

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

**Vergleichende morphologische und biochemische  
Charakterisierung der Effektorkompartimente  
zytotoxischer Lymphozyten**

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

vorgelegt von

Michelle Catherine Dietz  
aus Frankfurt am Main

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ottmar Janßen
2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Renate Burger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.12.2024

gez.: Prof. Dr. Ottmar Janßen

# INHALT

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das adaptive Immunsystem und seine Bestandteile .....	1
1.2 Zytotoxische Lymphozyten .....	2
1.2.1 αβ T-Zellen.....	2
1.2.2 γδ T-Zellen .....	4
1.3 Zytotoxische Granula – die Lysosomen-verwandten Effektorvesikel zytotoxischer T-Zellen .....	5
1.3.1 Die zytotoxische Synapse.....	6
1.3.2 Zwei Entitäten von Effektorkompartimenten .....	7
1.3.3 Der Inhalt Lysosomen-verwandter Effektorvesikel.....	9
1.3.3.1 FasL (CD178/CD95L).....	9
1.3.3.2 Granzym B .....	9
1.3.3.3 Perforin.....	10
1.3.3.4 Granulysin .....	11
1.3.3.5 DPP4/CD26.....	12
1.3.3.6 LAMP1/CD107a .....	12
<b>2 Fragestellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1 Material für zellbiologische Methoden .....	15
3.1.1 Zelllinien .....	15
3.1.2 Zellkultur.....	15
3.1.2.1 Magnetische Zellseparation ( <i>Magnetic activated cell sorting, MACS</i> ) .....	15
3.1.2.2 Phänotypisierung kultivierter Zellen .....	16
3.2 Material für biochemischen Methoden.....	17
3.2.1 Dichtegradientenzentrifugation .....	17
3.2.1.1 Anreicherung von Zellorganellen .....	17
3.2.1.2 Proteinmengenbestimmung .....	17
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	17
3.2.3 Westernblot.....	18
3.2.3.1 Antikörper für Westernblot.....	19
3.2.4 Materialien für die 2-Dimensionale Differenzielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) .....	19
3.2.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe für die 2D-DIGE .....	19
3.2.4.2 Isoelektrische Fokussierung.....	20
3.2.4.3 SDS-PAGE: Ettan Dalt six (GE Healthcare).....	20
3.2.5 Materialien zur Vorbereitung der Elektronenmikroskopie .....	22
3.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
3.3.1 Geräte .....	22
3.3.2 Verbrauchsmaterialien .....	24
3.4 Methoden.....	25
3.4.1 Zellbiologische Verfahren .....	25

3.4.1.1	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen.....	25
3.4.1.2	Ermittlung der Zellzahl kultivierter Zellen .....	26
3.4.1.3	Positive Isolierung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten mittels MACS .....	26
3.4.1.4	Expansion und Kultivierung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen .....	27
3.4.1.5	Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie .....	27
3.4.1.6	Elektronenmikroskopie .....	28
3.4.2	Biochemische Verfahren.....	28
3.4.2.1	Extraktion von Zellorganellen.....	28
3.4.2.2	Bestimmung der Proteinmenge.....	29
3.4.2.3	SDS-Page .....	29
3.4.2.4	Westernblot .....	30
3.4.2.5	2D-DIGE.....	30
3.4.3	Analyseverfahren .....	33
3.4.3.1	Typhoon Trio Scanner.....	33
3.4.3.2	Image Quant TL 1D v. 8.1 .....	33
3.4.3.3	De Cyder Software – DIA .....	33
3.4.3.4	Identifizierung ausgewählter Spots anhand von Proteomkarten .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
4.1	Zellexpansion und -kultivierung .....	36
4.1.1	Phänotypische Charakterisierung der T-Zellen.....	36
4.2	Anreicherung und Auftrennung subzellulärer Fraktionen .....	40
4.2.1	Verteilung zytotoxischer Mediatoren innerhalb der subzellulären Fraktionen.....	40
4.3	Elektronenmikroskopische Bilder .....	43
4.4	2D-DIGE der Fraktionen 2 und 6 der drei T-Zellsubpopulationen .....	45
4.4.1	Visueller und softwaregestützter Vergleich der F2-Vesikel und F6-Granula der drei T-Zellsubpopulationen .....	45
4.4.1.1	F2-Vesikel .....	45
4.4.1.2	F6-Granula .....	49
4.4.2	Prozentuale Übereinstimmung des Proteinmusters durch Auswertung der durch die DIA-Software generierten Daten .....	53
4.4.2.1	F2-Vesikel .....	54
4.4.2.2	F6-Granula .....	56
4.4.3	Differenziell abundante Proteine innerhalb der Effektorkompartimente .....	58
4.4.3.1	Maximal unterschiedlich abundante Proteinspots in den F2-Vesikeln .....	59
4.4.3.2	Maximal unterschiedlich abundante Proteine in den F6-Granula .....	66
4.4.3.3	Abundanz biologisch relevanter Proteine innerhalb der beiden Effektorkompartimente .....	73
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>83</b>
5.1	Elektronenmikroskopie .....	83
5.2	Westernblot-Analysen .....	84
5.3	2D-DIGE-basierte vergleichende Analyse .....	86
5.3.1	Visuelle und statistische Analyse der 2D-DIGE-Experimente der F2-Vesikel und F6-Granula .....	86
5.3.2	Differenziell exprimierte Proteine der F2-Vesikel und F6-Granula von CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Zellen .....	87
5.3.2.1	F2-Vesikel .....	88
5.3.2.2	F6-Granula .....	92
5.4	Limitationen .....	97
5.5	Ausblick .....	98

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>109</b>
9.1	Zeitschriftenartikel	109
9.2	Tagungsbeiträge	109
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>110</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

#	Spotanzahl
[ ]	Grenzwert Spot-Volumenverhältnis
2D-DIGE	<i>2-dimensional difference gel electrophoresis</i> , 2-dimensionale differenzielle Gelelektrophorese
2x SA	Zweifache Standardabweichung
Abb.	Abbildung
ACTB	Aktin beta
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
Arp 2/3-complex	<i>Actin-related protein 2/3-Komplex</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Cap G	<i>Gelsolin-like capping Protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD26/DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
CD4 <sup>+</sup>	CD4-positiv
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CLF	<i>Crude Lysosomal Fraction</i>
cSMAC	<i>Central Supramolecular Activation Cluster</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DIA	<i>Differential In-gel Analysis</i>
DIGE	<i>Difference gel electrophoresis</i>
DOF	<i>Diluted Optiprep® Fraction</i>
DTT	Dithiothreitol

EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EO	<i>Enriched Organelles</i> , angereicherte Organellen
EQ-Puffer	Equilibrierungspuffer
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
E-Syt1	<i>Extended Synaptotagmin 1</i>
EZR	Extrazellulärraum
F2	Fraktion 2
F6	Fraktion 6
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchfluszytometrie
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FHL	Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärts gestreutes Licht
GA	Glutaraldehyd
GLP-1	Glukagon- <i>like</i> Peptide 1
GS2	Griselli-Syndrom Typ 2
Gy	Gray
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IAA	Iodacetamid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPG	Immobiline <i>DryStrip</i> -Gel
LAMPs	Lysosomen-assozierte Markerproteine
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LREV	<i>Lysosome related effector vesicle</i> , Lysosomen-verwandtes Effektor- vesikel
LRO	<i>Lysosome related organelles</i> , Lysosomen-verwandte Organellen
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> , Monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> , Magnetische Zellseparation

MA-ID	Master-Referenznummer
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
n.i.	Nicht identifizierbar
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
Nck-Protein	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
NDUFV2	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2</i>
NFPs	<i>Nucleation Promoting Factors</i>
NKRs	<i>Natural Killer Rezeptoren</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
pAb	<i>Polyclonal Antibody</i> , Polyklonaler Antikörper
pAg	Phosphoantigen
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMNC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Zellen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohaemagglutinin
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
pSMAC	<i>peripheral Supramolecular Activation Cluster</i>
rIL2	rekombinantes IL-2
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
SL	Sekretorische Lysosomen
Spot-ID	Spot-Referenznummer
SSC	<i>sideward scatter</i>
SVV	Spot-Volumen-Verhältnis
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>h</sub> -Zellen	T-Helferzellen

TLRs	<i>Toll-Like-Rezeptoren</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein
WCL	<i>whole cell lysate</i> , Gesamtzelllysat
α	Anti
α-SNAP	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein alpha</i>

# 1 Einleitung

Die besondere Relevanz des Immunsystems wird deutlich, wenn seine Funktion wie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, genetischen Defekten oder malignen Prozessen bis hin zur Lebensunfähigkeit eines Organismus beeinträchtigt ist. Ist es hingegen intakt, schützt es den Körper vor pathogenen Mikroorganismen und wirkt intrinsischen Entartungsprozessen entgegen. Dabei ermöglichen die synergistisch wirkenden Systeme der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunabwehr und deren zelluläre sowie humorale Bestandteile eine kontinuierliche Anpassung an sich ständig verändernde Krankheitserreger.

