
Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Scheffold)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Aktivierungs-abhängige Mobilisierung zytotoxischer
Effektorproteine in humanen
T-Lymphozyten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Dohmen

aus Hildesheim

Kiel 2019

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ottmar Janßen, Institut für Immunologie
 2. Berichterstatter(in): Prof. Dr. Matthias Peipp, Klinik für Innere Medizin II mit dem Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
- Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.2.2020

gez.:

Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzende(r) der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	IV	
1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Einführung in das Immunsystem	1
1.2	T-Lymphozyten	2
1.2.1	Reifung der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im Thymus	2
1.2.2	T-Zell-Aktivierung	4
1.2.3	Subtypen der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten	5
1.2.4	$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten	6
1.3	Immunologische Synapse	7
1.3.1	Transport der sekretorischen Granula zur immunologischen Synapse	7
1.4	Sekretorische Lysosomen	9
1.4.1	Biogenese	10
1.4.2	Entitäten der Sekretorischen Lysosomen	11
1.5	Überblick über die zytotoxische Effektor- und lysosomalen Markerproteine	13
1.5.1	CD63 und CD107a (LAMP1)	13
1.5.2	Fas-Ligand	13
1.5.3	Granzyme und Perforin	14
1.5.4	Granulysin	14
2	<u>Fragestellung</u>	16
3	<u>Material und Methoden</u>	17
3.1	Material	17
3.1.1	Material für zellbiologische Untersuchungen	17
3.1.1.1	Zellen	17
3.1.1.2	Zellkultur und Mitogene	17
3.1.1.3	Stimulatoren und Inhibitoren von T-Zellen	18
3.1.1.4	Durchfluss- und <i>Imaging</i> Zytometrie	19
3.1.2	Material für biochemische Untersuchungen	20
3.1.2.1	Anreicherung von Zellorganellen	20
3.1.2.2	Proteinbestimmung	21
3.1.2.3	SDS-PAGE (Novex ®-Gele)	21
3.1.2.4	<i>Western-Blot</i>	22
3.1.2.5	Immunpräzipitation	24

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Geräte	24
3.1.3.1	Verbrauchsmaterial	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Zellbiologische Untersuchungen	26
3.2.1.1	Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen	26
3.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl und der Zellaktivität	26
3.2.1.3	Expansion von $\alpha\beta$ -T-Zellen	27
3.2.1.4	Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen	27
3.2.1.5	Auftauen und Restimulation von T-Zellklonen und -linien	27
3.2.1.6	Zellkultivierung	28
3.2.1.7	Durchflusszytometrie (FACS)	28
3.2.1.8	<i>Imaging</i> Zytometrie	29
3.2.1.9	Stimulation von T-Zellen	29
3.2.2	Biochemische Untersuchungen	30
3.2.2.1	Lyse von Zellen	30
3.2.2.2	Anreicherung von Zellorganellen	30
3.2.2.3	Proteinbestimmung (<i>Bradford-Assay</i>)	31
3.2.2.4	SDS-PAGE (Novex ®-Gele)	31
3.2.2.5	<i>Western-Blot</i>	32
3.2.2.6	Strippen von Membranen	32
3.2.2.7	Immunpräzipitation	32
4	<u>Ergebnisse</u>	34
4.1	Phänotypisierung der verwendeten Zellen	34
4.2	Assoziation verschiedener Transportproteine mit Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln	36
4.3	Verteilung von 9 kDa und 15 kDa Granulysin auf die Lysomen-verwandten Effektorvesikel	38
4.4	Nachweis intrazellulärer Effektor- und lysosomaler Markerproteine	39
4.4.1	CD107 (LAMP1)	41
4.4.2	CD63	42
4.4.3	Granulysin	43
4.4.4	Granzym A	44
4.4.5	Granzym B	45
4.4.6	Perforin	47
4.5	Aktivierungs-abhängige Mobilisierung von Granulysin in $\gamma\delta$ -T-Zellen	48
4.6	Kinetik der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granzym A und CD107a	50

5	<u>Diskussion</u>	54
5.1	Expression ausgewählter Effektor- und lysosomaler Markerproteine	54
5.2	Aktivierungs-abhängige Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen	55
5.2.1	Signalanforderungen und Zytoskelett-Beteiligung	56
5.3	Assoziation verschiedener Transportproteine mit Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln	58
5.4	Kinetik der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granzym A und CD107a	59
5.5	Modell	61
6	<u>Zusammenfassung</u>	63
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	64
8	<u>Anhang</u>	69
	Danksagung	69
	Veröffentlichungen	70

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	Adapter-Protein
APC	<i>Antigen-presenting-cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppe
CLF	<i>crude lysosomal fraction</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cSMAC	<i>central supramolecular activation cluster</i> , zentraler Supramolekularer Aktivierungskomplex
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGTA	Ethylenglycol-Bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FHL	Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRD	<i>Far Red Dye</i>
FWP	FACS-Waschpuffer
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

Abkürzungsverzeichnis

IS	immunologische Synapse
IU	<i>international unit</i> , Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAMP	Lysosomen-assozierte Membranproteine
Ick (p56 ^{ick})	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> , Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin-Kinase
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LREV	<i>lysosome related effector vesicles</i> , Lysosomen-verwandte Effektorvesikel
M	Molar
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> , Mitogen-aktiviertes Protein
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPR	Mannose-Phosphat-Rezeptor
MTOC	<i>Microtubuli Organizing Center</i> , Mikrotubuli-Organisationszentrum
MVB	<i>Multivesicular bodies</i> , Multi-vesikuläre Körper
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
PAK	Polyklonaler Antikörper
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> , Pathogen-assozierte molekulare Muster
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

Abkürzungsverzeichnis

PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohaemagglutinin
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptoren
pSMAC	<i>peripheral supramolecular activation cluster</i> , peripherer Supramolekularer Aktivierungskomplex
R	Region
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEA	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A
SL	Sekretorische Lysosomen
SNARE	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Receptors</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptoren</i>
TPA/PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Aacetat
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigten Staaten von Amerika
Vgl.	Vergleich
WCL	<i>whole cell lysate</i> , Gesamtzelllysat
z.B.	zum Beispiel
ZAP 70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i> , Zeta-Ketten assoziierte Proteinkinase
α	Anti
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen wie Viren, Pilzen und Bakterien sowie der Eliminierung körpereigener, potentiell entarteter Zellen. Es setzt sich aus verschiedenen miteinander kommunizierenden Komponenten zusammen, die sich in einen angeborenen unspezifischen und einen erworbenen spezifischen Teil gliedern lassen (Parkin & Cohen, 2001). Der angeborene Teil, der zwar schnell, aber weder Erreger-spezifisch ist noch ein „immunologisches Gedächtnis“ besitzt (Delves & Roitt, 2000b), umfasst neben physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren zelluläre und humorale Komponenten: so können beispielsweise neutrophile Granulozyten und Makrophagen pathogene Organismen durch Phagozytose beseitigen und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) entartete oder virusinfizierte Zellen lysieren oder in ihnen Apoptose induzieren (Parkin & Cohen, 2001). Das Sezernieren von Zytokinen wie Interleukinen, Interferonen oder Chemokinen ermöglicht eine interzelluläre Kommunikation und hat eine das Immunsystem modulierende und aktivierende Wirkung (Parkin & Cohen, 2001). Einen weiteren Bestandteil der angeborenen Immunantwort stellen die *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) dar. Hierzu gehören beispielsweise die *Toll-Like-Rezeptoren* (TLRs), die sich auf der Oberfläche von Makrophagen und Dendritischen Zellen finden. TLRs und andere PRRs erkennen *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Dies sind molekulare Strukturen, die typischerweise von pathogenen Organismen produziert werden wie beispielsweise Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien. Nach Erkennung und Bindung eines PAMPs können antimikrobielle Peptide und Zytokine freigesetzt und eine Immunantwort eingeleitet werden (Medzhitov & Janeway, 2000). Als Brücke zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr fungiert neben den Zytokinen das Komplementsystem. Dieses besteht aus im Blut zirkulierenden Glykoproteinen, den Komplementfaktoren, die über drei unterschiedliche Wege kaskadenartig aktiviert werden. Die Komplementfaktoren bewirken einerseits durch Porenbildung eine Lyse infizierter Zellen, andererseits opsonieren sie infizierte Zellen zur Erleichterung der Phagozytose und erleichtern als Bestandteil von Immunkomplexen das Eingreifen von B-Lymphozyten, wodurch sie auch eine Verbindung zur erworbenen, spezifischen Immunabwehr darstellen (Delves & Roitt, 2000b; Parkin & Cohen, 2001). Zu dieser adaptiven Immunabwehr gehören neben den B-Lymphozyten, deren Hauptaufgabe die Produktion von Antikörpern ist, auch die T-Lymphozyten, die über einen individuellen T-Zell-Rezeptor spezifische Antigene erkennen. T- und B- Lymphozyten können durch Bindung von Antigenen, wenn auch langsamer als das angeborene Immunsystem, hochspezifisch auf einen Erreger reagieren, ihn eliminieren und bei einer Reinfektion des Organismus mit dem gleichen

Einleitung

Erreger gezielt auf diesen reagieren. Dies wird vor allem durch die Funktion einiger B- und T-Lymphozyten gewährleistet, die als „Gedächtniszellen“ ein Erreger-spezifisches Antigen wiedererkennen und auf dieses schnell reagieren können. Die Immunantwort der B-Lymphozyten auf einen Erreger ist dabei in der Regel durch T-Lymphozyten gesteuert (Parkin & Cohen, 2001).

1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich anhand ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilen. Innerhalb der T-Lymphozyten, insbesondere der $\alpha\beta$ -T-Zellen, können anhand von Oberflächenproteinen und Funktion weitere Subtypen unterschieden werden, auf die im Verlauf der folgenden Abschnitte näher eingegangen wird.

1.2.1 Reifung der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im Thymus

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, die sich weiter in *Cluster of Differentiation* (CD)8 und CD4-positive T-Lymphozyten einteilen lassen, entwickeln sich aus ihren Vorläuferzellen, den Progenitorzellen, im Knochenmark und wandern von dort in den Thymus, wo ihre weitere Reifung zu naiven T-Lymphozyten stattfindet (Parkin & Cohen, 2001). Dort werden den sowohl CD4- als auch CD8-positiven T-Lymphozyten über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I- oder MHC II-Moleküle körperfremde und körpereigene Antigene präsentiert, die sie mit ihrem TCR erkennen bzw. nicht erkennen: hierbei findet eine positive Selektion derjenigen T-Lymphozyten statt, die auf körperfremde Antigene adäquat reagieren und körpereigene tolerieren. In Zellen, die auch auf körpereigene Antigene reagieren, wird hingegen zur negativen Selektion Apoptose eingeleitet, um den Organismus vor Autoimmunität zu schützen (Delves & Roitt, 2000b; Parkin & Cohen, 2001). Im Verlauf der Reifung kommt es abhängig davon, ob der T-Lymphozyt ein Antigen über MHC I- oder MHC II-Moleküle erkennt, zum Verlust von entweder CD4 oder CD8. CD4-positive $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen mit ihrem TCR nur Antigene, die ihnen von MHC II-Molekülen präsentiert werden, CD8-positive nur solche, die ihnen von MHC I-Molekülen präsentiert werden (Parkin & Cohen, 2001). Nach ihrer Reifung im Thymus zirkulieren die naiven T-Lymphozyten über Blut- und Lymphgefäß durch die lymphatischen Gewebe bis sie durch Bindung eines Antigens aktiviert werden. In Abbildung 1 ist die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus illustriert.

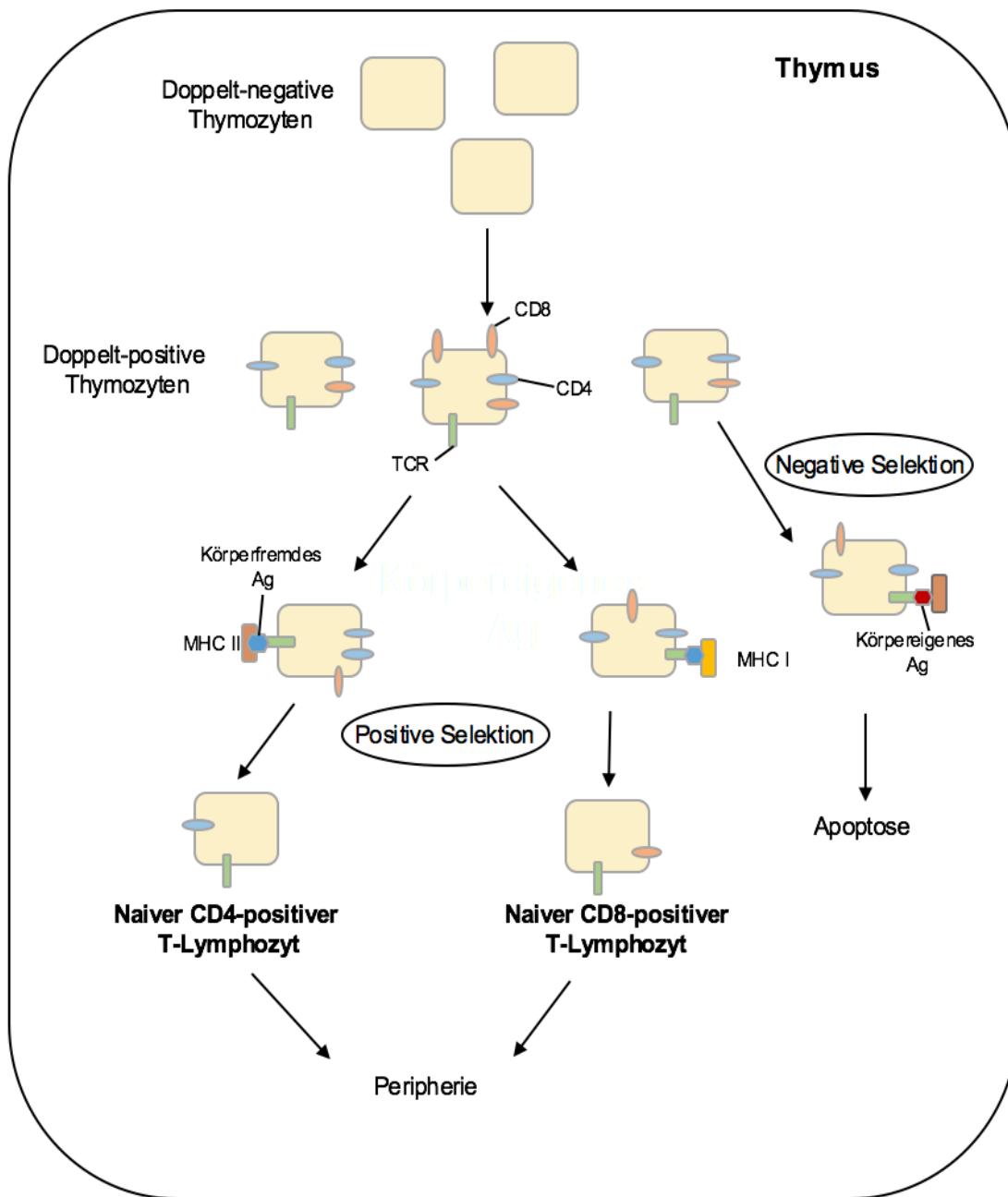


Abbildung 1: T-Zell-Reifung im Thymus. T-Zellen entwickeln sich aus ihren lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern von dort in den Thymus, wo ihre Reifung zu naiven T-Zellen erfolgt. Hierbei werden den Thymozyten sowohl körperfremde als auch körpereigene Antigene (Ag) präsentiert und es findet eine positive Selektion der Thymozyten statt, die körperfremde Antigene erkennen und körpereigene tolerieren. Erkennt ein Thymozyt ein körpereigenes Antigen nicht als solches, wird zum Schutz vor Autoimmunität im Rahmen der negativen Selektion Apoptose eingeleitet. Die Thymozyten sind im Verlauf ihrer Reifung sowohl für CD4 als auch für CD8 positiv. Je nachdem, ob sie Antigene (Ag) über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I oder MHC II-Moleküle erkennen, kommt es zum Verlust von CD4 oder CD8. CD8-positive T-Lymphozyten erkennen nur Antigene, die ihnen über MHC I-Moleküle präsentiert werden, CD4-positive nur über MHC II präsentierte Antigene. Nach erfolgter Reifung zirkulieren die naiven T-Lymphozyten durch Blut- und Lymphgefäß, bis sie durch Antigen-Bindung über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert werden (modifiziert nach Parkin & Cohen, 2001).

1.2.2 T-Zell-Aktivierung

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten erkennen und binden Antigene über ihren TCR. Dieses Heterodimer besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit und ist mit CD3, dessen zytosolische Komponente an der intrazellulären Signalweiterleitung nach Antigen-Bindung beteiligt ist, assoziiert (Delves & Roitt, 2000a). Zur Aktivierung eines (naiven) T-Lymphozyten ist neben der eigentlichen Antigen-Bindung ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Moleküle nötig: So erkennt der TCR ausschließlich über MHC-Moleküle anderer Zellen, z.B. Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Dendritische Zellen oder Makrophagen, präsentierte Antigene im Zusammenspiel mit CD4 bzw. CD8. Außerdem sind weitere kostimulatorische Signale notwendig, wie durch APCs freigesetzte Zytokine und die Interaktion einer Vielzahl von Rezeptoren und Liganden auf der Zelloberfläche des T-Lymphozyten und der der APC (Delves & Roitt, 2000a; Gutcher & Becher, 2007).

Ein wichtiger kostimulatorischer Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten ist beispielsweise CD28, an den als Liganden Moleküle der B7-Familie wie CD80 oder CD86 binden, die auf der Oberfläche Dendritischer Zellen vorhanden sind (Delves & Roitt, 2000a). Nach Aktivierung der (naiven) T-Zelle findet eine intrazelluläre Signaltransduktion bis in den Zellkern statt (siehe Abbildung 2). Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt unter anderem über Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen. So phosphorylieren die T-Zell-spezifischen Src-Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn} nach Antigen-Bindung die zeta-Ketten des CD3-Komplexes. An diese phosphorylierten Motive assoziiert die *Zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP70). ZAP70 phosphoryliert unterschiedliche Substrate und initiiert beispielsweise über die Phospholipase C eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und über die Freisetzung von Inositol-Trisphosphat (IP3) einen Anstieg der Konzentration von intrazellulären Calcium (Ca^{2+})-Ionen (Hashimoto et al., 1991). Die verschiedenen durch den TCR initiierten Signalwege können im Hinblick auf die PKC-Aktivierung *in vitro* durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA/PMA) und in Hinblick auf die Freisetzung von (Ca^{2+})-Ionen mit Ionophoren wie Ionomycin nachgestellt werden (Abraham & Weiss, 2004). Die unterschiedlichen Signalwege leiten letztendlich über zahlreiche weitere Stufen die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten ein.

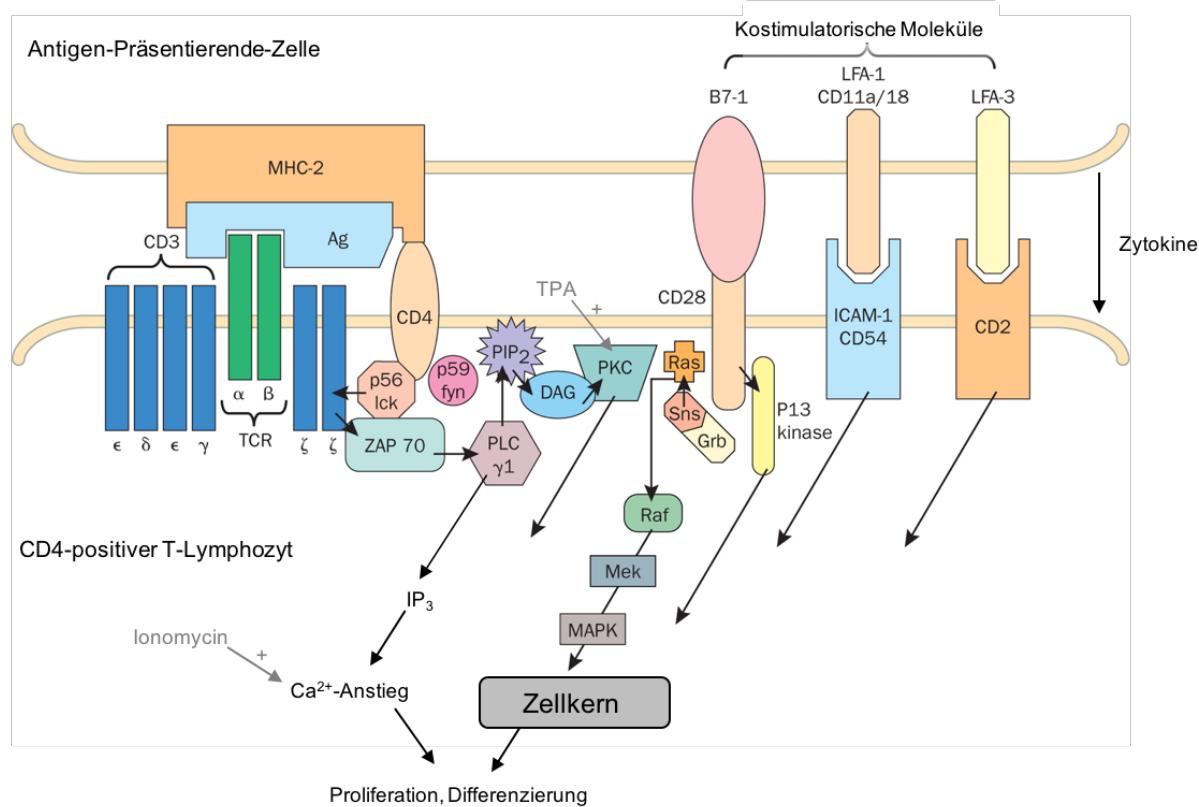


Abbildung 2: Intrazelluläre Signaltransduktion nach T-Zell-Aktivierung. Eine CD4-positive T-Zelle erkennt mit ihrem spezifischen TCR ein MHC II-gebundenes Antigen auf einer Antigen-präsentierenden Zelle. Kostimulatorische Moleküle und Zytokine modulieren die auflaufenden Signale kontextabhängig, was zur Proliferation und/oder Differenzierung der T-Zelle führt. Über Phosphorylierung von CD3-Untereinheiten kommt es zur Anlagerung und Aktivierung der Zeta-Ketten assoziierten Proteinkinase (ZAP70), wodurch über die Phospholipase C (PLC) und Diacylglycerin (DAG) die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird. Außerdem kommt es über Inositol-Triphosphat (IP_3) zum Anstieg der Konzentration intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen. Die Proteinkinase C lässt sich *in vitro* über Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) aktivieren. Ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg kann *in vitro* durch Ionomycin erreicht werden (Abbildung aus Parkin & Cohen, 2001, ergänzt nach Hashimoto et al., 1991, Abraham & Weiss, 2004; Gutcher & Becher, 2007).

1.2.3 Subtypen der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Bei $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten kann zwischen CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten unterschieden werden. Während die CD4-positiven T-Zellen, auch T-Helferzellen (Th-Zellen) genannt, im Rahmen der Immunantwort vor allem eine modulierende Funktion aufweisen, eliminieren CD8-positive zytotoxische T-Zellen direkt virusinfizierte oder entartete Zellen. CD4-positive T-Helferzellen erkennen Antigene, die ihnen auf MHC II-Molekülen präsentiert werden. Diese MHC II-Moleküle finden sich auf der Oberfläche anderer immunkompetenter Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten sowie aktivierte T-Zellen (Parkin & Cohen, 2001). Bei den CD4-positiven T-Helferzellen können wiederum zwei Typen, Th1- und Th2-Zellen, unterschieden werden, die sich vor allem in den von ihnen freigesetzten

Einleitung

Zytokinen unterscheiden: Th1-Zellen sezernieren vor allem Interleukin 2, das die Proliferation von CD4- und CD8-postiven T-Zellen fördert, und Interferon γ , welches Makrophagen aktiviert, die dann ihrerseits infizierte Zellen phagozytieren. Außerdem fördert Interferon γ die Proliferation weiterer Th1-Helferzellen und hemmt die von Th2-Zellen (Parkin & Cohen, 2001). Th2-Zellen nehmen z.B. über Interleukin 4, 5, 6 und 10 Einfluss auf die Antikörper-Produktion von B-Zellen und spielen eine Rolle bei der Vermittlung allergischer Reaktionen. So fördert Interleukin 4, das auch die Proliferation von Th2-Zellen fördert und die von Th1-Zellen hemmt, die Immunglobulin E (IgE)-Freisetzung aus B-Lymphozyten (Maggi, 1998; Parkin & Cohen, 2001). Neben diesen klassischen T-Helferzellen gibt es CD4-positive regulatorische T-Zellen (Tregs), die im Vergleich zu anderen T-Zell-Subtypen eine höhere Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und intrazellulär den Transkriptionsfaktor FoxP3 aufweisen. Tregs hemmen andere Immunzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunreaktionen und Allergien (Schmidt et al., 2012). In jüngerer Zeit wurden anhand der freigesetzten Zytokine noch weitere Th-Subtypen definiert, wie z.B. die Th17-Zellen, die eine wichtige Funktion bei Entzündungsreaktionen ausüben (Annunziato et al., 2007).

CD8-positve zytotoxische T-Lymphozyten erkennen über MHC I-Moleküle präsentierte Antigene. MHC I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, wodurch eine virusinfizierte oder entartete Zelle ohne Umwege von einer zytotoxischen T-Zelle erkannt und mit Hilfe zytotoxischer Effektorproteine beseitigt werden kann (Parkin & Cohen, 2001). Zu den zytotoxischen Effektorproteinen gehören zum Beispiel die Granzyme A und B sowie Perforin und Granulysin. Außerdem besteht über die Expression des Fas-Liganden (FasL) auf der Zelloberfläche die Möglichkeit, in der infizierten Zelle durch Bindung an den Fas-Rezeptor Apoptose zu induzieren (Lettau et al., 2007). Neben CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen gibt es auch einen geringen Anteil zytotoxischer CD4-positiver T-Zellen (Appay et al., 2002).

