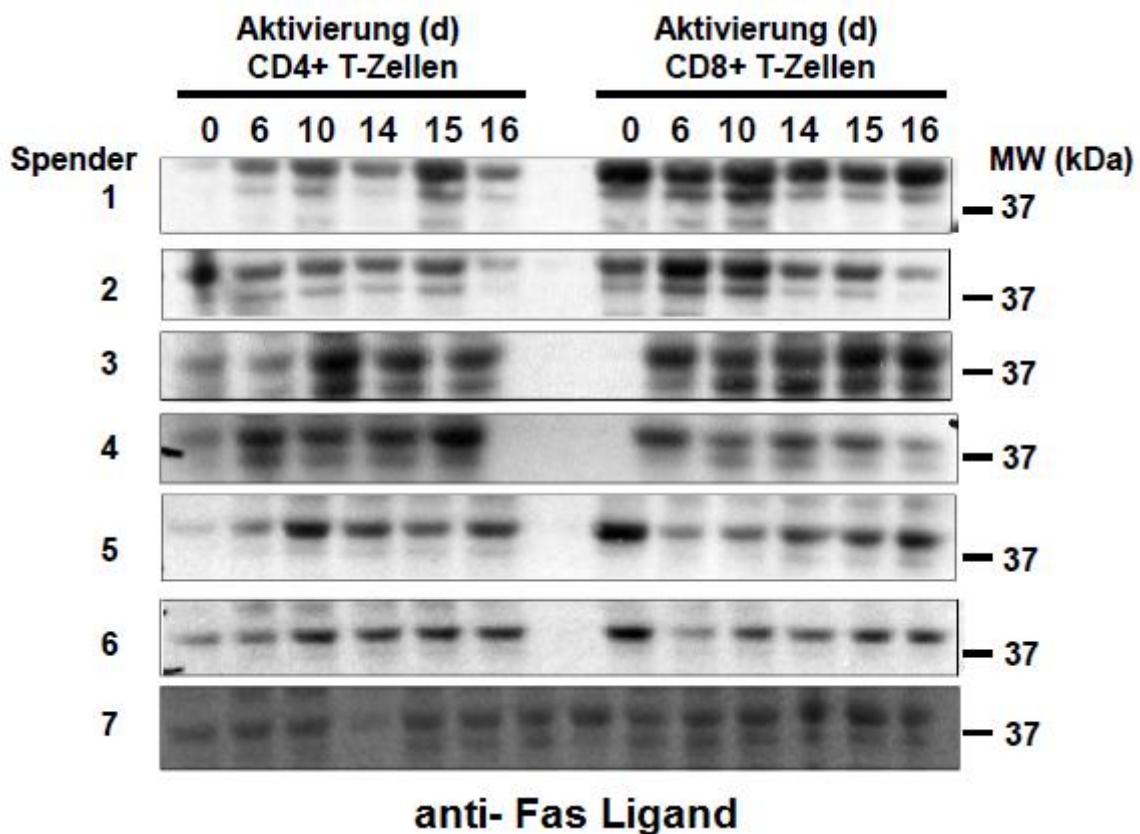


Abb. 3.20 Fas Ligand in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen Fas Ligand gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht.

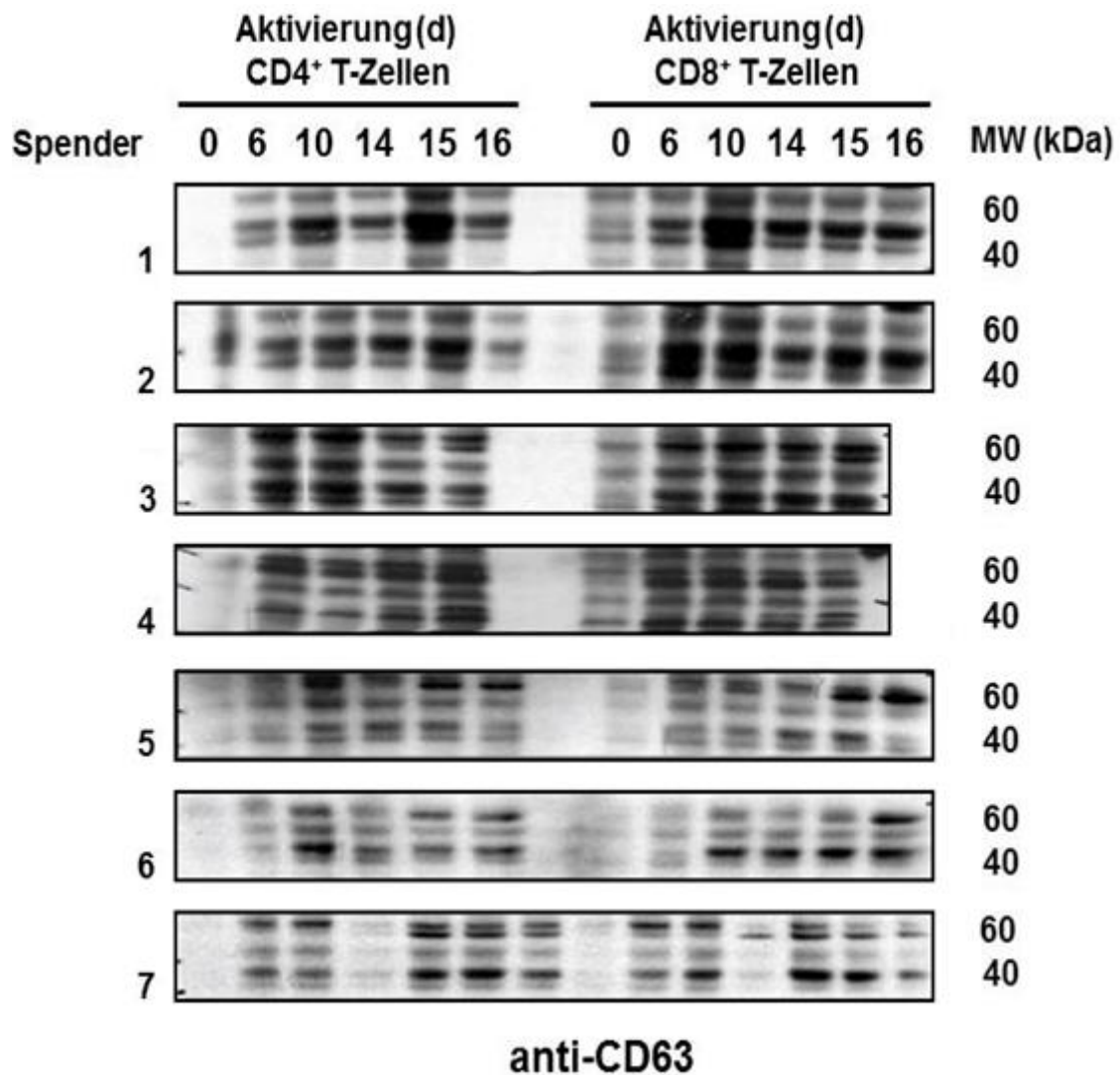


Abb. 3.21 CD63 in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen CD63 gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht.

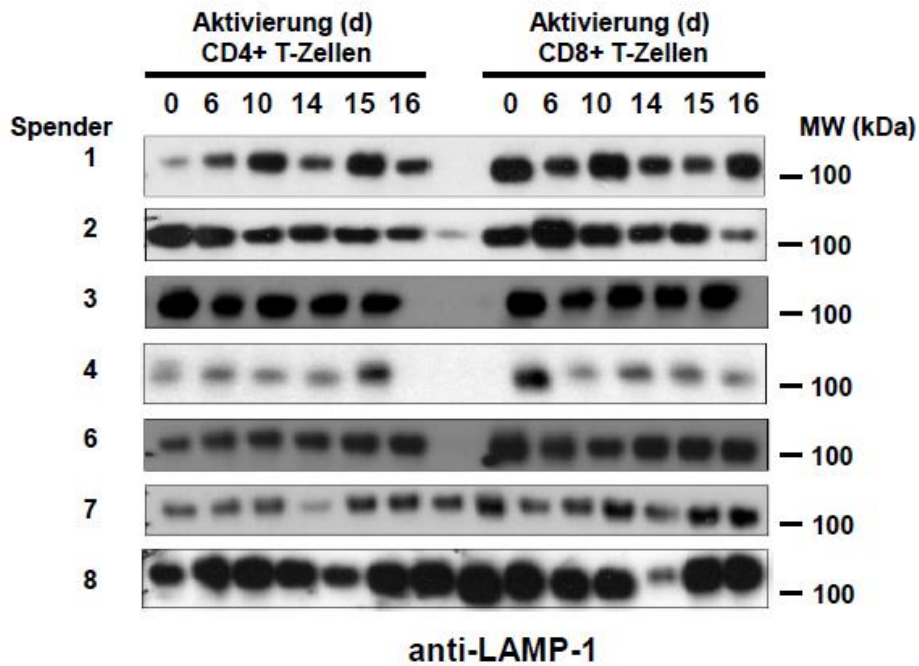


Abb. 3.22 LAMP-1 in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen LAMP-1 gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht.