## 1.1 Das adaptive Immunsystem und seine Bestandteile

Das adaptive Immunsystem ist im Gegensatz zur angeborenen Abwehr (Antigen-)spezifisch. Die Zellen der angeborenen Abwehr, wie zum Beispiel Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), detektieren über ihre Mustererkennungsrezeptoren redundante Oberflächenstrukturen von Pathogenen, sogenannte „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs). Die Zellen der erworbenen Abwehr besitzen hingegen spezifische Rezeptoren, die nur ein bestimmtes Antigen erkennen. Entsprechend des Ortes ihrer Differenzierung unterscheidet man die im Knochenmark ausreifenden B-Zellen und die sich im Thymus differenzierenden T-Zellen. Die reifen B- und T-Zellen werden über ihre entsprechenden B-Zell-Rezeptoren und T-Zell-Rezeptoren (TZR) aktiviert und können dann zu den entsprechenden Effektorzellen differenzieren. Während der B-Zell-Rezeptor zu den Immunglobulinen gehört und damit auch als solcher sezerniert werden kann, ist der T-Zell-Rezeptor zwar mit den Immunglobulinen verwandt, weist jedoch strukturell sowie in seinen Bindungseigenschaften einige Unterschiede auf und liegt ausschließlich membrangebunden vor. Der TZR entwickelt sich im Thymus im Rahmen der T-Zell-Reifung. Sein Aufbau ist ausschlaggebend für die weitere Klassifizierung der T-Zellen. Es handelt sich um ein Heterodimer, das aus zwei unterschiedlichen in der Zellmembran verankerten Polypeptidketten (Transmembran-Glykoproteine) besteht. Diese bestehen aus verschieden zusammengelagerten Untereinheiten und sind mittels Disulfidbrücken verbunden.

Es gibt zwei verschiedene Gruppen von T-Zell-Rezeptoren,  $\alpha\beta$  TZR und  $\gamma\delta$  TZR. Diese Unterscheidung ergibt sich aus der Zusammensetzung der unterschiedlichen Polypeptidketten, die entsprechend ihres Aufbaus als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Kette bezeichnet werden (Murphy und Weaver 2018). Die Mehrheit der naiven T-Lymphozyten entwickelt sich im Thymus zu T-Zellen mit einem  $\alpha\beta$  TZR; dieser erkennt Antigene im Kontext mit einem körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) - Molekül (s.u.) (Murphy und Weaver 2018).  $\alpha\beta$  T-Zellen tragen beim Verlassen des Thymus auf ihrer Oberfläche das *Cluster of Differentiation* (CD) 4- oder CD8-Molekül. Welchen der

beiden sie exprimieren, entscheidet sich im Rahmen der Selektion im Thymus. Hierbei werden den T-Vorläuferzellen, die zunächst beide CD-Moleküle tragen und daher als doppelt-positiv bezeichnet werden, Peptide im Komplex mit MHC-I oder -II-Molekülen dargeboten, welche sie mit ihren TZR erkennen und an die sie binden. Einer positiven Selektion unterliegen hierbei diejenigen T-Lymphozyten, deren Bindungsaaffinität zu dem Antigen-MHC-I/II-Komplex nicht zu stark und nicht zu schwach ist. Die Erkennung eines über MHC-I präsentierten Antigens bewirkt dabei den Verlust von CD4, die Erkennung eines über MHC-II präsentierten Antigens den Verlust von CD8.

Der unterschiedliche Besatz der Oberflächenmarker lässt sich mittels Durchflusszytometrie nutzen, um die verschiedenen Differenzierungsstadien der T-Zellen zu bestimmen. Diese Methode hat auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden.

## **1.2 Zytotoxische Lymphozyten**

### **1.2.1 $\alpha\beta$ T-Zellen**

#### **CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Um sich vom naiven T-Lymphozyten zur reifen CD8<sup>+</sup> T-Zelle zu entwickeln, ist die Interaktion der T-Zelle mit einem zu ihrem Rezeptor passenden Antigen erforderlich. Da CD8 an eine Region am MHC-I-Protein bindet, interagieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit auf MHC-I präsentierten Antigenen.

Das MHC-I-Molekül ist ein Glykoprotein, das auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert ist. Es wird im endoplasmatischen Retikulum klassischerweise mit endogenen Bestandteilen der Zelle beladen, die dann auf der Zelloberfläche dargeboten werden. Auch Bestandteile intrazellulärer Pathogene können über diesen Weg auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Erkennt der TZR der CD8<sup>+</sup> T-Zelle im Rahmen einer Infektion entsprechend präsentierte Antigene, erfolgt eine Aktivierung, bei der unter anderem mit zytotoxischen Mediatoren (Granzyme, Granulysin, Perforin oder Fas Ligand) beladene Vesikel gebildet und gespeichert werden. Im Falle eines neuerlichen Antigenkontakts können die nun reifen T-Zellen ihre Effektorfunktion ausüben (Russell und Ley 2002). Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedeutet dies die Eliminierung der infizierten Zelle, weshalb man sie auch als zytotoxische T-Zellen (*Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL*) bezeichnet. Im Rahmen der zytotoxischen Effektorphase können CTL auf verschiedene Mechanismen zurückgreifen: Zum einen können sie Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) oder IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) freisetzen. Interferon- $\gamma$  hemmt unter anderem die virale Replikation, wodurch die Wirtszelle vermehrt MHC-I-Moleküle exprimieren kann und sich in der Konsequenz die Wahrscheinlichkeit erhöht, von zytotoxischen Zellen detektiert zu werden (Murphy und Weaver 2018). TNF- $\alpha$  wiederum kann durch die Bindung an seinen korrespondierenden Rezeptor (TNFR1) zur Apoptose der infizierten Zelle beitragen. Auf der anderen Seite können die intrazellulär gespeicherten Vesikel mobilisiert und deren

Inhalt unter Ausbildung einer sogenannten „immunologischen Synapse“ in die Zielzelle entlassen werden, was die Apoptose der Zielzelle einleitet. Letzteres kann einerseits über die Interaktion des Fas Liganden (FasL) mit seinem Rezeptor Fas (CD95) und andererseits durch die Wirkung der Mediatoren Granzym, Granulysin und Perforin geschehen (Barry und Bleackley 2002).

### **CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen nehmen vielfältige Aufgaben im Rahmen des Immunsystems wahr. So unterstützen sie die B-Zellen in ihrer Antikörperproduktion, verstärken und erhalten die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort, regulieren die Funktion von Makrophagen und stimmen das Ausmaß der Immunantwort gegen ein weites Spektrum an pathogenen Mikroorganismen ab. Sie haben hierbei auch regulierende Funktion, um autoimmunologische Prozesse einzuschränken (Zhu et al. 2010). Da sie das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, welches mit einer Region am MHC-II-Protein interagiert, erkennen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur Peptide, die ihnen über den MHC-II-Komplex präsentiert werden. Antigen-Präsentierende Zellen (APC) der angeborenen Abwehr, also dendritische Zellen und Makrophagen, aber auch B-Zellen, tragen MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sie nutzen diese für die Antigenpräsentation phagozytierter (exogener) Peptide. Dieser Antigen-Antikörper-Kontakt dient der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zelle zur Reifung und Differenzierung zur Effektorzelle, die bei neuerlichem Antigenkontakt ihre Funktion ausführen kann. In Bezug auf diese Effektorfunktion zeigen sich bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhebliche Unterschiede, weshalb sich verschiedene Subpopulationen unterscheiden lassen. Je nach Zusammensetzung des Zytokinspektrums können sich die klassischen T-Helferzellen (Th-Zellen) oder IL-17 produzierenden (Th17) sowie regulatorischen T-Zellen (Treg) entwickeln. Die klassischen Th-Zellen wiederum lassen sich in Th1- und Th2-Zellen unterteilen. Th1-Zellen exprimieren die Zytokine INF-γ, IL-2 und TNF-α, wohingegen Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 sowie TNF-α und in geringerem Umfang IL-2 produzieren (Zhu et al. 2010). Letztere bewirken über ihr sezerniertes Zytokinspektrum eine Steigerung der Antikörperproduktion von B-Zellen, stimulieren den Immunglobulin-Klassenwechsel und die somatische Hypermutation (Zhu et al. 2010). Th1-Zellen spielen eine größere Rolle in der Phagozyten-vermittelten Immunreaktion, indem sie die Aktivierung von Makrophagen unterstützen (Romagnani 1999).