1.2.4 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der TCR von $\gamma\delta$ -T-Zellen besteht aus einer γ - und einer δ -Untereinheit. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Regel CD4- und CD8-negativ, wobei es auch einige CD8-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen gibt (Goodman & Lefrançois, 1988). $\gamma\delta$ -T-Zellen machen im peripheren Blut etwa 1-5 % aller zirkulierenden Lymphozyten aus (Sandstrom et al., 2012). In Epithelgeweben wie der Haut oder der Darm-Mukosa sind sie mit einem Anteil von bis zu 50 % aller dort angesiedelten Lymphozyten hingegen deutlich häufiger vertreten (Carding & Egan, 2002). Während sie den $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten in einigen Funktionen wie immunmodulatorischer und zytotoxischer Aktivität ähneln, sind sie außerdem an Wundheilungs-Prozessen und der Regeneration von Epithelien beteiligt (Kabelitz et al., 2013). Ein weiterer Unterschied zu $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten ist, dass sie als Antigene sowohl Peptide als auch Nicht-Proteine wie Pyrophosphate erkennen, die nicht über klassische MHC-Moleküle präsentiert werden (Carding & Egan, 2002;

Einleitung

Sandstrom et al., 2012). Den häufigsten Subtyp stellen bei Erwachsenen mit etwa 80 % V γ 9V δ 2-T-Zellen dar, welche ähnlich wie zytotoxische CD8-positive $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten infizierte oder entartete Zellen mittels zytotoxischer Effektorproteine eliminieren können (Harly et al., 2015).

1.3 Immunologische Synapse

Im Rahmen der Antigenerkennung und Aktivierung kommt es zwischen APC und zytotoxischen T-Lymphozyten zur Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS), in die T-Lymphozyten ihre sekretorischen mit zytotoxischen Effektorproteinen beladenen Granula freisetzen. Diese immunologische Synapse besteht aus einem äußeren Ring aus Adhäsionsproteinen, dem peripheren *supramolecular activation cluster* (pSMAC), der vor allem das Integrin *Lymphocyte Function-associated Antigen-1* (LFA-1) enthält. Dieser Ring umschließt zwei separate Domänen, eine für Signalmoleküle wie den TCR und CD8 und eine für die Freisetzung der sekretorischen Granula, die zusammen als zentraler *supramolecular activation cluster* (cSMAC) bezeichnet werden (Stinchcombe et al., 2001; Bossi & Griffiths, 2005). In Abbildung 3 ist der Aufbau einer immunologische Synapse schematisch dargestellt.

1.3.1 Transport der sekretorischen Granula zur immunologischen Synapse

Die für die Eliminierung infizierter oder entarteter Zellen verwendeten zytotoxischen Effektorproteine werden in zytotoxischen T-Lymphozyten in Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln (*lysosome related effector vesicles*, LREV), sog. sekretorischen Lysosomen (SL), gespeichert (Blott & Griffiths, 2002). Nach T-Zell-Aktivierung finden parallel zur Ausbildung der immunologischen Synapse innerhalb des T-Lymphozyten eine Umlagerung von Zytoskelett-Elementen und ein Transport der SL zur immunologischen Synapse statt (Abbildung 3) (Bossi & Griffiths, 2005). Hierbei sind viele Mechanismen noch ungeklärt und die in den Transport involvierten Proteine sowie ihre genauen Funktionen bisher vor allem auf Grundlage von Erkrankungen verstanden, bei denen aufgrund von Mutationen in einem dieser Proteine bestimmte Abläufe im Transport gestört sind (Lettau et al., 2015).

Nach T-Zell-Aktivierung kommt es intrazellulär zur Translokation des *Microtubuli Organizing Center* (MTOC) von der Zellperipherie zur immunologischen Synapse und zum Andocken der Minus-Enden der Mikrotubuli an der sekretorischen Domäne. Der Transport der SL erfolgt dann entlang der Mikrotubuli in Richtung der Minus-Enden über das Motorprotein Dynein, möglicherweise auch unter Einfluss der kleinen Guanosintriphosphat (GTP)ase Rab7. Außerdem könnten auch Aktin-abhängige Vorgänge über Myosin Ila beim Transport der SL eine Rolle spielen (Bossi & Griffiths, 2005; Lettau et al., 2015). Nach Erreichen des MTOC kommt es vermittelt durch Rab27a zum Andocken der SL an die Zellmembran (Bossi & Griffiths, 2005). Rab27a, ebenfalls eine kleine GTPase, interagiert mit Munc13-4, welches an

Einleitung

der Fusion der SL mit der Plasmamembran beteiligt ist (Elstak et al., 2011). Munc13-4 ist möglicherweise außerdem an der Fusion von Rab7- und Rab27a-assozierten enthaltenen späten Endosomen und recycelten Rab11⁺-Vesikeln beteiligt, bei der letztendlich SL mit zytotoxisch wirksamen Granula entstehen (Ménager et al., 2007; Lettau et al., 2015). An der Fusion der SL mit der Plasmamembran sind neben Munc13-4 auch Unc18-2 (auch Munc18-2 genannt) und Syntaxin 11 beteiligt. Unc18-2 bindet dabei Syntaxin 11, das zur Familie der *Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Receptors* (SNARE)-Proteine gehört, welche an verschiedenen Stellen im Körper an Membran-Fusionen beteiligt sind. Unc18-2 kontrolliert hierbei möglicherweise die Formation des bei der Fusion entstehenden SNARE-Komplexes (zur Stadt et al., 2005, 2009; Lettau et al., 2015). Nachdem das SL mit der Plasmamembran fusioniert ist, kann es seinen zytotoxischen Inhalt in den synaptischen Spalt entlassen und die infizierte Zelle eliminieren.

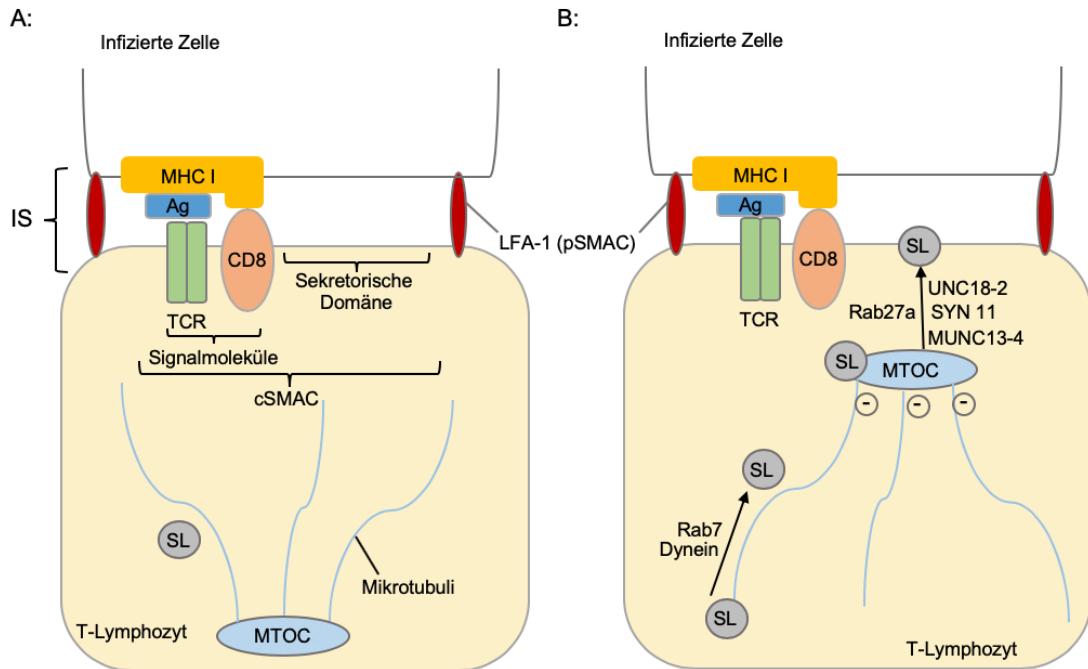


Abbildung 3: Immunologische Synapse und Transport der Sekretorischen Lysosomen zur Immunologischen Synapse. **A:** Nachdem ein zytotoxischer T-Lymphozyt (z.B. ein CD8-postiver $\alpha\beta$ -T-Lymphozyt) durch Antigen (Ag)-Bindung über seinen T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert worden ist, kommt es zwischen ihm und der infizierten Zelle zur Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS). Die IS besteht aus einem peripheren Ring aus Adhäsionsproteinen, der auch als peripherer *supramolecular activation cluster* (pSMAC) bezeichnet wird und z.B. das *Lymphocyte Function-associated Antigen-1* (LFA-1) enthält. Dieser Ring umschließt den inneren Teil der IS, den zentralen SMAC (cSMAC), der sich in eine Domäne für Signalmoleküle und eine sekretorische Domäne gliedert lässt, in der die Sekretorischen Lysosomen (SL) nach Fusion mit der Plasmamembran ihren Inhalt in den synaptischen Spalt entlassen. **B:** Parallel zur Ausbildung der IS, transloziert das *Microtubuli Organizing Center* (MTOC) von der Zellperipherie zur IS und der Transport der SL beginnt. Der SL-Transport erfolgt dabei entlang der Mikrotubuli in Richtung ihrer Minus-Enden unter Mithilfe des Motorproteins Dynein und der Guanosintriphosphat (GTP)ase Rab7. Unter Einfluss von Rab27a kommt es zum Andocken der SL am MTOC. Von dort erfolgt der Weitertransport zur Plasmamembran und letztendlich die Fusion der SL mit der Plasmamembran, sodass sie ihren zytotoxischen Effektorproteine in den synaptischen Spalt entlassen und die infizierte Zelle eliminiert werden kann. An der Fusion der SL mit der Plasmamembran sind die Proteine MUNC13-4, UNC18-2 sowie Syntaxin 11 mitbeteiligt (Abbildung erstellt und modifiziert nach Bossi & Griffiths, 2005; Lettau et al., 2015).

1.4 Sekretorische Lysosomen

SL fungieren als Speicherort für zytotoxische Effektorproteine und kombinieren dabei lysosomale und sekretorische Eigenschaften (Blott & Griffiths, 2002). Sie sind von einer Lipidmembran umgebene Organellen, die genau wie Lysosomen einen sauren pH-Wert aufweisen sowie Hydrolasen und Lysosomen-assozierte Markerproteine (LAMPs) enthalten. Außerdem sind sie in der Lage, zytotoxische Effektorproteine zu speichern und bei Bedarf zu sezernieren (Bossi & Griffiths, 2005). SL finden sich in zytotoxischen Zellen wie NK-Zellen, CD8-positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie in einigen CD4-positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen (Lettau et al., 2015). Zudem sind sie auch in Melanozyten vertreten, die ihre Pigmentproteine in ihnen

Einleitung

speichern. Dass es sich bei diesen sog. Melanosomen um ähnliche Organellen handelt, wird durch genetische Erkrankungen wie das Griscelli-Syndrom oder das Hermansky-Pudlak-Syndrom deutlich, bei denen eine Kombination aus Immundefizienz und Albinismus vorliegt (Bossi & Griffiths, 2005; Lettau et al., 2015).

1.4.1 Biogenese

In naiven T-Lymphozyten finden sich nur wenige SL, da diese erst nach T-Zell-Aktivierung vermehrt synthetisiert und beladen werden. Hierbei bilden sich über frühe Endosomen zunächst *Multi-Vesicular Bodies* (MVB), die zu späten Endosomen heranreifen, aus denen letztendlich die SL entstehen (Bossi & Griffiths, 2005). Im Verlauf dieser Synthese reichern sich auf unterschiedlichen Wegen nach und nach zytotoxische Effektor- und lysosomale Markerproteine in den Endosomen an (Bossi & Griffiths, 2005). Die Granzyme gelangen nach ihrer Expression über eine Markierung mit Mannose-6-Phosphat vom trans-Golgi-Netzwerk zu den späten Endosomen (Griffiths & Isaaz, 1993). Lysosomale Membranproteine gelangen mit Hilfe von Adapter-Proteinen (AP) entweder von der Zellmembran oder dem trans-Golgi-Netzwerk zu den SL. So wird CD63 beispielsweise über AP-3 zu SL transportiert (Bossi & Griffiths, 2005). Der Apoptose-induzierende FasL wird in zytotoxischen T-Zellen unter strenger Kontrolle direkt zu späten Endosomen bzw. SL transportiert. Grundlage des gerichteten Transports stellt hierbei die intrazelluläre Prolin-reiche Domäne des FasL dar, die über Interaktionen mit SH3-Domänen-enthaltenden Adapterproteinen einen fehlerhaften Transport zur Plasmamembran verhindert (Blott et al., 2001; Bossi & Griffiths, 2005). Abbildung 4 illustriert die Einzelheiten der Biogenese der SL.

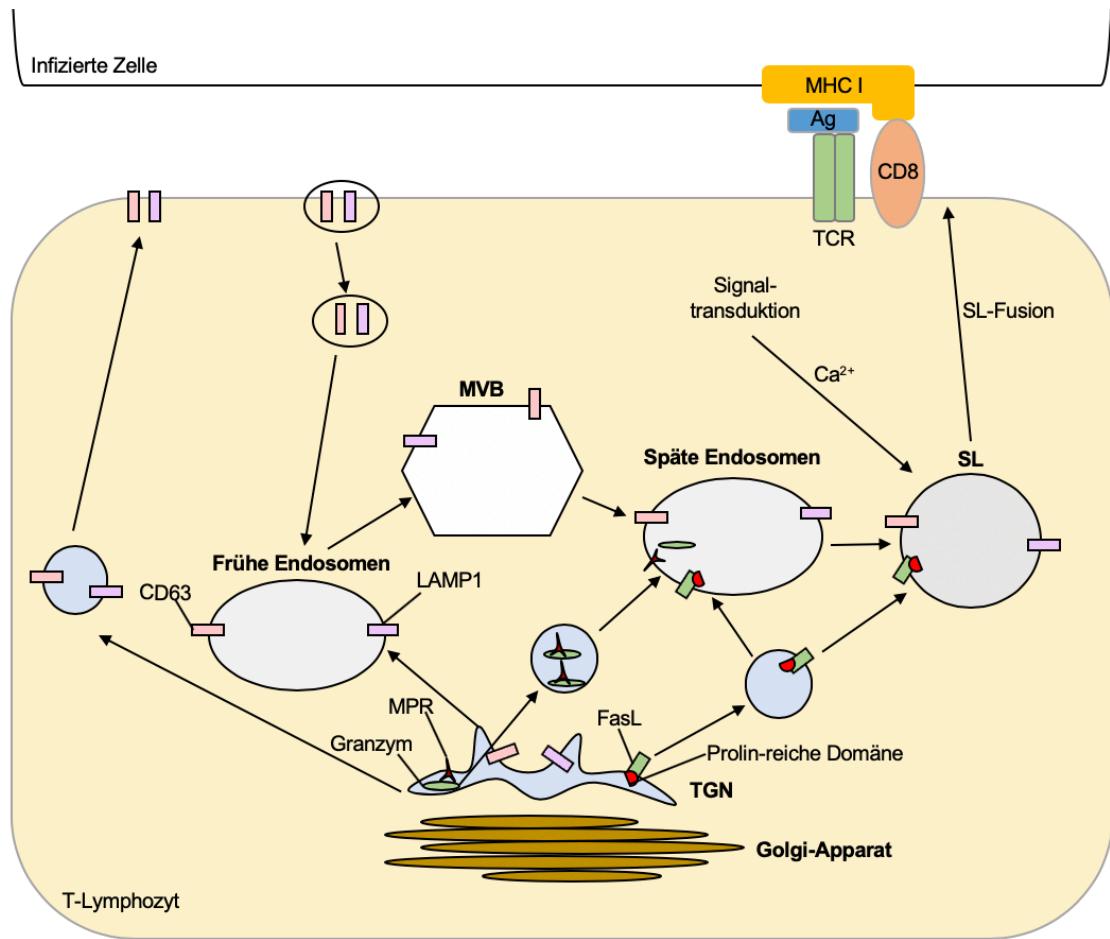


Abbildung 4: Biogenese der Sekretorischen Lysosomen. Nach T-Zell-Aktivierung kommt es zur Freisetzung Sekretorischer Lysosomen (SL). Die SL entwickeln sich aus frühen Endosomen über *Multi-Vesicular Bodies* (MVB) und späte Endosomen. Im Verlauf der Biogenese werden nach und nach die zytotoxischen Effektor- und lysosomalen Markerproteine hinzugefügt. Die Granzyme gelangen hierbei durch eine Markierung mit Mannose-6-Phosphat, das von einem Mannose-Phosphat-Rezeptor (MPR) erkannt wird, vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den späten Endosomen. Die lysosomalen Markerproteine CD63 und LAMP1 gelangen entweder über das TGN und die frühen Endosomen zu den SL oder werden von der Plasmamembran recycelt. Der Fas-Ligand (FasL), der nach Expression auf der Plasmamembran Apoptose induzieren kann, gelangt unter strenger Kontrolle über Interaktionspartner seiner Prolin-reichen Domänen zu den späten Endosomen oder SL (Abbildung erstellt nach Bossi & Griffiths, 2005).

1.4.2 Entitäten der Sekretorischen Lysosomen

Nachdem über längere Zeit davon ausgegangen wurde, dass sämtliche Effektorproteine gemeinsam in SL gespeichert werden, haben neuere Erkenntnisse gezeigt, dass es zwei unterschiedliche Entitäten von LREV gibt, die sich hinsichtlich ihrer Dichte, Granularität und Proteinbeladung unterscheiden (H. Schmidt et al., 2011; Lettau et al., 2015). Die eigentlichen SL enthalten nach biochemischen Analysen den FasL und das 15 kDa Granulysin. Bisher wurde außerdem angenommen, dass auch die lysosomalen Markerproteine CD107a und CD63 in SL gespeichert werden. Diese Annahme ist nach neusten Erkenntnissen jedoch nicht mehr aufrechtzuerhalten, da eine Kolokalisation von CD63 und CD107a mit zytotoxischen

Einleitung

Effektorproteinen wie Granzym B gezeigt werden konnte, nicht aber mit dem FasL (Lettau et al., 2018). Zytotoxische Effektorproteine wie 9 kDa Granulysin, Granzym B und Perforin sowie nach neusten Erkenntnissen auch CD63 und CD107a werden in einer zweiten Entität, die eine höhere Dichte als die SL besitzt und daher auch als „dichte Granula“ bezeichnet wird, gespeichert (Lettau et al., 2015, 2018). Aufgrund der Auf trennung der beiden Entitäten in der Dichtegradientenzentrifugation, werden die SL auch als Fraktion 2- und die dichten Granula auch als Fraktion 6-Vesikel bezeichnet (H. Schmidt et al., 2009). Zu welchem Zeitpunkt der Biogenese die beiden unterschiedlichen Entitäten entstehen, ist noch nicht endgültig geklärt. Eine Möglichkeit könnte sein, dass durch Fusion von MVB und den späten Endosomen je nach Bedarf SL oder dichte Granula entstehen (Lettau et al., 2015).

Zusätzlich zur Existenz zweier Entitäten der LREV konnte außerdem eine Assoziation der beiden Entitäten mit jeweils unterschiedlichen Adapter-Proteinen und Zytoskelett-Elementen gezeigt werden, was auf eine unterschiedliche Mobilisierung hindeutet (Lettau et al., 2015).

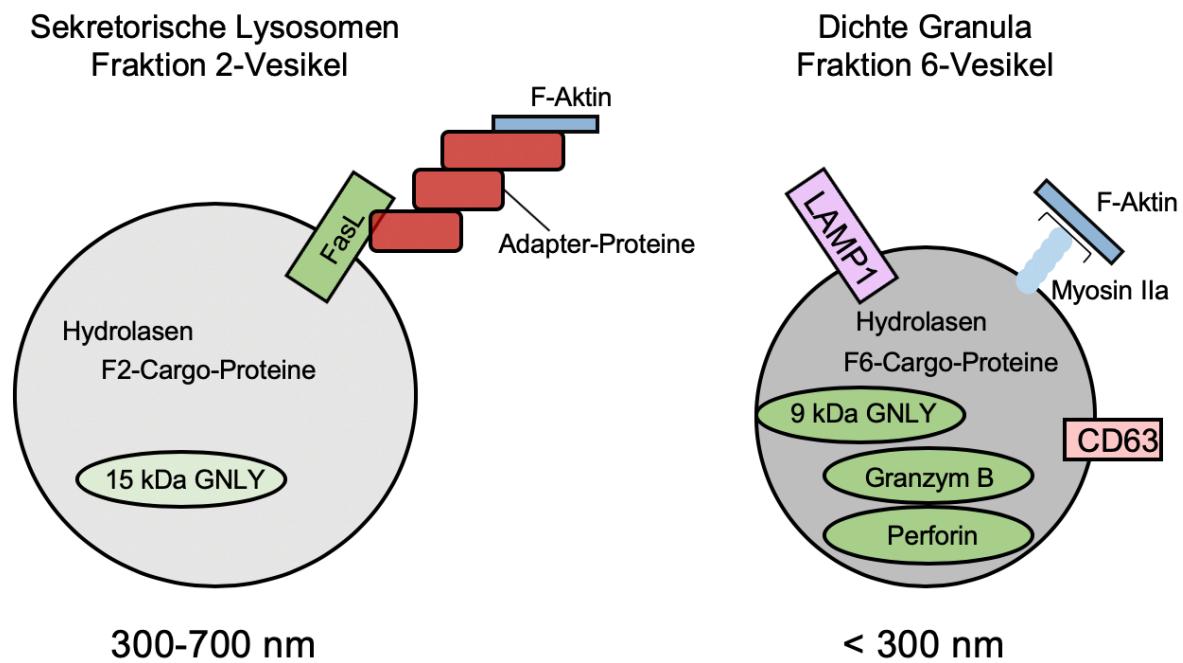


Abbildung 5: Lysosomen-verwandte Effektorvesikel. Mittels Dichtegradientenzentrifugation konnten zwei unterschiedliche Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel identifiziert werden, die sich in ihrer Größe, Granularität, Proteinbeladung sowie Assoziation mit Adapter-Proteinen und Zytoskelett-Elementen unterscheiden. Die Fraktion 2-Vesikel, auch Sekretorische Lysosomen genannt, enthalten neben für Lysosomen typischen Hydrolasen den Apoptose-induzierenden Fas-Liganden (FasL) und das 15 kDa Granulysin (GNLY). Fraktion 6-Vesikel enthalten zytotoxische Effektorproteine wie Granzyme, Perforin und das 9 kDa Granulysin (Vereinfacht und modifiziert nach Lettau et al., 2015, 2018).

1.5 Überblick über die zytotoxische Effektor- und lysosomalen Markerproteine

Die folgenden Abschnitte geben einen kurzen Einblick in die Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen zytotoxischen Effektor- und lysosomalen Markerproteine.

1.5.1 CD63 und CD107a

CD63 (LAMP3) und CD107a (LAMP1) sind Lysosomen-assoziierte Membranproteine (LAMP), die sich nach biochemischen Analysen auch in der Membranen der SL/Faktion 2- Vesikel finden, aber nach aktuellen Analysen vermehrt in dichten Granula nachweisbar sind (Lettau et al., 2015, 2018). CD63 fungiert nach T-Zell-Aktivierung und Transport zur Plasmamembran als Kostimulator und fördert eine effiziente T-Zell-Antwort (Lettau et al., 2007). Durch Expression von CD63 auf der Plasmamembran wird unter anderem die Proliferation von T-Zellen sowie die Freisetzung von Interleukin 2 durch die T-Zelle gefördert (Pfistershammer et al., 2004). Die Expression vom CD107a auf der Plasmamembran der T-Zelle schützt diese vor der „Selbstzerstörung“ durch die zytotoxischen Effektorproteine (Cohnen et al., 2013). Sowohl CD107a als auch CD63 werden Ca^{2+} -abhängig mobilisiert und ihr Transport scheint Aktin-abhängig über das Motorprotein Myosin Ila zu erfolgen (Lettau et al., 2018).

1.5.2 Fas-Ligand

Der FasL ist ein Transmembran-Protein, das zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktoren gehört (Suda et al., 1993). Durch Interaktion mit dem Fas-Rezeptor (CD95) wirkt er Apoptose-induzierend und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Beseitigung infizierter Zellen oder der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase im Immunsystem (Suda et al., 1993; Roberts et al., 2003).

So ist er während der T-Zell-Reifung an der negativen Selektion autoreaktiver Thymozyten und in Th1-Zellen am *Activation-induced cell death* beteiligt, der eine Immunantwort der aktiven T-Zellen beendet und den Organismus so vor Autoimmunität schützt (Dhein et al., 1995; Linkermann et al., 2003). Wie bereits beschrieben, ist der FasL ebenfalls ein Bestandteil der Membran von Fraktion 2-Vesikeln/SL in zytotoxischen T-Zellen, wo seine Expression auf der Plasmamembran der Zelle durch Prolin-reiche Domänen streng reguliert wird (Blott et al., 2001). In zytotoxischen T-Zellen folgt die Aktivierungs-induzierte Oberflächenexpression des FasL einem biphasischen Verlauf. Hierbei wird nach T-Zell-Aktivierung zunächst gespeicherter FasL auf der Zellmembran exprimiert, etwa 2 h später kommt es dann zur Mobilisierung von neu-synthetisiertem FasL (Lettau et al., 2004). Der gespeicherte FasL benötigt hierbei eine geringere Antigen-Konzentration, um freigesetzt zu werden, und kann spezifisch und schnell eine Beseitigung infizierter Zellen bewirken, wird allerdings durch

Einleitung

Metallo-Proteasen auch schnell wieder beseitigt (Lettau et al., 2007; He et al., 2010). Auch die zur Freisetzung von gespeichertem und neu-synthetisiertem FasL nötigen Stimuli und Zytoskelett-Elemente unterscheiden sich: während die Freisetzung des gespeichertem FasL Ca^{2+} -unabhängig ist und sich durch Hemmung der Aktin-Polymerisation verringern lässt, ist die Freisetzung des neu-synthetisiertem FasL Ca^{2+} -abhängig (Kassahn et al., 2009; Lettau et al., 2018).

1.5.3 Granzyme und Perforin

Perforin galt lange Zeit als Porenbildner, der Granzymen den Eintritt in die Zielzelle ermöglicht. Dieses Modell wird jedoch mittlerweile kontrovers diskutiert und die genaue Rolle von Perforin ist bisher ungeklärt, während für den Eintritt der Granzyme in die Zielzelle unterschiedliche Theorien existieren (Lettau et al., 2007).

Granzyme sind Serinproteasen und es existieren mindestens fünf unterschiedliche Formen (Granzym A, B, H, M und K), wobei vor allem Granzym B funktionell umfassend charakterisiert ist (Lettau et al., 2007). Granzym B wirkt durch Spaltung unterschiedlicher Substrate in der Zielzelle Apoptose-fördernd und ist eines der wichtigsten zytotoxischen Effektorproteine (Lettau et al., 2007). Wie genau Granzym B in die Zielzelle gelangt und ob seine Wirkung von Perforin abhängig ist oder nicht, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass Granzym B, das eine positive Ladung aufweist und in der zytotoxischen Zelle zur Speicherung mit Serglycin komplexiert ist, an der Zielzelle an negativ geladene Moleküle bindet und dann unspezifisch aufgenommen wird (Galvin et al., 1999; Shi et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit ist, dass es Ladungs-unabhängig, aber Rezeptor-vermittelt über den *Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor receptor* in die Zielzelle aufgenommen wird (Motyka et al., 2000). Granzym B wird Ca^{2+} -abhängig freigesetzt und sein Transport zur Plasmamembran nach T-Zell-Aktivierung scheint Aktin-abhängig über das Motorprotein Myosin IIa zu erfolgen (Lettau et al., 2018).