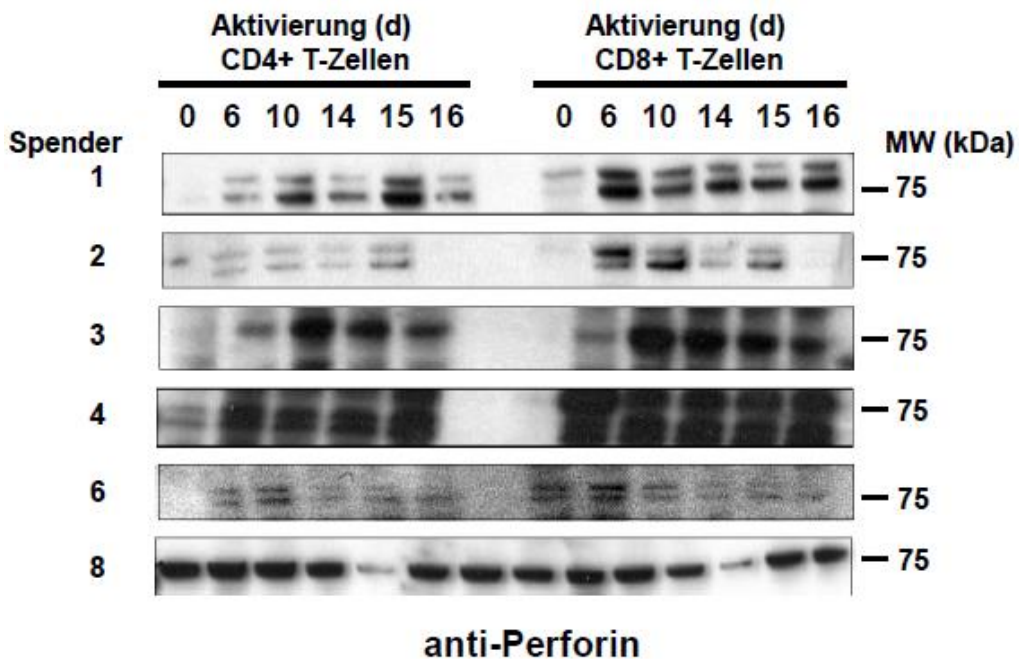


Abb. 3.23 Perforin in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen Perforin gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht.

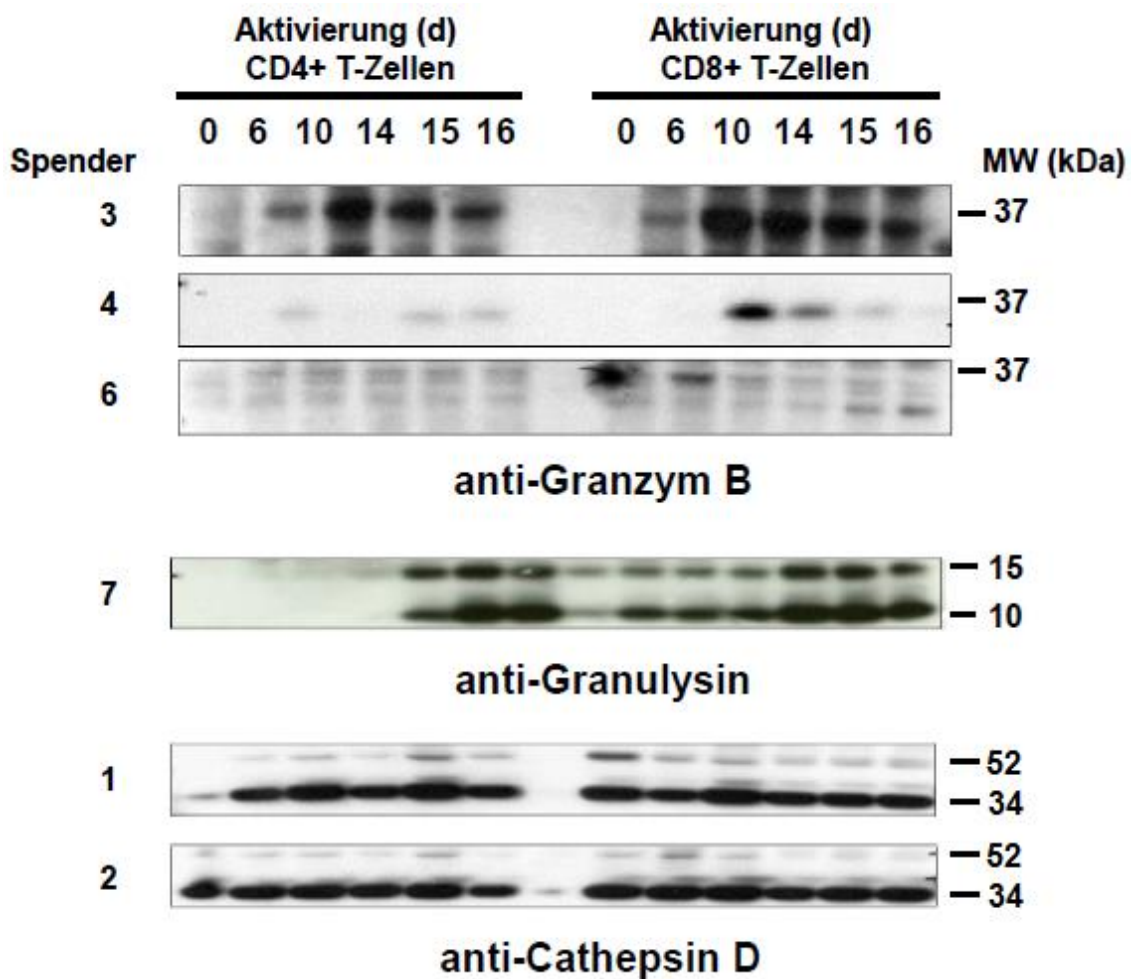


Abb. 3.24 Granzym B, Granulysin und Cathepsin D in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen Granzym B, Granulysin und Cathepsin D gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht. Marker

Granzym B war an Tag 0 weder in CD4⁺ noch in CD8⁺ T-Zellen nachweisbar, erschien aber in CD8⁺ T-Zellen möglicherweise etwas früher (bereits an Tag 5) und verstärkt. In CD4⁺ T-Zellen zeigte sich erst ab Tag 7 eine deutliche Granzym B-Expression. Bei Granulysin zeigte sich eine beginnende Expression beider Formen in CD8⁺ T-Zellen eines Spenders ebenfalls 6 Tage nach Stimulation, während in den CD4⁺ T-Zellen dieses Spenders Granulysin erst nach 14 Tagen nachzuweisen war. Cathepsin D war in CD8⁺ T-Zellen unabhängig von der Stimulation konstant über den ganzen Untersuchungszeitraum nachweisbar, ebenso in einer von zwei CD4⁺ T-Zell-Linien. In der anderen Linie wurde das Protein erst nach Stimulation angefärbt.

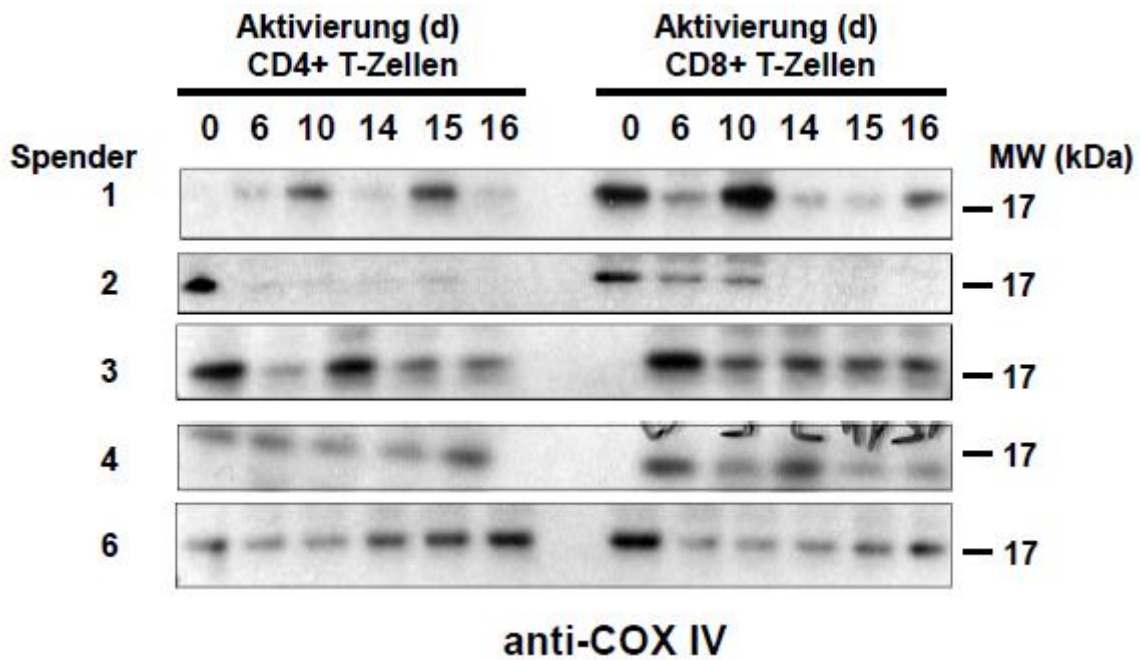


Abb. 3.25 COX IV in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien. Die Lysate wurden an den angegebenen Tagen von frisch isolierten und expandierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien hergestellt und eingefroren. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen COX IV gefärbt. Von Spendern 3 und 4 wurden lediglich fünf Proben untersucht.

Das mitochondriale Protein COX IV war in beiden Populationen bereits vor Stimulation ähnlich stark exprimiert, die Expression entwickelte sich nach Stimulation zwischen den Spendern unterschiedlich, aber nahm tendenziell eher ab.