Neben den klassischen Th-Zellen gibt es eine weniger bekannte Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sich vorwiegend aus Th1-Zellen (bzw. Th1 ähnlichen Zellen) entwickelt und zytotoxische Funktion besitzt, ähnlich der von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Marshall und Swain 2011; Takeuchi und Saito 2017). Sie können zytotoxische Granula sezernieren, die Granzym B und Perforin und/oder FasL enthalten, um Zielzellen direkt zu eliminieren. Zunächst hielt man diese Population für ein *in vitro*-Phänomen, das sich bei langer Kultivierung entwickelte. Es zeigte

sich jedoch, dass insbesondere Patienten mit chronischen viralen Infekten wie mit CMV, HIV 1 und Hepatitis eine erhöhte Anzahl von CD4<sup>+</sup> CTLs aufwiesen (Marshall und Swain 2011; Takeuchi und Saito 2017) und dass sie sich insbesondere unter IL-2-Einfluss zu solchen ausdifferenzierten (Marshall und Swain 2011). Dies kann sich daher auch in der Zellkultur zunutze gemacht werden, um diese Population zu stimulieren. Entsprechend der zytotoxischen Funktion der CD8<sup>+</sup> CTL reagieren auch sie in antigenspezifischer Weise (Takeuchi und Saito 2017). Allerdings sind auch die CD4<sup>+</sup> CTL entsprechend dem Rest des CD4<sup>+</sup> Kollektivs auf eine Präsentation über MHC-II angewiesen (Marshall und Swain 2011). Somit kann ein Antigen, das über MHC-II präsentiert wird, ebenfalls zur direkten Elimination der Zielzelle führen. Da einige Viren die Herunterregulierung der MHC-I-Moleküle als Immunevasionsstrategie nutzen, kann über den intakten MHC-II-Mechanismus durch die CD4<sup>+</sup> CTL trotzdem eine Elimination erreicht werden (Takeuchi und Saito 2017).

### **1.2.2 $\gamma\delta$ T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zellen gehen aus derselben Vorläuferzelle wie die  $\alpha\beta$  T-Zellen hervor (Vantourout und Hayday 2013), sind in der Regel jedoch CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>. Sie werden durch den Aufbau ihres TZR klassifiziert, der aus je einer  $\gamma$ -Kette und einer  $\delta$ -Kette besteht. Im Unterschied zu den  $\alpha\beta$ -Ketten liegt eine begrenztere Anzahl variabler (V) Gensegmente für die Expression und Kombination dieser Ketten vor, wodurch die Variabilität des  $\gamma\delta$  TZRs deutlich geringer ist (Kabelitz et al. 2017). Entsprechend des exprimierten TZR-Typs lassen sich zwei Gruppen unterscheiden (Vantourout und Hayday 2013): Eine im peripheren Blut vorherrschende Gruppe und eine gewebeprädominante Gruppe. Die gewebebasierte Form trägt einen V $\delta$ 1<sup>+</sup> TZR und besiedelt vor allem epitheliale Gewebe, insbesondere die des Darms und der Haut (Xiong und Raulet 2007). Sie tragen hier zur Eliminierung von Pathogenen bei, indem sie bakteriostatische und lytische Moleküle wie Defensine und Granulysin produzieren und freisetzen (Bonneville et al. 2010). Somit wirken sie bei der Ausbildung der Barrierefunktion der Epithelien mit. Die im Blut vorherrschende Gruppe trägt den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>+</sup> TZR und macht einen Anteil von 1-10 % aller T-Lymphozyten aus (Nussbaumer und Thurnher 2020). Ihr Anteil kann sich jedoch im Rahmen von Infektionen drastisch (auf bis zu 60 %) steigern (Chien et al. 2014; Shiromizu und Jancic 2018). Dies liegt daran, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Eliminierung infizierter oder transformierter Zellen beitragen, indem sie einerseits große Mengen von IFN $\gamma$  und TNF produzieren und andererseits durch die Freisetzung zytotoxischer Granula und über FasL und TRAIL die Apoptose in der Zielzelle induzieren (Bonneville et al. 2010; Shiromizu und Jancic 2018; Vantourout und Hayday 2013). Anders als die  $\alpha\beta$  T-Zellen sind sie dabei jedoch nicht strikt auf die Präsentation prozessierter Antigene über MHC-Moleküle angewiesen, sondern können mit ihrem TZR Oberflächenmoleküle wie kleine phosphorylierte nicht-Peptid-Antigene (Phosphoantigene, pAg) erkennen (Peters et al. 2018). Diese werden

von Tumoren oder infizierten Zellen Stress-induziert exprimiert und für die  $\gamma\delta$  T-Zelle detektierbar, wenn sie im Zusammenhang mit einem Vermittlermolekül (Butyrophillin, BTN3A1) präsentiert werden (Kabelitz et al. 2017). Daneben können sie vielfältige Strukturen auch über Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) und Natural Killer Rezeptoren (NKR) erkennen und damit zur Beseitigung infizierter Zellen beitragen (Bonneville et al. 2010; Vantourout und Hayday 2013). Außerdem sind sie durch Bisphosphonate, die bei der Osteoporose-Therapie eingesetzt werden, aktivierbar, was man sich wiederum in der Zellkultur zunutze machen kann (Holtmeier und Kabelitz 2005).

Entsprechend der Vermischung von Charakteristika von Zellen der adaptiven Immunabwehr (weisen einen TZR auf, stammen von der gleichen Vorläuferzelle wie  $\alpha\beta$  Zellen ab, weisen ein differenziertes Zytokinspektrum auf, zeigen eine Differenzierungsvielfalt zu unterschiedlichen Effektorzellen) und Eigenschaften der Zellen des angeborenen Immunsystems (rasche Reaktion, Vorhalten der Epithelbarriere, keine MHC-Restriktion, Erkennung von PAMPs), spricht man in Bezug auf diese Zellpopulation auch von transitioneller Immunität oder von *innate-like* T-Lymphozyten (Vantourout und Hayday 2013).

### **1.3 Zytotoxische Granula – die Lysosomen-verwandten Effektorvesikel zytotoxischer T-Zellen**

Neben den herkömmlichen Lysosomen gibt es sogenannte Lysosomen-verwandte Organellen (LRO), die auch als „Lysosomen-verwandte Effektorvesikel“ (*Lysosome Related Effector Vesicles*, LREV) bezeichnet werden. Sie weisen Eigenschaften von Lysosomen auf, haben aber zusätzliche zellspezifische Aufgaben. Eine besondere Gruppe dieser LREV stellt die Gruppe der sekretorischen Lysosomen dar. Dabei handelt es sich um bifunktionelle Organellen mit degradativer und sekretorischer Funktion. Sie enthalten neben ihrer lysosomalen Ausstattung zellspezifische Komponenten, die im entsprechenden Kontext sezerniert werden können (Blott und Griffiths 2002). Vorwiegend kommen sie in Zellen vor, die der hämatopoetischen Reihe entstammen, so zum Beispiel in Thrombozyten, Mastzellen, basophilen Granulozyten, Osteoklasten sowie in zytotoxischen Lymphozyten. In Letzteren findet sich ein spezieller Typ sekretorischer Lysosomen, die als zytotoxische oder lytische Granula bezeichnet werden. Entsprechend ihrer Verwandtschaft zu Lysosomen weisen diese einen sauren pH-Wert auf, exprimieren typische Lysosomen-assozierte Markerproteine (LAMPs), sind membranumschlossen und enthalten Hydrolasen (Blott und Griffiths 2002). Merkmal der zytotoxischen Granula in Lymphozyten ist die zusätzliche Ausstattung mit Effektormolekülen wie Granzymen, Granulysin und Perforin (s.u.) oder dem Membran-assozierten FasL (s.u.). Sie weisen zusätzlich Ankerproteine auf, die sie mit dem Zytoskelett verbinden. Dies ermöglicht ihre Mobilisierung zur zytotoxischen Synapse und führt zur gerichteten Freisetzung der in ihnen enthaltenen Effektorproteine in die immunologische

Synapse (s.u.). Die konzertierte Aktivität dieser Mediatoren induziert den Zelltod der Zielzelle. Somit sind diese Organellen essenzieller Bestandteil der Effektorfunktion zytotoxischer Zellen. Wie im Rahmen der Vorstellung der verschiedenen Zellpopulationen bereits erwähnt, bilden die CD8<sup>+</sup> CTL und CD4<sup>+</sup> T-Zellen erst nach Aktivierung durch den TZR über Kontakt mit dem passenden Antigen zytotoxische Granula aus (Blott und Griffiths 2002; Lettau et al. 2007). Auch Zellen der angeborenen Abwehr, wie Natürliche Killerzellen, besitzen zytotoxische Granula zur Zielzellelimination, die hier jedoch bereits präformiert vorliegen. Für γδ T-Zellen ist dies nicht endgültig geklärt, wobei jedoch gezeigt werden konnte, dass z.B. γδ Thymozyten noch kein zytotoxisches Potenzial aufweisen, jedoch eine TZR-unabhängige Stimulation zur Aktivierung führt (Ribot et al. 2014). Neben den Zellen des Immunsystems nutzen auch Melanozyten und einige neuronale Zellen sekretorische Lysosomen, was anhand von Syndromen wie dem Chediak–Higashi Syndrom und dem Hermansky–Pudlak Syndrom (HPS) deutlich wird. Diese Erkrankungen sind durch Hypopigmentierung, verlängerte Blutungszeit und einen Immundefekt gekennzeichnet, alles Symptome, die auf einem Defekt in der Mobilisierung von LREV beruhen (Bowman et al. 2019).