1.5.4 Granulysin

Granulysin gehört zur Saposin-Familie und ist, genau wie die Granzyme, ein wichtiges zytotoxisches Effektorprotein (Lettau et al., 2007). Es sind zwei unterschiedliche Granulysin-Formen bekannt, eine kurze 9 kDa und eine lange 15 kDa Form, wobei das 9 kDa Granulysin durch Prozessierung am Amino- und Carboxylende aus der 15 kDa Granulysin entsteht (Krensky & Clayberger, 2009). Beide Formen werden in unterschiedlichen Entitäten der LREV gespeichert und besitzen außerdem unterschiedliche Funktionen. Das 9 kDa Granulysin wird vor allem in den Fraktion 6-Vesikeln gespeichert und hat eine zytotoxische Wirkung (Krensky & Clayberger, 2009; Lettau et al., 2015). Diese entfaltet es, indem es zunächst vermutlich Ladungs-abhängig an die Zielzelle bindet und eine intrazelluläre Erhöhung von Ca^{2+} bzw.

Einleitung

einen Ausfluss von Kalium bewirkt. Dies führt durch Zerstörung von Mitochondrien zum Austritt von Cytochrom C und Apoptose-induzierenden Faktoren, was unter anderem der Beseitigung infizierter Zellen dient (Lettau et al., 2007; Krensky & Clayberger, 2009). Das 15 kDa wird in Fraktion 2-Vesikeln gespeichert und weist eine zytolytische Wirkung auf (Wei et al., 2016). Außerdem bewirkt sie eine Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen. So fördert die Freisetzung von 15 kDa Granulysin eine Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (Clayberger et al., 2012). Die genauen Stimuli, die zur Freisetzung der beiden Granulysin-Formen in zytotoxischen T-Zellen führen, sind noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass das 15 kDa Granulysin Ca^{2+} -unabhängig und das 9 kDa Granulysin Ca^{2+} -abhängig freigesetzt wird (Ogawa et al., 2003).

2 Fragestellung

Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen eliminieren Virus-infizierte und entartete Zellen mit Hilfe zytotoxischer Effektorproteine, die in Lysosomen-verwandten Effektorvesikel gespeichert werden. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass zwei unterschiedliche Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel existieren, die sich hinsichtlich Dichte, Granularität und Proteinbeladung unterscheiden. In sog. sekretorischen Lysosomen werden der Apoptose-induzierende Fas-Ligand sowie das nicht prozessierte 15 kDa Granulysin gespeichert, in sog. dichten Granula zytotoxische Effektorproteine wie Granzyme, Perforin und 9 kDa Granulysin. Die beiden Entitäten sind interessanterweise auch mit unterschiedlichen Komponenten des Zytoskeletts assoziiert, was eine separate und unabhängige Mobilisierung nahelegt. Dies konnte in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits für einige der genannten Proteine gezeigt werden. So erfolgt die Freisetzung bzw. Mobilisierung des Fas-Liganden, Granzymen, CD63 und CD107a unter Einfluss unterschiedlicher Stimuli und Zytoskelett-Elemente. Mit der vorliegenden Arbeit sollen die bisherigen Untersuchungen zur Aktivierungs-abhängigen Mobilisierung zytotoxischer Effektorproteine fortgeführt werden. Hierzu sollen die beiden Entitäten der Lysosomen-verwandten Effektorvesikel aus zytotoxischen T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden, um herauszuarbeiten, ob sie sich hinsichtlich der Assoziation mit bestimmten Transportproteinen unterscheiden. Außerdem sollte unter Einsatz verschiedener Stimuli, z.B. Phorbolester und Ca^{2+} -Ionophor, oder unter Verwendung verschiedener Inhibitoren der Aktin-Polymerisation die aktivierungs-abhängige Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen näher untersucht werden. Im Einzelnen sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Sind die am Transport von Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln zur Plasmamembran beteiligten Proteine MUNC13-4, UNC18-2, Syntaxin 11, Rab7, Rab11 und Rab27a in unterschiedlicher Weise mit sekretorischen Lysosomen und dichten Granula assoziiert? Welche Transportproteine sind für die eine oder andere Form von Effektor-Vesikeln möglicherweise charakteristisch?
- 2) Lässt sich die zuvor gefundene unterschiedliche Verteilung der kurzen (9 kDa) und langen (15 kDa) Form von Granulysin verifizieren? Wie unterscheiden sich die beiden Granulysin-Formen bezüglich der für ihre Mobilisierung nötigen Stimuli und Transportmechanismen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Material für zellbiologische Untersuchungen

3.1.1.1 Zellen

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten T-Zellklone/-linien

Name	Zelllinie/Klon	T-Zellrezeptor	Subtyp	Quelle
A37/10	T-Zellklon	αβ	CD4-positiv, Th1	(Oberg et al., 1997)
KCD8	T-Zelllinie	αβ	CD8-positiv	(Lettau et al, 2004)

Im Institut etablierte Epstein-Barr-Virus(EBV)-transformierte B-Zelllinien

EBV-O

EBV-W

3.1.1.2 Zellkultur und Mitogene

Zellkulturmedium

RPMI 1640 (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin) Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA

Penicillin (10000 U) /Streptomycin (1000 µg) Biochrom GmbH, Berlin

FCS Thermo Fisher Scientific

(bei 56 °C für 30 min inaktiviert, filtriert mit 0,22 µm)

Zur Kultivierung von Zellen wurden zum RPMI 1640 Medium 5 % oder 10 % Fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt (im Folgenden als 5 %- bzw. 10 %-FCS-Zellkulturmedium bezeichnet).

X-VivoTM 15 Lonza, Basel, Schweiz

Das Medium wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin und rIL-2 (Einsatzkonzentration 50 IU/ml) versetzt.

PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) Merck KGaA, Darmstadt

PBS (mit Mg²⁺ und Ca²⁺) Cell Concepts, Umkirch

Material und

Trypanblau-Lösung (0,4 %) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Biocoll *Separating Solution* (1,077 g/ml)
(im Folgenden als Ficoll bezeichnet) Biochrom GmbH

Phytohaemagglutinin (PHA)
Einsatzkonzentration 0,5 µg/ml Remel Inc., Lenexa, USA

Staphylococcus Enterotoxin A (SEA)
Einsatzkonzentration 0,5 µg/ml Serva, Heidelberg

Zoledronat
Einsatzkonzentration 2,5 µM Novartis Pharma GmbH,
Basel, Schweiz

Rekombinantes Interleukin 2 (rIL-2, 22 Mio IU/ml) Novartis
(In ddH₂O und RPMI mit 0,5 % FCS aufgelöst und steril filtriert)
1 × 10⁵ IU/ml, Einsatzkonzentration 100 bzw. 50 IU/ml

3.1.1.3 Stimulatoren und Inhibitoren

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA/PMA)
Einsatzkonzentration 20 ng/ml Sigma-Aldrich

Ionomycin
Einsatzkonzentration 500 ng/ml Calbiochem, La Jolla, USA

Ethylenglycol-Bis(aminoethylether)-
N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)
Einsatzkonzentration 4 mM Merck

Magnesiumchlorid (MgCl₂)
Einsatzkonzentration 4 mM Merck

Dimethylsulfoxid (DMSO)
Merck

Latrunculin A (5 mM in DMSO)
Einsatzkonzentration 5 µM Tocris Bioscience, Bristol, UK

3.1.1.4 Durchfluss- und *Imaging* Zytometrie

FACS-Waschpuffer

10 g bovines Serumalbumin (BSA) Serva
 1 g Natriumazid Merck
 1 l PBS

1 %-Paraformaldehyd (PFA)-Fixierungspuffer

10 g PFA Merck
 1 l PBS

Fixierungs- und Permeabilisierungskit

BD, Franklin Lakes, USA

Cytofix/Cytoperm
Perm/Wash-Puffer
 (1:10 in _{dd}H₂O)

Tab. 2: Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

α – anti, FITC – Fluoresceinisothiocyanat, FWP – FACS- Waschpuffer, PE – Phycoerythrin

Antikörper	Klon	Verdünnung in FWP	Hersteller
α-CD14-PE	18D11	1:5	Immunotools, Friesoythe
α-CD19-FITC	LT19	1:5	Immunotools
α-CD2-FITC	HIT11	1:5	Immunotools
α-CD3-PE	MEM-57	1:5	Immunotools
α-CD4-FITC	MEM-241	1:5	Immunotools
α-CD56-FITC	B-A19	1:5	Immunotools
α-CD8-PE	MEM-31	1:8	Immunotools
IgG1-FITC	203	1:5	Immunotools
IgG2a-PE	PPV-04	1:5	Immunotools
α-T-Zell-Rezeptor-αβ-FITC	IP26	1:5	BioLegend, San Diego, USA
α-T-Zell-Rezeptor- γδ-PE	11F2	1:5	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Material und

Tab. 3: Antikörper für die Imaging Zytometrie

α – anti, AF – Alexa Fluor, FITC – Fluoresceinisothiocyanat, FWP – FACS- Waschpuffer, PE – Phycoerythrin

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
α-CD63-PE	MEM-259	1:2 in Perm/Wash-Puffer	Abcam, Cambridge, USA
α-CD8a- <i>Brilliant Violet 421</i>	RPA-T8	1:10 in FWP	BioLegend
α-Granulysin-PE	DH2	1:5 in Perm/Wash-Puffer	BioLegend
α-Granzym A-AF 488	CB9	1:5 in Perm Wash	BioLegend
α-Granzym B-FITC	GB11	1:10 in Perm/Wash-Puffer	BioLegend
IgG1-AF 488	MOPC-21	1:5 in Perm/Wash-Puffer	BioLegend
IgG1-PE	203	1:5 in FWP	Immunotools
IgG2b-AF488	MPC-11	1:5 in Perm Wash-Puffer	BioLegend
α-CD107a (LAMP1)-FITC	H4A3	1:75 in Perm/Wash-Puffer	BioLegend
α-CD107a (LAMP1)-PE	H4A3	1:120 in FWP	BioLegend
α-Perforin-AF488	dG9	1:20 in Perm/Wash-Puffer	BioLegend
α-T-Zellrezeptor-Vδ2-VioBlue®	REA771	1:10 in FWP	Miltenyi Biotec

Vitalfarbstoff

LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dye Cell Stain Kit

Thermo Fisher Scientific

(1:2000 in PBS verdünnt)

3.1.2 Material für biochemische Untersuchungen

3.1.2.1 Anreicherung von Zellorganellen

Lysosomenextraktionskit

Sigma-Aldrich

Dilutionspuffer

(im Verhältnis 1:20 mit H₂O verdünnt)

60 %-Optipreplösung

2,3 M Sucrose

Extraktionspuffer

(im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt; zu 10 ml angesetztem Extraktionspuffer wurden 100 µl Proteaseinhibitoren hinzugefügt)

Proteaseinhibitoren p8340

Sigma-Aldrich

Material und

1 Molar Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

121,14 g Tris, 1 M	Merck
pH-Einstellung mit HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
1 l _{dd} H ₂ O	

NP40-Lysepuffer

10 ml Tris (pH 7,4), 1 M	
4,38 g NaCl	Merck
5 ml NP40	Fluka, Steinheim
5 ml EDTA (pH 8), 0,5 M	Merck
500 ml _{dd} H ₂ O	

Homogenisierungspuffer

42,788 g Sucrose, 250 mM	Merck
1,192 g Hepes (pH 7,3), 10 mM	Sigma-Aldrich
0,056 g EDTA, 0,3 mM	Merck
500 ml H ₂ O	

3.1.2.2 Proteinbestimmung (Bradford-Assay)

Coomassie-Protein-Assay-Reagenz	Thermo Fisher Scientific
---------------------------------	--------------------------

3.1.2.3 SDS-PAGE (Novex® Gele)

1× MES-Laupuffer

50 ml 20 × MES-Laupuffer	Novex® by life technologies
	Carlsbad, USA
950 ml _{dd} H ₂ O	

3 × Probenpuffer

20 ml Tris (pH 6,8), 1 M	
6 g Natriumdodecylsulat (SDS)	Serva
34 ml 87 % Glycerin	Carl Roth GmbH
5 ml β -Mercaptoethanol	Calbiochem
5 mg Bromphenolblau	Sigma-Aldrich

Material und

Molekulargewichtsstandard

Precision Plus Protein All Blue

Bio-Rad, Hercules, USA

Low Range Marker

Bio-Rad

3.1.2.4 Western-Blot

Transferpuffer

4 l H₂O

Merck

15,1 g Tris

72,1 g Glycin

Merck

1 l Methanol

Carl Roth GmbH

7,5 ml 10 % SDS

Merck

Ponceau-S

Sigma-Aldrich

10 × Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

121,14 g Tris, 100 mM

876,6 g NaCl, 1,5 M

Merck

10 l _{dd}H₂O

1 × TBS

2 l 10 × TBS

18 l _{dd}H₂O

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (TBST)

1 l 1 × TBS

500 µl Tween 20

Sigma-Aldrich

5 % BSA-Blockierlösung

100 ml Tris (pH 7,5), 1 M

8,76 g NaCl

Merck

10 ml 10 % Natriumazid (NaN₃) in H₂O

Merck

50 g BSA

Serva

1 l H₂O

Material und

5 % Milchpulver-Blockierlösung

0,5 g Milchpulver in TBST

Granovita GmbH, Heimertingen

Chemilumineszenz-Lösung

ECL™ *Western-Blotting Detection Reagents*

GE Healthcare, Life Sciences

Stripping-Lösung

200 ml 10 % SDS

Merck

62,5 ml Tris HCl (pH 6,8)

730,56 ml H₂O

6,94 ml β-Mercaptoethanol

Calbiochem

Aufbewahrungslösung für die Membranen

100 ml TBST

500 µl 10 % Natriumazid (NaN₃) in H₂O

Sigma

Tab. 4: Primärantikörper für *Western-Blot*

α – anti, PAK – polyklonaler Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung in TBST	Hersteller
α-Bip/Grp78	40/BiP	Maus	1:250	BD
α-CD26	D6D8K	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technologies, Danvers, US
α-COXIV	PAK	Kaninchen	1:1000	Abcam
α-FasL	G2474	Maus	1:500	BD
α-Granulysin	PAK	Ziege	1:1000	R&D systems, Minneapolis, USA
α-Granzym B	2C5/F5	Maus	1:1000	BD
α-LAMP1	25/LAMP1	Maus	1:2000	BD
α-MUNC13-4	EPR4914	Kaninchen	1:2000	Abcam
α-Rab11	PAK	Kaninchen	1:1000	Thermo Fisher Scientific
α-Rab7	Rab7-117	Maus	1:2500	Abcam
α-Syntaxin 11	PAK	Kaninchen	1:1000	Synaptic Systems, Göttingen
α-UNC18-2	PAK	Kaninchen	1:1000	Bio Rad GmbH, Heidelberg

Material und

Tab. 5: Sekundärantikörper (verdünnt in TBST)

α – anti, HRP – Meerrettichperoxidase

Antikörper	Verdünnung in TBST	Hersteller
α-Maus-HRP	1:7500	GE Healthcare
α-Kaninchen-HRP	1:5000	GE Healthcare
α-Ziege-HRP	1:30000	Abcam

3.1.2.5 Immunpräzipitation

Protein-G-Beads Invitrogen™, Rockford, USA

α-Granulysin (PAK, Ziege) R&D Systems

3.1.3 Geräte

Blot-System Mini Trans-Blot ® Cell	Bio-Rad
Brutschrank HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD
Ein- und Zwölfkanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Chicago, USA
Entwicklungsmaschine CP 1000	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Gefriertruhe (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefriertruhe (-4 °C)	Liebherr
Gefriertruhe (-80 °C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Heizblock DB 3A	Techne, Staffordshire, UK
<i>Image Stream® X mkII</i>	Merck Milipore, Billerica, USA
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop Zeiss ID03	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt/M.
Photometer Smart SpecTM 3000	Bio-Rad
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Schüttelwasserbad	GFL®, Burgwedel

Material und

SDS-PAGE-System NuPage	Invitrogen™
Sterilbank HeraeusTM LaminAir ® HB2472K	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf AG
Vortex Genie-2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage Scout II	Ohaus® Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Wipptisch	Fröbel Labortechnik, Lindau
XL-80 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Zellhomogenisator	EMBL, Heidelberg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG
Zentrifuge HeraeusTM Biofuge 15R	Heraeus
Zentrifuge HeraeusTM Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge HeraeusTM Varifuge 3.0R	Heraeus

3.1.3.1 Verbrauchsmaterial

Deckgläschchen	Thermo Fisher Scientific
Flachbodenplatte (96 Well)	Thermo Fisher Scientific
Handschuhe Nitril	Ansell, Yarra City, Australien
Kanüle (27 G 3/4 0,4 x 19 mm)	Becton Dickinson
Nitrocellulosemembran (ProteanTM 0,2 µm)	Franklin Lakes, USA
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele	GE Healthcare, Life Sciences
Parafilm	Life Technologies
Pasteurpipetten	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen	Karl Hecht GmbH und Co KG
Reagenzgläser (0,6 ml, FACS-Messröhrchen)	Sondheim/ Rhön
Reaktionsgefäße (1 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific
Röntgenfilm	Sarstedt
Serologische Pipetten	Greiner bio-one,
Spektrometer-Küvetten	Kremsmünster, Österreich
Spitzbodenplatte (96 Well)	GE Healthcare, Life Sciences
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Greiner bio-one
	Sarstedt
	Thermo Fisher Scientific
	Becton Dickinson,

Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter
Vernichtungsbeutel	Sarstedt
Whatman-Papier	GE Healthcare, Life Sciences
Zellkulturflaschen (650 ml, 200 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturplatte (24 Well)	Greiner bio-one
Zellkulturschale (100 × 20 mm)	Corning, New York, USA
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt
Zubehör für SDS-PAGE	Bio-Rad

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Untersuchungen

3.2.1.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen

Zur Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des UKSH bereitgestellte Lymphozytenkonzentrate verwendet (Ethik-Votum D485/14). Diese wurden zunächst in einer Zellkulturflasche mit PBS auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht (Verhältnis 1:4), dann auf vier 50 ml-Röhrchen aufgeteilt und mit 13 ml Ficoll unterschichtet. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt (2000 Umdrehungen pro Minute (rpm), 20 min, Raumtemperatur (RT), ohne Bremse) wurden die zellulären Bestandteile des Lymphozytenkonzentrats aufgetrennt: Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen setzten sich im Sediment ab, Lymphozyten und Monozyten im Interphase-Ring. Dieser wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die auf diese Weise isolierten PBMCs wurden in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten in je 50 ml PBS gewaschen (1600 rpm, 5 min, RT; 1000 rpm, 10 min, RT; 1400 rpm, 5 min, RT), wobei nach jedem Waschschritt der Überstand dekantiert und die Zellen in PBS resuspendiert wurden. Nach dem letzten Waschschritt wurden die PBMCs in 5 %- oder 10 %-FCS-Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellaktivität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung verdünnt (je nach erwarteter Zellzahl im Verhältnis 1:10 oder 1:4) und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Gezählt wurden die Zellen aus zwei bis vier Teilquadranten und die Zellzahl pro Milliliter mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \div \text{Anzahl gezählter Teilquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

Material und

Da tote Zellen auf Grund ihrer Membrandurchlässigkeit selektiv mit Trypanblau-Lösung angefärbt werden können, konnte neben der Zellzahl auch die Zellvitalität bestimmt werden.

3.2.1.3 Expansion von $\alpha\beta$ -T-Zellen

Um bei den isolierten PBMCs das Wachstum von $\alpha\beta$ -T-Zellen zu fördern, wurden diese entweder mit Phytohämagglutinin (PHA) oder *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A (SEA) stimuliert.

Zur Gewinnung sog. PHA-Blasten wurden die Zellen in 10 %-FCS-Zellkulturmedium auf 10^6 /ml eingestellt und 0,5 μ g/ml PHA hinzugefügt.

Alternativ wurden die isolierten Lymphozyten erneut zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), das Sediment in 1 ml 10 %-FCS-Zellkulturmedium aufgenommen, in eine 24 Well Zellkulturplatte überführt und 5 μ l SEA (Einsatzkonzentration 0,5 μ g/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden nun für 1 Stunde (h) im Brutschrank bei 37 °C mit SEA stimuliert. Anschließend wurde die Vorkultur in eine Zellkulturflasche überführt, die Zellen mit 10 %-FCS-Zellkulturmedium auf eine Dichte von 10^6 Zellen/ml verdünnt und rIL-2 (Einsatzkonzentration 100 IU/ml) hinzugefügt.

Nach sechs Tagen erfolgte bei PHA- und SEA-aktivierten T-Zellblasten eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, um die stimulierten T-Lymphozyten von toten Zellen zu separieren. Die PHA-Blasten bzw. SEA-Zellen wurden erneut auf 10^6 /ml eingestellt und rIL-2 (Einsatzkonzentration 100 IU/ml) hinzugefügt.

3.2.1.4 Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Zur Stimulation des Wachstums von $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die isolierten PBMCs mit 10 %-FCS-Zellkulturmedium auf $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt und Zoledronat (Einsatzkonzentration 2,5 mM) sowie rIL-2 (Einsatzkonzentration 50 IU/ml) hinzugefügt.

3.2.1.5 Auftauen und Restimulation von T-Zellklonen und -linien

30×10^6 in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen des T-Zellklons A37/10 bzw. der T-Zelllinie KCD8 wurden aufgetaut und in 20 %-FCS-Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in 10 %-FCS-Kulturmedium gewaschen (1400 rpm, 5 min, RT), auf 10^6 /ml eingestellt und restimuliert. Die Restimulation erfolgte mit einem sog. *Feeder-Cocktail*. Dieser enthielt 30×10^6 mit 40 Gray (Gy) bestrahlte periphere mononukleäre Blutzellen, jeweils $1,5 \times 10^6$ ebenfalls bestrahlte (70 Gy) Zellen der EBV-transformierte B-Zelllinien EBV-O oder EBV-W sowie 5 μ g/ml PHA und 500 IU/ml rIL-2. Dieser *Feeder-Cocktail* wurde im Verhältnis 1:10 auf die aufgetauten T-Zellen gegeben. Fünf Tage nach Restimulation wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, um die restimulierten Zellen von den im Feeder-

Material und

Cocktail enthaltenen Zellen zu separieren. Die Zellen konnten nach Restimulation 21 Tage kultiviert werden.

3.2.1.6 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die PHA-Blasten und SEA-Zellen wurden nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation am Tag sechs alle zwei bis drei Tage versorgt: das Zellkulturmedium wurde abzentrifugiert (1400 rpm, 5min, RT) und verworfen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen (10⁶/ml) in neuem 10 %-FCS-Zellkulturmedium sowie rIL-2 (Einsatzkonzentration 100 IU/ml) aufgenommen.

Die mit Zoledronat stimulierten Zellen wurden ebenfalls alle zwei bis drei Tage gezählt, jedoch ohne diese zu zentrifugieren. Danach wurde neues 10 %-FCS-Zellkulturmedium ergänzt bis die Zellen erneut auf 1,5 × 10⁶/ml eingestellt waren und rIL-2 (Einsatzkonzentration 50 IU/ml) hinzugefügt.

Auch die T-Zellklone/-linien A37/10 und KCD8 wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation alle zwei bis drei Tage versorgt: sie wurden zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT) und der Überstand (10 %-FCS-Zellkulturmedium) aufbewahrt. Dann wurden die Zellen gezählt und mit dem aufbewahrten und frischen 10 %-FCS-Zellkulturmedium im Verhältnis 1:2 auf 10⁶/ml eingestellt. Abschließend wurde rIL-2 (Einsatzkonzentration 50 IU/ml) hinzugefügt.

Alle Zellen wurden 14 bis 17 Tage kultiviert. Die PHA-Blasten und SEA-Zellen wurden an Tag sieben und Tag 13 bis 15, die mit Zoledronat stimulierten Zellen zwischen Tag 14 und 16 (unmittelbar vor den folgenden Experimenten) mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert. Die T-Zellklone/-linien A37/10 und KCD8 wurden im Anschluss an die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation phänotypisiert.

3.2.1.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression von Oberflächenantigenen durch Anfärben der Zellen mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Hierzu wurden zunächst 100.000-200.000 Zellen in eine 96 Well Spitzbodenplatte überführt und für 2 min mit 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen (1000 rpm, 4 °C). Nachfolgend wurden die Zellen für 20 min mit 10 µl Antikörper-Lösung (Antikörper verdünnt in FACS-Waschpuffer) bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit 150 µl FACS-Waschpuffer (1000 rpm, 2 min, 4°C) wurden die gefärbten Zellen zur Fixierung in 100 µl 1 %-PFA-Lösung aufgenommen, in ein 0,6 ml-Reagenzglas

Material und

überführt und mit Parafilm abgedeckt. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (FACS CaliburTM).

3.2.1.8 *Imaging Zytometrie*

Die *Imaging Zytometrie* ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Analyse einzelner Zellen in hohem Durchsatz und vereint somit die Vorteile von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.

Die Zellen wurden auf $1-1,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und in eine 96 *Well* Spitzbodenplatte überführt. Nach einem Waschschritt mit PBS (1000 rpm, 2 min, 4 °C) wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C im Dunkeln mit 100 µl Vitalfarbstoff inkubiert, um tote Zellen anzufärben. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS und nachfolgend mit FACS-Waschpuffer (1000 rpm, 2 min, 4 °C), wurden die Zellen für weitere 20 min bei 4 °C im Dunkeln entweder mit 10 µl α-CD8- oder α-Vδ2-Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit FACS-Waschpuffer (1000 rpm, 2 min, 4 °C) wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C im Dunkeln mit Cytofix/Cytoperm fixiert und permeabilisiert und danach einmal mit *Perm/Wash* gewaschen (1000 rpm, 2 min, 4 °C). Zum Anfärben von Oberflächenproteinen erfolgte stattdessen eine Aufnahme in FACS-Waschpuffer. Im Anschluss wurden verschiedene Proteine angefärbt. Hierzu wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C mit 10 µl des jeweiligen Antikörpers inkubiert, welcher für intrazelluläre Färbungen in *Perm/Wash*, für Oberflächenfärbungen in FACS-Waschpuffer aufgenommen worden war. Anschließend wurden die Zellen einmal mit *Perm/Wash* (Zellen mit angefärbten Oberflächenproteinen mit FACS-Waschpuffer) und einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen (1000 rpm, 2 min, 4 °C). Um die Zellen für die anschließende Messung zu fixieren, wurden diese in 40 µl 1 % PFA aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Messung erfolgte am *Image Stream ® X mkII*, wobei pro Färbung je 5000 Zellen bei geringer Fließgeschwindigkeit aufgenommen und mit 60-facher Vergrößerung visualisiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *IDEAS®-Software*.