Nach dem gewählten Standardprotokoll konnten während der Frühphase der Induktion jedoch keine Zellen entnommen werden, da die Stimulation mit dem Feeder-Cocktail aus bestrahlten PBMZ und EBV-transformierten B-Zellen erfolgte. Aus diesem Grund wurde nach Abschluss der gezeigten Experimente noch ein weiteres Experiment mit einer kurzzeitigeren Kinetik durchgeführt. In diesem Falle wurden die isolierten CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen an Tag 0 mit PHA stimuliert und ab Tag 1 mit IL-2 versorgt. Für die folgenden Western Blots wurden in der Folge täglich 1-5 x 10⁶ Zellen entnommen, lysiert und mittels SDS-PAGE separiert (Abb. 3.26). Dieser Testlauf ergab bereits an Tag 0 eine Expression des Fas Liganden in CD8⁺ T-Zellen, wobei die Expression ab Tag 4 deutlich stärker wurde. In CD4⁺ T-Zellen zeigte sich die erste Expression ab Tag 1; auch hier wird die Expression jedoch erst ab Tag 5 deutlicher. CD63 war in den Tagen 0-5 nur sehr schwach nachweisbar und die Expression nahm in beiden Populationen erst ab den Tagen 3-4 ein wenig zu. LAMP-1 war in beiden

Populationen schon vor Stimulation exprimiert, wobei in CD8⁺ T-Zellen die Expression insbesondere an Tag 1 etwas stärker war, und dann etwas abzunehmen schien. In CD4⁺ T-Zellen erschien sie über die Zeit konstant. Perforin zeigte sich in diesem Experiment in CD4⁺ T-Zellen anfänglich stärker exprimiert als in CD8⁺ T-Zellen, wobei die Expression in CD8⁺ T-Zellen konstant über die Zeit anstieg und in CD4⁺ T-Zellen eher abnahm. Granzym B war in den ersten 5 Tagen in CD4⁺ T-Zellen kaum nachzuweisen; in CD8⁺ T-Zellen begann die Expression etwa ab Tag 4. Beide Formen des Granulysins wurden von CD8⁺ T-Zellen von Tag 0 an exprimiert, wobei die Expression nach 3 Tagen vorerst wieder abnahm. In CD4⁺ T-Zellen war Granulysin in den ersten 5 Tagen nicht nachweisbar.

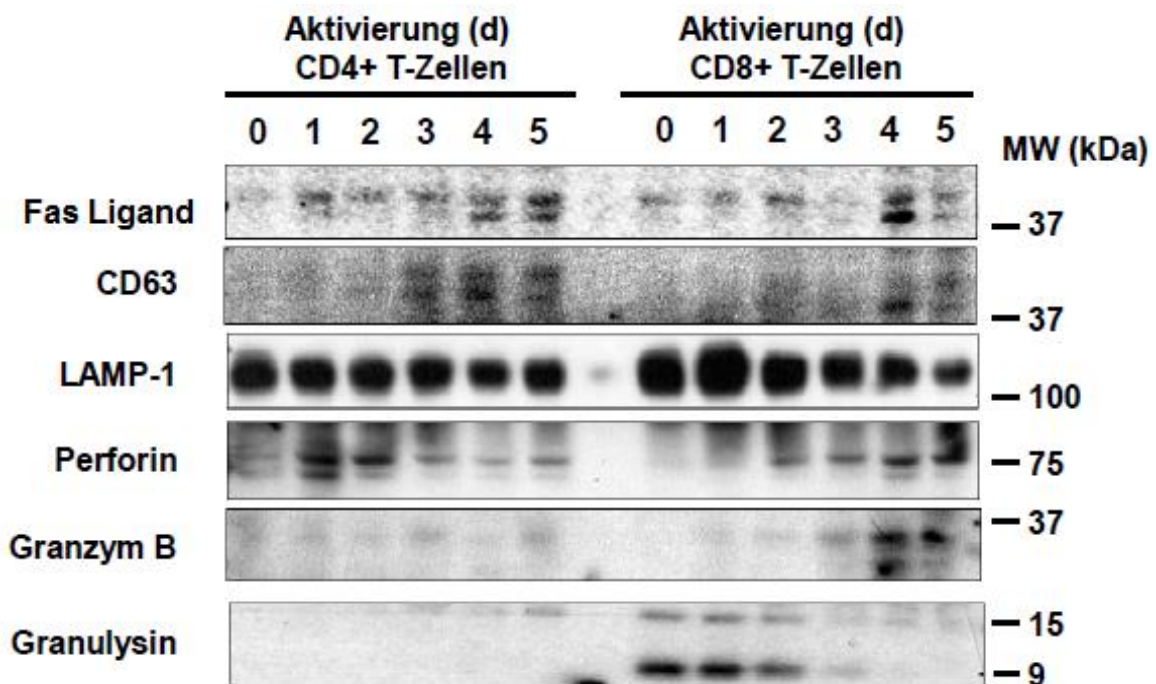


Abb. 3.26 Zytotoxische Effektoren und lysosomale Membranproteine in Gesamt-Lysaten von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Linien (Tag 1 bis 5). Die T-Zellen wurden vor der Stimulation oder nach polyklonaler Aktivierung mit PHA (ab Tag 1 zusätzlich mit IL-2) zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, gewaschen und in NP40-Puffer lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die Blots mit Antikörpern gegen Fas Ligand, CD63, LAMP-1, Perforin, Granzym B und Granulysin gefärbt. Der Kontrast in den Scans des Fas Liganden und von CD63 wurde erhöht, um die sehr schwachen Banden deutlicher hervorzuheben.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, lysosomale Effektorkompartimente aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu isolieren und hinsichtlich ihres Proteingehalts vergleichend zu untersuchen. Hierfür musste zunächst ein im Labor zuvor etabliertes Protokoll adaptiert werden, welches eine Anreicherung und Trennung von Organellen mit zytotoxischen Effektorproteinen ermöglichen sollte. Anschließend sollten die nach der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Fraktionen mittels Western Blot und 2D-DIGE hinsichtlich ihres Proteinenbesatzes analysiert werden. Ferner sollte überprüft werden, ob und wie sich der Proteinbesatz, die Differenzierung und die Reifung von Effektor-Vesikeln nach der Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verändert. Hierfür wurde eine Reihe von Experimenten mit isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, aber auch mit Tumorzelllinien und PHA-Blasten durchgeführt. Die publizierten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe dienten als Referenz für die eigenen Untersuchungen. Sie hatten im Vorfeld ergeben, dass in humanen T-Zellen prinzipiell zwei verschiedene Typen von Effektor-Vesikeln mit unterschiedlichem Besatz an zytotoxischen Effektor-Proteinen existieren (Schmidt et al. 2009, Schmidt et al. 2011a, Schmidt et al. 2011b).

4.1 Anreicherung von sekretorischen Lysosomen aus unterschiedlichen T-Zell-Populationen

Die Anreicherung sekretorischer Lysosomen sollte nach einem in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erarbeiteten Protokoll erfolgen (Schmidt et al. 2009), musste aber nach einigen personellen Veränderungen in der AG neu etabliert werden. Mittels Western Blot sollten die unterschiedlichen Fraktionen hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung überprüft werden, wobei Fas Ligand für die Fraktion 2 und Granzym B oder Perforin für die Fraktion 6 als Marker-Proteine fungierten. In den ersten Experimenten ergab sich jedoch nicht die erwartete Auftrennung der Fraktionen im Dichtegradienten. Zunächst ließen sich anhand der gewählten Markerproteine die Fraktionen nur schlecht voneinander abgrenzen. Auch der mitochondriale Marker COX IV zeigte anfänglich nicht die erwartete und zuvor beschriebene selektive Anreicherung in der fünften Fraktion. Entsprechend wurden im Rahmen einer intensiven Fehlersuche die meisten Materialien, Reagenzien, Trennmedien und Puffer überprüft und ausgetauscht. Des Weiteren wurde die für die anschließende

Auftrennung besonders entscheidende Homogenisierung der expandierten Zellen kritisch geprüft. Unterschiedliche Verfahren wurden letztendlich an in größerer Menge verfügbaren PHA-Blasten getestet. Wir stellten dabei fest, dass die stellenweise unzureichende Trennung der Zellorganellen auf eine uneinheitlich effiziente Homogenisierung der Zellen zurückzuführen war. In insgesamt 8-10 Testdurchläufen mittels Dounce-Glas-Homogenisatoren mit unterschiedlichen Pistillen und Spaltmaßen stellte sich jedoch heraus, dass auch eine zu starke Homogenisierung offensichtlich zu einer mehr oder minder ausgeprägten Zerstörung der Organellen und einer diffusen Separation der entsprechenden Markerproteine im Dichtegradienten führte. Ein Versuch, in dem die Zellen mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, stellte sich ebenfalls als nicht zielführend heraus, da hierbei offensichtlich auch alle subzellulären Strukturen zerstört wurden. Die erfolgreiche Separation der Organellen konnte jedoch mittels Western-Blot-Analyse der oben genannten Marker schließlich nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprachen denen der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Schmidt et al. 2011b).

Ein weiteres Problem im Rahmen der Probenvorbereitung für die 2D-DIGE-Analysen war die in der Regel geringe Proteinmenge in den angereicherten Fraktionen. Die Fraktionen wurden aus dem Dichtegradienten abgenommen und mittels erneuter Ultrazentrifugation getrennt voneinander umgepuffert und anschließend in 2D-Lysepuffer aufgenommen, bevor der Proteingehalt gemessen wurde. So gelang es nur in einigen Versuchen, die erforderliche Minimal-Menge von 50 µg in der Fraktion 2 zu erlangen, um damit die geplanten 2D-DIGE-Analysen durchführen zu können. Diese geringe Proteinmenge reichte aber erwartungsgemäß nicht aus, um die zweidimensional aufgetrennten Proteine für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse zu prozessieren. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ist es leider nicht gelungen, Fraktion-6-Präparationen mit für die 2D-DIGE ausreichenden Proteinmengen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu erhalten. Wie sich herausstellte, konnte im Gegensatz zu den zuvor verwendeten PHA-Blasten aus unseparierten PBMZ nach initialer Lektin-Stimulation und 14-tägiger Expansion aus den MACS-angereicherten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen keine ausreichend große Zellmenge generiert werden. Eine Lösung wäre möglicherweise die Erhöhung der Zellzahl durch längere Expansion (beispielsweise 3-4 Wochen) gewesen, was als Konzept für Anschlussarbeiten in Frage kommt. Unabhängig von der Zellmenge sollten

verschiedene Variationen des Standard-Protokolls die Proteinausbeute verbessern (Abnahme der Fraktionen mit anderen Pipetten, ein weiterer Ultrazentrifugations-Schritt oder unterschiedliches Umpuffern). Deshalb beschränken sich die Ergebnisse im Wesentlichen auf den Vergleich der Fraktion-2-Vesikeln aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und die Analysen zur Reifung zytotoxischer Granula. Im Rahmen von weiteren Untersuchungen soll aufgrund der hier erarbeiteten Ergebnisse mit höheren Zellzahlen gearbeitet werden. Zudem wurde mit einem Homogenisierer von Isobiotec inzwischen eine Alternative zu den bisher verwendeten Dounce-Homogenisatoren gefunden.