### **1.3.1 Die zytotoxische Synapse**

Die Ausbildung von Synapsen als Medium des Informationsaustausches bei der Zellkommunikation ist ein typischer Vorgang, der beispielsweise auch bei der Interaktion von T-Zellen mit APCs im Rahmen des *Primings* zustande kommt. Eine spezielle Form dieses Zellkontaktees stellt die zytotoxische Synapse dar. Sie dient der zielgerichteten Freisetzung zytotoxischer Effektmoleküle aus der zytotoxischen Zelle zur Zielzelle bei gleichzeitigem Schutz von sich selbst und umgebenden Strukturen (Dieckmann et al. 2016; Trambas und Griffiths 2003). Durch die TZR-Aktivierung kommt es durch einen intrazellulären Kalziumanstieg zur Reorganisation des Zytoskeletts und zum Transport der sekretorischen Granula in Richtung der immunologischen Synapse (La Roche et al. 2016). An der Kontaktfläche der beiden Zellen bildet sich dadurch eine Struktur aus, die man entsprechend der morphologischen Analogie als *Bulls Eye* bezeichnet. Im Zentrum entsteht durch die Zusammenlagerung der TZRs ein Bereich, der *central Supramolecular Activation Cluster* (cSMAC) heißt. Zirkulär um diese Struktur lagern sich eine Reihe von Adhäsionsmolekülen zusammen (*Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1 und Talin), die den sogenannten *peripheral Supramolecular Activation Cluster* (pSMAC) ausbilden. Dieser wiederum ist von einem Aktinwall umgeben, den man *distal SMAC* nennt (Dieckmann et al. 2016). Neben der cSMAC- und innerhalb der pSMAC-Region ist ein sekretorischer Bereich, in dem die zytotoxischen Granula freigesetzt werden.

Neben den Veränderungen an der Plasmamembran bewegt sich auch das Zentrosom (*Microtubule Organizing Center*, MTOC) in Richtung der Fusionsstelle, wo es schließlich

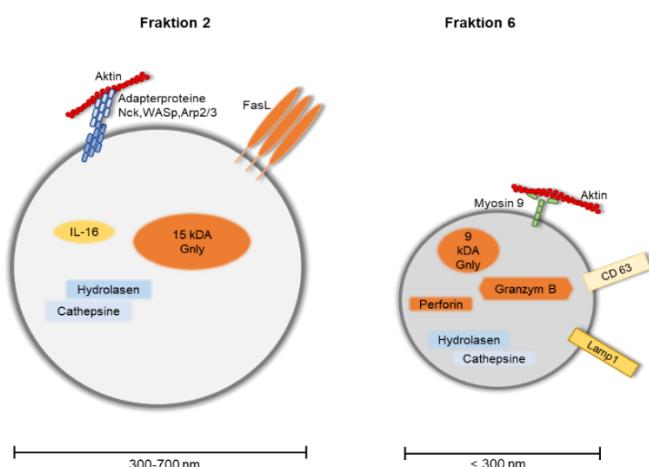
neben dem cSMAC andockt. Da die sekretorischen Lysosomen am Zentrosom verankert sind, bewegen sie sich gemeinsam mit diesem in Richtung der sekretorischen Domäne, wo sie schließlich mit der Plasmamembran fusionieren, wobei lösliche zytotoxische Effektmoleküle in die Synapse entlassen und Transmembrankomponenten lokal auf der Zelloberfläche exponiert werden (Dieckmann et al. 2016). Die besondere Bedeutung dieses Prozesses im Immunsystem wird deutlich, wenn er im Rahmen von genetischen Erkrankungen wie der familiären hämophagozytischen Lymphohistiozytose (FHL) oder Griscelli-Syndrom Typ 2 (GS2) gestört ist. Diese sehr seltenen Erkrankungen münden bei stark unterschiedlichem Verlauf in einer schweren Immundefizienz (Dieckmann et al. 2016).

### **1.3.2 Zwei Entitäten von Effektorkompartimenten**

Anders als zunächst postuliert, konnte gezeigt werden, dass es für FasL eine andere Speicher- und Sekretionsstruktur gibt als für Granzyme und Perforin. Beide Formen sind zytotoxische Granula, weisen jedoch sowohl hinsichtlich ihres Aufbaus als auch bezüglich ihrer Mobilisierungseigenschaften klare Unterschiede auf (He und Ostergaard 2007; Lettau et al. 2018). So werden die Effektorproteine FasL und die 15 kDa-Form von Granulysin in anderen zytotoxischen Granula gespeichert als Granzym B und Perforin sowie das 9 kDa-Granulysin, welche in einer deutlich elektronendichteren Struktur vorliegen, die daher als „dense granules“ (dichte Granula) bezeichnet wurden (Schmidt 2009a). Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde deren unterschiedliche Dichte methodisch genutzt, um sie mittels Dichtegradientenzentrifugation voneinander zu separieren und zu analysieren. Bei diesen Untersuchungen entstanden insgesamt sechs Fraktionen, wobei sich das FasL/15 kDa-Granulysin-speichernde Kompartiment in der zweiten Fraktion (F2), das Granzym- / Perforin- / 9 kDa-Granulysin-Kompartiment dagegen in der sechsten Fraktion (F6) anreicherte. Daraus ergeben sich im Folgenden die Bezeichnungen „F2-Vesikel“ und „F6-Granula“. Über massenspektrometrische Untersuchungen der mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) separierten Proteine wurden Proteomkarten beider Entitäten von LREV erstellt. In diesen wurden alle identifizierten Proteine der jeweiligen Fraktion markiert, sodass sie anhand der Proteinliste zugeordnet werden können (Schmidt et al. 2011b). In der vorliegenden Arbeit wurden keine massenspektrometrischen Analysen durchgeführt. Die vorliegenden Proteomkarten wurden entsprechend als Referenz für die Benennung der individuellen Spots herangezogen.

Überdies zeigte sich eine unterschiedliche Anbindung der beiden Speicherkompartimente an das Zytoskelett. Für die F6-Granula legten Vorarbeiten eine Assoziation an das Aktin-Zytoskelett über Myosin 2a nahe, für die F2-Vesikel zeigte sich hingegen eine Assoziation durch die Proteine Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein*), WASp (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) und den Arp 2/3 (*Actin-related protein 2/3*) -Komplex. Bei

Nck handelt es sich um ein 47 kDa Protein, welches keine intrinsische katalytische Aktivität besitzt, jedoch in verschiedenen Kontexten als Adaptermolekül fungiert und so zum Beispiel an der Vermittlung der Bindung zwischen WASp und dem Aktin-Zytoskelett beteiligt ist (Antón et al. 1998). Bei WASp handelt es sich um ein 65 kDa Polypeptid, das eine wichtige Rolle in der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts spielt (O'Sullivan et al. 1999). Die Beeinträchtigung der Funktion des Proteins ist für einen Teil der Symptome des Wiskott-Aldrich-Syndroms verantwortlich (O'Sullivan et al. 1999). Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die mit schwerer Thrombozytopenie, Ekzemen, blutigen Diarrhoen und einer schweren Immundefizienz sowie einem gesteigerten Risiko für Malignome (insbesondere Lymphome) einhergeht und ohne adäquate Behandlung stets letal verläuft. Der Arp 2/3-Komplex ist ein aus sieben Monomeren bestehendes Protein, das an der Anknüpfung neuer Aktinmonomere an ein bestehendes Aktinfilament beteiligt ist (Veltman und Insall 2010). Des Weiteren konnten Unterschiede bei der Mobilisierung und Degranulation, also der Freisetzung der in den Effektorkompartimenten gespeicherten Mediatoren, festgestellt werden. Hier lag der ausschlaggebende Unterschied in einer strikten Kalziumabhängigkeit der F6-Granula gegenüber einer zweiphasigen Mobilisierung der F2-Vesikel, bei der zumindest die frühe Phase der Freisetzung kalziumunabhängig verläuft (s.u.). In Abbildung 1.1 ist der aktuelle Kenntnisstand zu den Charakteristika der beiden Speicher- und Sekretionskompartimente der verschiedenen Mediatoren zusammenfassend abgebildet. Insgesamt lassen die beschriebenen Unterschiede innerhalb der beiden Entitäten von Speicherkompartimenten bezüglich Beschaffenheit und Ausstattung sowie Freisetzungsmechanismen eine kontextabhängige Rekrutierung der verschiedenen Effektormoleküle vermuten. Im Folgenden soll näher auf die zytotoxischen Mediatoren und deren Eigenschaften eingegangen werden, wie sie in den Effektorvesikeln vorkommen.



**Abbildung 1.1 Schematisches Modell der beiden Entitäten von Effektorkompartimenten.** Die Abbildung links zeigt die größeren F2-Vesikel, die den membrangebundenen FasL tragen, die rechte Abbildung zeigt die elektronendichten F6-Granula mit freien zytotoxisch-/lytischen Mediatoren (vereinfacht und modifiziert nach Lettau et al. 2015).