3.2.1.9 *Stimulation von T-Zellen*

Um den zeitlichen Verlauf der Oberflächenexpression membranständiger Proteine und der Degranulation zytotoxischer Effektorproteine zu untersuchen, wurden die T-Zelllinie KCD8 und der T-Zellklon A37/10 verwendet. Zunächst wurden die Zellen auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt, in eine 96 *Well* Flachbodenplatte überführt und stimuliert. Pro Stimulationsansatz wurden 180.000 Zellen verwendet. Die Stimulation erfolgte mit 20 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin für 10, 30, 60, 120 und 180 min bei 37 °C. Nach 180 min wurden die Zellen in eine 96 *Well* Spitzbodenplatte überführt und die Stimulation durch Zentrifugation bei 4 °C abgestoppt (1000 rpm, 2 min). Nachfolgend wurden verschiedene Oberflächen- und intrazelluläre Proteine

Material und

angefärbt (siehe 3.2.1.8) und die Zellen mittels *Imaging* Zytometrie analysiert, wobei ein Vergleich mit unstimulierten Zellen erfolgte.

Darüber hinaus wurde die Degranulation von Effektorproteinen in $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Hierzu wurden pro Ansatz mindestens 15×10^6 Zellen verwendet, die in 10 ml mit 1 % Penicillin/Streptomycin und rIL-2 (Einsatzkonzentration 50 IU/ml) versetztem X-VivoTM-Medium aufgenommen wurden und für 3 h bei 37 °C wie folgt stimuliert wurden:

20 ng/ml TPA (ggf. 5 μ M Latrunculin A)

20 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin (ggf. 5 μ M Latrunculin A)

20 ng/ml TPA, 500 ng/ml Ionomycin, 4 mM EGTA und 4 mM Magnesiumchlorid

Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach Ende der Stimulation wurden die Überstände und Zellen der einzelnen Stimulationsansätze separat abgenommen. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.2.2.1), die Überstände zentrifugiert (2 x 1600 rpm, 5 min, RT). Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation (siehe 3.2.2.7) der Überstände.

3.2.2 Biochemische Untersuchungen

3.2.2.1 Lyse von Zellen

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen für 20 min auf Eis in 1 % NP40-Lysepuffer lysiert und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand (das Lysat) wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.2 Anreicherung von Zellorganellen

Um aus SEA- bzw. PHA-expandierten T-Zellen die Zellorganellen (insbesondere die sekretorischen Lysosomen) anzureichern, wurden mindestens 500×10^6 Zellen verwendet. Als Kontrolle wurde zunächst ein Gesamtzell-Lysat von 2×10^6 Zellen mit NP40-Lysepuffer hergestellt (siehe Abschnitt 3.2.2.1) und bei -20 °C eingefroren. Die übrigen Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen (1400 rpm, 5 min, RT) und das Zellsediment in Extraktionspuffer (2,7-faches Volumen des Zellsediments) aufgenommen. Danach wurde die Zellmembran mit Hilfe eines Zellhomogenisators mechanisch zerstört, um intakte Organellen freizusetzen. Das auf diese Art gewonnene Gesamtzell-Lysat (*whole cell lysate*, WCL) enthielt neben den intakten Organellen auch verbliebene intakte Zellen sowie Zelltrümmer und Zellkerne. 50 μ l WCL wurden als Kontrolle abgenommen und bei -20°C eingefroren. Um die Organellen zu isolieren, wurde das WCL zentrifugiert (3400 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Das Sediment aus diesem Zentrifugationsschritt (sog. *crude lysosomal fraction*, CLF) enthielt die intakten Organellen. Die CLF wurde mit Extraktionspuffer auf ein Volumen von 505 μ l gebracht, wobei 50 μ l als Kontrolle abgenommen

Material und

und bei -20 °C eingefroren wurden. Die isolierten Organellen wurden nachfolgend mittels Dichtegradientenzentrifugation in der Ultrazentrifuge fraktioniert. Dafür wurden Lösungen (siehe Tab. 6) unterschiedlicher Dichte angesetzt und wie folgt in speziellen Ultrazentrifugen-Röhrchen geschichtet:

1. 500 µl 27%-Optiprep-Lösung
2. 800 µl 22,5%-Optiprep-Lösung
3. 900 µl Probe (455 µl CLF, 288 µl 60 %-Optiprep-Lösung, 156,5 µl Dilutionspuffer)
4. 900 µl 12 %-Optiprep-Lösung
5. 900 µl 8 %-Optiprep-Lösung
6. 1 %-Optiprep-Lösung (bis an den Rand des Röhrchens gefüllt)

Die Probe wurde zentrifugiert (XL-80 Ultrazentrifuge, SW60 Ti, 38.000 rpm (14.800 g), 5 h, 4 °C, ohne Bremse). Hierbei wurden die intakten Organellen in fünf Fraktionen ihrer Dichte entsprechend aufgetrennt. Die Interphasen wurden abgenommen und in je ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und zentrifugiert (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Anschließend wurden die Sedimente in 50 µl ddH_2O aufgenommen und die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Tab. 6: Ansatz für 10 ml Optiprep-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

Endkonzentration (%)	60 %-Optiprep-Lösung (ml)	Dilutionspuffer (ml)	2,3 M Sucrose (ml)
27	4,5	4,9	0,6
22,5	3,75	5,63	0,62
12	2	7,29	0,71
8	1,33	7,9	0,77
1	0,17	8,94	0,89

3.2.2.3 Proteinbestimmung (Bradford-Assay)

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Assay. Hierzu wurden 5 µl der Proben mit 995 µl Coomassie-Protein-Assay-Reagenz gemischt. Nach 10 min Inkubation wurden die Proben in spezielle Küvetten überführt und die Proteinkonzentration (in mg/ml) bei 595 nm photometrisch ermittelt. Als Referenz diente der jeweilige für die Proben verwendete Puffer (z.B. NP40-Lysepuffer für Zelllysate, Extraktionspuffer für das WCL und die CLF, H_2O für die jeweiligen Fraktionen).

3.2.2.4 SDS-PAGE (Novex ® Gele)

Die SDS-PAGE dient der Auf trennung eines Proteingemisches nach Molekulargewicht in einem elektrischen Feld.

Material und

Hierzu wurden je Probe 5 µg Protein verwendet und mit ddH_2O auf ein definiertes Volumen aufgefüllt (abhängig von der Größe der Taschen im verwendeten Gel). Nach Zugabe von 3 × Probenpuffer wurden die Proben bei 95 °C für 5 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren und ggf. zu reduzieren. Die Proben sowie die Molekulargewichtsstandards (5 µl *All Blue Marker*, 8 µl *Low Marker*) wurden auf ein Gel mit diskontinuierlichem Acrylamidgradienten (4-12 % Acrylamid) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 × MES-Laupuffer bei 200 V für etwa 50 min.

3.2.2.5 Western-Blot

Der *Western-Blot* dient der Übertragung der zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, um diese in nachfolgenden Schritten nachweisen zu können. Das Gel aus der SDS-PAGE und die Nitrozellulosemembran wurden zunächst zwischen zwei Faserschwämme und je zwei *Whatman*-Papiere, die zuvor in Transferpuffer equilibriert wurden, in eine Blot-Kassette eingespannt. Anschließend erfolgte der *Western-Blot* in Transferpuffer bei 100 V für 1 h unter Eiskühlung. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran mit ddH_2O gespült und in Ponceau-S inkubiert, um die Proteine reversibel anzufärben und die Proteinbeladung zu dokumentieren. Anschließend wurde die Membran mit 1 × TBS entfärbt und freie Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % BSA- oder 5 % Milchpulver-Blockierlösung blockiert (1 h, RT). Die Membran wurde nun über Nacht bei 4 °C in Primärantikörper in TBST inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 × 10 min in TBST gewaschen und anschließend für 1 h (bei RT) mit HRP-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (3 × 10 min in TBST) wurde die Membran für 1 min in Chemilumineszenz-Detektionslösung geschwenkt. Dann erfolgte der Proteinnachweis durch Belichtung eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer.

3.2.2.6 Strichen von Membranen

Zur wiederholten Färbung einer gegebenen Membran wurden zuvor verwendete Primär- und Sekundärantikörper entfernt. Hierzu wurde die Membran zunächst 10 min in TBST gewaschen und dann für 20 min bei 56 °C in *Stripping*-Lösung inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte (3 × 10 min in TBST) und eine anschließende Inkubation in 5 %- BSA-Blockierlösung für 20 min bevor die Membran mit einem weiteren Primärantikörper gemäß Standardprotokoll inkubiert wurde.

3.2.2.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Anreicherung einzelner Proteine/Antigene aus einem Proteingemisch mit Hilfe von Antikörper-bindenden *Protein-G-Beads*. Hierzu wurden den

Material und

jeweiligen Proben 60 µl Protein-G-*Beads* sowie 1 µg Antikörper hinzugefügt. Die Proben rotierten über Nacht bei 4 °C. Nachfolgend wurden die Protein-G-*Beads* samt gebundenem Antikörper-Antigen-Komplex mittels Zentrifugation (*Quick Spin*) vom Überstand separiert und dreimal mit 500 µl NP40-Lysepuffer sowie zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Die Protein-G-*Beads* wurden nun mit einer Kanüle (27 G) trocken gesaugt und in 3 × Probenpuffer aufgenommen. Dann wurden die Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die präzipitierten Proteine von den Protein-G-*Beads* zu separieren. Abschließend erfolgten SDS-PAGE und *Western-Blot* nach Standardprotokoll (siehe 3.2.2.4 und 3.2.2.5).

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypisierung der verwendeten Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden durchflusszytometrisch phänotypisiert. Untersucht wurde hierbei die Oberflächenexpression charakteristischer Markerproteine. In Abbildung 6 ist exemplarisch je eine Phänotypisierung für Zoledronat- bzw. SEA- und PHA-expandierte Zellen sowie für den T-Zellklon A37/10 und die T-Zelllinie KCD8 dargestellt. Alle verwendeten Zellen exprimierten CD2, einen T- und NK-Zellmarker, und CD3, einen Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes, auf ihrer Zelloberfläche. Wie zu erwarten konnten der B-Zellmarker CD19 sowie CD14, ein auf Monozyten und Makrophagen exprimiertes Oberflächenprotein, nicht nachgewiesen werden. Sowohl der T-Zellklon A37/10 und die T-Zelllinie KCD8 als auch die SEA- und PHA-expandierten T-Zellen konnten als $\alpha\beta$ -T-Zellen identifiziert werden. Der T-Zellklon A37/10 war CD4-positiv, die T-Zelllinie KCD8 hingegen CD8-positiv. Die SEA- und PHA-expandierten T-Zellen unterscheiden sich nicht im Anteil CD8-positiver Zellen. Die mit Zoledronat-expandierten T-Zellen konnten als $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden. Der NK-Zell-Marker CD56 konnte nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse

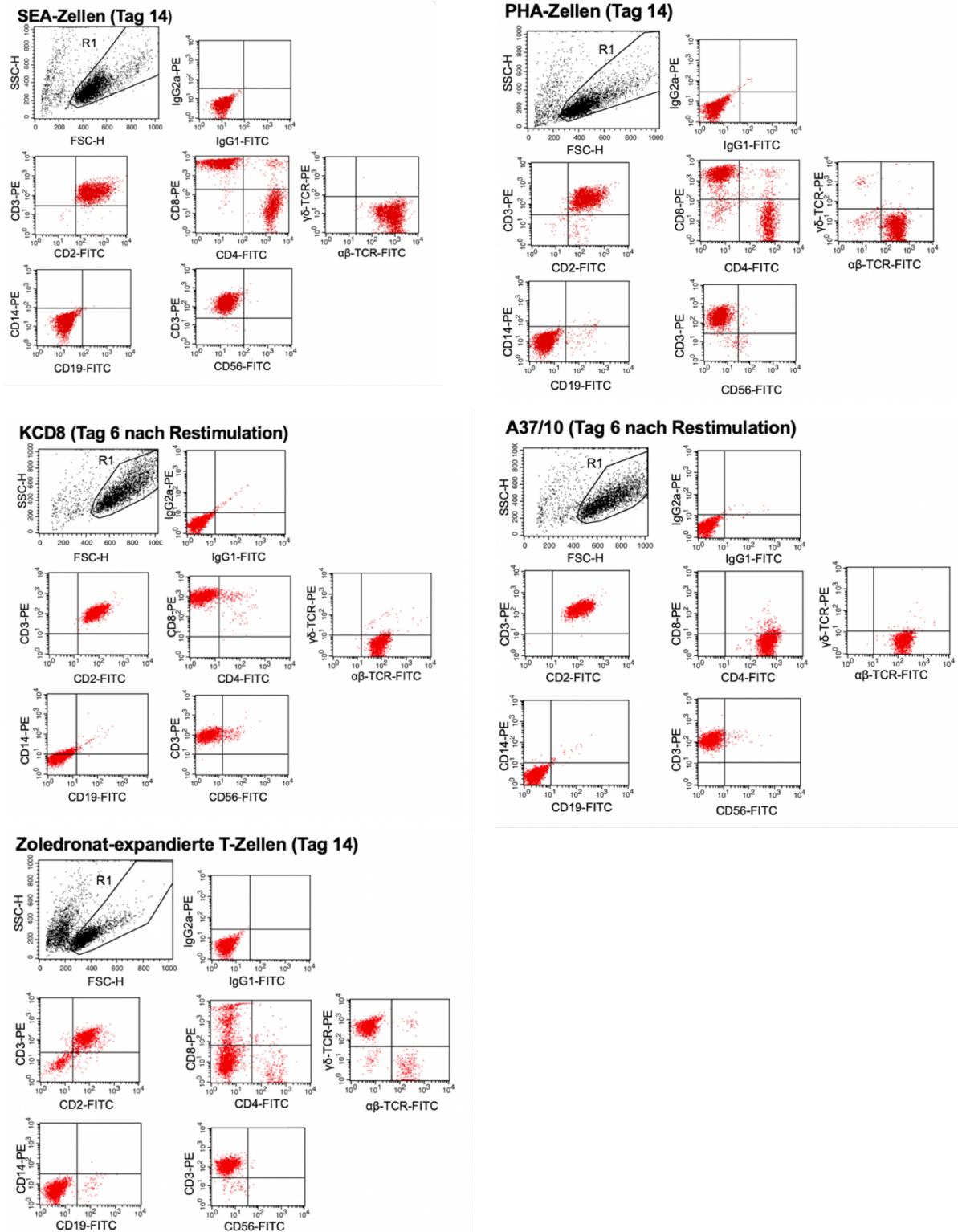


Abbildung 6: Phänotypisierung der verwendeten Zellen. TCR - T-Zell-Rezeptor. CD - Cluster of Differentiation. Pro Färbung wurden 10.000 vitale Lymphozyten analysiert, die im *Forward Scatter (FSC)-Side Scatter (SSC)-dotplot* auf Grundlage ihrer Größe und Granularität identifiziert wurden (Region (R) 1). Je Probe wurde eine Doppelfärbung mit einem Phycoerythrin (PE)- und einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjuguierten Antikörper durchgeführt, die in den entsprechenden *dot plots* gegeneinander aufgetragen sind. Zum Ausschluss unspezifischer Hintergrundsignale dient die jeweils oben rechts gezeigte Isotypkontrolle.

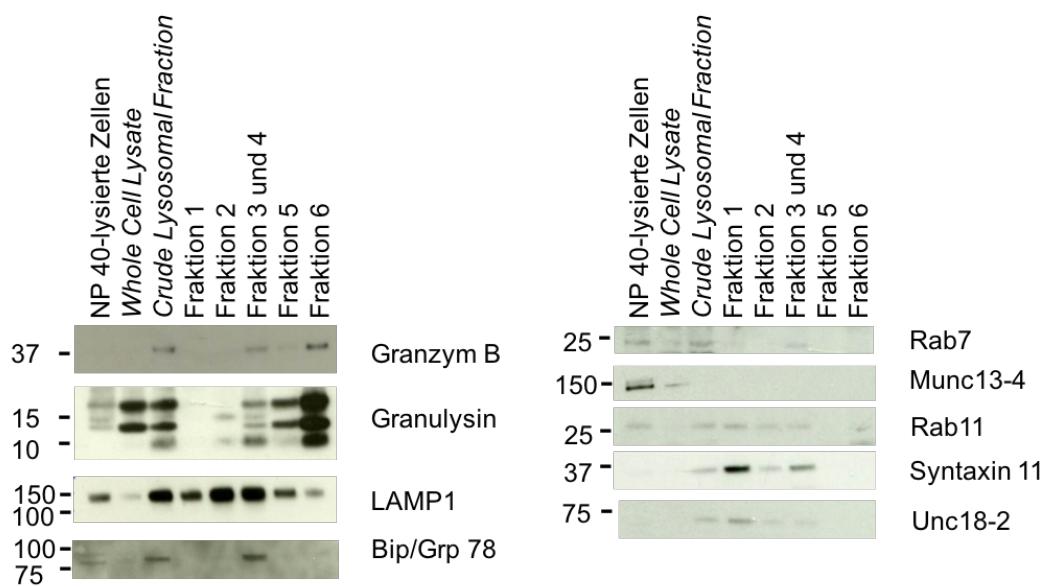
4.2 Assoziation verschiedener Transportproteine mit Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln

Da in dieser Arbeit das Augenmerk auf der Untersuchung der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung zytotoxischer Effektorproteine, insbesondere von Granulysin, lag, sollte zunächst die Assoziation Lysosomen-verwandter Effektorvesikel (LREV), in welchen zytotoxische Effektorproteine gespeichert sind, mit unterschiedlichen am vesikulären Transport beteiligten Proteinen untersucht werden. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass es in T-Zellen zwei unterschiedliche Entitäten von LREV gibt, die sich hinsichtlich ihrer Dichte, Granularität und Proteinbeladung unterscheiden und aufgrund ihrer Auftrennung in der Dichtegradientenzentrifugation auch als Fraktion 2- und Fraktion 6-Vesikel bezeichnet werden. Es ist bekannt, dass die Transportproteine Munc13-4, Unc18-2, Rab7 und 11 sowie Syntaxin 11 beim Transport der LREV zur Zellmembran eine Rolle spielen. Hier sollte nun geklärt werden, ob eine direkte Assoziation dieser Transportproteine mit den LREV besteht und ob sich unterschiedliche LREV in ihrer Assoziation mit Transportproteinen unterscheiden.

Dazu wurden aus SEA und PHA-expandierten T-Zellen zunächst die Zellorganellen extrahiert und anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Nach der Zentrifugation konnten 5 Fraktionen unterschiedlicher Dichte als Fraktionen gewonnen werden, welche jeweils charakteristische Zellorganellen enthielten. In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe wurden in der Dichtegradientenzentrifugation insgesamt 6 Fraktionen gewonnen. Fraktion 3 und 4 sind in dieser Arbeit zu einer zusammengefasst (sog. Fraktion 3 + 4). Zunächst wurde die korrekte Auftrennung der Probe in die einzelnen Fraktionen überprüft, indem für bestimmte Fraktionen charakteristische Proteine angefärbt wurden. So sollte Bip/Grp78 als Marker für das endoplasmatische Retikulum in der Fraktion 3 + 4 detektiert werden können, während CD107a (LAMP1) nach den biochemischen Vorbefunden eher als Bestandteil der Membran der LREV in Fraktion 2 galt und das zytotoxische Effektorprotein Granzym B in den Fraktion 6-Vesikeln zu finden ist. COX IV ist als Mitochondrien-Marker in Fraktion 5 zu finden. Nachdem eine korrekte Auftrennung der Probe bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 7), wurde nun untersucht, ob Proteine, die an vesikulären Transportprozessen beteiligt sind, in Fraktion 2 oder Fraktion 6 nachweisbar sind. Während Munc13-4 keine direkte Assoziation mit Fraktion 2 oder 6 zeigt und Rab7 nur einmalig und in schwacher Intensität in Fraktion 6 ausgemacht werden konnte (siehe Abbildung 7B), können Unc18-2, Syntaxin 11 und Rab11 in den weniger dichten Fraktionen 1 und 2 detektiert werden, nicht aber in Fraktion 6. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass dem Transport der beiden LREV unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Ergebnisse

A:



B:

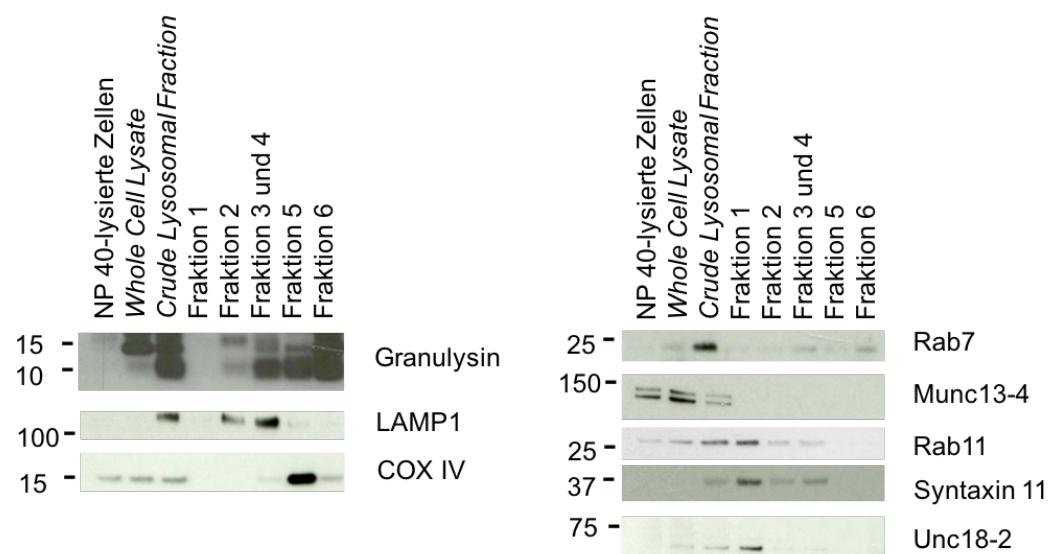


Abbildung 7: Assoziation von Marker-, Effektor- und Transportproteinen mit Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln. A: Es wurden $1,2 \times 10^9$ SEA-expandierte T-Zellen (Tag 15) verwendet. Der Anteil CD8-positiver Zellen betrug 56 %. Als Kontrolle dienten NP 40-lysierte Zellen, das Whole Cell Lysate (WCL) sowie die Crude Lysosomal Fraction (CLF). Pro Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen, außer bei den NP 40-lysierten Zellen (1,9 µg) und bei Fraktion 5 (1,05 µg). Der Proteinnachweis erfolgte im Falle von Granzym B, Munc13-4, Rab7, Bip/Grp78 und LAMP1 mittels monoklonaler Antikörper, im Falle von Granulysin, Rab11, Syntaxin 11 und Unc18-2 mittels polyklonaler Antikörper. Es wurden zwei Gele verwendet, wobei die Membranen vor jedem neuen Proteinnachweis gestript wurden. Granzym B, Munc13-4 und Rab7 wurden auf dem ersten Blot detektiert, alle weiteren hier aufgezeigten Proteine auf dem zweiten Blot. **B:** Es wurden $0,975 \times 10^9$ SEA-expandierte T-Zellen (Tag 13) verwendet. Der Anteil CD8-positiver Zellen betrug 67,25 %. Pro Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen. Der Proteinnachweis von COX IV erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper. Es wurden 3 Gele verwendet, wobei die Membranen vor jedem Proteinnachweis gestript wurden. Der Nachweis von MUNC13-4 erfolgte auf dem ersten Blot, der von Granulysin, LAMP1, Syntaxin 11 und Rab7 auf dem zweiten Blot. Alle weiteren Proteine wurden auf dem dritten Blot detektiert.

4.3 Verteilung von 9 kDa und 15 kDa Granulysin auf die Lysosomen-verwandten Effektorvesikel

Für das zytotoxische Effektorprotein Granulysin sind zwei unterschiedliche Formen, eine 9 kDa und eine 15 kDa große, bekannt, deren Speicherung in unterschiedlichen LREV zytotoxischer T-Zellen in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden sollte. Da der verwendete polyklonale α -Granulysin-Antikörper im *Western-Blot* eine Vielzahl unspezifischer Banden erzeugt, wurde zur Identifizierung der spezifischen Banden zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt, in welcher beide Granulysin-Formen gezielt angereichert wurden und im Vergleich mit Gesamtzelllysat ohne durchgeführte Immunpräzipitation als spezifische Granulysin-Banden identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 8). Anhand dieser Immunpräzipitation konnte nach Durchführen einer Lysosomenextraktion (vgl. 4.2) mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation verifiziert werden, dass das 15 kDa Granulysin ausschließlich in den Fraktion 2-Vesikeln/Sekretorischen Lysosomen vorhanden ist, während das 9 kDa Granulysin in den Fraktion 6-Vesikeln/Dichten Granula vorliegt (siehe Abbildung 7).

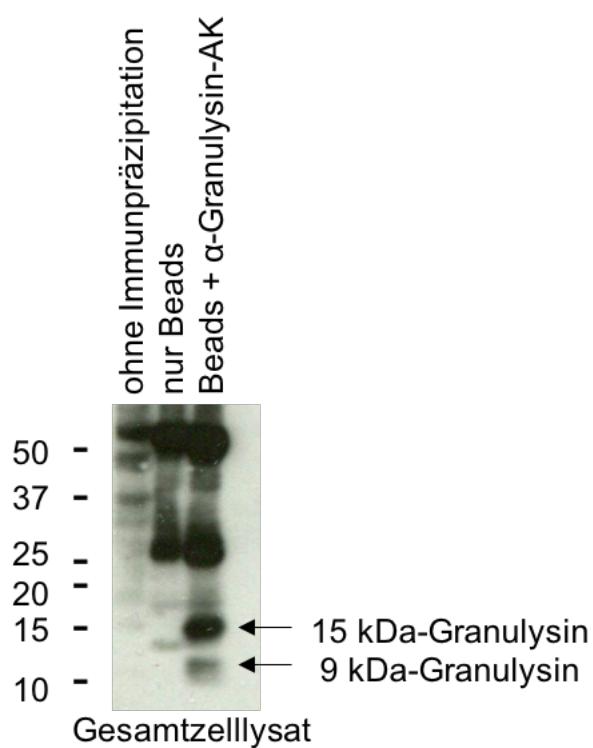


Abbildung 8:Granulysin-Immunpräzipitation. Insgesamt wurden 325×10^6 PHA-expandierte Zellen (Tag 17) verwendet, welche in NP40-Lysepuffer lysiert wurden. Zur Immunpräzipitation (IP) wurde 1 ml des Zelllysats mit, 50 μ l Protein-G-Beads und 2 μ g polyklonalem anti-Granulysin-Antikörper versetzt. Als Kontrolle dienten 5 μ g Gesamtzelllysat und ein Präzipitat von Protein-G-Beads ohne Antikörper. Der *Western-Blot* wurde mit dem auch für die IP verwendeten polyklonalen α -Granulysin-Antikörper entwickelt.