4.2 Charakterisierung der individuellen Organellenfraktionen über den Nachweis bekannter Markerproteine mittels Western Blot

4.2.1 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus PHA-Blasten

Da sich aus den zur Verfügung stehenden Leukozyten-Konzentraten nach polyklonaler Aktivierung eine relativ große Anzahl von PHA-Blasten generieren ließ, wurden die ersten Experimente zur Charakterisierung der Organellenfraktionen mit Lysaten von PHA-stimulierten Zellen durchgeführt. Die erfolgreiche Auftrennung der Fraktionen konnte mittels Färbung der Markerproteine im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Im Rahmen der Gelelektrophorese wurden nicht nur die individuellen Fraktionen nach dem Dichtegradienten, sondern auch eine Probe des Gesamtlisates der homogenisierten Zellen (GL) und der angereicherten Organellen nach differentieller Zentrifugation (AO) aufgetrennt. Anhand des Vergleichs der unterschiedlichen Banden im Western Blot konnte eine Anreicherung des Fas Liganden in den Fraktionen 1 und 2 nachgewiesen werden. Die leichten Fraktionen 1 und 2 (8 - 12 % Iodexanol) liegen im Dichtegradienten nahe beieinander. In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe wurde FasL in der Regel in Fraktion 2, in manchen Experimenten allerdings auch in Fraktion 1 nachgewiesen. Granzym B ist als zytotoxisches Effektorprotein laut Vorarbeiten charakteristisches Markerprotein der dichten Granula in Fraktion 6. Die Western Blot-Analysen bestätigen die hohe Abundanz von Granzym B in den schweren Fraktionen und insbesondere in Fraktion 6. LAMP-1 war in Fraktion 2 angereichert, aber zum Teil auch in anderen Fraktionen nachweisbar. Auch dies steht in Einklang mit den Vorarbeiten von Schmidt et al. (2009, 2011a, 2011b). LAMP-1 ist auf verschiedensten lysosomalen Entitäten nachgewiesen worden und nicht

ausschließlich auf sekretorische Lysosomen. Auf der anderen Seite wurde COX IV wie zuvor beschrieben als Indiz für eine ausreichend effiziente Organellen-Separation nahezu ausschließlich in den Fraktionen 4 und insbesondere 5 nachgewiesen (Schmidt et al. 2009).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es gelungen ist, die anfänglich erheblichen Schwierigkeiten im Kontext der Zellseparation erfolgreich zu lösen und letztendlich vergleichbare Ergebnisse zu den zuvor publizierten Befunden mit PHA-Blasten zu erarbeiten.

4.2.2 Charakterisierung der Organellenfraktionen aus leukämischen T-Zell-Linien

Parallel zu den geschilderten Versuchen mit PHA-Blasten wurden auch entsprechende Experimente mit leukämischen T-Zellen durchgeführt. Dabei sollte gleichzeitig überprüft werden, ob und in wieweit sich zytotoxische Effektorvesikel unterschiedlicher leukämischer T-Zellen voneinander unterscheiden. Dazu wurden Proben der angereicherten Zellorganellen mittels Western Blot und 2D-DIGE verglichen. Zunächst wurden die Dichtegradientenfraktionen der vier untersuchten Zelllinien (JE6-1, J16-Rapo, JFL 39.1 und HuT-78) auf das Vorhandensein des mitochondrialen Proteins COX IV in Fraktion 5 zur Beurteilung der erfolgreichen Separation überprüft. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, konnte in den Jurkat-Varianten COX IV in der entsprechenden Fraktion 5 nachgewiesen werden. Die Proben wurden nachfolgend einer 2D-DIGE-Analyse unterzogen, wobei die Fraktionen 2 und 6 aus J16-Rapo und JFL 39.1, sowie aus HuT-78 und JE6-1 miteinander verglichen wurden.

Vergleich J16-Rapo und JFL 39.1

Bei JFL 39.1 handelt es sich um eine stabile hFas-L Transfektante von J16-Rapo (Qian et al. 2005). Die beiden Zelllinien sollten somit in Hinblick auf ihr Gesamt-Proteom sehr ähnlich sein. Der direkte Vergleich diene folglich zur Klärung der Frage, inwiefern eine Überexpression des Fas Liganden das Vorkommen und die Proteinzusammensetzung sekretorischer Lysosomen beeinflusst. Eine 90 - 91%ige Übereinstimmung der Proteinspots in den in Abb. 3.4 und 3.5 gezeigten Gelen deutet an, dass die FasL-Transfektion doch einen recht deutlichen Einfluss auf den Proteingehalt der

individuellen Vesikelpopulationen haben könnte. In den durchgeführten Experimenten scheint der Proteingehalt beider Fraktionen 2 und 6 in den Transfektanten insgesamt etwas geringer als in J16-Rapo.

Vergleich JE6-1 und HuT-78

Im Vergleich der T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat E6-1 und der T-Zell-Lymphom-Linie HuT-78 zeigte sich eine 85-88%ige Übereinstimmung im Proteingehalt der Fraktionen 2 und 6 (Tabelle 3.2). Diese hier zusammengefassten Experimente dokumentieren, dass die Anreicherung beider Vesikel-Populationen auch aus leukämischen T-Zell-Linien durchaus erfolgreich war. Die einzelnen Gradienten-Präparationen unterschieden sich jedoch recht deutlich in der Ausbeute, so dass verlässliche quantitative Aussagen im Rahmen der Etablierungsphase nur für individuelle Experimente zu machen sind. Für eine umfassende statistische Auswertung konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht entsprechend viele technische und biologische Replikate gefahren werden. Bemerkenswert ist, dass JE6-1 eine akute T-Zell-Leukämie-Linie ist und HuT-78 aus einem kutanen T-Zell-Lymphom etabliert wurde. Dennoch sind die isolierten Organellenfraktionen der beiden Zelllinien insgesamt recht ähnlich.

Die Reproduzierbarkeit der Organellen-Präparation ist vielleicht am eindrucksvollsten an den beiden in Abb. 3.7 und 3.8. gezeigten Fraktion-6-Gelen zu sehen. Auch beim Austausch der Farbstoffe (*dye swap*) sind die Muster der Proteinspots insgesamt sehr ähnlich.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass im Vergleich zu den zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten Analysen an PHA-Blasten unterschiedlicher Spender der Proteinbesatz der Vesikel aus den Tumorzelllinien möglicherweise so unterschiedlich ist, wie dies zuvor für leukämische NK-Zellen beschrieben wurde (Schmidt et al. 2008). Eine genauere Analyse der Unterschiede wurde jedoch nicht im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt, sondern wurde Gegenstand einer parallel bearbeiteten Masterarbeit (Poch 2015).

4.3 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Hauptziel dieser Arbeit war es, die sekretorischen Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vergleichend zu untersuchen. Innerhalb der $\alpha\beta$ T-Zellen stellen die CD8⁺ T-Zellen die klassischen zytotoxischen Effektorzellen dar. CD4⁺ T-Zellen haben vor allem immunregulatorische Aufgaben, z.B. über ihre Zytokinfreisetzung. Unter *in vitro* Stimulation können auch CD4⁺ T-Zellen zytotoxische Effektorfunktionen übernehmen (Shen et al. 2006). Es wird diskutiert, dass CD4⁺ ZTL (zytotoxische T-Lymphozyten) zytotoxische Effekte über den FasL und CD8⁺ ZTL (und auch NK-Zellen) eher über Granzyme und Perforin vermitteln (Hahn et al. 1995, Stalder et al. 1994). Doch scheinen auch CD4⁺ ZTL unter bestimmten Stimulationsbedingungen (beispielsweise CD3/CD46) auch vermehrt Granzym B zu exprimieren (Grossman et al. 2004). Da CD4⁺ ZTL nur etwa 2 % der CD4⁺ Gesamtpopulation in peripherem Blut ausmachen, ist noch wenig über deren *in vivo* Relevanz bekannt. Sie scheinen jedoch eine Rolle im Rahmen von chronischen viralen Infektionen zu spielen (Appay et al. 2002). Sekretorische Organellen werden in beiden Zelltypen gebildet und diese degranulieren nach Stimulation (Ochoa et al. 2001). SL von CD8⁺ T-Zellen sind deutlich besser untersucht als ihre Pendanten in CD4⁺ T-Zellen (Lida et al. 2000). Ältere Befunde zeigten überraschenderweise auf mRNA-Ebene kaum Unterschiede in der Expression zytolytischer Proteine (Granulysin, Granzyme, Perforin) zwischen Alloantigen-stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Hidalgo et al. 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nun die Expressionsunterschiede auf Proteinebene untersucht. Die SL der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden über den Fas Liganden, CD63 und LAMP-1 definiert und wie beschrieben von anderen Organellen (z.B. Mitochondrien) separiert (Abb. 3.10). **FasL** als Markerprotein für leichte sekretorische Lysosomen fand sich bei beiden Zelltypen in der Fraktion 2. Dies deckt sich mit früheren Befunden der Arbeitsgruppe, die auf eine ähnliche Speicherung und Freisetzung in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hindeuteten (Lettau et al. 2004, Lettau et al. 2011). Erwartungsgemäß könnte der Fas Ligand nicht nur wie zuvor beschrieben (Hahn et al. 1995, Stalder et al. 1994) in CD4⁺ T-Zellen zytolytische Aktivität bedingen, sondern auch als Transmembranprotein eine Rolle bei der Speicherung und Mobilisierung von Effektorvesikeln in CD8⁺ T-Zellen spielen. **Cathepsin D** ist eine lysosomale Protease und wird häufig unabhängig vom Zelltyp als lysosomales Markerprotein angefärbt bzw. nachgewiesen. In den eigenen Untersuchungen war