### **1.3.3 Der Inhalt Lysosomen-verwandter Effektorvesikel**

#### **1.3.3.1 FasL (CD178/CD95L)**

Fas ist als Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie einer der physiologisch wichtigsten Rezeptoren, die den programmierten Zelltod initiieren können. Nach Ligation durch seinen Liganden FasL (CD178/CD95L) bewirkt er über die Aktivierung des sogenannten „*Fas-associated protein with death domain*“ (FADD) und Caspase8 eine zytoplasmatische und nukleäre Kondensierung und Fragmentierung der DNA (Russell und Ley 2002). Bei FasL handelt es sich um ein Typ II Transmembranprotein. Eine lösliche Form, die vermutlich in einer Trimerstruktur vorliegt, kann durch proteolytische Spaltung des transmembranen FasL generiert werden (Nagata und Golstein 1995).

Die Rezeptor-Liganden Interaktion von Fas und FasL spielt bei der Bekämpfung von Tumorzellen, virusinfizierten Zellen und autoreaktiven Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Neben der Apoptoseinduktion über zytolytische Mediatoren wie Granulysin und Perforin sowie Granzyme, haben zytotoxische T-Zellen die Fähigkeit zur Vermittlung des Zelltodes über den davon unabhängigen FasL-Pathway (Nagata und Golstein 1995). Aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und hier insbesondere Th1-Zellen nutzen den FasL-Weg, um Zielzellen zu eliminieren (Lowin et al. 1996; Oberg et al. 1997; Stalder et al. 1994). Fas wird konstitutiv auf einer großen Vielzahl an Geweben exprimiert; Leber, Herz, Lunge, Nieren und die Ovarien exprimieren die größten Mengen. Aus diesem Grund muss die Oberflächenexpression von seinem Liganden streng reguliert werden, um unbeabsichtigten Zellschaden zu verhindern (He et al. 2010). FasL ist konstitutiv nur auf Zellen immunprivilegierter Organe, wie den Augen, der Plazenta oder den Hoden exprimiert. Auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems ist nur sehr wenig FasL nachweisbar, da er hier in intrazellulär lokalisierten sekretorischen Lysosomen gespeichert wird (Lettau et al. 2018). Seine Expression kann im Rahmen von TZR-Aktivierung und durch Zytokine wie Interferon (IFN) induziert werden (Rossin et al. 2019). Zur Ausübung seiner Funktion muss FasL an die Oberfläche mobilisiert werden, wobei zwei Phasen beobachtet werden. In der ersten Phase wird gespeicherter FasL kalziumunabhängig mobilisiert. In der zweiten Phase, die nach etwa 90-120 min einsetzt, erfolgt ein zweiter Anstieg der Oberflächenexpression von nun aber neu synthetisiertem FasL (Lettau et al. 2018).

#### **1.3.3.2 Granzym B**

Granzym B ist eine Serinprotease und gehört der Chymotrypsin-Superfamilie an. Es wird als Präproenzym nach dem Transport über das Endplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in sekretorischen Granula von zytotoxischen T- und NK-Zellen verpackt und gespeichert (Rousalova und Krepela 2010). Granzym B dient als potenter Induktor der Apoptose. Dies geschieht auf verschiedenen Wegen. Zum einen induziert Granzym B die

Caspase-Kaskade durch direkte enzymatische Aktivierung verschiedener Caspase (insbesondere 3 und 8). Zum anderen aktiviert Granzym B das pro-apoptotische BID-Protein, welches der BCL2-Familie angehört und über weitere Schritte zur Freisetzung von CytochromC aus Mitochondrien führt (Barry und Bleackley 2002). Diese Apoptose-induzierende Funktion des Granzym B wird von zytotoxischen T- und NK-Zellen zur Zielzelleliminierung genutzt.

Neben Granzym B gibt es weitere Granzyme (A, C, H, K und M), die sich in LREV befinden. Sie induzieren ebenfalls den Zelltod, jedoch über andere Substrate und Mechanismen, die parallel oder unabhängig voneinander ablaufen. Dies ermöglicht die sichere Eliminierung einer Zielzelle auch dann, wenn diese gegen verschiedene Mechanismen der Zelltodinduktion resistent ist (Lieberman 2010). Granzym A beispielsweise aktiviert ein Caspase-unabhängiges Zelltodprogramm und spielt neben der Zelltodinduktion wahrscheinlich eine große Rolle in inflammatorischen Prozessen, indem es außerdem proinflammatorische Zytokine aktiviert (Lieberman 2010).

### **1.3.3.3 Perforin**

Bei Perforin handelt es sich um ein schlüsselförmiges Molekül, das am N-Terminus eine sogenannte *membrane Attack Complex/Perforin*-Domäne, eine *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Domäne und eine Kalzium/Lipid-Bindungststelle aufweist (Spicer et al. 2017). Die Aktivität von Perforin wird streng kontrolliert, einerseits durch den niedrigen pH-Wert und andererseits durch die niedrige Kalziumkonzentration, wie sie in den sekretorischen Lysosomen vorherrscht (Spicer et al. 2017). Nach seiner Freisetzung aus sekretorischen Lysosomen spielt Perforin eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von viralen und bakteriellen Infektionen sowie bei der Tumorabwehr (Lowin et al. 1996). Perforin allein kann jedoch keinen Zelltod auslösen (Barry und Bleackley 2002). Seine Funktion scheint vielmehr darin zu liegen, den Eintritt von Granzymen in die Zielzelle zu erleichtern, denn in Abwesenheit von Perforin können Granzyme ihre zytotoxische Funktion nicht effektiv ausüben (Barry und Bleackley 2002; Voskoboinik et al. 2015). Auf welche Art und Weise Perforin dieser Aufgabe nachkommt, ist nicht abschließend geklärt. Nach dem klassischen Modell bildet Perforin nach Multimerisierung innerhalb der Zielzellmembran Poren aus, die den Granzymen den Eintritt in die Zielzelle erlauben (Masson und Tschoop 1985). Barry und Bleackley 2002 vermuteten hingegen, dass Perforin erst bei der Freisetzung von Granzymen aus endozytotischen Vesikeln beteiligt ist, die zuvor durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen wurden. Sie hielten die durch Perforin erzeugte Pore in der Plasmamembran der Zielzelle für zu klein, als dass Granzyme diese passieren könnten. Die Untersuchungen von Rudd-Schmidt et al. 2019 unterstützten wiederum die ursprünglichen Annahmen des klassischen Modells und konnten

zeigen, dass Perforin nach Freisetzung durch Degranulation eine Perforation der Plasmamembran der Zielzelle bewirkt, indem es transmembranäre, oligomere Poren formt, die das Eindringen von Granzym B ins Zytosol der Zielzelle ermöglichen, was schließlich in ihrer Apoptose mündet.

#### **1.3.3.4 Granulysin**

Granulysin gehört zur Familie der *Saposin-like* Proteine (Krensky und Clayberger 2009). Es ist ein zytolytisches und proinflammatorisches Molekül, welches in zwei Formen unterschiedlichen Molekulargewichtes vorkommt, die sich auch hinsichtlich Funktion und Speicherung unterscheiden. Bei der einen handelt es sich um eine 15 kDa-Form, bei der anderen um eine daraus posttranslational prozessierte 9 kDa-Form (Sparrow und Bodman-Smith 2020). Das 9 kDa-Granulysin hat zytolytische Wirkung auf Tumorzellen und Mikroben. Hierbei wirkt es auf Bakterien (darunter auch *M. tuberculosis*), aber auch auf Pilze und Parasiten (Sparrow und Bodman-Smith 2020). Es wirkt dabei über die direkte Zerstörung der Integrität der Membran und bewirkt eine mitochondriale Depolarisation, was über Cytochrom C-Freisetzung zum Zelltod führt (Russell und Ley 2002).

Daneben hat Granulysin eine Chemokin-Wirkung auf T-Lymphozyten, Monozyten und andere Immunzellen und induziert die Expression von Zytokinen (Krensky und Clayberger 2009). Die Funktion des 15 kDa-Granulysin hingegen ist weniger gut bekannt, es wird ihm jedoch eine Funktion als Immun-“Alarmin“ zugesprochen und es scheint die Reifung von Antigenpräsentierenden Zellen sowie die Migration von Immunzellen zu unterstützen. Ob es überhaupt zytotoxische Eigenschaften besitzt, ist umstritten (Clayberger et al. 2012; Sparrow und Bodman-Smith 2020).