4.4 Nachweis intrazellulärer Effektor- und lysosomaler Markerproteine

Die Expression ausgewählter Effektor und lysosomaler Markerproteine wurde in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen via *Imaging Zytometrie* analysiert. Vorarbeiten hatten ergeben, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen unter anderem relativ große Mengen an Granulysin speichern, dessen aktivierungs-abhängige Mobilisierung in nachfolgenden Experimenten untersucht werden sollte. In Abbildung 9 sind exemplarisch die *Gating*-Strategien aufgeführt, durch welche die in die Auswertung mit einbezogenen Zellen definiert wurden. So wurden bei der Auswertung nur fokussierte, einzelne, vitale, V δ 2- bzw. in einem Experiment auch CD8-positive Zellen berücksichtigt.

Ergebnisse

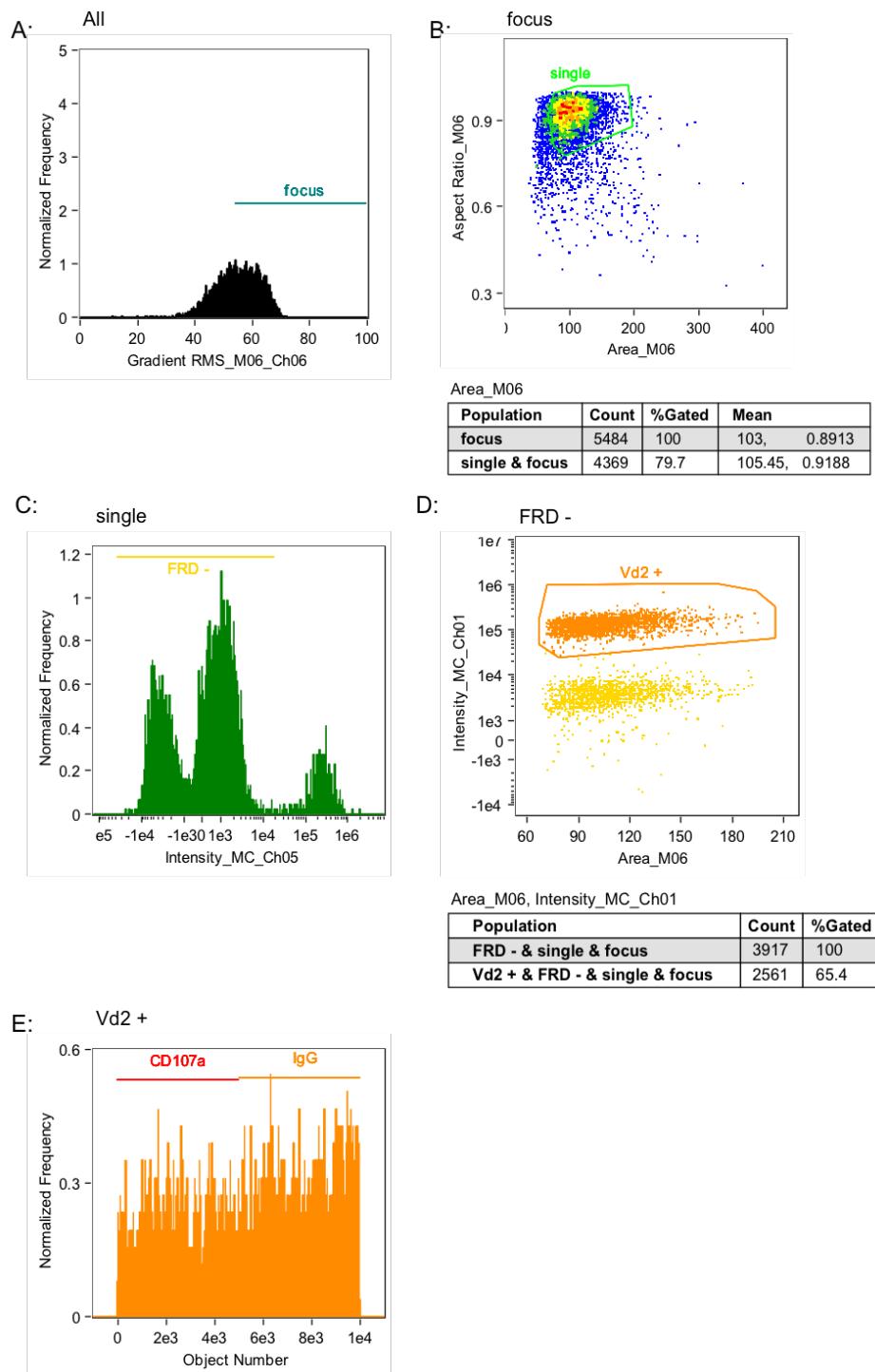


Abbildung 9: Gating-Strategien zur Ermittlung der Expressionslevel ausgewählter Effektor- und Markerproteine in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Nicht vitale Zellen wurden zunächst mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)* angefärbt. Anschließend wurde eine Oberflächenfärbung mit einem Antikörper gegen den $V\delta 2$ -T-Zellrezeptor bzw. in einem Experiment auch gegen CD8 durchgeführt. Zuletzt wurden intrazellulär ausgewählte Effektor- und lysosomale Markerproteine angefärbt. 5.000 Zellen wurden mit einem *Imaging* Zytometer aufgenommen. Es wurden nur Zellen analysiert, die folgende Kriterien erfüllten: **A:** fokussiert (*focused cells*, beurteilt auf Grundlage des *gradient root mean square* im Durchlichtkanal) **B:** als Einzelzelle erfasst (*single cells* beurteilt auf Grundlage des *gradient root mean square* im Durchlichtkanal) **C:** vital (*FRD-negative Zellen*) **D:** $V\delta 2$ -positiv bzw. in einem Experiment auch CD8-positiv **E:** In Zellen, die alle definierten Kriterien erfüllten, wurde nun die Expression der verschiedenen Proteine in Relation zur Färbung mit der Isotypkontrolle (Bsp. CD107a) untersucht.

Ergebnisse

Nach dem *Gating* wurde bei den ausgewählten Zellen die Verteilung von CD63, CD107a, Granulysin, Granzym A, Granzym B und Perforin untersucht. Hierzu wurde zunächst die Fluoreszenzintensität der spezifisch angefärbten Zellen mit entsprechenden Isotypkontrollen verglichen. Daraus wurde der prozentuale Anteil an positiven Zellen bestimmt. Außerdem konnte mit Hilfe des *Intensity Feature* die Fluoreszenzintensität in den für das jeweilige Protein positiven Zellen quantifiziert werden (Abbildung 10-15). Darüber hinaus wurde über die *Bright Detail Intensity Features* analysiert, ob das Fluoreszenzsignal von distinkten Foci innerhalb der Zelle ausgeht oder ob es sich diffus über die gesamte Zelle erstreckte. Die *Bright Detail Intensity* errechnet die Fluoreszenzintensität lokalisierter, hell-leuchtender Spots innerhalb einer Zelle unter Abzug des umgebenden Hintergrunds. Dabei gilt, je höher die *Bright Detail Intensity* desto distinkter die Lokalisation innerhalb der Zelle. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität, der *Bright Detail Intensity* und der prozentuale Anteil aller für das jeweilige Effektor- bzw. Markerprotein positiven Zellen aus vier Experimenten graphisch zusammengefasst. Da die Intensitäten der unterschiedlichen Färbungen nicht miteinander vergleichbar sind, wurden für die *Bright Detail Intensity* und die Fluoreszenzintensität für jedes angefärbte Effektor- bzw. Markerprotein separate Graphen verwendet (siehe Abbildung 16B und C). In einem der Experimente wurde nicht nur die Expression in V δ 2-positiven Zellen, sondern auch die in CD8-positiven Zellen untersucht. Im Folgenden wird die Expression aller untersuchten Effektor- und lysosomalen Markerproteine näher betrachtet und jeweils am Beispiel eines Experiments exemplarisch dargestellt.

4.4.1 CD107 (LAMP1)

CD107a (LAMP1) ist in der Membran unterschiedlicher Lysosomen vorhanden. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abbildung 10A) zeigte, dass es intrazellulär mit zahlreichen granulären Strukturen assoziiert ist. Dies wurde auch durch die hohe *Bright Detail Intensity* veranschaulicht, die im gezeigten Experiment aus Abbildung 10E im Mittel bei 27.271,75 und im Mittel aus allen vier durchgeführten Experimenten noch deutlich höher (bei 46.528,9) lag (siehe Abbildung 16). Im hier gezeigten Experiment waren 85,6 % der ausgewerteten Zellen CD107a-positiv (Abbildung 10C). Der Anteil CD107a-positiver Zellen im Vergleich aller vier durchgeführten Experimente lag durchschnittlich bei 95,68 % (Abbildung 16A). Die Fluoreszenzintensität lag im Mittel aus allen vier Experimenten bei 256.029 (siehe Abbildung 16B). Es konnten keine nennenswerten Unterschiede im Anteil CD107a-positiver zwischen CD8- und V δ 2-positiven Zellen ausgemacht werden.

Ergebnisse

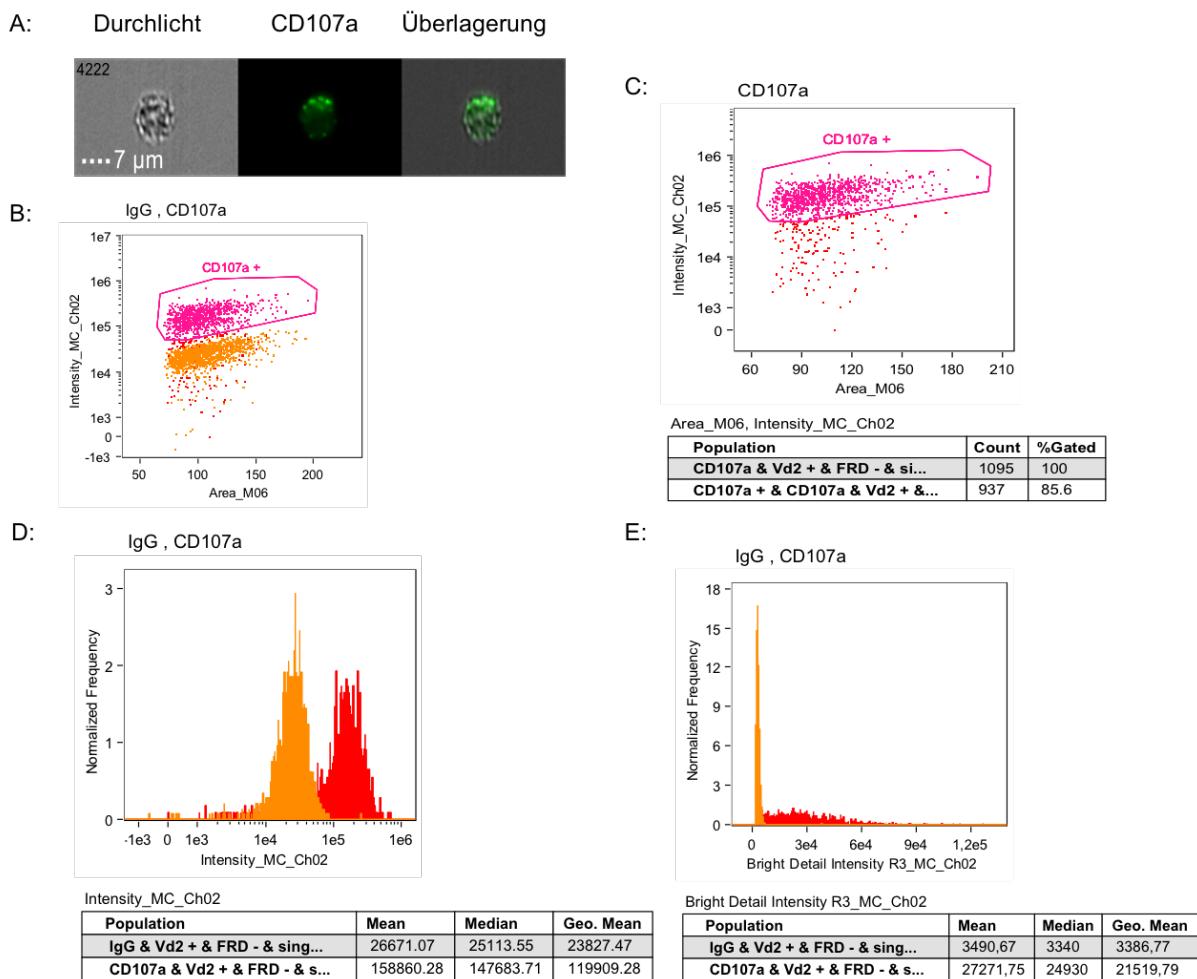


Abbildung 10: CD107a-Expression in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye* (FRD), einem Antikörper gegen den V δ 2-T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen CD107a bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, V δ 2-positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer CD107a-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der CD107a-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils CD107a-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil CD107a-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der CD107a-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** Bright Detail Intensity der CD107a-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

4.4.2 CD63

CD63, ist ebenfalls ein Lysosomen-assoziiertes integrales Membranprotein und ist entsprechend in distinkten Granula lokalisiert (siehe Abbildung 11A). Im vorgestellten Experiment waren 96,5 % der Zellen CD63-positiv (siehe Abbildung 11C), im Mittel aus allen durchgeführten Experimenten waren es 98,12 % (Abbildung 16A). Die Fluoreszenzintensität lag im Mittel bei 31.792,5, die Bright Detail Intensity bei 4596,61 (vergleiche Abbildung 16B und C). Auch im Anteil CD63-positiver Zellen waren keine Unterschiede zwischen CD8- und V δ 2-positiven Zellen erkennbar.

Ergebnisse

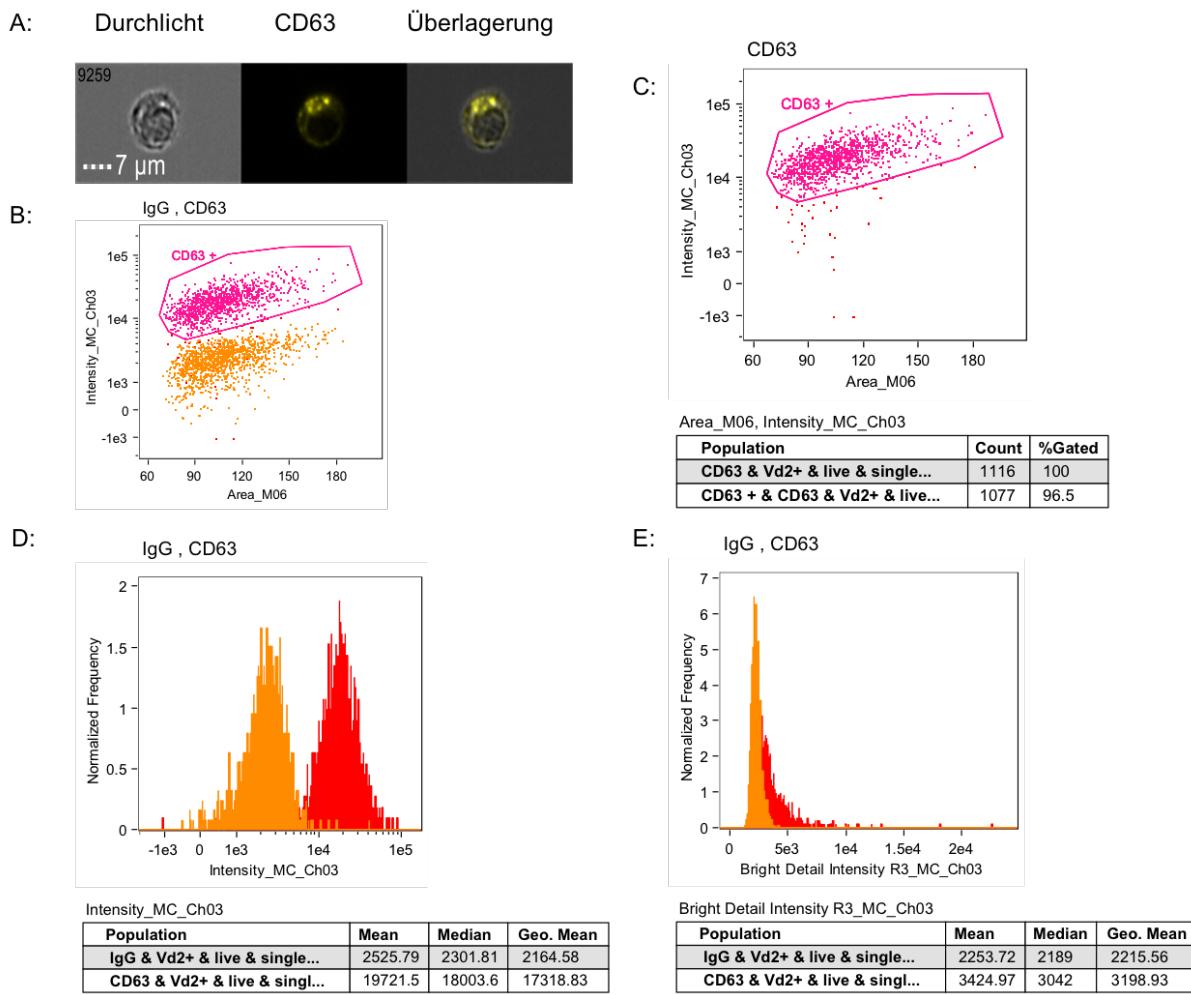


Abbildung 11: CD63-Expression in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)*, einem Antikörper gegen den V δ 2-T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen CD63 bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, V δ 2-positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer CD63-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der CD63-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils CD63-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil CD63-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der CD63-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** Bright Detail Intensity der CD63-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

4.4.3 Granulysin

Das zytotoxische Effektorprotein Granulysin liegt intrazellulär in distinkten Granula vor (siehe Abbildung 12A). Im vorliegenden Experiment waren 69,5 % der Zellen Granulysin-positiv. Im Mittel aus allen vier durchgeführten Experimenten lag der Anteil bei 76,4 %, wobei in zwei Experimenten deutlich höhere Anteile von über 80 % ermittelt werden konnten (siehe Abbildung 16A). Die Fluoreszenzintensität lag im Mittel aus allen vier Experimenten bei

Ergebnisse

87.694,6, die *Bright Detail Intensity* bei 14.167,3 (siehe Abbildung 16C). Der Anteil Granulysin-positiver Zellen in CD8-positiven Zellen betrug 75,2 %.

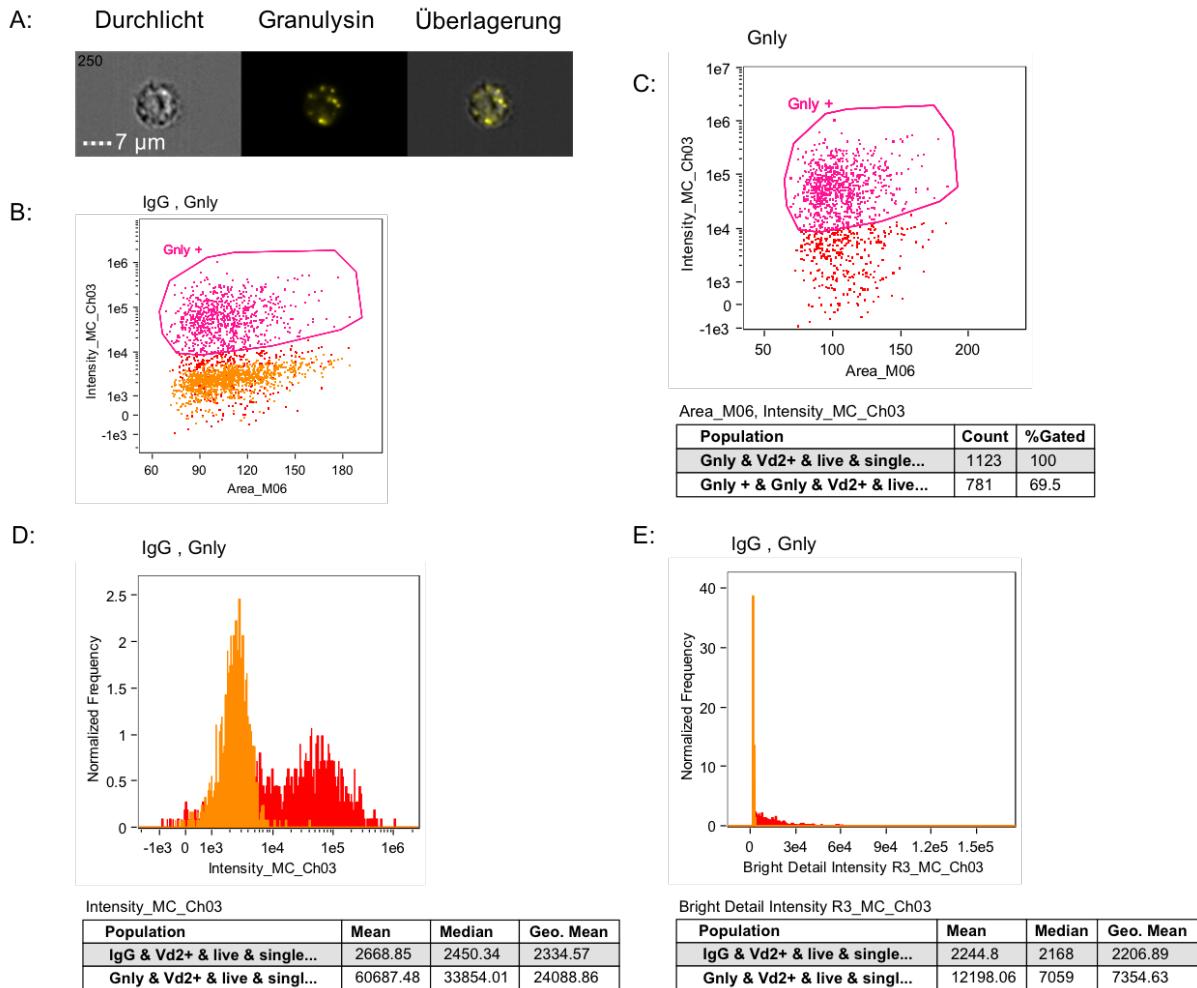


Abbildung 12: Granulysin-Expression in Zoledronat-expandierten γδ-T-Zellen. Zoledronat-expandierte γδ-T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)*, einem Antikörper gegen den Vδ2-T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen Granulysin bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, Vδ2-positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Granulysin-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der Granulysin-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils Granulysin-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil Granulysin-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der Granulysin-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** *Bright Detail Intensity* der Granulysin-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

4.4.4 Granzym A

Auch Granzym A, ebenfalls ein zytotoxisches Effektorprotein, wird in intrazellulären Granula gespeichert (siehe Abbildung 13A). Sowohl in der Fluoreszenzintensität als auch der *Bright Detail Intensity* zeigte sich eine breite Streuung der Werte zwischen den einzelnen Experimenten. Während in einem Experiment die Fluoreszenzintensität mit 159.296,12 und

Ergebnisse

die *Bright Detail Intensity* mit 38.278,61 unterhalb der Standardabweichung lag, lagen beide Werte in einem anderen Experiment deutlich oberhalb der Standardabweichung (siehe Abbildung 16B und C). Lediglich der Anteil Granzym A-positiver Zellen war in allen vier durchgeföhrten Experimenten ähnlich hoch (bei im Mittel 94,26 %, siehe Abbildung 16A).

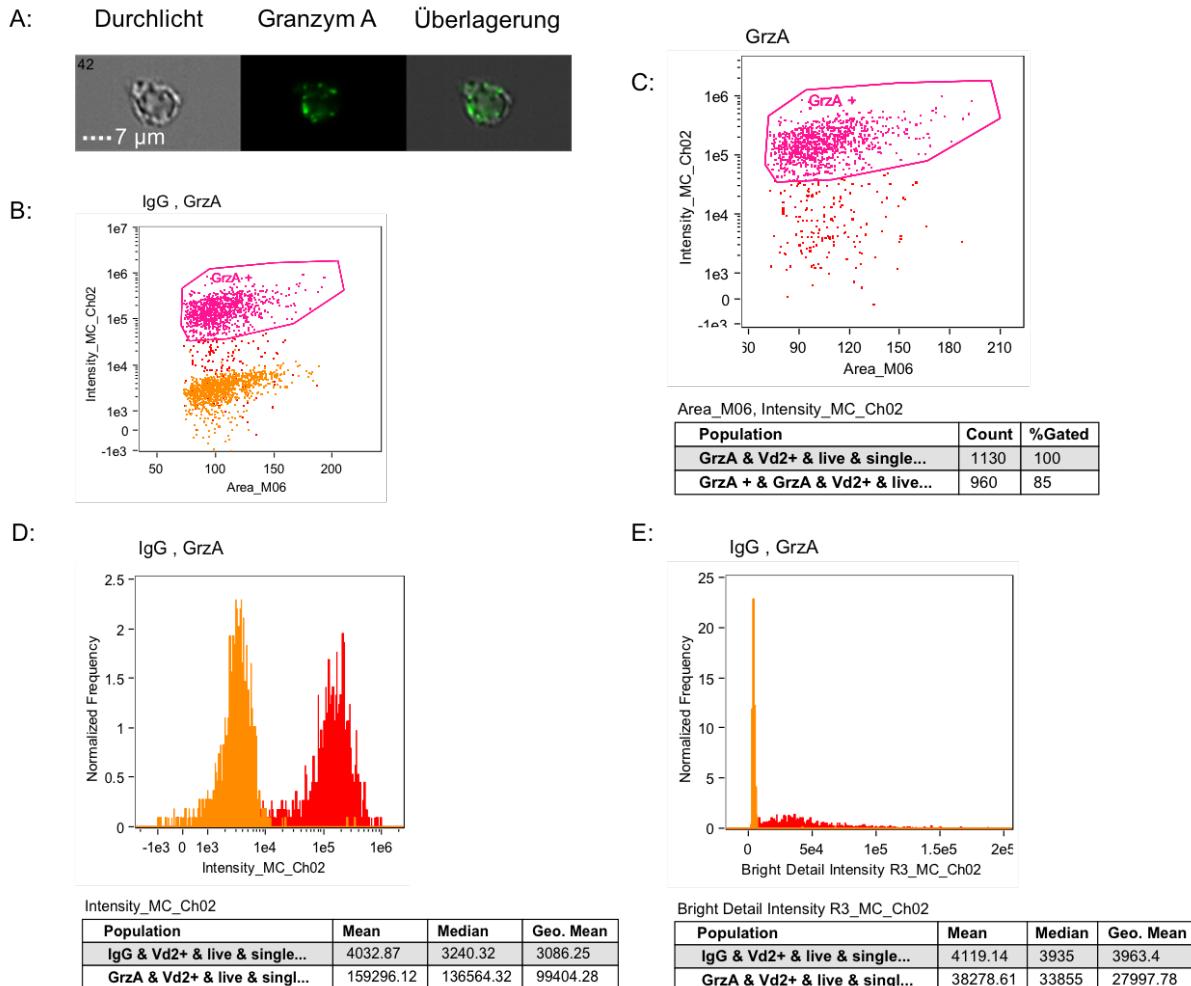


Abbildung 13: Granzym A-Expression in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)*, einem Antikörper gegen den V δ 2-T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen Granzym A bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, V δ 2-positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Granzym A-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der Granzym A-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils Granzym A-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil Granzym A-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der Granzym A-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** Bright Detail Intensity der Granzym A-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

4.4.5 Granzym B

Für Granzym B waren im Mittel 50,74 % der Zellen positiv, wobei es auch hier deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten gibt (siehe Abbildung 16A). In der in

Ergebnisse

Abbildung 14C dargestellten Analyse war der Anteil Granzym B-positiver Zellen mit 29,5 % eher niedrig, in einem weiteren Experiment lag er deutlich höher bei 75,5 %, wobei in diesem auch der Anteil Granzym B-positiver Zellen in CD8-positiven Zellen analysiert wurde. Dieser lag bei 46,9 %. Die Fluoreszenzintensität lag im Mittel aus allen durchgeführten Experimenten bei 88.968,8, die *Bright Detail Intensity* bei 11.548,8 (siehe Abbildung 16B und C).