Cathepsin D sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen eher in den leichten Fraktionen (um Fraktion 2 herum) nachweisbar. Dies traf im Übrigen auch auf die beiden anderen lysosomalen Marker **LAMP-1** und **CD63** zu. **Perforin** wurde in CD8⁺ T-Zellen in der Fraktion 6 und bei beiden Zellpopulationen in Fraktion 2 nachgewiesen. Klassischerweise wird Perforin eher als Effektor in CD8⁺ T-Zellen genannt, jedoch zeigten verschiedene Untersuchungen, dass auch CD4⁺ T-Zellen unterschiedliche Mengen an Perforin sezernieren können, besonders in Situationen, in denen keine klassischen zytotoxischen Vorgänge vonstattengehen (Voskoboinik et al. 2010, Williams und Engelhard 1997). In unseren Experimenten haben wir isolierte und weitgehend „saubere“ CD4⁺ T-Zell-Populationen verwendet. Entsprechend ist in dieser Population keine „klassische“ CD8⁺-vermittelte Zytotoxizität zu erwarten. Die Proteine aus mutmaßlich vorhandenen CD8⁺ T-Zellen wären bei den bestimmten Reinheiten so gering, dass sie kaum ins Gewicht der Analysen fallen würden. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass aktivierte und expandierte CD4⁺ T-Zellen zytotoxisches Potential aufweisen. Ob diese Zytotoxizität über FasL oder Perforin und Granzyme vermittelt wird, bleibt zu klären. Interessant ist in jedem Fall, dass in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Perforin in CD4⁺ T-Zellen im Wesentlichen in leichteren Vesikeln, nicht aber in dichten Granula detektiert wurde.

Wie erwähnt war Perforin in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in PHA-Blasten im Wesentlichen in Fraktion 6 nachgewiesen worden und wurde mit **Granzym B** sogar als Markerprotein für die schweren/dichten Granula benannt (Schmidt et al. 2011). In isolierten CD4⁺ T-Zellen war insgesamt nur relativ wenig Granzym B nachweisbar. Deutlich mehr Granzym B war in CD8⁺ T-Zellen vorhanden, wo es vorwiegend in Fraktion 6 vorkam. Granzym B ist eine Serinprotease, welche nach Freisetzung in die immunologische Synapse und Aufnahme in die Zielzellen in diesen eine Caspasen-abhängige Apoptose initiiert. Man geht in der Tat davon aus, dass Perforin und Granzym B in den gleichen (dichten) Granula gespeichert werden und nach Ausbildung einer zytotoxischen Synapse zusammen die Zielzelle erreichen. Perforin soll anschließend das Eindringen von Granzym B durch die Plasmamembran ermöglichen oder beschleunigen. Die Befunde zur unterschiedlichen Verteilung von Granzym B und Perforin in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren unerwartet, deuten aber möglicherweise auf verschiedene Regulationsmechanismen hin.

Ähnliche Unterschiede beobachteten wir hinsichtlich der Verteilung von **Granulysin**. Dessen reife (9 kDa) Form war deutlich in Fraktion 6 Vesikeln aus CD8⁺ T-Zellen nachweisbar, jedoch unter gleichen Bedingungen kaum in CD4⁺ T-Zellen, obwohl die nicht prozessierte (15 kDa) Form in beiden Zellpopulationen in etwa gleicher Stärke in der 2. Fraktion detektiert wurde. Die zytotoxische Aktivität von Granulysin entsteht nach posttranslationaler Prozessierung am N- und am C-Terminus, wofür eine Ansäuerung der Granulysin-transportierenden Granula erforderlich ist (Hanson et al. 1999). Somit entsteht aus der 15 kDa Vorform durch Proteolyse das aktive Granulysin (Pena et al. 1997). Die Western Blot- Analysen bestätigten folglich insbesondere für CD8⁺ T-Zellen die Vorbefunde, dass in den leichten Vesikeln eine Reifung stattfinden könnte, bevor das maturierte Protein zur Speicherung in dichten Granula akkumuliert. Interessanterweise deckt sich die Verteilung von Granulysin weitgehend mit der von Perforin. Es wurde in diesem Kontext berichtet, dass Perforin die lytische Aktivität von Granulysin positiv beeinflusst (Walch et al. 2007). Da Perforin in dichten Granula von CD4⁺ T-Zellen kaum nachzuweisen war (Abb. 3.10), scheint es schlüssig, dass in dieser Fraktion auch nur sehr wenig reifes, aktives Granulysin vorhanden ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sowohl aus CD4⁺ als auch aus CD8⁺ T-Zellen unterschiedliche lysosomale Kompartimente isoliert werden konnten, die den zuvor beschriebenen FasL-assoziierten sekretorischen Lysosomen und den Granzym B-assoziierten dichten Granula entsprechen. Auf Proteinebene gibt es in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aber durchaus deutliche Unterschiede in der Expression bzw. Verteilung der zytolytischen Effektorproteine. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde sprechen somit gegen das ursprüngliche Modell für sekretorische Lysosomen von Griffiths und Kollegen, nach dem alle zytotoxischen Effektoren (insbesondere FasL, Perforin und Granzym B) in einem gemeinsamen Kompartiment gespeichert werden (Blott et al. 2001).

Um einen tieferen Einblick in die Unterschiede der Vesikel aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit weitere 2D-DIGE-Experimente durchgeführt. Tabelle 3.4 fasst das experimentelle Setup dieser Versuche zusammen. MACS-separierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von 6 Spendern wurden für 14 Tage expandiert, homogenisiert und subzellulär fraktioniert. Leider war – wie erwähnt – in den meisten Fällen die Proteinmenge in den isolierten dichten Granula der Fraktion 6 nicht ausreichend, weshalb ich mich auf den Vergleich der

Fraktion-2-Isolate beschränken musste. Auf die beiden ersten Experimente mit Proben der Spender 1 und 2 wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Insgesamt waren bei diesen Proben erstaunlich wenig Spots detektiert worden und der durchgeführte Farbwechsel (*dye swap*) zeigte, dass die für die eine oder andere Zellpopulation verwendeten Fluorophore keinen wesentlichen Unterschied ausmachten. In den restlichen Experimenten wurden daher jeweils die Fraktion-2-Vesikel aus CD4⁺ T-Zellen mit Cy5 und aus CD8⁺ T-Zellen mit Cy3 markiert.

Anhand der Übersichten in Abb. 3.11 bis 3.14 ist eindrucksvoll zu erkennen, dass es sich bei den isolierten Fraktion-2-Vesikeln in der Tat um stabile lysosomale Kompartimente handelt. Zum einen ist die Proteinverteilung nach der Auftrennung in allen vier Experimenten sehr ähnlich, zum anderen sind bei 87-95 % der detektierten Proteine auch die Proteinmengen individueller Spots insgesamt sehr ähnlich. Ein weiteres Indiz für die Homogenität des Kompartimentes, auch in unterschiedlichen Populationen, ist die Verteilung in der DIA-Statistik (Abb. 3.11 bis 3.14 D). Die entsprechenden Histogramme für Spender 3, 5 und 6 aus der DIA-Software sind in Abb. 3.15 noch einmal separat dargestellt. Die in diesen Experimenten erhobenen Daten bildeten die Grundlage für die folgende statistische Analyse.

Die Varianzanalyse (t-Test) ergab einige Proteine, die in CD8⁺ T-Zellen in ihrer Abundanz erhöht waren, also ein durchschnittliches Volumenverhältnis von $> 1,5$ aufwiesen, und bei allen drei Spendern mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit ein ähnliches differentielles Profil aufwiesen. Fünf dieser Proteine konnten durch Zuordnung der entsprechenden Spots in einem zuvor kompilierten Mastergel benannt werden. Interessanterweise lassen sich vier dieser Proteine in ihrer Funktion dem Zytoskelett zuweisen. Beispielsweise handelt es sich bei dem Protein Moesin (Verhältnis CD4/CD8 +2,36) um ein Protein der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-Familie, welche als Bindeglieder zwischen Transmembran-Proteinen und dem Aktin-Zytoskelett eine Rolle spielen (Mangeat et al. 1999, Tsukita und Yonemura 1999, Bretscher et al. 2000). Außerdem spielt Moesin auch eine wichtige Rolle bei der Bildung der immunologischen Synapse (Delon et al. 2001, Faure et al. 2004). Somit könnte es am Transport der lytischen Granula zur IS beteiligt sein. Eine unterschiedliche Abundanz in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen könnte darauf hinweisen, dass unterschiedliche Zytoskelett-Proteine am Transport der Vesikel zur immunologischen Synapse beteiligt sein könnten. Möglicherweise unterscheiden sich also nicht nur die

Fraktion-2- oder Fraktion-6-assoziierten Zytoskelett-Proteine, sondern es gibt auch quantitative Unterschiede bezüglich der Verteilung der Fraktion-2-assoziierten Proteine in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Auf der anderen Seite konnten auch 13 Proteine benannt werden, die über alle Experimente hinweg leicht vermehrt in Fraktion 2 aus CD4⁺ T-Zellen vorkamen. Deren Funktionen ließen sich grob der Biosynthese und dem Metabolismus in der Zelle zuordnen. Es handelt sich um Proteine, die eine dynamische Rolle in der Zellentwicklung, im Zellhaushalt und im Transport einnehmen. Nur ein Protein (Septin-9 delta, #558) wäre dem Zytoskelett zuzuordnen. Beispielsweise war Copine III (#340) in CD4⁺ T-Zellen um das 1,75-fache erhöht vorhanden. Copine III wird über verschiedene Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle beim Membranauf- und abbau, bei der Zellteilung und beim Zellwachstum zugeschrieben (Tomsig und Creutz 2002). Subzellulär kommt es in Melanosomen, Exosomen und Thrombozytengranula vor (Schmidt et al. 2011b). In Fraktion 2 aus CD4⁺ T-Zellen waren zudem vermehrt Isoformen von Enzymen der Pyruvatkinase-Familie detektierbar. Diese haben eine essentielle Funktion im Zell-Metabolismus, da die Pyruvatkinase das letzte der drei Schlüsselenzyme der Glykolyse darstellt. Enolase I ist ebenfalls ein Enzym der Glykolyse; durch Wasserabspaltung induziert es die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat (Horn 2009). Dieses Enzym wurde ebenfalls vermehrt in der Fraktion 2 aus CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die hier erarbeiteten Befunde in der Tat die Hypothese unterstützen, dass reife aktivierte T-Zellen unterschiedlicher Phänotypen (hier CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) insgesamt ähnliche lysosomale Kompartimente mit einem vergleichbaren Proteinbesatz aufweisen. Dennoch gibt es über verschiedene Spender hinweg Unterschiede im Proteinbesatz, die einerseits auf eine unterschiedliche Assoziation mit dem Zytoskelett, andererseits auf unterschiedliche metabolische Aktivität hindeuten.