Im Hinblick auf die Speicherung der beiden Granulysin-Formen konnte gezeigt werden, dass sie in unterschiedlichen subzellulären Strukturen lokalisiert sind. Während sich das 9 kDa-Granulysin in den dichten F6-Granula anreicherte, die auch die anderen zytotoxischen Mediatoren Granzym B und Perforin beinhalteten, war das 15 kDa-Granulysin in den F2-Vesikeln zu finden. Diese Unterschiede in der Speicherung ließen sich weiter untermauern, da die beiden Granulysin-Formen unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen unterliegen. Klassischerweise erfolgt die Degranulation und Freisetzung zytotoxischer Mediatoren unter Ausbildung der zytotoxischen Synapse kalziumabhängig (s.o.). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, dass im Rahmen dieser klassischen Degranulation nur die 9 kDa-Form des Granulysins kalziumabhängig freigesetzt wird. Dahingegen erfolgt die Freisetzung von 15 kDa-Granulysin spontan und lässt sich durch Phorbolesterbehandlung, wodurch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird, weiter steigern, was auf nicht-klassische Degranulation hindeutet (Lettau et al. 2019).

### **1.3.3.5 DPP4/CD26**

Bei DPP4/CD26 (Dipeptidylpeptidase 4) handelt es sich um ein Oberflächen-Antigen von T-Zellen, das enzymatische Aktivität besitzt (spaltet L-Prolin oder L-Alanin Dipeptide an der vorletzten Position des N-Terminus). Es ist ein Homodimer und integrales Typ II Glykoprotein (Klemann et al. 2016). Initial liegt DPP4/CD26 membrangebunden vor. Es gibt jedoch auch eine lösliche Form, die wahrscheinlich durch proteolytische Prozessierung der membrangebundenen Form entsteht. DPP4/CD26 kommt in einer Vielzahl von Geweben vor, darunter Epithelien und Endothelien von Nieren, Leber, Lunge und Darm (Klemann et al. 2016). Variable DPP4/CD26-Expressionsmuster auf T-Zellen und in Geweben sind bei verschiedenen Erkrankungen wie Asthma, Arthritis, Multipler Sklerose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar. Außerdem spielt DPP4/CD26 eine entscheidende Rolle im Glukose-Metabolismus, indem es das Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1) durch enzymatische Spaltung inaktiviert. GLP-1 bewirkt die Ausschüttung von Insulin, sein Abbau führt daher zu verminderten Insulinspiegeln. Inhibitoren von DPP4/CD26 („Gliptine“) sind zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen, da sie durch die Hemmung des Abbaus von GLP-1 zu einer gesteigerten Insulinsekretion führen. Neben dieser Wirkung auf den Glukosestoffwechsel kommt DPP4/CD26 eine besondere Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen im Rahmen von Immunprozessen zu (Wagner et al. 2016). Zudem ist DPP4/CD26 ein Mediator der T-Zell-Migration im Thymus. Es wird bei Apoptose herunterreguliert und ist in höchster Konzentration auf reifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu finden (Klemann et al. 2016). Auf ruhenden T-Zellen ist DPP4/CD26 kaum exprimiert, unter Aktivierung zeigt sich jedoch eine sehr deutliche Steigerung der Expression (Klemann et al. 2016). Neben der klassischen Lokalisation an der Oberfläche konnte DPP4/CD26 auch intrazellulär nachgewiesen werden. In NK-Zellen und in zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> sowie  $\gamma\delta$  T-Zellen) scheint sich DPP4/CD26 präformiert in den sekretorischen Lysosomen zu befinden, die auch Granzym B, 9 kDa-Granulysin und Perforin enthalten. Auch in Bezug auf DPP4/CD26 scheint eine aktivierungsabhängige Mobilisierung an die Oberfläche aus diesen Kompartimenten heraus kalziumabhängig zu erfolgen (Lettau et al. 2020).

### **1.3.3.6 LAMP1/CD107a**

Die Membran von Lysosomen grenzt das saure Milieu im Inneren von seiner Umgebung ab und dient als Kontaktstruktur bei Membranfusionen mit z.B. Endosomen, Phagosomen und der Plasmamembran (Fukuda 1991). Ein essenzieller Bestandteil dieser Membranen sind die sogenannten *lysosomal-associated membrane proteins* (Lysosomen-assoziierte Membranproteine, LAMPs). Sie sind stark glykosylierte Typ I-Transmembranproteine mit einer großen luminalen Domäne, einer einfachen Transmembrandomäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (Eskelinen 2006). LAMP1 (CD107a) und LAMP2 machen etwa

50 % der lysosomalen Membranen aus und sind somit Teil der Definition eines lysosomalen Kompartiments (Eskelinne 2006). Wie bereits erwähnt, weisen neben klassischen Lysosomen auch sekretorische Lysosomen LAMPs auf. Bei der Degranulation von zytotoxischen T- und NK-Zellen werden diese auf der Zelloberfläche exponiert, weshalb insbesondere LAMP1 als Marker für Zytotoxizitätsassays genutzt wird (Alter et al. 2004). Das Expressionsmuster von LAMP1 wurde auch in Bezug auf die beiden Entitäten von Speicherkompartimenten untersucht. Im Vergleich war eine deutliche Anreicherung in der Fraktion 2 nachweisbar, während es in Fraktion 6 schwächer vertreten war. Im Rahmen von Studien zur Mobilisierung und Kolokalisation von LAMP1 mit den beiden Entitäten von zytotoxischen Granula zeigte sich eine gemeinsame Oberflächenexpression nur bei der kalziumabhängigen Degranulation. Die Oberflächenexpression von LAMP1 konnte also während der Freisetzung von Granzym B und der späten Phase von den FasL-Vesikeln beobachtet werden. In der kalziumunabhängigen Phase der Freisetzung von präformiertem FasL war keine Kolokalisation mit LAMP1 detektierbar (Lettau et al. 2018).

## **2 Fragestellung**

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen sollen die durch Vorarbeiten erzielten Erkenntnisse überprüft werden, nämlich dass die Lymphozyten-vermittelte Zytotoxizität nicht nur auf einem universellen Typus von Speichergranula beruht, sondern dass verschiedene Effektorzellen des Immunsystems über mindestens zwei distinkte zytotoxische Kompartimente mit zelltypabhängigem Proteinbesatz verfügen. Über die Analyse und den Vergleich des Proteoms der beiden Entitäten innerhalb der verschiedenen Populationen soll die Hypothese, dass die unterschiedlichen LREV kontextabhängig mobilisiert werden können, um auf diese Weise die Spezifität einer Immunantwort zu steigern und gleichzeitig die Gefahr unbeabsichtigter Gewebeschädigung zu minimieren, weiter untersucht werden.

Die sich daraus ergebende Fragestellung lautete somit:

Inwiefern sind die beiden Entitäten der bereits weitgehend charakterisierten zytotoxischen Effektorkompartimente innerhalb der untersuchten zytotoxischen T-Zellsubpopulationen hinsichtlich ihres Proteinbesatzes vergleichbar und welche biologisch relevanten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten weisen sie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu  $\gamma\delta$  und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf?

Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die folgenden Bereiche gelegt werden:

1. Lassen sich die beiden Entitäten von zytotoxischen Granula in allen drei untersuchten zytotoxischen T-Subpopulationen entsprechend den Erkenntnissen aus Vorarbeiten nachweisen?
2. Inwiefern unterscheidet sich die generelle Ausstattung der LREV der untersuchten T-Zelllinien hinsichtlich ihres Proteinbesatzes?
3. Lassen sich aufgrund von Unterschieden im Expressionsmuster ausgewählter Proteine innerhalb der verschiedenen T-Zelllinien Rückschlüsse auf deren Mobilisierung und Wirkweise ziehen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material für zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Zelllinien

EBV-transformierte B-Zellen (B-LCL)

##### 3.1.2 Zellkultur

Zellkulturmedium	Hersteller
Zellkulturmedium RPMI 1640 (25 mM HEPES und L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zusätze	Hersteller
Penicillin (10 000 U)/Streptomycin (1000 µg)	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific
(bei 56 °C für 30 min inaktiviert, filtriert mit 0,22 µm, bei 4 °C gelagert)	
Das Zellkulturmedium wurde mit 5 oder 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt und bei 4 °C gelagert.	
Phytohaemagglutinin (PHA)	Remel, Lenexa, USA
PBS	Cell Concepts, Umkirch
Zoledronat	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Rekombinantes Interleukin 2 (rIL-2)	Novartis Pharma
Lösungen & Puffer	Hersteller
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> , PBS)	Biochrom, Berlin
<i>Biocoll Separating Solution</i> (1,077 g/ml)	Biochrom

##### 3.1.2.1 Magnetische Zellseparation (*Magnetic activated cell sorting, MACS*)

Isolations-Kits	Hersteller
CD4 <sup>+</sup> <i>T Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8 <sup>+</sup> <i>T Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec

Puffer	Hersteller	
<b>MACS-Waschpuffer</b>		
Bovines Serumalbumin (BSA)	10 % (w/v)	Serva, Heidelberg
EDTA	2 mM	Merck, Darmstadt
Lösen in PBS		Cell Concepts