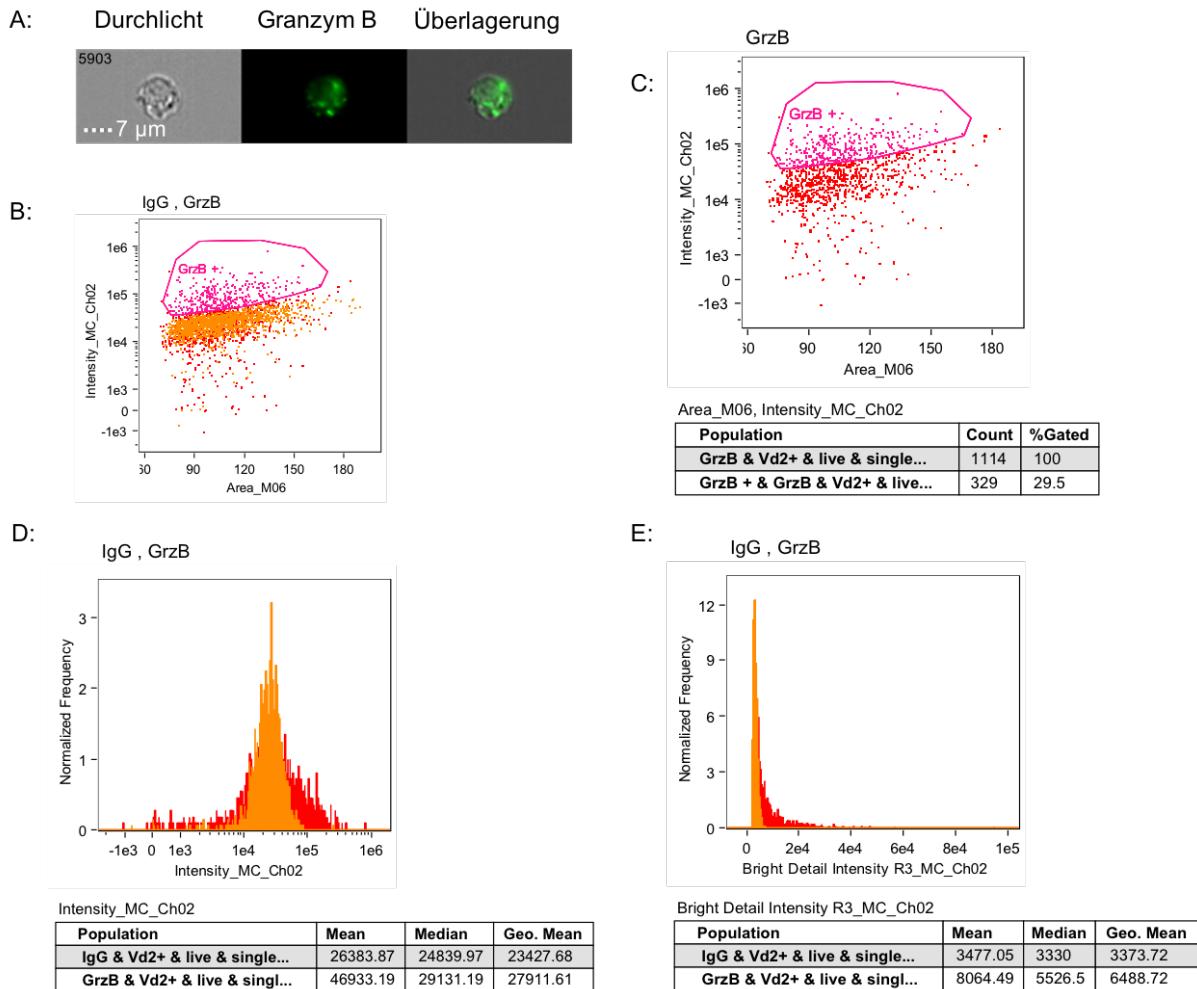


Abbildung 14: : Granzym B-Expression in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)*, einem Antikörper gegen den $V\delta 2$ -T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen Granzym B bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, $V\delta 2$ -positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Granzym B-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der Granzym B-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils Granzym B-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil Granzym B-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der Granzym B-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** *Bright Detail Intensity* der Granzym B-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

Ergebnisse

4.4.6 Perforin

Wie in Abbildung 15A dargestellt, wird auch Perforin in distinkten Granula gespeichert. In den durchgeföhrten Experimenten zeigen sich die Zellen hinsichtlich ihrer intrazellulären Perforin-Expression variabel. Im Experiment aus Abbildung 15 waren 44,6 % der Zellen Perforin-positiv, im Mittel aus allen Experimenten waren es über 64,18 % der Zellen (siehe Abbildung 16A). Im Experiment, in dem die Perforin-Expression in CD8- und V δ 2-postiven Zellen verglichen wurde, exprimierten 78,8 % der V δ 2-positiven Zellen Perforin und 37,5 % der CD8-positiven Zellen. Die Fluoreszenzintensität lag durchschnittlich bei 78.166,2, die der *Bright Detail Intensity* bei 15.718,5 (siehe Abbildung 16B und C).

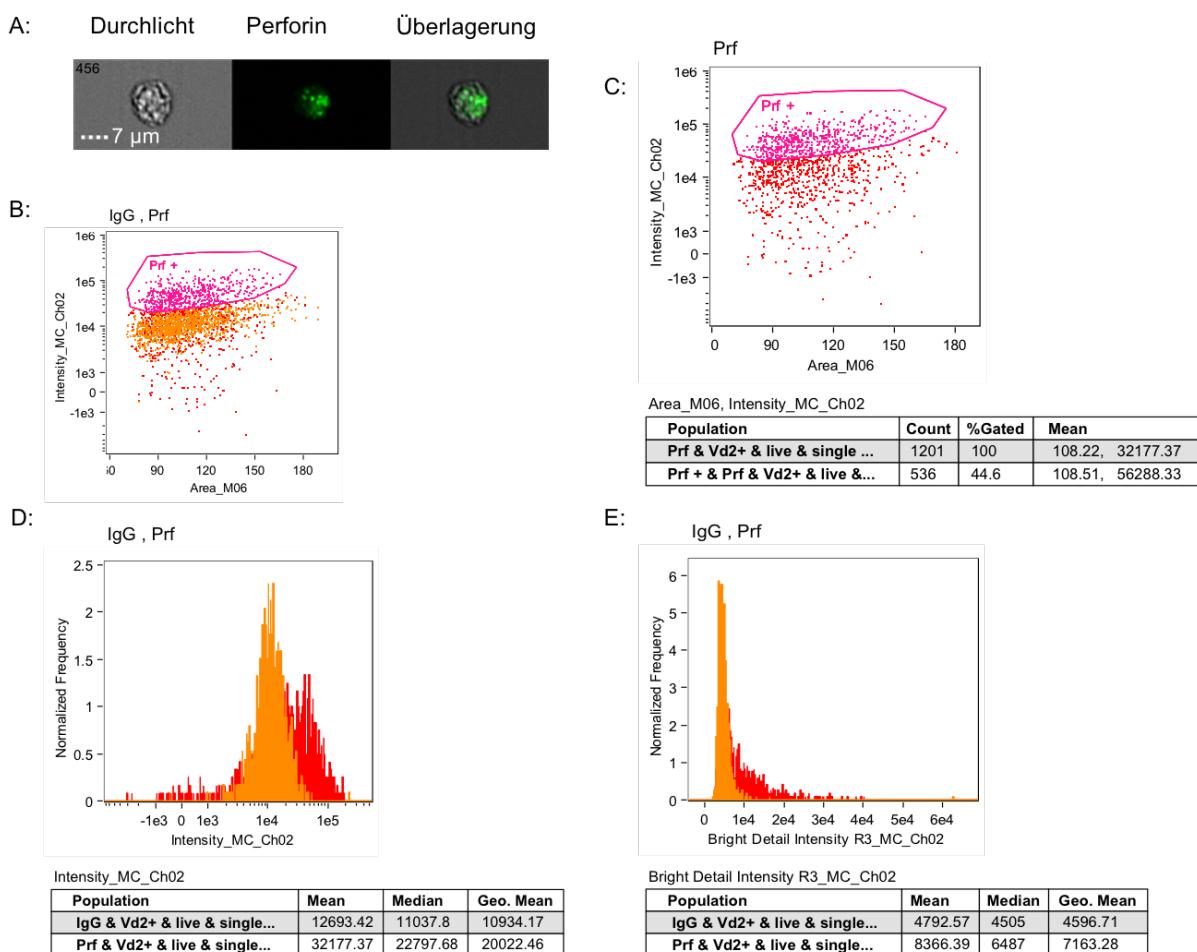


Abbildung 15: Perforin-Expression in Zoledronat-expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 10) wurden mit dem Vitalfarbstoff *Far Red Dye (FRD)*, einem Antikörper gegen den V δ 2-T-Zellrezeptor und nach Permeabilisierung mit einem Antikörper gegen Perforin bzw. einem geeigneten Isotyp-Kontrollantikörper gefärbt und anschließend analysiert. Pro Färbung wurden 5000 Zellen bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden ausschließlich fokussierte, vitale, V δ 2-positive Einzelzellen analysiert. **A:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Perforin-positiven Zelle. **B:** Fluoreszenzintensität der Perforin-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (orange) zur Beurteilung des Anteils Perforin-positiver Zellen (pink). **C:** Anteil Perforin-positiver Zellen. **D:** Fluoreszenzintensität der Perforin-gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange). **E:** *Bright Detail Intensity* der Perforin-positiven Zellen (rot) im Vergleich zur Isotypkontrolle (orange).

Ergebnisse

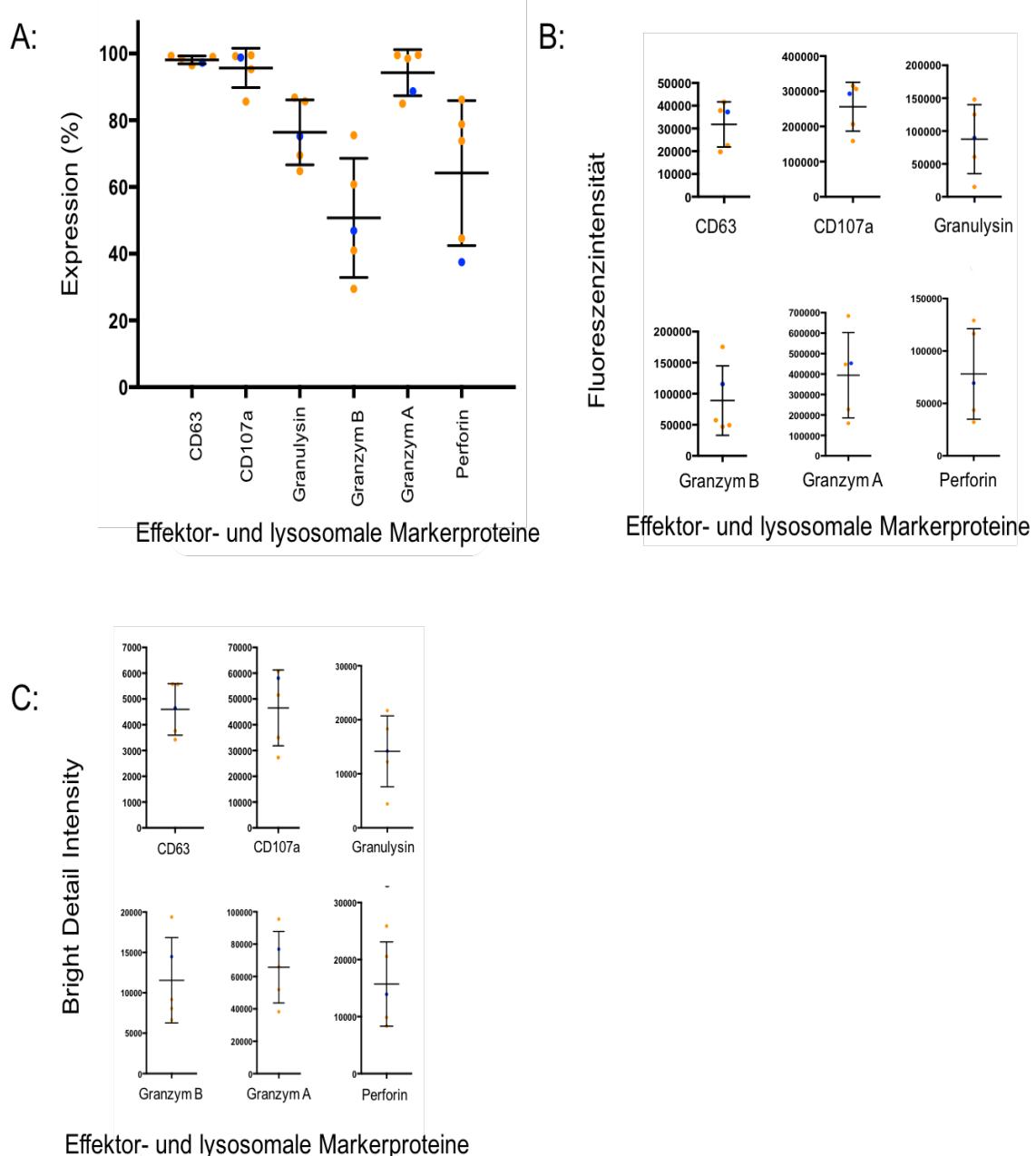


Abbildung 16: Übersicht über die Expressionslevel der untersuchten Proteine in $\gamma\delta$ -T-Zellen. Untersucht wurden insgesamt vier Zoledronat-expandierte $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen (zwischen Tag 10 und 15). In einem der Experimente wurde zusätzlich zur Expression der Effektor- und lysosomalen Markerproteine in V δ 2 (orange)- auch die in CD8-postiven Zellen (blau) untersucht. **A:** prozentualer Anteil der für das jeweilige Protein positiven Zellen **B:** Mittelwerte der Fluoreszenzintensität **C:** Mittelwerte der *Bright Detail Intensity* mitsamt dem jeweiligen Mittelwert aus allen vier Experimenten und der Standardabweichung.

4.5 Aktivierungs-abhängige Mobilisierung von Granulysin in $\gamma\delta$ -T-Zellen

Da in $\gamma\delta$ -T-Zellen eine hohe Expression von Granulysin nachgewiesen werden konnte, wurden diese zur näheren Untersuchung der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen (9 und 15 kDa) verwendet. Nachdem mittels Dichtegradientenzentrifugation die Speicherung der beiden Granulysin-Formen in zwei

Ergebnisse

unterschiedlichen Arten von LREV gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, inwieweit sich ihre Mobilisierung im Hinblick auf Stimuli und Transportmechanismen unterscheidet.

Hierzu wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen für bis zu 3 h mit TPA alleine oder TPA und Ionomycin stimuliert und zusätzlich mit Latrunculin A behandelt. In Vorarbeiten im Rahmen einer Masterarbeit war bereits gezeigt worden, dass der Phorbolester TPA über eine Aktivierung der Proteinkinase C zur Mobilisierung von FasL (aus Fraktion 2-Vesikeln) ausreicht, während Ionomycin und die resultierende Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} für die Mobilisierung der dichten (Fraktion 6) Granula notwendig ist. Latrunculin A hemmt das Zytoskelett, indem es die Aktin-Polymerisation zu Filamenten verhindert. Wie in Abbildung 17A zusammengefasst, war das 15 kDa Granulysin in höchster Intensität im Überstand von TPA-stimulierten Zellen nachweisbar, während das 9 kDa Granulysin in stärkster Intensität im Überstand der mit TPA und Ionomycin stimulierten Zellen detektiert wurde. Unter Zugabe von Latrunculin A verringerte sich die Intensität der Bande des 15 kDa Granulysins im Überstand unstimulierter und mit TPA stimulierter Zellen, wohingegen die des 9 kDa Granulysins nach Stimulation mit TPA und Ionomycin zunahm (vergleiche Abbildung 17B). Dieser Befund führt zu der Annahme, dass sich die beiden Granulysin-Formen nicht nur in ihrer aktivierungsabhängigen Mobilisierung unterscheiden, sondern dass auch ihr Transport über unterschiedliche Komponenten des Zytoskeletts reguliert wird.

Ergebnisse

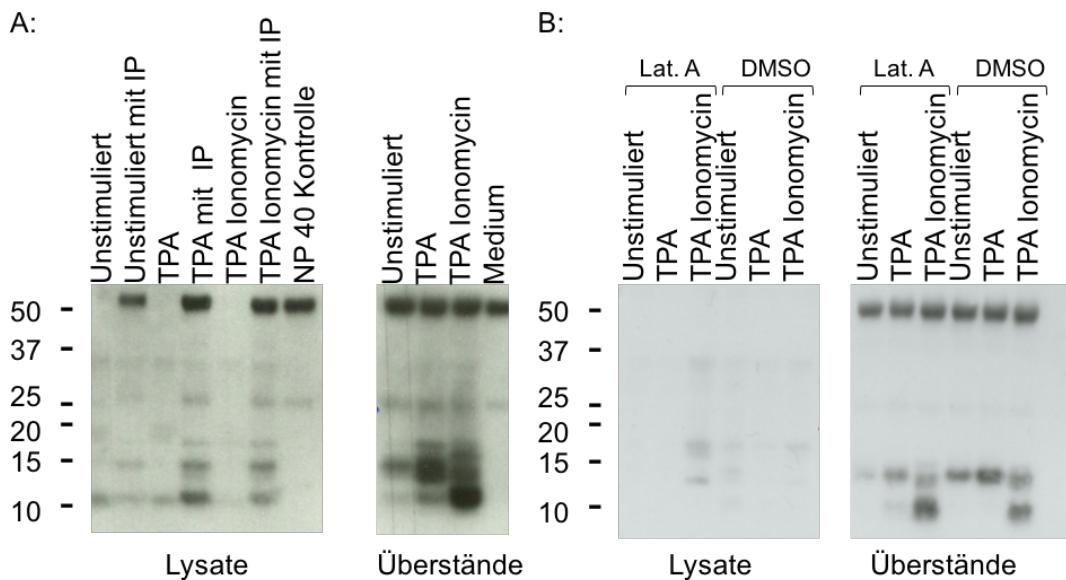


Abbildung 17: Aktivierungs-abhängige Mobilisierung von Granulysin nach Stimulation mit TPA und Ionomycin. **A:** $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 17) wurden für 3 h bei 37 °C mit 20 ng/ml TPA und/oder 500 ng/ml Ionomycin inkubiert. Pro Stimulationsansatz wurden 100×10^6 Zellen verwendet. Die Immunpräzipitation erfolgte unter Zugabe von 60 μ l Protein-G-Beads und 2 μ g polyklonalem anti-Granulysin-Antikörper. Als Kontrolle dienten Gesamtzelllysate der verschiedenen Stimulationsansätze, der zur Zelllyse verwendete NP 40-Lysepuffer sowie das während der Stimulation verwendete Medium X-Vivo™ 15. Pro Spur wurden 5 μ g Lysat aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem auch in der Immunpräzipitation verwendeten polyklonalen Antikörper gegen Granulysin. **B:** $\gamma\delta$ -T-Zellen (Tag 15) wurden in An- oder Abwesenheit von 5 μ M Latrunculin A für 2,5 h bei 37 °C mit 20 ng/ml TPA und gegebenenfalls zusätzlich 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Pro Stimulationsansatz wurden 22×10^6 Zellen verwendet. Die Immunpräzipitation aus den Überständen erfolgte unter Zugabe von 60 μ l Protein-G-Beads und 1 μ g polyklonalem anti-Granulysin-Antikörper. Als Kontrolle dienten Gesamtzelllysate der verschiedenen Stimulationsansätze. Pro Spur wurden 5 μ g Lysat aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem auch in der Immunpräzipitation verwendeten anti-Granulysin-Antikörper.

4.6 Kinetik der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granzym A und CD107a

Neben der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granulysin sollte auch die von Granzym A und CD107a näher untersucht werden. Hierzu wurde der CD4-positive T-Zellklon A37/10 für bis zu 3 h mit TPA und Ionomycin stimuliert und mittels *Imaging Zytometrie* analysiert. Es sollten Veränderungen in der Lokalisation und Expression von Granzym A und CD107a intrazellulär und auf der Zelloberfläche erfasst werden. Neben Veränderungen in der Fluoreszenzintensität konnte mithilfe des sog. *Spot Count Features* eine Zu- bzw. Abnahme von in intrazellulären Granula gespeichertem CD107a und Granzym A berechnet werden. Das *Spot Count Feature* zählt die Anzahl diskreter *Spots* mit hoher Fluoreszenzintensität und errechnet Mittelwerte für die Anzahl dieser *Spots* pro Zelle, wodurch es sich zur Quantifizierung von intrazellulären Granula eignet.

Granzym A konnte erwartungsgemäß nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18B). Es zeigte sich jedoch eine Veränderung der intrazellulären Expression über die Zeit. So lag der Median der *Spots* nach 10 min Stimulation mit TPA und Ionomycin

Ergebnisse

bei 5, nach 60 min bei 3 und nach 3 h Stimulation bei 1 (siehe Abbildung 18A, c)). Die Abnahme der *Spots* korreliert mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 18A, b)) über die Zeit und ist auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sichtbar (siehe Abbildung 18A, a)). Dies lässt darauf schließen, dass durch Stimulation mit TPA und Ionomycin eine Degranulation und Freisetzung von Granzym A erfolgt.

Die intrazelluläre Verteilung von CD107a zeigt über die Zeit kaum Veränderungen. Der Median der *Spots* pro Zelle liegt, wie in Abbildung 19A (c) erkennbar, über die gesamten 3 h Stimulation bei 6 oder 7, die intrazelluläre Fluoreszenzintensität nimmt innerhalb der ersten 60 min nach Stimulation lediglich leicht ab (siehe Abbildung 19A, b)). Jedoch zeigte sich auf der Zelloberfläche bereits nach einer Stunde eine deutliche Zunahme der Expression von CD107a. Diese Zunahme ist sowohl in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen als auch an der Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen (siehe Abbildung 19B). Nach 2 h Stimulationszeit erreicht die Oberflächenexpression von CD107a ein Maximum und beginnt dann wieder zu fallen.