4.4 Reifung zytotoxischer Effektor-Kompartimente

4.4.1 PHA-Blasten

In dieser Arbeit wurden ruhende T-Zellen polyklonal mittels Zugabe des mitogenen Pflanzenlektins Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert, um die Ausbildung und Reifung

der sekretorischen Effektor-Kompartimente zu beobachten. Ruhende T-Zellen sind zunächst klein und rund und verfügen über relativ wenig Zytoplasma und Zellorganellen. Nach Aktivierung transformieren sie während weniger Stunden oder Tage zu sogenannten „Blasten“. Das Zytoplasma dehnt sich aus, es kommt zur Zellteilung und sekretorische Lysosomen reifen heran. Wenn eine derart differenzierte Effektorzelle erneut über den TZR stimuliert wird oder z.B. eine Zielzelle erkennt, kommt es kontextabhängig zur Degranulation und Freisetzung der zytolytischen Granula oder zu erneuter Aktivierung und Expansion.

Im Rahmen der Lysosomenreifung erfolgt eine Akkumulation lysosomaler Proteine (z.B. LAMP-1) in elektronendichten Strukturen. Die Biogenese und Speicherung zytotoxischer oder zytolytischer Proteine, deren Freisetzung und Wirkungsweise wird nach wie vor zum Teil widersprüchlich diskutiert. Für zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) der Maus konnte eine zytolytische Aktivität bereits 36-42 Stunden nach Primär-Aktivierung nachgewiesen werden (Shen et al. 2006), bei humanen CD8⁺ T-Zellen dagegen wurde das Maximum erst nach 10 Tagen erreicht (Stinchcombe et al. 2000). Die initialen Experimente mit PHA-Blasten zeigen nach Aktivierung mit PHA und Expansion unter Zugabe von IL-2, dass Fas Ligand und Perforin wie erwartet erst nach Stimulation exprimiert werden. In frisch isolierten bzw. ruhenden T-Zellen sind die Effektorproteine marginal nachweisbar und es scheint kaum zytotoxische Aktivität vorhanden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass unter bestimmten Stimulationsbedingungen individuelle Lymphozytenpopulationen möglicherweise unterschiedlich expandieren. So wäre es denkbar, dass sich CD8⁺ T-Zellen nach PHA-Stimulation unter Zugabe von IL-2 schneller vermehren als CD4⁺ T-Zellen, was einen Einfluss auf die Expression der zytolytischen Moleküle in der Gesamtpopulation haben könnte. Um diese unterschiedlichen Eigenschaften in der Gesamtpopulation auszublenden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit MACS-separierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen untersucht.

4.4.2 In vitro expandierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Linien

Die einzelnen Experimente mit isolierten Zellpopulationen zeigten teils sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dennoch lässt sich eine Tendenz feststellen. Die mit sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) assoziierten Proteine (Fas Ligand, LAMP-1,

CD63) wurden von CD4⁺ T-Zellen erst nach Stimulation vermehrt gebildet. Bei CD8⁺ T-Zellen war bereits vor Stimulation (Tag 0) eine gewisse Menge an Protein nachweisbar. Ein Teil der CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes scheint also bereits im Rahmen der Differenzierung und Entlassung in die Zirkulation über einen Besatz mit lysosomalen Effektorproteinen zu verfügen. Allerdings verstärkt sich diese Expression auch hier nach Stimulation.

Bezüglich der für Fraktion 6 charakteristischen Proteine Perforin, Granzym B, Granulysin und Cathepsin D ist ebenfalls an Tag 0 eine Basis-Expression in CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Beide Zellpopulationen erreichen aber nach Stimulation und Differenzierung unter IL-2 ein deutlich erhöhtes und auch insgesamt ähnliches Expressionsmuster. In CD4⁺ T-Zellen erfolgt der Anstieg lediglich mit einer gewissen Verzögerung, beispielsweise sind entsprechende Mengen von Granulysin erst 10 Tage später nachweisbar. Gleichermaßen war die Expression des mitochondrialen Markers COX IV in beiden Subpopulationen unerwartet variabel. Dies geht möglicherweise mit einer Stoffwechsellumstellung und einem geänderten Energiebedarf im Rahmen der Differenzierung oder Stimulation einher.

Die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass die Perforinlevel in CD8⁺ T-Zellen vor Stimulation am höchsten seien (Ortaldo et al. 1995), ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Perforin wies nach Stimulation ein ähnliches Expressionsmuster in beiden Zellpopulationen auf. In beiden Fällen deutet sich eine relative Abnahme der Perforins über die Zeit an, was aber möglicherweise nur auf die geänderte Stoffwechselsituation zurückzuführen ist. Im Falle von Granulysin zeigten CD8⁺ T-Zellen bereits ohne Stimulation eine deutliche Expression, die nach Tag 10 noch weiter zunahm. Bei CD4⁺ T-Zellen scheint dieser anfängliche Granulysin-Speicher nicht vorhanden, die Synthese erfolgt erst ab Tag 10 nach Primärstimulation. In einigen Fällen stellte sich nach den geschilderten Ergebnissen die Frage, ob die entscheidenden Ereignisse der Lysosomen-Reifung zu Effektor-Vesikeln bereits in den ersten Tagen nach Stimulation erfolgen könnten. Aus diesem Grund wurde in einem abschließenden Pilotexperiment eine andere Kinetik gefahren und die Expression der genannten Proteine (FasL, CD63, LAMP-1, Perforin, Granzym B und Granulysin) über einen Zeitraum von 5 Tagen ab Primärstimulation untersucht. In der Tat konnten bis auf LAMP-1 alle Proteine in den ersten beiden Tagen im Western Blot nur ganz schwach nachgewiesen werden. In beiden Zellpopulationen konnte eine deutliche Fas Ligand-Expression erst ab Tag 4

beobachtet werden. Im Gegensatz zu den zuvor geschilderten Ergebnissen, konnte Perforin ebenfalls in CD4⁺ T-Zellen zu frühen Zeitpunkten (Tag 1 und 2) nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen ergaben hingegen, dass die Perforin-Expression in unstimulierten CD8⁺ T-Zellen am ausgeprägtesten ist und im Verlauf einer weiteren Stimulation stetig abnimmt (Schmidt 2009, Ortaldo et al. 1995). Damit scheinen CD8⁺ T-Zellen über einen Pool an Perforin zu verfügen, der kurz nach Stimulation der Zellen ausgeschüttet wird. Dies scheint jedoch, ausgehend von den Ergebnissen des Pilotexperimentes, auch bei CD4⁺ T-Zellen der Fall zu sein. Bereits nach 1 - 2 Tagen lässt sich hier eine Expression erkennen. Dass das Ausgangsniveau der Perforinexpression auch nach 18 Tagen nicht wieder erreicht wird (Schmidt 2009), konnte zumindest in einigen der Versuche nicht bestätigt werden. Die Perforin-Expression nach 14 Tagen zeigt sich hier sehr variabel und hängt möglicherweise ebenfalls mit einem unterschiedlichen Stoffwechsel der Zellen zusammen.

Granzym B war in CD4⁺ T-Zellen innerhalb der ersten 5 Tage nicht nachweisbar und konnte auch in CD8⁺ T-Zellen erst nach 4 Tagen detektiert werden. Erstaunlich war, dass in dem dargestellten Experiment Granulysin in CD4⁺ T-Zellen innerhalb der ersten 5 Tage nicht nachweisbar war, wohingegen klare Banden in frisch isolierten oder für 1 - 2 Tage stimulierten CD8⁺ T-Zellen nachweisbar waren. Nach den vorherigen Untersuchungen hatte sich Granulysin ähnlich wie Perforin verhalten, war also in CD8⁺ T-Zellen zunächst sehr stark exprimiert und wurde vermutlich nach primärer Degranulation nur noch reduziert ausgeschüttet (Schmidt et al. 2009). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich ein ähnliches Bild: Granulysin war bis ca. Tag 14 in CD4⁺ T-Zellen kaum nachweisbar. CD8⁺ T-Zellen exprimierten bereits vor der Stimulation und während der Expansion Granulysin; allerdings stieg auch hier das Expressionslevel um Tag 14 stark an. Über die Verteilung von Granulysin auf verschiedene Vesikeltypen kann anhand der Western Blots keine Aussage getroffen werden. Im Gegensatz zu der unreifen Form, die in zytolytischen Granula gespeichert werden soll, soll die reife Form konstitutiv sezerniert werden (Hanson et al. 1999).

Abschließend deuten diese Ergebnisse an, dass die Expression der untersuchten Proteine in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen variabel und von vielen verschiedenen Faktoren abhängig zu sein scheint. Eine Tendenz zu einer bereits im Rahmen der initialen Differenzierung angelegten lysosomalen Speicherung von Effektorproteinen

in CD8⁺ T-Zellen ist ebenso erkennbar, genauso wie die vermehrte Neusynthese des Arsenalens in CD4⁺ T-Zellen.