### 3.1.2.2 Phänotypisierung kultivierter Zellen

Puffer	Hersteller	
<b>FACS-Waschpuffer</b>		
BSA	1 % (w/v)	Serva
Natriumazid	0,1 %	Merck
Lösen in PBS		Cell Concepts
<b>1 %-Paraformaldehyd (PFA)-Fixierungspuffer</b>		
PFA	1 % (w/v)	Merck
Lösen in PBS		Cell Concepts

Vitalfarbstoff	Hersteller	
LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dye Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific	

Antikörper für die Durchflusszytometrie				
Antikörper	Klon	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
α-CD14-PE	18D11	1:5	IgG1	Immunotools, Friesoythe
α-CD19-FITC	LT19	1:5	IgG1	Immunotools
α-CD2-FITC	HIT11	1:5	IgG1	Immunotools
α-CD3-PE	MEM-57	1:5	IgG2a	Immunotools
α-CD4-FITC	MEM-241	1:5	IgG1	Immunotools
α-CD56-FITC	B-A19	1:5	IgG2a	Immunotools
α-CD8-PE	MEM-31	1:8	IgG2a	Immunotools
α-TZR-αβ-FITC	IP26	1:5	IgG1	BioLegend, San Diego, USA
α-TZR-γδ-PE	11F2	1:5	IgG1	Miltenyi Biotec

Isotypenkontrollen			
Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
IgG1-FITC	203	1:5	Immunotools
IgG2a-PE	713	1:5	Immunotools

## **3.2 Material für biochemischen Methoden**

### **3.2.1 Dichtegradientenzentrifugation**

#### **3.2.1.1 Anreicherung von Zellorganellen**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>	
<b>Lysosomenextraktionskit</b>	Sigma-Aldrich	
<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>	
<b>1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer</b>		
Tris	1 M	Merck
HCl zur Einstellung des pH auf 7,7		Carl Roth, Karlsruhe
Lösen in $_{dd}H_2O$		
<b>NP40-Lysepuffer</b>		
Tris (pH 7,4)	20 mM	
NaCl	150 mM	Merck
Nonidet P40	1 %	Fluka, Steinheim
EDTA	5 mM	Merck
<b>Homogenisierungspuffer</b>		
Sucrose	250 mM	Merck
Hepes	10 mM	Sigma-Aldrich
EDTA	0,3 mM	Merck
in $_{dd}H_2O$		

#### **3.2.1.2 Proteinmengenbestimmung**

<b>Bradford-Assay</b>	<b>Hersteller</b>	
Coomassie Protein Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific	

### **3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>	
<b>1× MES-Laupuffer</b>		
20 × Novex® MES-Laupuffer	Life Technologies, Carlsbad, USA	
Lösen im Verhältnis 1:20 in $_{dd}H_2O$		
<b>3x Probenpuffer</b>		
Tris (pH 6,8)	200 mM	Merck
Natriumdodecylsulat (SDS)	6 % (w/v)	Serva

Glycerin	30 %	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	Merck
Bromphenolblau	Spatelspitze	Sigma-Aldrich

Molekulargewichtsstandard	Hersteller
Precision Plus Protein All Blue	Bio-Rad, Hercules, USA
Low Range Marker	Bio-Rad

### 3.2.3 Westernblot

Puffer & Lösungen	Hersteller
<b>Transferpuffer</b>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
10 % SDS	0,15 % (v/v)
Lösen in $_{dd}H_2O$	
<b>Proteinfärbelösung</b>	
Ponceau-S-Farbkonzentrat	Sigma-Aldrich
<b>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)</b>	
Tris,	10 mM
NaCl	150 M
in $_{dd}H_2O$	
<b>Waschpuffer (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (TBS-T))</b>	
Tween 20	0,05 %
in TBS	
<b>5 %-BSA-Blockierungslösung</b>	
Natriumazid ( $NaN_3$ ) in $H_2O$	10 % (w/v)
BSA	5 % (w/v)
Lösen in TBS-T, sterilfiltrieren (0,22 $\mu m$ )	
<b>Chemilumineszenz-Lösung</b>	
ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Fairfield, USA

Puffer & Lösungen	Hersteller
<b>“Stripping”-Lösung</b>	
SDS	10 %
Tris HCl, pH 6,8	62,5 mM
β-Mercaptoethanol	Calbiochem
Lösen in $\text{ddH}_2\text{O}$	

### 3.2.3.1 Antikörper für Westernblot

<b>Primärantikörper</b>				
Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α-FasL	G2474	Maus	1:500	BD San Jose, Kalifornien, USA
α-Granulysin	Sc-2	Ziege	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, USA
α-Granzym B	2C5/F5	Maus	1:1000	BD
α-CD26/DPP4	D6D8K	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technologies, Leiden, Niederlande
α-LAMP1	25/LAMP1	Maus	1:2000	BD
<b>Sekundärantikörper</b>				
Antikörper	Verdünnung		Hersteller	
α-Maus-HRP	1:7500		GE Healthcare	
α-Kaninchen-HRP	1:5000		GE Healthcare	
α-Ziege-HRP	1:30000		Abcam	

### 3.2.4 Materialien für die 2-Dimensionale Differenzielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)

#### 3.2.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe für die 2D-DIGE

Kits	Hersteller
<b>G-Dyes Labeling Kit, 8G, Refraction-2D™</b>	NH DyeAGNOSTICS, Halle
G-Dye100 Emissionsmaximum bei 524 nm	
G-Dye200 Emissionsmaximum bei 575 nm	
G-Dye300 Emissionsmaximum bei 663 nm	
Abstopplösung	
G-Dye Lösungsmittel	

### 3.2.4.2 Isoelektrische Fokussierung

Puffer & Lösungen		Hersteller
<b>2D-Lysepuffer</b>		
Harnstoff	7 M	Carl Roth
Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)	4 % (w/v)	Merck
Tris	30 mM	
pH 8,5 vor Zugabe von CHAPS eingestellt, aliquotiert und gelagert bei -20 °C		
<b>2D-2x Probenpuffer</b>		
Harnstoff, 7 M	7 M	Carl Roth
Thioharnstoff, 2 M	2 M	GE Healthcare
CHAPS	4 % (w/v)	Carl Roth
$\text{ddH}_2\text{O}$		
Aliquotiert à 500 µl, gelagert bei -20 °C, vor Benutzung Zugabe von:		
Dithiothreitol (DTT)	1 % (w/v)	Sigma-Aldrich
<b>Ampholyte</b>		
IPG Puffer pH 3-11NL	2,4 % (w/v)	GE Healthcare
<b>Rehydratationslösung</b>		
DeStreak Solution	450 µl pro Streifen	GE Healthcare
IPG-Puffer (pH3-11)	0,5 % (v/v)	
<b>Mineralöl</b>		
PlusOne DryStrip Cover Fluid		GE Healthcare
<b>Protease Inhibitor</b>		
Protease Inhibitor Cocktail	2,5 % (v/v)	Roche, Penzberg
(40-fach) 1 Tablette pro 250 µl $\text{ddH}_2\text{O}$		

### 3.2.4.3 SDS-PAGE: Ettan Dalt six (GE Healthcare)

Puffer & Lösungen		Hersteller
<b>Equilibrierungspuffer</b>		
Tris	75 mM	Merck
Harnstoff	6 M	GE Healthcare
Natriumdodecylsulfat (SDS)	70 mM	GE Healthcare

<b>Puffer &amp; Lösungen</b>		<b>Hersteller</b>
Glycerin	30 % (v/v)	Carl Roth
Bromphenolblau	Spatelspitze	Merck
<b>Reduktionspuffer</b>		
DTT in Equilibrierungspuffer	1 % (w/v)	Sigma-Aldrich
<b>Alkylierungspuffer</b>		
IAA in Equilibrierungspuffer	2,5 %	Merck
<b>Verdrängungslösung</b>		
Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M	Merck
Glycerol	87 % (v/v)	Carl Roth
Bromphenolblau	Spatelspitze	Merck
Mit $_{dd}H_2O$ auf 100 ml aufgefüllt		
<b>Low-melting Agarose</b>		
L.M.P. Agarose	0,5 % (w/v)	FMC Bio Products, Philadelphia, USA
Bromphenolblau	Spatelspitze	Merck
Lösen in 2x 2D-Laupuffer		
<b>2D-Laupuffer</b>		
Tris	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Carl Roth
SDS	3,5 mM	Serva
<b>Trenngel (12,5 %)</b>	<b>Ansatz für 4 Gele</b>	<b>Hersteller</b>
$_{dd}H_2O$	127 ml	Braun
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	100 ml	Merck
30 % Acrylamid (N, N-Methylenbisacrylamid, Verhältnis 37,5:1)	166,7 ml	Carl Roth
SDS 10 %	4 ml	Merck
<i>20 min auf Eis entgasen</i>		
Ammoniumpersulphat (APS) 20 %	1 ml	Merck
TEMED	111 $\mu$ l	GE Healthcare