Ergebnisse

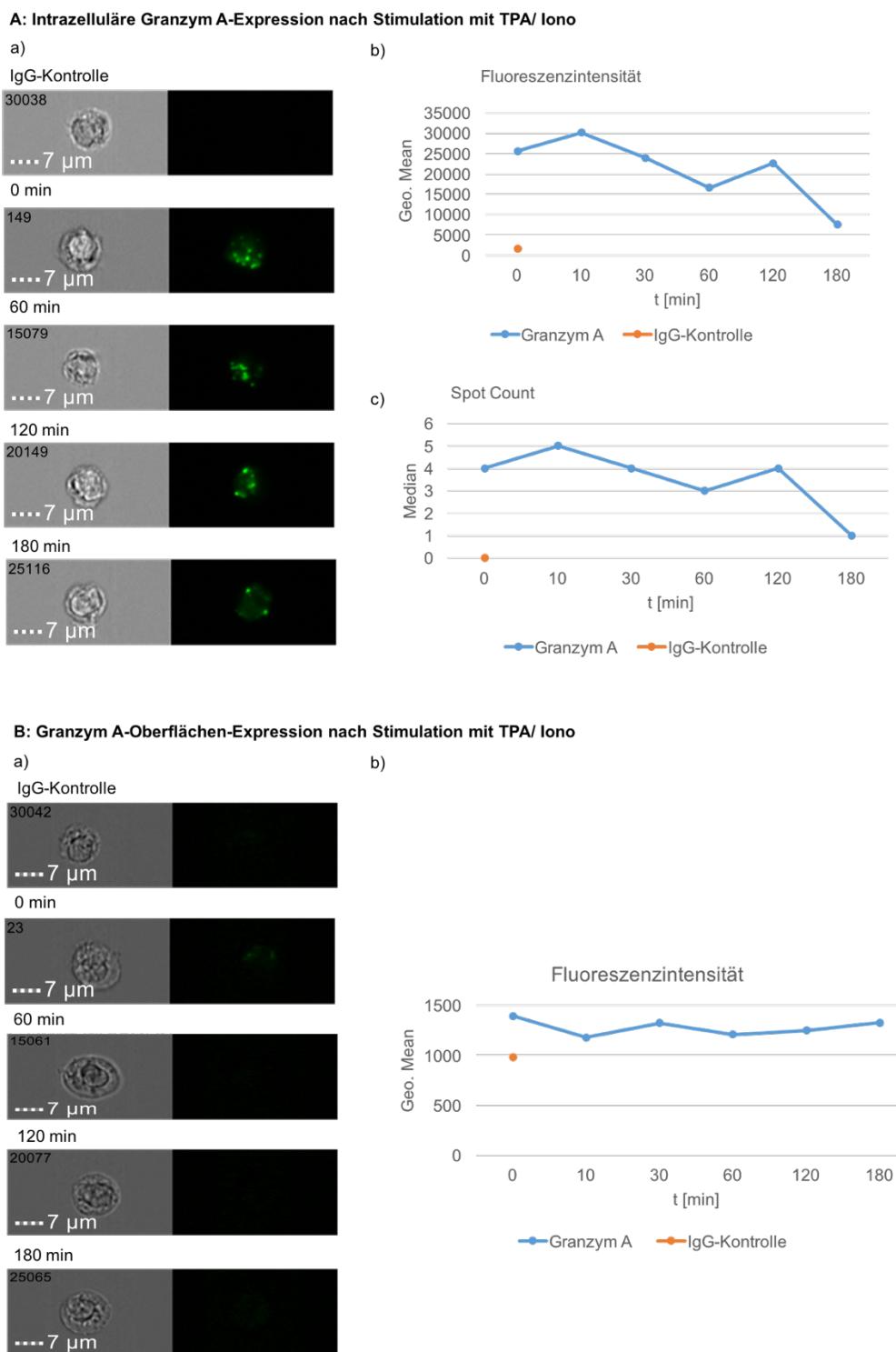
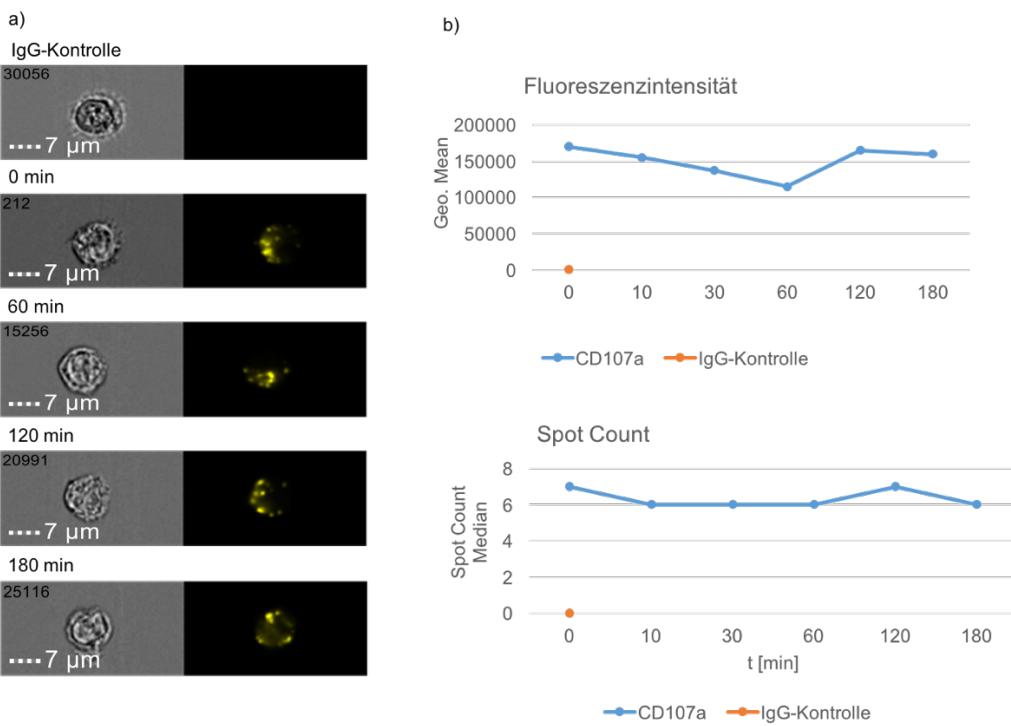


Abbildung 18: Oberflächen- und intrazelluläre Expression von Granzym A nach Stimulation mit TPA und Ionomycin. Verwendet wurde der CD4-positive T-Zellklon A37/10 (Tag 7 nach Restimulation). Die Zellen wurden für 10 min, 30 min, 60 min, 120 min und 3 h mit 20 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert und mit unstimulierten Zellen verglichen. Anschließend wurde Granzym A mit einem monoklonalen Antikörper intrazellulär und auf der Zelloberfläche angefärbt. **A:** a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in 60-facher Vergrößerung) der intrazellulären Granzym A-Verteilung nach Stimulation mit TPA und Ionomycin über einen Zeitraum von 3 h im Vergleich zur Isotypkontrolle. b) Verlauf des Geometrischen Mittels der intrazellulären Fluoreszenzintensität. c) Verlauf des Medians der mit dem Spot Count Feature errechneten Spots pro Zelle nach intrazellulärer Färbung. **B:** a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Oberflächenfärbung von Granzym A. b) Verlauf des Geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität nach Oberflächen-Färbung.

Ergebnisse

A: Intrazelluläre CD107a-Expression nach Stimulation mit TPA/ Iono



B: CD107a-Oberflächen-Expression nach Stimulation mit TPA/ Iono

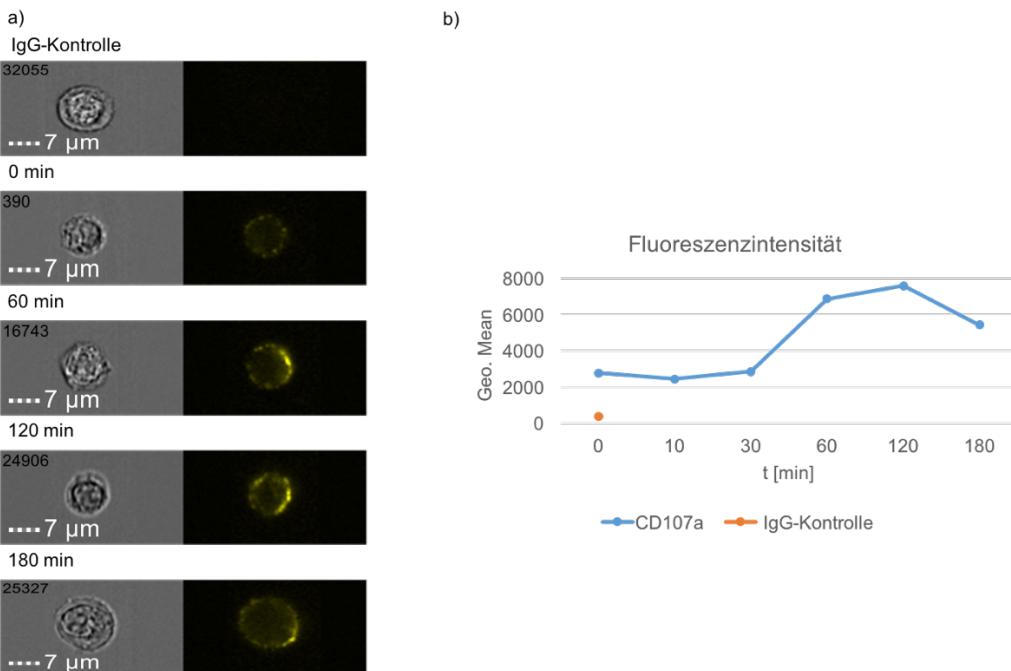


Abbildung 19: Oberflächen- und intrazelluläre Expression von CD107a nach Stimulation mit TPA und Ionomycin. Verwendet wurde der CD4-positive T-Zellklon A37/10 (Tag 7 nach Restimulation). Die Zellen wurden für 10 min, 30 min, 60 min, 120 min und 3 h mit 20 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert und mit unstimulierten Zellen verglichen. Anschließend wurde CD107a mit einem monoklonalen Antikörper intrazellulär und auf der Zelloberfläche angefärbt. **A:** a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in 60-facher Vergrößerung) der intrazellulären CD107a-Verteilung nach Stimulation mit TPA und Ionomycin über einen Zeitraum von 3 h im Vergleich zur Isotypkontrolle. b) Verlauf des Geometrischen Mittels der intrazellulären Fluoreszenzintensität. c) Verlauf des Medians der mit dem *Spot Count Feature* errechneten Spots pro Zelle nach intrazellulärer Färbung. **B:** a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Oberflächenfärbung von CD107a. b) Verlauf des Geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität nach Oberflächen-Färbung

5 Diskussion

Zytotoxische T-Lymphozyten eliminieren virusinfizierte oder entartete Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Effektorproteine, die in Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln (LREV) gespeichert und nach Aktivierung der T-Lymphozyten über ihren TCR freigesetzt werden. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass sämtliche Effektorproteine in den gleichen Effektorvesikeln gespeichert werden, was jedoch durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe widerlegt wurde. Diese haben gezeigt, dass es mindestens zwei unterschiedliche Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel gibt, die nach ihrer Auftrennung über Dichtegradienten auch als Fraktion 2 und Fraktion 6-Vesikel bezeichnet wurden und sich in ihrer Dichte, Granularität und Proteinbeladung unterscheiden (H. Schmidt et al., 2009, Lettau et al., 2015). Dabei wurde nicht nur die Existenz zweier unterschiedlicher Entitäten aufgezeigt, sondern auch, dass diese mit unterschiedlichen Zytoskelett-Elementen verknüpft sind und die in ihnen gespeicherten Effektorproteine auf unterschiedliche Weise mobilisiert werden (Lettau et al., 2015, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde an diese Befunde anknüpfend untersucht, ob Proteine, die mutmaßlich am Transport von LREV beteiligt sind, selektiv mit der einen oder anderen Form von Vesikeln assoziiert sind. Zusätzlich wurde die aktivierungs-abhängige Mobilisierung von Granulysin in Hinblick auf Signalanforderungen und Zytoskelett-Beteiligung untersucht. Vorarbeiten hatten in diesem Kontext ergeben, dass die beiden beschriebenen 9 und 15 kDa Formen von Granulysin möglicherweise als zusätzliche Marker für die Diskriminierung der unterschiedlichen LREV angesehen werden können.

5.1 Expression ausgewählter Effektor- und lysosomaler Markerproteine

Zur Visualisierung und Quantifizierung der Expression ausgewählter Effektor- und lysosomaler Markerproteine mittels *Imaging* Zytometrie wurden im Wesentlichen $\gamma\delta$ -T-Zellen verwendet. V γ 9V δ 2-T-Zellen stellen mit rund 80 % die größte Subpopulation unter den $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut dar. Die Eliminierung infizierter oder entarteter Zellen mittels zytotoxischer und antimikrobieller Effektorproteine gilt als eine Hauptfunktion von V γ 9V δ 2-T-Zellen, die entsprechend ein relativ komplettes Arsenal an Effektoren in LREV vorhalten (Harly et al., 2015). Untersucht wurde die Expression von Granzym A und Granzym B, Perforin und Granulysin sowie CD107a und CD63, da diese als charakteristische zytotoxische Effektorproteine bzw. im Falle von CD63 und CD107a als charakteristische lysosomale Markerproteine von LREV anzusehen sind (Lettau et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass bei Fluoreszenzfärbung diese Proteine in den untersuchten V γ 9V δ 2-T-Zellen als hellleuchtende Spots innerhalb der Zelle erscheinen, was einer Speicherung in präformierten Vesikeln entspricht (vgl. Abbildung 10A bis Abbildung 15A). In einem Experiment wurde auch die Expression der oben genannten Proteine in CD8-positiven T-Zellen untersucht und mit der Expression in V δ 2-positiven Zellen verglichen. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass der

Diskussion

Vergleich innerhalb Zoledronat-stimulierter PBMC erfolgte. Zoledronat fördert vornehmlich das Wachstum von $\gamma\delta$ -T-Zellen, während das Wachstum CD8-positiver $\alpha\beta$ -T-Zellen *in vitro* durch Stimulation mit PHA erreicht wird (vgl. 3.2.1.3 und 3.2.1.4). Inwieweit die hier untersuchten CD8-positiven T-Zellen also repräsentativ für zytotoxische CD8-positive $\alpha\beta$ -T-Zellen sind, bleibt kritisch zu hinterfragen. Innerhalb des Experiments, indem sowohl die Expression in V δ 2-positiven als auch die in CD8-positiven Zellen untersucht wurde, zeigten sich hinsichtlich des Anteils Perforin- und Granzym B-positiver Zellen deutliche Unterschiede. So waren 78,8 % der V δ 2-positiven Zellen Perforin-positiv, aber nur 37,5 % der CD8-positiven Zellen. Auch für Granzym B zeigten sich deutlich mehr V δ 2-positive Zellen positiv (75,5 % und 46,9 %). Ein möglicher Grund für die niedrigere Perforin- und Granzym B-Expression in CD8-positiven Zellen könnte sein, dass die zytotoxischen Effektorproteine nicht in allen Zellen homogen in präformierten LREV gespeichert werden, sondern dass diese Kontext-abhängig erst nach Antigen-Präsentation und T-Zell-Aktivierung synthetisiert und vorgehalten werden (Olsen et al., 1990). Hinsichtlich des Anteils CD63-, CD107a-, Granzym A- und Granulysin-positiver Zellen waren jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen CD8- und V δ 2-positiven Zellen erkennbar (vgl. Abbildung 16). Vergleicht man allerdings V δ 2-positive Zellen mit PHA-stimulierten $\alpha\beta$ -T-Zellen so wird erkennbar, dass V δ 2-positive Zellen deutlich mehr Granulysin exprimieren. Während in den in dieser Arbeit untersuchten Zoledronat-stimulierten V δ 2-positive Zellen der Anteil Granulysin-positiver Zellen bei über 60 % und teilweise sogar bei über 80 % lag (vgl. 4.4.3), waren in PHA-stimulierten CD8-positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen nur 14,5 % der Zellen Granulysin-positiv (Lettau et al., 2019). Aufgrund des hohen Anteils Granulysin-positiver Zellen scheinen Zoledronat-stimulierte $\gamma\delta$ -T-Zellen zur näheren Untersuchung der Aktivierungs-abhängigen Mobilisierung besonders geeignet.

5.2 Aktivierungs-abhängige Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen

Da ein Großteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen Granulysin exprimiert (vgl. 4.4.3), wurden diese zur näheren Untersuchung der Aktivierungs-abhängigen Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen (9 und 15 kDa) verwendet. Hierbei wurden die Zellen für bis zu 3 h mit TPA und dem Ca $^{2+}$ -Ionophor Ionomycin oder TPA alleine stimuliert. Ionomycin erhöht die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration und aktiviert somit die klassische, Ca $^{2+}$ -abhängige Degranulation. TPA aktiviert die Proteinkinase C und somit die nicht-klassische, PKC-abhängige Degranulation (Hashimoto et al., 1991). Auf diese Weise imitieren TPA und Ionomycin die TCR-vermittelte T-Zellaktivierung, die und unter anderem in der Freisetzung zytotoxischer Granula mündet, unter Umgehung der *upstream*-Signaltransduktionsereignisse (siehe auch Abbildung 2). Auch der Einfluss von Zytoskelett-Elementen auf den Transport der beiden Granulysin-Formen wurde untersucht, indem Latrunculin A, ein Toxin aus dem Schwamm *Latrunculia magnifica*, das die Aktin-Polymerisation hemmt, eingesetzt wurde (Coué et al., 1987).

5.2.1 Signalanforderungen und Zytoskelett-Beteiligung

Wie bereits erwähnt galt für die Speicherung und Freisetzung der zytotoxischen Effektorproteine zunächst ein „one for all“-Modell. Laut diesem werden alle zytotoxischen Effektorproteine in sekretorischen Lysosomen gespeichert und nach T-Zell-Aktivierung zur Plasmamembran an der immunologischen Synapse transportiert und in den synaptischen Spalt entlassen bzw. im Falle des Apoptose-induzierenden FasL auf der Zelloberfläche exprimiert (Blott & Griffiths, 2002; Bossi & Griffiths, 2005). Nach und nach wurde jedoch ein deutlich differenzierteres Bild der Speicherung und Freisetzung zytotoxischer Effektorproteine und damit auch des „Reaktionsvermögens“ zytotoxischer T-Lymphozyten gezeichnet. So wurde gezeigt, dass der FasL zusammen mit 15 kDa Granulysin in einer weniger dichten Entität Lysosomen-verwandter Effektorvesikel, den sekretorischen Lysosomen bzw. Fraktion 2-Vesikeln, gespeichert wird, während die zytotoxischen Effektorproteine Granzym A und Granzym B sowie Perforin und das 9 kDa Granulysin in einer zweiten Entität, den sog. dichten Granula bzw. Fraktion 6-Vesikeln, vorliegen (Lettau et al., 2015). Außerdem wurde die gemeinsame Freisetzung aller zytotoxischen Effektorproteine inklusive dem FasL ausschließlich durch eine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Level nach und nach widerlegt. Bereits 1998 zeigten Kessler et al. über eine Blockade oder Modifikation des CD8-Signals, dass sich die zur Freisetzung von FasL und Perforin nötigen TCR-vermittelten Signale in ihrer Stärke unterscheiden. Durch Blockade von CD8, was unter anderem eine verringerte Liganden-Bindung an den TCR, eine geringere Phosphorylierung von ZAP70 sowie eine reduzierte Ca^{2+} -Mobilisierung zur Folge hatte, wurde zwar der FasL mobilisiert, es fand aber keine Freisetzung von Perforin statt. In späteren Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die aktivierungs-induzierte Oberflächen-Expression von gespeichertem FasL Ca^{2+} -unabhängig erfolgt, was *in vitro* durch eine Stimulation von T-Lymphozyten mit TPA herbeigeführt werden konnte (Lettau et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Untersuchung der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granulysin ein weiterer dringender Hinweis für eine selektive und gezielte Mobilisierung von Effektorproteinen geliefert werden. Granulysin liegt in T-Lymphozyten in zwei Formen vor, einer 9 kDa und einer 15 kDa großen, die sich nicht nur in ihrer Größe sondern auch in ihrer Funktion unterscheiden. Das 15 kDa Granulysin weist sowohl eine antimikrobielle als auch eine immunmodulatorische Funktion auf. Sie wirkt einerseits über eine Veränderung des Membranpotentials und der Membranpermeabilität antimikrobiell und bewirkt andererseits nach ihrer Freisetzung extrazellulär eine Rekrutierung anderer immunkompetenter Zellen (Clayberger et al., 2012; Wei et al., 2016). Das 9 kDa Granulysin, das durch proteolytische Spaltung am Carboxy- und Amino-Ende aus dem 15 kDa Granulysin entsteht, weist hingegen eine prominente zytolytische Wirkung auf und beseitigt so unter anderem entartete Zellen sowie Parasiten,

Diskussion

Pilze und gram-negative und grampositive Bakterien. Außerdem ist es an der Bekämpfung von Tuberkulose- und Malaria-Erregern beteiligt (Krensky & Clayberger, 2009). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Granulysin-Formen stellt außerdem ihre Mobilisierung dar. So wird das 9 kDa Granulysin im Rahmen der Ca^{2+} -abhängigen Degranulation freigesetzt werden, während die Freisetzung von 15 kDa Granulysin konstitutiv und Ca^{2+} -unabhängig erfolgt (Ogawa et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst die Speicherung der beiden Formen in unterschiedlichen LREV-Entitäten verifiziert werden (siehe 4.5). Dieser Befund legte bereits Unterschiede in den Signalanforderungen und Transportmechanismen nahe, die in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden konnten. So zeigte sich, dass das 15 kDa Granulysin durch Stimulation mit TPA alleine, d.h. in der Tat Ca^{2+} -unabhängig, über den nicht-klassischen PKC-abhängigen Weg freigesetzt wird. Damit wird 15 kDa Granulysin nicht nur wie bereits beschrieben konstitutiv freigesetzt, sondern kann auch individuell aktivierungs-abhängig mobilisiert. Die Degranulation der dichten LREV und Freisetzung des 9 kDa Granulysin wird durch Ca^{2+} -Ionophor ausgelöst und durch Chelatoren blockiert und folgt daher wie vermutet dem klassischen Ca^{2+} -abhängigen Weg (siehe 4.5 und Lettau et al., 2019). Die Unterschiede in der Signalanforderung der beiden Granulysin-Formen stehen in perfektem Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen zur aktivierungs-abhängigen Mobilisierung der beiden LREV-Entitäten. So gleicht die Ca^{2+} -unabhängige Freisetzung des 15 kDa Granulysin der des FasL, der ebenfalls in sekretorischen (Fraktion 2-) Lysosomen gespeichert wird. Das 9 kDa Granulysin wird hingegen genau wie Granzym B in dichten (Fraktion 6-) Granula gespeichert und Ca^{2+} -abhängig freigesetzt (Lettau et al., 2018).

Neben der Existenz zweier unterschiedlicher LREV-Entitäten konnte in Vorarbeiten auch deren Verknüpfung mit unterschiedlichen Zytoskelett-Elementen aufgezeigt werden: Während die SL (Fraktion 2-Vesikel) über Adapter-Proteine wie Nck, WASP und Arp2/3 mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft sind, erfolgt die Anbindung der dichten Granula (Fraktion 6-Vesikel) an das Zytoskelett über Myosin IIA (Lettau et al., 2015). Bereits diese initialen Befunde legten unterschiedliche Transportmechanismen für die Mobilisierung der beiden Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel nahe. Es wurde in der Folge demonstriert, dass die Mobilisierung von FasL unter Einsatz des Aktin-Zytoskelett-Inhibitors Latrunculin A verringert ist, während die von Granzym B unter gleichen Bedingungen steigt. Die Granzym B-Freisetzung verringert sich wiederum durch Hemmung von Myosin IIA (Lettau et al., 2018). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transportmechanismen der Granulysin-Freisetzung, liefern eine weitere Bestätigung der unterschiedlichen Transportmechanismen für SL und dichte Granula. So gleicht die aktivierungs-abhängige Mobilisierung des 15 kDa Granulysin der von gespeichertem FasL nicht nur in ihrer Ca^{2+} -Unabhängigkeit, sondern auch in ihrem Aktin-abhängigem Transport, was durch verringerte Freisetzung von 15 kDa Granulysin unter Einsatz von Latrunculin A gezeigt werden konnte (siehe 4.5). Die Freisetzung des 9 kDa

Diskussion

Granulysin bleibt von Latrunculin A unbeeinflusst bzw. steigt leicht an, was nahelegt, dass es wie Granzym B unter anderem über Myosin IIa transportiert wird. Diese dargestellten Befunde liefern immer deutlichere Hinweise bezüglich der Fähigkeiten von T-Lymphozyten, differenziert und bedarfsgerecht zu reagieren. So scheint es im Hinblick auf die aktivierungs-abhängige Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen und ihre unterschiedlichen Funktionen theoretisch möglich, die Immunantwort über die Freisetzung von 15 kDa Granulysin in eine eher entzündliche bzw. über die Freisetzung von 9 kDa Granulysin in eine eher zytotoxische Richtung zu lenken. Eine genaue Kenntnis der für die Granulysin-Mobilisierung verantwortlichen Mechanismen scheint dabei auch klinisch relevant. So könnte die Rolle von Granulysin bei der Bekämpfung von Erkrankungen wie Malaria oder Tuberkulose auch therapeutisch genutzt werden. In Mäusen konnte beispielsweise bereits eine Wirksamkeit von Granulysin gegen Tuberkulose als Teil einer Kombinations-Therapie gezeigt werden (Kita et al., 2012).

5.3 Assoziation verschiedener Transportproteine mit Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von am Transport der LREV zur Plasmamembran beteiligten Transportproteinen. Hierbei wurde untersucht, ob eine Assoziation dieser Transportproteine mit der einen oder anderen Entität LREV vorliegt. Nach Auftrennung von Zellorganellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließendem *Western-Blot* wurde analysiert, ob Proteine, die in den Transport von intrazellulären Organellen involviert sind, direkt in SL (Fraktion 2-Vesikeln) oder dichten Granula (Fraktion 6-Vesikel) nachweisbar sind (siehe 4.2). Eine Beteiligung der untersuchten Proteine am Transport Lysosomen-verwandter Effektorvesikel wird deutlich, wenn Mutationen einen fehlerhaften Vesikel-Transport oder eine fehlerhafte Speicherung von Effektorproteinen zur Folge haben, die sich in primären Immundefizienzen äußern. Beispielsweise ist beim autosomal-rezessiven *Griscelli*-Syndrom das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran durch einen Defekt in der GTPAse Rab27a gestört, während bei der Familiären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose 3 (FHL) aufgrund des Fehlens von Munc13-4 zwar ein Andocken der Vesikel an der Plasmamembran, aber keine Exozytose der zytotoxischen Granula möglich ist (Feldmann et al., 2003). Interessanterweise deuten diese genetischen Erkrankungen auf die bereits beschriebene unabhängige und separate Mobilisierung der beiden Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel hin. So zeigten Haddad et al. in Mäusen mit einer Mutation im Protein Rab27a, dass zwar die Exozytose zytotoxischer Granula gestört ist, nicht aber die Expression des FasL auf der Zelloberfläche. Weitere Kenntnisse über die Verknüpfung dieser Proteine mit den LREV scheinen auf Grundlage der aufgeführten genetischen Erkrankungen auch von klinischer Relevanz. In der vorliegenden Arbeit konnte

Diskussion

eine Assoziation der Proteine Unc18-2, Syntaxin 11 und Rab11 mit den SL (Fraktion 2-Vesikeln) gezeigt werden (vgl. 4.2). Der Nachweis von Unc18-2 und Syntaxin 11 in derselben Entität Lysosomen-verwandter Effektorvesikel unterstreicht die funktionelle Kooperation dieser beiden Proteine: Unc18-2, das auch als *syntaxin binding protein 2* bezeichnet wird, bildet zusammen mit dem SNARE-Protein Syntaxin 11 einen Komplex, der zur Fusion von SL mit der Plasmamembran führt (zur Stadt et al., 2009). Im Rahmen der FHL 5, bei der ein Defekt von Unc18-2 vorliegt, konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von Syntaxin 11 verringert ist, was die gemeinsame Funktion ebenfalls herausstellt (Côte et al., 2009). Rab11 wiederum gilt als Bestandteil recycelter Endosomen, die mit späten Endosomen fusionieren, aus denen letztendlich SL entstehen (Van der Sluijs et al., 2013).

In dichten Granula (Fraktion 6-Vesikeln) konnte hingegen nur in einem Fall das Transportprotein Rab7 nachgewiesen werden (siehe 4.2). Dass die SL und dichten Granula in unterschiedlicher Weise mit den Transportproteinen assoziiert sind, könnte als weiteres Indiz für ihre unterschiedliche Mobilisierung gedeutet werden. Gleichzeitig zeigt der einmalige Nachweis von Rab7, dass es bei der genauen Rolle dieser Proteine beim Transport der LREV noch viele offene Fragen gibt. Es erscheint möglich, dass beispielsweise im Fall von Rab7 und Munc13-4, nur eine temporäre Assoziation der Transportproteine mit einer oder beiden Entitäten erfolgt. Beide Proteine sind bekanntermaßen in den Transport bzw. die Biogenese Lysosomen-verwandter Effektorvesikel involviert (Van der Sluijs et al., 2013), konnten aber nicht zuverlässig in einer der beiden Entitäten nachgewiesen werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass sowohl die Synthese als auch der Transport der LREV zur Plasmamembran erst nach T-Zell-Aktivierung stattfinden (Olsen et al., 1990), der Nachweis der Transportproteine jedoch in unstimulierten Zellen erfolgte.