Die Experimente dieser Arbeit zeigen zusammengefasst, dass die Proteinzusammensetzung und die Mobilisierung der verschiedenen sekretorischen Vesikel insgesamt recht ähnlich sind. Neben einer zu erwartenden Spender-abhängigen Heterogenität (z.B. im Besatz mit verschiedenen MHC-Molekülen) weisen sogar unterschiedliche Zellpopulationen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nur geringe Unterschiede in der Protein-Abundanz auf. Die lysosomalen Kompartimente sind offensichtlich insgesamt sehr ähnlich, weisen aber einige Unterschiede hinsichtlich der Assoziation mit Zytoskelett-Proteinen und auch mit verschiedenen Stoffwechsel-Enzymen auf. Darüber hinaus scheint auch die Reifung und Ausprägung der zytotoxischen Vesikel bei den untersuchten Zellpopulationen unterschiedlich zu sein.

Die vorgelegten Ergebnisse tragen somit als weitere Puzzleteile zur Aufklärung der Speicherung und Mobilisierung von zytotoxischen Effektororganellen und -proteinen bei. Der initiale Befund, dass unterschiedliche leukämische T-Zellen offensichtlich nur eine relativ geringe Menge an zytotoxischen Effektoren speichern, wurde inzwischen im Rahmen einer Masterarbeit bestätigt. Die beschriebenen Befunde zu Lysosomen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen könnten zudem zum besseren Verständnis von lysosomalen Speicherkrankheiten beitragen, bei denen beispielsweise eine partielle oder komplette Immundefizienz auf Ebene der zytotoxischen T- und NK-Zellen mit dem Entstehen von typischen Riesenlysosomen assoziiert ist. Bei solchen Krankheitsbildern wurden bisher vermehrt die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen untersucht, obwohl davon auszugehen ist, dass auch CD4⁺ T-Zellen lysosomale Transportstörungen aufweisen.

Die interessanteste Perspektive der Untersuchungen der beiden Typen von Effektor-Vesikeln scheint jedoch, dass sie (wie auch neue Befunde der Arbeitsgruppe bestätigen) mit unterschiedlichen Signalen mobilisiert werden könnten. Wenn man verstehen würde, unter welchen Bedingungen welche Vesikel wie mobilisiert werden, könnte man dies gezielt zur Therapie von Infektions- oder Tumorerkrankungen einsetzen. Eine Modulation des spezifischen TZR-Signales im Sinne einer direkten Ko-Stimulation oder der Inhibition eines negativen (Checkpoint) Signales ist heute das A und O der Immuntherapie.

5. Zusammenfassung

T-Zellen unterliegen einem umfangreichen Selektionsprozess und differenzieren sich in die Untergruppen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) zerstören von Krankheitserregern befallene Zellen über die Freisetzung zytolytischer Effektorproteine. T-Helferzellen (CD4⁺ T-Zellen) steuern über Zytokin-Produktion die Differenzierung anderer Zellen des Immunsystems und können unter bestimmten Stimulationsbedingungen ebenfalls zytotoxisches Potential über lytische Effektorproteine entwickeln.

Sekretorische Lysosomen sind Zellorganellen und verbinden die typisch abbauende, hydrolytische Funktion der Lysosomen mit einer sekretorischen Komponente und stellen somit spezialisierte bifunktionale Organellen dar. Sekretorische und konventionelle Lysosomen unterscheiden sich wesentlich im Besatz ihrer Transport- und Effektorproteine. Die schnelle und gerichtete Freisetzung der Effektorproteine zeichnet im Besonderen sekretorische Lysosomen aus und gewährleistet so die Eliminierung spezifisch erkannter Zielzellen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der Proteinbeladung ihrer lysosomalen Effektorkompartimente unterscheiden.

Um den Proteinbesatz sekretorischer Lysosomen zu untersuchen, wurde ein im Labor etabliertes Verfahren adaptiert.

Die Granula wurden zunächst durch differentielle und Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Die erhaltenen separierten Organellen aus den unterschiedlichen Fraktionen konnten nachfolgend anhand von Markerproteinen charakterisiert und unterschiedlichen lysosomalen Spezies zugeordnet werden. Anschliessend wurden die erhaltenen Fraktionen durch eine quantitative Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) untersucht.

Zunächst wurden Zellorganellen von mit Phytohämagglutinin stimulierten Leukozyten und anschließend von leukämischen Zelllinien angereichert und analysiert. Nachdem Western Blot-Untersuchungen eine erfolgreiche Trennung der Organellen bestätigten, wurde das Proteom der Organellenfraktionen aus unterschiedlichen leukämischen Zelllinien mittels 2D-DIGE verglichen. Hierbei zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit

der Organellen-Präparation und der Proteinbesatz der Organellenfraktionen unterschiedlicher leukämischer Zelllinien erschien recht ähnlich.

Die Untersuchung der separierten Organellen aus unter gleichen Bedingungen expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestätigte erneut, dass das ursprünglich postulierte Modell eines gemeinsamen Kompartimentes für alle zytotoxischen Effektoren möglicherweise zu stark vereinfacht ist. Die beiden physikalisch separierten Fraktionen 2 und 6 wiesen die zuvor beobachteten Unterschiede in der Proteinverteilung auf. Gleichzeitig unterstützen die vorgelegten Ergebnisse die Hypothese, dass aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen insgesamt sehr ähnliche lysosomale Kompartimente mit vergleichbarem Proteinbesatz aufweisen. Es zeigten sich allerdings auch einige über mehrere Spender reproduzierbare Unterschiede, die auf eine unterschiedliche Mobilisierung der Vesikel sowie eine unterschiedliche metabolische Aktivität der beiden Zellpopulationen hindeuten.

Ferner wurde die Reifung zytotoxischer Effektor-Kompartimente bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen über einen Stimulationszeitraum von 16 Tagen beobachtet. Hier zeigte sich eine sehr variable Expression, die von vielen verschiedenen Faktoren abhängig zu sein scheint. Es wurde aber eine Tendenz zu bereits im Vorfeld gespeicherten lysosomalen Effektorproteinen in CD8⁺ T-Zellen und zu erst nach Stimulation vermehrt gebildeten Proteinen in CD4⁺ T-Zellen deutlich.

6. Literaturverzeichnis

- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G (2004) First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod*, 10: 55-63.
- Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol*, 137: 825834.
- Agarraberes FA, Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*, 114: 2491-2499.
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*, 294: 15-22.
- Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, Opas M, Bleackley RC, Michalak M (1998) Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*, 37: 1038610394.
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael A, Cooper D, Rowland-Jones S, Kelleher AD (2002) Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol*, 168: 5954-5958.
- Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J (1999) Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*, 10: 585-594.
- Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo M, Jaju M, Lieberman J (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*, 276: 43285-43293.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol. Methods*, 281: 65-78.
- Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci*, 114: 2405-2416.
- Blott EJ, Griffiths GM (2002) Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 122-131.
- Bossi G, Griffiths GM (1999) Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*, 5: 90 - 96.
- Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: 113-143.
- Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM, Luzio JP (1997) Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are reformed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci*, 110: 202-2040.
- Bunbury A, Potalicchio I, Maitra R, Santambrogio L (2009) Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. *FASEB J*, 23: 164-171.

Burkhardt JK, Hester S, Lapham CK, Argon Y (1990) The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J. Cell Biol*, 111: 2327-2340.

Carlsson SR, Fukuda M (1989) Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem*, 264: 20526-20531.

Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT, Watzl C (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, 122: 1411-1418.

Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273: 501-503.

Delon J, Kaibuchi K, Germain RN (2001) Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*, 15: 691-701.

Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM (2005) Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol*, 174: 5243-5248.

Ebsen H, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O (2015) Subcellular localization and activation of ADAM proteases in the context of FasL shedding in T lymphocytes. *Mol Immunol*, 65: 416-428.

Eskelinen EL (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*, 27: 495-502.

Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, Delon J (2004) ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol*, 5: 272-279.

Feng L, Seymour AB, Jiang S, To A, Peden AA, Novak EK, Zhen L, Rusiniak ME, Eicher EM, Robinson MS, Gorin MB, Swank RT (1999) The β 3A 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*, 8: 323-330.

Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW (2007) Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol*, 178: 1498-1504.

Frangmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L (2005) Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod*, 11: 35-41.

Griffiths GM, Isaaz S (1993) Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J. Cell Biol*, 120: 885-896.

Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ (2004) Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104: 2840-2848.

Hahn S, Gehri R, Erb P (1995) Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev*, 146: 57-79.

- Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM (1999) Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol*, 36: 413-422.
- He JS, Ostergaard HL (2007) CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol*, 179: 2339-2348.
- Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Halloran PF (2008) The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4(+) CTL, CD8(+) CTL and NK cells. *Am J Transplant*, 8: 627-636.
- Horn F (2009) *Biochemie des Menschen*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 82-88.
- Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res*, 301: 85-99.
- Jolly C, Sattentau QJ (2007) Regulated secretion from CD4+ T cells. *Trends Immunol*, 28: 474-481.
- Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW, Holcombe RF (1996) Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP-1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*, 171: 10-19.
- Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A, Hanson DA, Kluck RM, Hitoshi Y, Johnson DE, Froelich CJ, Thompson CB, Newmeyer DD, Anel A, Clayberger C, Krensky AM (2001) A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol*, 167: 350-356.
- Kassahn D, Nachbur U, Conus S, Micheau O, Schneider P, Simon HU, Brunner T (2009) Distinct requirements for activation-induced cell surface expression of preformed Fas/CD95 ligand and cytolytic granule markers in T cells. *Cell Death Differ*, 16: 115-124.
- Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J (2005) Perforin triggers a plasma membranerepair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23: 249-262.
- Kessler B, Hudrisier D, Schroeter M, Tschopp J, Cerottini JC, Luescher IF (1998) 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*, 161: 6939-6946.
- Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJ, Stoorvogel W, Geuze HJ (2001) Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol*, 155: 53-63.
- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D (1991) Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 328-338.
- Kolset SO, Prydz K, Pejler G (2004) Intracellular proteoglycans. *Biochem J*, 379: 217-227.

- Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U (2007) Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol*, 8: 9.
- Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O (2004) Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal Transduction*, 5-6: 206-211.
- Lettau M, Qian J, Linkermann A, Larose L, Latreille M, Kabelitz D, Janssen O (2006) The adapter protein Nck interacts with FasLigand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 103: 5911-5916.
- Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, Janssen O (2011) Insights in the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *European Journal of Cell Biology*, 90: 465-466.
- Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O (2007) Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*, 108: 10-19.
- Lettau M, Kabelitz D, Janssen O (2015) Lysosome-related effector vesicles in T lymphocytes and NK cells. *Scand J Immunol*, 82: 235-243.
- Lida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H, Kominami E, Fujisawa T, Saito T (2000) Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 165: 5062-5068.
- Liu CC, Walsh CM, Young JD (1995) Perforin: structure and function. *Immunol Today*, 16: 194-201.
- Liu CC, Young LH, Young JD (1996) Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *N Engl J Med*, 335: 1651-1659.
- Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9): 1515-1524.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 11: 428-442.
- Majeski AE, Dice JF (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2435-2444.
- Mangeat P, Roy C, Martin M (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol*, 9: 187-192.
- Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M (1997) Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 114: 207-217.
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P, Larrad L (2004) The human melanoma cell line MeJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res*, 295: 315-329.
- Masson D, Peters PJ, Geuze HJ, Borst J, Tschopp J (1990) Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry*, 29: 11229-11235.
- McKechnie NM, King BC, Fletcher E, Braun G (2006) Fas-ligand is stored in secretory lysosomes of ocular barrier epithelia and released with microvesicles. *Exp Eye Res*, 83: 304-314.

- McNicol A, Israels SJ (1999) Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*, 95: 1-18.
- Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC (1991) CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 266: 3239-3245.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395: 82-86.
- Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J (1999) Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolor flow cytometric method. *Clin Exp Immunol*, 115: 393-396.
- Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC (2000) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*, 103: 491-500.
- Murphy KM, Travers P, Walport M (2009) *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., Springer Spektrum, Heidelberg
- Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Sarno EN, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL (2001) T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med*, 7: 174-179.
- Orlow SJ (1995) Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*, 105: 3-7.
- Ortaldo JR, Wiltrout TA, Sayers TJ, Yagita H, Winkler-Pickett RT (1995) Characterization of a non-granule associated pore-forming protein in agranular lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 57: 897-903.
- Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA, Susin SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, Anel A (2001) A role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol*, 167: 1222-1229.
- Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM (1997) Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol*, 158: 2680-2688.
- Peters PJ, Geuze HJ, Van der Donk HA, Slot JW, Griffith JM, Stam NJ, Clevers HC, Borst J (1989) Molecules relevant for T cell target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 19: 1469-1475.
- Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ (1991) Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature*, 349: 669-676.
- Poch T (2015) Charakterisierung sekretorischer Lysosomen in humanen leukämischen T-Zell-Linien, Masterarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Kiel.
- Pols MS, Klumperman J (2008) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*, 315: 1584-1592.

- Qian J, Lettau M, Podda G, Janssen O (2005) FasL associated factors and their potential role in the regulation of FasL expression. *Signal transduction*, 4: 195-201.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol*, 152: 809-824.
- Raposo G, Fevrier B, Stoorvogel W, Marks MS (2002) Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct Funct*, 27: 443-456.
- Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Watzl C, Kabelitz D, Leippe M, Janssen O (2008) 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics*, 8: 2911-2925.
- Schmidt H (2009) Charakterisierung sekretorischer Lysosomen aus humanen T- und NK-Zellen, Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Kiel.
- Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Lucius R, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O (2009) Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunology*, 10: 41.
- Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Lucius R, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O (2011a) Effector granules in human T lymphocytes: proteomic evidence for two distinct species of cytotoxic effector vesicles. *Journal of proteome research*, 10: 1603-1620.
- Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Lucius R, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O (2011b) Effector granules in human T lymphocytes: the luminal proteome of secretory lysosomes from human T cells. *Cell Commun Signal*, 9: 4.
- Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S (2006) 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*, 80: 827-837.
- Stalder T, Hahn S, Erb P (1994) Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 152: 1127-1133.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282: 121-125.
- Stevens RL, Otsu K, Weis JH, Tantravahi RV, Austen KF, Henkart PA, Galli MC, Reynolds CW (1987) 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*, 139: 863-868.
- Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM (2000) Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. *Traffic*, 1: 435-444.
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM (2001) The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*, 15: 751-761.

- Stinchcombe JC, Bossi G, Griffiths GM (2004) Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science*, 305: 55-59.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75: 1169-1178.
- Sun Q, Burton RL, Lucas KG (2002) Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood*, 99: 3302-3309.
- Susskind B, Shornick MD, Lannotti MR, Duffy B, Mehrotra PT, Siegel JP, Mohanakumar T (1996). Cytolytic effector mechanisms of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Hum Immunol*, 45: 64-75.
- Tomsig JL, Creutz CE (2002) Copines: a ubiquitous family of Ca (2+)-dependent phospholipid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.*, 59(9): 1467-1477.
- Tsukita S, Yonemura S (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem*, 274: 34507-34510.
- Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, Trapani JA (2005) Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues. *J Biol Chem*, 280: 8426-8434.
- Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.*, 235: 35-54.
- Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner CA, Groscurth P, Ziegler U (2007) Perforin enhances the granulysin-induced lysis of *Listeria innocua* in human dendritic cells. *BMC Immunol*, 8: 14.
- Williams NS, Engelhard VH (1997) Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. *J Immunol*, 159: 2091-2099.
- Young JD, Liu CC, Persechini PM (1988) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated killing. *Braz J Med Biol Res*, 21: 1145-1153.

Tagungsbeiträge

Janssen O., Drews L., Poch T., Ebsen, H, Schmidt H., Kabelitz D., Lettau M. Two distinct species of lysosome-related cytotoxic effector vesicles in activated human T cells. 4th European Congress of Immunology, 06-09 September 2015 - Vienna, Austria

Janssen O., Drews L., Poch T., Lettau M. Biochemical and proteomic evidence for distinct species of lysosome-related cytotoxic effector vesicles in activated human T cells. 19th Joint Meeting Signal Transduction, 02-04 November 2015 – Weimar, Germany

Drews L., Lettau M., Janssen O. Secretory effector vesicles in human T-cell populations: Initial comparison of secretory effector vesicles from activated human CD4+ and CD8+ T cells. Poster Presentation. Annual Meeting of the German Society for Immunology 27-30 September 2016 – Hamburg/Germany

Lettau M., Armbrust F., Poch T., Drews L., Janssen O. Secretory effector vesicles in human T-cell populations: Flow cytometric analysis of co-localization and differential mobilization of effector proteins. Annual Meeting of the German Society for Immunology 27-30 September 2016 – Hamburg/Germany

Lettau M., Armbrust F., Poch T., Drews L., Janssen O. Secretory granules in human T-cell populations: Analysis of co-localization and differential mobilization of cytotoxic effector proteins. 20th Joint Meeting Signal Transduction, 09-11 November 2016 – Weimar, Germany

Drews L., Lettau M., Janssen O. Initial comparison of secretory effector vesicles from activated human CD4+ and CD8+ T cells. 20th Joint Meeting Signal Transduction, 09-11 November 2016 – Weimar, Germany

Veröffentlichung

Lettau M., Armbrust F., Dohmen K., Drews L., Poch T., Kabelitz D., Janssen O (2018) Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human T cells. *International Immunology*.

Danksagung

Für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit am Institut für Immunologie des UKSH Campus Kiel durchzuführen, möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz bedanken.

Herrn Professor Dr. Ottmar Janßen danke ich sehr herzlich, mir dieses interessante Thema und die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe anvertraut zu haben. Ebenso danke ich ihm für die stets hervorragende Betreuung, die Geduld und Unterstützung bei der Durchführung, wie auch bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ich möchte ebenso allen Mitarbeitern der AG Janßen und des Instituts für Immunologie für ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit danken. Das Arbeitsklima im Labor war stets angenehm und bereichernd.

Im Speziellen möchte ich PD Dr. Marcus Lettau für seine fachkundige Unterstützung während der experimentellen Phase, aber auch für seine hilfreichen Korrekturen meiner Arbeit danken.

Ein großer Dank gilt auch Melanie Nebendahl für die hervorragende Einarbeitung in den Laborbetrieb und die stets angenehme Atmosphäre.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt hat. Im Besonderen danke ich Maximilian Steinberger für seine professionelle Unterstützung bei der Erstellung der Grafiken.

Meinem Kommilitonen Patrik Theodor Nerdal danke ich herzlich für die zeitaufwendige Korrektur meiner Arbeit. Auch Florian Gössele spreche ich meinen Dank für die optische Korrektur und die Fehlersuche aus.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Drews
Vorname Lisann Marie
Anschrift Fruchttallee 13
20259 Hamburg
Geburtsdaten: Hamburg, 06.12.1989
Familienstand ledig

Akademische Ausbildung

2000 – 2009 Walddorfer Gymnasium, Hamburg, Abitur 2009
2010 – 2012 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Studiengang Medizin, vorklinisches Studium
2012 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
2013 – heute Medizinstudium, klinischer Teil, am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
2013 – 2014 Auslandssemester an der Zhejiang University in Hangzhou, China, in Humanmedizin und Chinesisch
2014 – 2015 Anerkannte ärztliche Weiterbildung im Bereich der ayurvedischen Medizin an der Europäischen Akademie für Ayurveda in Birstein und Berlin, Arbeit an experimenteller Doktorarbeit am Institut für Immunologie, UKSH
2016 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Beginn des praktischen Jahres am Universitätsklinikum Eppendorf, zweites Tertial am Karapitiya Hospital in Sri Lanka
2017 Drittes Tertial des praktischen Jahres am Westklinikum Rissen, Hamburg und praktischer Teil des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, Approbation

Kiel 2018