5.4 Kinetik der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granzym A und CD107a

Neben der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung von Granulysin wurde auch die von Granzym A und CD107a näher betrachtet. Hierbei wurde die Speicherung und Degranulation von Granzym A und CD107a in T-Lymphozyten mittels *Imaging Zytometrie* analysiert. Die T-Lymphozyten wurden unterschiedlich lang (10, 30, 60, 120 und 180 min) mit TPA und Ionomycin stimuliert, was eine Mobilisierung der LREV und damit auch von CD107a und Granzym A zur Folge hatte. Eine Stimulation mit TPA und Ionomycin wurde gewählt, da zumindest für CD107a und Granzym B bereits eine Ca^{2+} -abhängige Degranulation beschrieben wurde (Lettau et al., 2018). Aufgrund der unterschiedlichen Stimulationszeiten konnte das Verhalten der T-Lymphozyten hinsichtlich der Granzym A- und CD107a-Mobilisierung zur Zelloberfläche über einen Zeitraum von 3 h analysiert werden. Wie in 4.4 gezeigt werden konnte, liegen CD107a und Granzym A intrazellulär in sekretorischen Vesikeln vor (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19). CD107a ist in geringer Dichte auch in unstimulierten

Diskussion

Zellen auf der Zelloberfläche nachweisbar. Die Oberflächen-Expression steigt nach einstündiger Stimulation mit TPA und Ionomycin stark an. Dies ist in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen optisch erkennbar und in einer Zunahme der Intensität der Oberflächenfärbung messbar (vgl. 4.6 und Abbildung 19). In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen fällt außerdem auf, dass sich die CD107a-Expression an bestimmten Regionen der Zellmembran besonders anreichert. Dies könnte möglicherweise den Ort der Freisetzung der zytotoxischen Granula, d.h. bei Vorliegen eines Kontaktes mit einer infizierten oder entarteten Zelle den Ort der immunologischen Synapse, darstellen. Eine zentrale Aufgabe von CD107a ist dabei, T- oder NK-Zellen vor der Zytotoxizität ihrer eigenen Effektorproteinen zu schützen (Cohnen et al., 2013).

Nach Stimulation mit TPA und Ionomycin nimmt die Intensität der intrazellulären Granzym A-Färbung ab. Mit Hilfe des *Spot Count Features*, das die Anzahl diskreter *Spots* mit hoher Fluoreszenzintensität zählt und Mittelwerte für die Anzahl dieser *Spots* pro Zelle errechnet, konnte die intrazelluläre Abnahme von Granzym A quantifiziert werden. Ein kurzzeitiger erneuter Anstieg nach 2 h Stimulation mit TPA und Ionomycin könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass im Falle von Granzym A eine *de novo*-Synthese erfolgen kann, die bereits für FasL gezeigt wurde (Lettau et al., 2018). Für eine Bestätigung dieser Hypothese bedürfte es jedoch noch weiterer Untersuchungen der Granzym A-Degranulation. Die generelle intrazelluläre Abnahme von Granzym A weist zunächst auf seine Freisetzung im Rahmen der T-Zell-Antwort und damit auf seine Funktion als zytotoxisches Effektorprotein hin.

5.5 Modell

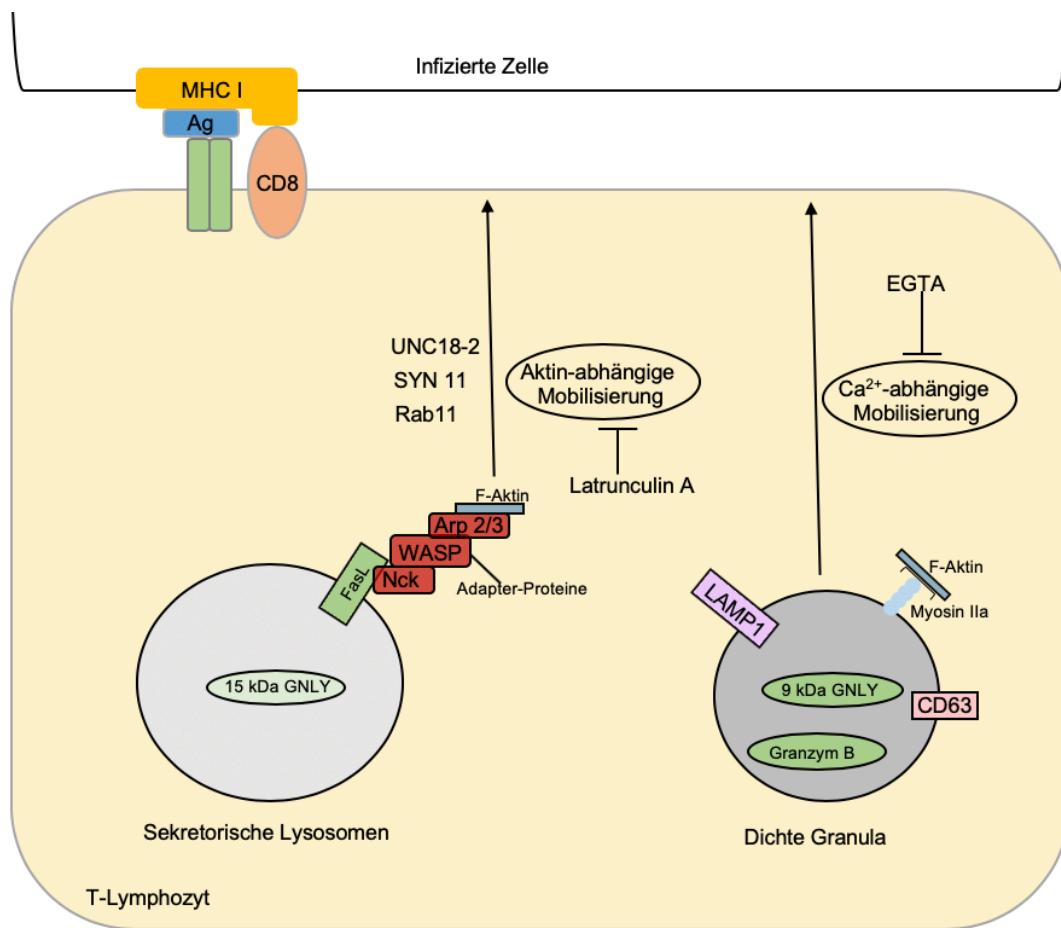


Abbildung 20: Modell für die aktivierungs-abhängige Mobilisierung zytotoxischer Effektorproteine in humanen T-Lymphozyten. Nachdem ein zytotoxischer T-Lymphozyt ein von einer infizierten Zelle mit Hilfe eines MHC I-Moleküls präsentiertes Antigen (Ag) mit seinem T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt hat, ist er in der Lage die infizierte Zelle durch Mobilisierung seiner zytotoxischen Effektorproteine zu eliminieren. Die Effektorproteine werden in zwei unterschiedlichen Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel (LREV) gespeichert, die der T-Lymphozyt gezielt mobilisieren kann. In sekretorischen Lysosomen werden der FasL und das 15 kDa Granulysin (GNLY) gespeichert. Über die Adapter-Proteine Nck, WASP und Arp 2/3 sind die sekretorischen Lysosomen mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft. Der Transport von FasL und 15 kDa Granulysin zur Zellmembran erfolgt Aktin-abhängig und kann durch Latrunculin A gehemmt werden. Außerdem sind möglicherweise weitere Proteine wie Unc18-2, Syntaxin (Syn) 11 und Rab 11 am Transport der sekretorischen Lysosomen beteiligt. In der zweiten Entität LREV, den dichten Granula, werden Granzym B, 9 kDa Granulysin, CD63 und LAMP1 (CD107a) gespeichert. Diese werden Ca^{2+} -abhängig mobilisiert, was durch Hemmung mit EGTA gezeigt werden konnte. Der Transport der dichten Granula erfolgt unter Beteiligung von Myosin IIa.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den bereits veröffentlichten Befunden und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergibt sich für die aktivierungs-abhängige Mobilisierung zytotoxischer Effektorproteine in humanen T-Lymphozyten folgendes Modell: zur Beseitigung infizierter oder entarteter Zellen können zytotoxische T-Lymphozyten auf zwei verschiedene Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel, sekretorische Lysosomen und dichte Granula, zurückgreifen. In sekretorischen Lysosomen werden der FasL und das 15 kDa Granulysin

Diskussion

gespeichert. Die sekretorischen Lysosomen sind über Nck, WASP und Arp2/3 mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft. Genau wie der FasL wird auch das 15 kDa Granulysin unter Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts mobilisiert. Dies konnte durch Einsatz des Aktin-Polymerisations-Inhibitors Latrunculin A gezeigt werden. Neben dem Aktin-Zytoskelett sind möglicherweise weitere Transportproteine wie Unc18-2, Syntaxin 11 und Rab11 am Transport der sekretorischen Lysosomen beteiligt, da diese sich in entsprechenden Vesikelpräparationen mittels *Western-Blot* nachweisen lassen. Die Mobilisierung von in sekretorischen Lysosomen gespeichertem FasL und 15 kDa Granulysin erfolgt Ca^{2+} -unabhängig.

In dichten Granula werden die zytotoxischen Effektorproteine Granzym A und Granzym B, Perforin, 9 kDa Granulysin sowie LAMP1 (CD107a) und CD63 gespeichert. An der Mobilisierung der in dichten Granula gespeicherten Proteine ist Myosin IIa beteiligt. Genau wie die Mobilisierung von CD63, LAMP1 und Granzym B erfolgt auch die Freisetzung von 9 kDa Granulysin Ca^{2+} -abhängig, was durch Einsatz von Ionomycin gezeigt werden konnte.

Letztendlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass die beiden Entitäten Lysosomen-verwandter Effektorvesikel sich im Hinblick auf Signalanforderungen und Zytoskelett-Beteiligung unterscheiden, bestätigt werden. Die *in vitro* beobachteten Unterschiede hinsichtlich der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung der beiden Entitäten legen auch *in vivo* ein differenziertes Reaktionsvermögen von T-Lymphozyten nahe. So könnte je nach Erreger oder T-Zell-Subtyp die T-Zell-Antwort durch Freisetzung verschiedener Effektorproteine in unterschiedliche Richtungen gelenkt werden.

6 Zusammenfassung

Zytotoxische T-Lymphozyten eliminieren virusinfizierte oder entartete Zellen mit Hilfe zytotoxischer Effektorproteine, die in Lysosomen-verwandten Effektorvesikeln (LREV) gespeichert werden. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass zwei unterschiedliche Entitäten von LREV existieren, die sich in Dichte und Proteinbeladung unterscheiden. Die sog. sekretorischen Lysosomen enthalten den Apoptose-induzierenden Fas-Ligand (FasL) und die 15 kDa Form von Granulysin, die neben einer antimikrobiellen auch eine immunmodulatorische Wirkung aufweist. In sog. dichten Granula werden die zytotoxischen Effektorproteine Granzym A und Granzym B, Perforin und das prozessierte 9 kDa Granulysin gespeichert. Die Lysosomen-assoziierten Membranproteine CD63 und CD107a kolokalisieren nach aktuellen *Imaging*-Analysen vermehrt mit dichten Granula. Die beiden Entitäten der LREV sind außerdem mit unterschiedlichen Zytoskelett-Elementen assoziiert, was eine differenzierte Mobilisierung nahelegt. So konnten bereits Unterschiede in Stimuli und Transportmechanismen für den FasL, Granzym B, CD107a und CD63 aufgezeigt werden. An diese Ergebnisse anknüpfend wurde in dieser Arbeit die aktivierungs-abhängige Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen näher untersucht. Hierfür wurde zunächst die selektive Speicherung von 9 kDa und 15 kDa Granulysin in unterschiedlichen LREV verifiziert. Anschließend wurden T-Lymphozyten u.a. unter Einsatz verschiedener Inhibitoren des Zytoskeletts mit Phorbolester und Ca^{2+} -Ionophor stimuliert. Mittels Immunpräzipitation und *Western-Blot* wurden die beiden Granulysin-Formen in den Kulturüberständen analysiert. Auf diese Weise wurde nachgewiesen, dass das 15 kDa Granulysin Ca^{2+} -unabhängig und Aktin-abhängig mobilisiert wird. Dies steht im Einklang mit der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung des FasL, der ebenfalls in sekretorischen Lysosomen gespeichert wird. Das 9 kDa Granulysin wird hingegen Ca^{2+} -abhängig freigesetzt und folgt damit hinsichtlich seiner Mobilisierung dem ebenfalls in dichten Granula gespeichertem Granzym B. Darüber hinaus wurden LREV aus T-Lymphozyten über Dichtegradientenzentrifugation angereichert und mittels *Western-Blot* überprüft, ob bekannte lysosomale Transportproteine selektiv in der einen oder anderen Entität von LREV nachweisbar sind. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Entitäten auch in ihrer Assoziation mit Transportproteinen unterscheiden. Sowohl dieser Befund als auch die Unterschiede in der aktivierungs-abhängigen Mobilisierung der beiden Granulysin-Formen liefern weitere Hinweise für eine selektive Mobilisierung der unterschiedlichen Effektor-Vesikel. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass zytotoxische T-Lymphozyten Kontext-abhängig und gezielt bestimmte zytotoxische Effektorproteine freisetzen und damit bedarfsgerecht auf entartete oder infizierte Zellen reagieren können.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T., Weiss, A. (2004): Jurkat t cells and development of the t-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*, 4(4), 301–308.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S. (2007): Phenotypic and functional features of human th17 cells. *J Exp Med*, 204(8), 1849–1861.
- Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Don Smith, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S. L., Kelleher, A. D. (2002): Characterization of cd4(+) ctls ex vivo. *J Immunol*, 168(11), 5954–5958.
- Blott, E. J., Griffiths, G. (2002): Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3, 122.
- Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., Griffiths, G. M. (2001): Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci*, 114(Pt 13), 2405–2416.
- Bossi, G., Griffiths, G.M. (2005): CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmfull organelle. *Semin Immunol*, 17(1), 87–94.
- Carding, S. R., Egan, P. J. (2002): $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2(5), 336–345.
- Clayberger, C., Finn, M. W., Wang, T., Saini, R., Wilson, C., Barr, V.A., Sabatino, M., Castiello, L., Stroncek, D., Krensky, A.M. (2012): 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity. *J Immunol*, 188(12), 6119-6126.
- Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y. T., Watzl, C. (2013): Surface cd107a / lamp-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Immunobiology*, 122(8), 1411–1418.
- Côte, M., Ménager, M. M., Burgess, A., Mahlaoui, N., Picard, C., Schaffner, C., Al-manjomi, F., Alangari, A., Deist, F.L., Gennery, A.R., Prince, N., Cariou, A., Nitschke, P. (2009): Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient nk cells. *J Clin Invest*, 2(12), 3765–3773.
- Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I., Korn, E. D. (1987): Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett*, 2(2), 316–318.
- Delves, P. J., Roitt, I. M. (2000a): The immune system. part 2. *N Engl J Med*, 343(2), 108–117.
- Delves, P. J., Roitt, I. M. (2000b): The immune system. *N Engl J Med.*, 343(2), 108–117.
- Dhein, J., Walczak, H., Bäumlert, C., Debatint, K. M., Krammer, P. H. (1995): Autocrine t-cell suicide mediated by apo-1/(fas/cd95). *Nat*, 373 (6513), 438-441.
- Elstak, E. D., Neeft, M., Nehme, N. T., Voortman, J., Cheung, M., Goodarzifard, M., Gerritsen, H. C., Bergen, P. , Callebaut, I., Basile, G. D. Saint. (2011): Munc13-4 rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood*,

- 118(6), 1570–1579.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A., De Saint Basile, G. (2003): Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (fhl3). *Cell J*, 115(4), 461–473.
- Galvin, J. P., Spaeny-Dekking, L. H., Wang, B., Seth, P., Hack, C. E., Froelich, C. J. (1999): Apoptosis induced by granzyme b-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol*, 162(9), 5345–5350.
- Goodman, T., Lefrançois, L. (1988): Expression of the γ - δ t-cell receptor on intestinal cd8+ intraepithelial lymphocytes. *Nat*, 333, 855.
- Griffiths, G. M., 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(4), 885–896.
- Gutcher, I., Becher, B. (2007): APC derived cytokines and t cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, 117(5), 1119–1127.
- Haddad, E. K., Wu, X., Hammer, J. A., & Henkart, P. A. (2001): Defective granule exocytosis in rab27a-deficient lymphocytes from ashen mice. *J Cell Biol*, 152(4), 835–841.
- Harly, C., Peigné, C. M., Scotet, E. (2015): Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human γ 9 δ 2 t cells. *Front Immunol*, 6(JAN), 1–13.
- Hashimoto, S., Takahashi, Y., Tomita, Y., Hayama, T., Sawada, S., Horie, T., Mccombs, C.C., Michalski, J. P. (1991): Mechanism of calcium ionophore and phorbol ester-induced t-cell activation. *Scand J Immunol*, 33, 393–403.
- He, J.-S., Gong, D.-E., Ostergaard, H. L. (2010): Stored fas ligand, a mediator of rapid ctl-mediated killing, has a lower threshold for response than degranulation or newly synthesized fas ligand. *J Immunol*, 184(2), 555–563.
- Kabelitz, D., Peters, C., Wesch, D., Oberg, H. H. (2013): Regulatory functions of γ δ Tcells. *Intl Immunopharmacol*, 16(3), 382–387.
- Kassahn, D., Nachbur, U., Conus, S., Micheau, O., Schneider, P., Simon, H. U., 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(1), 115–124.
- Kessler, B., Hudrisier, D., Schroeter, M., Tschopp, J., Cerottini, J.-C., Luescher, I. F. (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.
- Kita, Y., Hashimoto, S., Nakajima, T., Nakatani, H., Nishimatsu, S., Nishida, Y., Kanamaru, N., Kaneda, Y., Takamori, Y., McMurray, D., Tan, E. V., Cang, M. L., Saunderson, P., Dela

- Cruz, E.C., Okada, M. (2012): Novel therapeutic vaccines [(hsp65 + il-12)DNA-, granulysin- and ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. *Hum vaccin*, 9(3), 526–533.
- Krensky, A. M., Clayberger, C. (2009): Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*, 73(3), 193–198.
- Lettau, M., Armbrust, F., Dohmen, K., Drews, L., Poch, T., Dietz, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2018): Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human T cells. *Int Immunol*, 30(5), 215–228.
- Lettau, M., Dietz, M., Dohmen, K., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2019): Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles and get mobilized by either classical or non-classical degranulation. *Mol Immunol*, 107, 44–53.
- Lettau, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2015): Lysosome-related effector vesicles in T lymphocytes and NK cells. *Scand J Immunol*, 82(3), 235–243.
- Lettau, M., Qian, J., Kabelitz, D., Janssen, O. (2004): Activation-dependent fasL expression in T lymphocytes and natural killer cells. *Signal Transduction*, 4(5–6), 206–211.
- Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., Janssen, O. (2007): Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*, 108(1), 10–19.
- Linkermann, A., Qian, J., Janssen, O. (2003): Slowly getting a clue on CD95 ligand biology. *Biochem Pharmacol*, 66(8), 1417–1426.
- Maggi, E. (1998): The Th1/Th2 paradigm in allergy. *Immunotechnology*, 3(4), 233–244.
- Medzhitov, R., Janeway, C. (2000): Innate immune recognition. *Immunol Rev*, 173, 89–97.
- Ménager, M. M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C. H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., de Saint Basile, G. (2007): Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hmunc13-4. *Nat Immunol*, 8(3), 257–267.
- Motyka, B., Korbutt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F. B., Gauldie, J., Bleackley, R. C. (2000): Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell J*, 103(3), 491–500.
- Oberg, H. H., Lengl-Janssen, B., Kabelitz, D., Janssen, O. (1997): Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cell Immunol*, 181(1), 93–100.
- Ogawa, K., Takamori, Y., Suzuki, K., Nagasawa, M., Takano, S., Kasahara, Y., Nakamura, Y., Kondo, S., Sugamura, K., Nakamura M., Nagata, K. (2003): Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol*, 33(7), 1925–1933.
- Olsen, I., Bou-Gharios, G., Abraham, D. (1990): The activation of resting lymphocytes is

- accompanied by the biogenesis of lysosomal organelles. *Eur J Immunol*, 20(10), 2161–2170.
- Parkin, J., Cohen, B. (2001): An overview of the immune system. *The Lancet*, 357, 1777–1789.
- Pfistershammer, K., Majdic, O., Stöckl, J., Zlabinger, G., Kirchberger, S., Steinberger, P., Knapp, W. (2004): CD63 as an activation-linked t cell costimulatory element. *J Immunol*, 173(3), 6000–6008.
- Roberts, A. I., Devadas, S., Zhang, X., Zhang, L., Keegan, A., Greeneltch, K., Solomon, J., Wei, L., Das, J., Sun, E., Liu, C., Yuan, Z., Zhou, J. N., Shi, Y. (2003): The role of activation-induced cell death in the differentiation of t-helper-cell subsets. *Immunol Res*, 28(3), 285–293.
- Sandstrom, A., Scharf, L., McRae, G., Hawk, A. J., Meredith, S. C., Adams, E. J. (2012): $\gamma\delta$ t cell receptors recognize the non-classical major histocompatibility complex (mhc) molecule t22 via conserved anchor residues in a mhc peptide-like fashion. *J Biol Chem*, 287(8), 6035–6043.
- Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, P. H. (2012): Molecular mechanisms of treg-mediated t cell suppression. *Front Immunol*, 3(MAR), 1–20.
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Lucius, R., Nebendahl, M., Leippe, M., Janssen, O. (2009): Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunol*, 10, 1–12.
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Lucius, R., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2011): Effector granules in human t lymphocytes: proteomic evidence for two distinct species of cytotoxic effector vesicles. *J Proteome Res*, 10(4), 1603–1620.
- Shi, L., Keefe, D., Durand, E., Feng, H., Zhang, D., Lieberman, J. (2005): Granzyme b binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J Immunol*, 174(9), 5456–5461.
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G. M. (2001): The immunological synapse of ctl contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*, 15(5), 751–761.
- 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 J*, 75(6), 1169–1178.
- Van der Sluijs, P., Zibouche, M., van Kerkhof, P. (2013): Late steps in secretory lysosome exocytosis in cytotoxic lymphocytes. *Front Immunol*, 4(NOV), 1–7.
- Wei, H. M., Lin, L. C., Wang, C. F., Lee, Y. J., Chen, Y. T., Liao, Y. Di. (2016): Antimicrobial properties of an immunomodulator - 15 kda human granulysin. *PLoS ONE*, 11(6), 1–17.
- zur Stadt, U., Rohr, J., Seifert, W., Koch, F., Grieve, S., Pagel, J., Strauß, J., Kasper, B., Nürnberg, G., Becker, C., Maul-Pavicic, A., Beutel, K., Janka, G., Griffiths, G., Ehl, S., Hennies, H. C. (2009): Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (fhl-5) is

- caused by mutations in munc18-2 and Impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet*, 85(4), 482–492.
- zur Stadt, U., Schmidt, S., Kasper, B., Beutel, K., Diler, A. S., Henter, J. I., Kabisch, H., Schneppenheim, R., Nürnberg, P., Janka, G., Hennies, H. C. (2005): Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (fhl) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet*, 14(6), 827–834.

8 Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt den Institutionsdirektoren Prof. Dr. Dieter Kabelitz und Prof. Dr. Alexander Scheffold für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Immunologie durchzuführen.

Besonders herzlich danke ich Prof. Dr. Ottmar Janßen und PD Dr. Marcus Lettau. Ersterem für die Bereitstellung des interessanten Themas und die umfassende Unterstützung während meiner Zeit im Labor, insbesondere bei meinen Vorträgen und auch beim Verfassen dieser Arbeit. PD Dr. Marcus Lettau danke ich für die sehr gute Einarbeitung, die scheinbar endlose Geduld beim Beantworten meiner Fragen und dem einen oder anderen Missgeschick im Labor sowie für die konstruktive Kritik und guten Hinweise beim Verfassen dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt Signe Valentin und Dr. Henriette Ebsen, die mir in den ersten Wochen meiner Laborzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ina Martens danke ich für die tatkräftige und mentale Unterstützung während meiner gesamten Laborzeit, für gute Gespräche und die freundliche und gute Stimmung, die sie im Labor verbreitet hat.

Außerdem bedanke ich mich bei Fred Armbrust, der zu meinem Thema bereits gute Vorarbeit geleistet hat.

In diesem Zuge möchte ich mich auch beim Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Offenheit, Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Ich finde es nicht selbstverständlich, dass meine Fragen auch außerhalb meiner Arbeitsgruppe stets auf ein offenes Ohr gestoßen sind.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir stets das Gefühl geben, frei in meiner Lebensgestaltung zu sein und mir ihrer Verbundenheit und Unterstützung bedingungslos sicher sein zu können, sowie meinem Freund und meinen Freunden und Freundinnen, die mich in meinen Entscheidungen stets beraten und bestärkt haben und mir immer zuverlässig zur Seite stehen.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Lettau, M., Armbrust, F., Dohmen, K., Drews, L., Poch, T., Dietz, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2018): Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human t cells. *Int Immunol*, 30(5), 215–228.

Lettau. M., Dietz, M., Dohmen, K., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2019): Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles and get mobilized by either classical or non-classical degranulation. *Mol Immunol*, 107, 44-53.

Ko-Autorenschaften auf Tagungsbeiträgen/ Abstracts

Lettau M., Dietz M., Dohmen K., Armbrust F., Poch T., Drews L., Janssen O.: Lysosome-related effector compartments in human T-cell populations: Analysis of the differential mobilization of cytotoxic marker and effector proteins. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie. Erlangen. 12-15. September, 2017.

Dietz M., Drews L., Dohmen K., Janssen O., Lettau M.: Morphological and biochemical characterization of effector compartments of cytotoxic T lymphocytes. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie. Erlangen. 12-15. September 2017.

Lettau M., Dietz M., Dohmen K., Armbrust F., Poch T., Drews L., Janssen O.: Lysosome-related effector compartments in human T-cell populations: Analysis of the differential mobilization of cytotoxic marker and effector proteins. Joint Meeting Signal Transduction. Weimar. 8.-10. November 2017.

Dietz M., Drews L., Dohmen K., Janssen O., Lettau M.: Morphological and biochemical characterization of effector compartments of cytotoxic T lymphocytes. Joint Meeting Signal Transduction. Weimar. 8.-10. November 2017.