### **3.2.5 Materialien zur Vorbereitung der Elektronenmikroskopie**

<b>Puffer</b>		<b>Hersteller</b>
Phosphatpuffer pH 7,4	0.1 M	Merck
<b>Stocklösung A) monobasisch:</b>		
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat reinst	156,01 M	Merck
$\text{ddH}_2\text{O}$		
<b>Stocklösung B) dibasisch:</b>		
Di-Natriumhydrogenphosphat	141,96 M	Carl Roth
$\text{ddH}_2\text{O}$		
<b>5 % Glutaraldehyd (GA)-Phosphatpuffer-Lösung</b>		
GA 25 %	Auf 5 % mit Phosphatpuffer heruntertitrieren	Carl Roth
<b>Polymerisationspuffer</b>		
PFA in PBS	16 % (w/v)	Merck
GA	25 % (v/v)	Carl Roth
Phosphatpuffer		

### **3.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

#### **3.3.1 Geräte**

<b>Kühlsysteme</b>		<b>Hersteller</b>
Eismaschine		Scotsman Ice Systems, Chicago, USA
Gefrierschrank (-20 °C)		Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-4 °C)		Liebherr
Gefriertruhe (-80 °C)		New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kühlschrank		Liebherr
<b>Zentrifugen</b>		
Tischzentrifuge 5415 C		Eppendorf AG, Hamburg
TL-100 Ultrazentrifuge		Beckman Coulter, Brea, USA

XL-80 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Rotor SW 60 TI	
Buckets SW 60 44,4	
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge HeraeusTM Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge HeraeusTM Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge HeraeusTM Varifuge 3.0R	Heraeus
<b>Westernblot und SDS-Systeme</b>	<b>Hersteller</b>
Blot-System Mini Trans-Blot ® Cell	Bio-Rad
SDS-PAGE-System Novex Mini-Cell	Invitrogen™ Thermo Fisher
<b>Messgeräte</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometer FACS Calibur™	BD
Entwicklungsmaschine CP 1000	AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien
Lichtmikroskop Zeiss ID03	Carl Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt/M.
Photometer Smart Spec™ 3000	Bio-Rad
<b>Sonstige Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific
Ein- und Zwölfkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Heizblock DB 3A	Techne, Staffordshire, UK
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Schüttelwasserbad	GFL®, Burgwedel
Sterilbank Heraeus™ LaminAir ® HB2472K	Heraeus
Waage Scout II	Ohaus® Europe, Nänikon, Schweiz
Wipptisch	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zellhomogenisator	EMBL, Heidelberg
Rollermaschine Stuart SRT6	Bibby Scientific limited, Stone, UK
Vortex Genie-2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Ständer mit Magnet (MidiMACS™ Manual cell separator)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Geräte für die 2D-DIGE	Hersteller
Elektrophorese Stromquelle (Electrophoresis Power supply EPS 601)	Amersham, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Ettan™ Dalt six	Amersham, GE Healthcare
Ettan™ Dalt six Gelcaster	Amersham, GE Healthcare
Ettan™ IPGphor	Amersham, GE Healthcare
Keramikblock 1016	Amersham, GE Healthcare
Kühlfalle Multitemp III	Amersham, GE Healthcare
Quellschalen (Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray)	Amersham, GE Healthcare
Typhoon™ Trio, Fluoreszenzscanner	Amersham, GE Healthcare
Ultraschallbad Brandelin Sonorex	Brandelin Electronics, Berlin

### 3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Aufsätze für das Beladen der Streifen (IPG Loading Cups)	Amersham, GE Healthcare
Deckgläschen	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, Franklin Lakes, USA
Magnetsäulen (LS Columns)	Miltenyi Biotec
Nitrocellulosemembran (Protean™ 0,45 µm)	GE Healthcare, Life Sciences
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele	Life Technologies
Paper Wicks	Amersham, GE Healthcare
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten	Karl Hecht, Sondheim/Rhön
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen mit Mikrokapillare zur Gelbeladung (1-200 µl)	VWR, Darmstadt
Rundboden-Reagenzgläser (0,6 ml, FACS-Messrörchen)	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (1 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt

Material	Hersteller
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Röntgenfilm	GE Healthcare, Life Sciences
Serologische Pipetten	Greiner bio-one
Spektrometer-Küvetten	Sarstedt
Spitzbodenplatte (96 Well)	Thermo Fisher Scientific
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten pH 3-11 NL, 24 cm (Immobiline™ DryStrip)	GE Healthcare
Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter
Whatman-Papier	GE Healthcare
Zellkulturflaschen (650 ml, 200 ml)	Greiner bio-one
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt
Zubehör für SDS-PAGE	Bio-Rad

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Zellbiologische Verfahren

#### 3.4.1.1 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMNC) wurden Leukozytenkonzentrate verwendet. Diese wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des UKSH aus Blutspenden gesunder Probanden hergestellt. Das schriftliche Einverständnis der Spender über die Verwendung der Leukozytenkonzentrate für Forschungszwecke lag bei allen verwendeten Proben vor und wurde durch das Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (Ethikvotum D 485/14). Um später eine ausreichende Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen zu erhalten, wurde vor Beginn der Isolierung der gewünschten T-Zellen eine Vorauswahl der Lymphozytenspender getroffen. Diese basierte auf der prozentual enthaltenen Menge an  $\gamma\delta$  T-Zellen im Spenderblut, die mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Diese Voranalyse wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Wesch durchgeführt.

PBMNCs wurden mittels Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, bei der sich neben toten Zellen Erythrozyten und Granulozyten im Sediment, Monozyten und Lymphozyten hingegen in der Interphase anreichern.

Dafür wurde zunächst die Zellsuspension aus den Leukozytenkonzentraten in 100 ml PBS in einer 200 ml Zellkulturflasche verdünnt. Anschließend wurden in vier 50 ml Röhrchen je 15 ml *Biocoll separating solution* vorgelegt und mit dem verdünnten Leukozytenkonzentrat langsam überschichtet. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 20 min, Raumtemperatur (RT), ohne Bremse) wurde die Interphase abpipettiert, in neue Röhrchen überführt und mit je 50 ml PBS dreimal gewaschen. Die Zellen wurden schrittweise zusammengeführt und in 5 %-FCS RPMI-Medium aufgenommen.

### **3.4.1.2 Ermittlung der Zellzahl kultivierter Zellen**

Die Anzahl der aufbereiteten Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypanblau-Lösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Zellen in 2-4 Teilquadranten wurden gezählt, Trypanblau-positive (tote Zellen) wurden nicht mitgezählt. Zur Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter wurde der Mittelwert der Anzahl der Zellen in den ausgezählten Quadranten mit dem Verdünnungsfaktor (10) und dem vorgegebenen Kammerfaktor ( $10^4$ ) multipliziert.

### **3.4.1.3 Positive Isolierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mittels MACS**

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten wurden positiv mittels MACS angereichert. Grundlage dieses Verfahrens ist dabei die Markierung der zu isolierenden Zellen anhand subpopulationsspezifischer Oberflächenproteine mit Antikörper-konjugierten magnetischen *Microbeads*, was eine Retention der gewünschten Zellen im magnetischen Feld erlaubt.

Für die Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden  $150 \times 10^6$  PBMNC in 15 ml Röhrchen überführt. Zur Aufreinigung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden  $300 \times 10^6$  PBMNC verwendet. Diese wurden einmal mit kaltem MACS-Waschpuffer gewaschen (1400 rpm, 5 min). Der Ansatz für die CD4<sup>+</sup>-Isolierung wurde anschließend in 1,2 ml MACS-Puffer zusammen mit 300 µl CD4-*microbeads*, der Ansatz für die CD8<sup>+</sup>-Isolierung in 2,4 ml MACS-Puffer zusammen mit 600 µl CD8-*microbeads* resuspendiert und anschließend 15 min im Kühlschrank inkubiert. Innerhalb der Inkubationszeit wurden die Proben zweimal vorsichtig geschwenkt. Die beiden Ansätze wurden auf 20 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (1400 rpm, 5 min). Der CD4<sup>+</sup>-Ansatz wurde in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen, der CD8<sup>+</sup>-Ansatz in 2 ml MACS-Puffer. Beide Ansätze wurden auf eine im Magneten eingespannte und mit MACS-Puffer equilibrierte LS-Säule gegeben. Durch dreimaliges Waschen wurden unmarkierte Zellen entfernt. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnettfeld wurden die verbliebenen markierten Zellen mit 5 ml MACS-Puffer und einem geeigneten Stempel eluiert.

### **3.4.1.4 Expansion und Kultivierung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen**

#### **Expansion von $\alpha\beta$ T-Zellen**

Die entsprechend dem MACS-Protokoll isolierten und in RPMI-Medium aufgenommenen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden zunächst mit einem allogenen „Feeder Cocktail“ und unter Zugabe von rIL-2 (100 IU/ml) und PHA (0,5 µg/ml) für 4 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Feeder Cocktail bestand aus 10<sup>6</sup> mit 40 Gy bestrahlten PBMNC/ml und 10<sup>5</sup> mit 60 Gy bestrahlten EBV-transformierten B-Zellen/ml und wurde im Verhältnis 1:10 eingesetzt.

Am vierten Tag nach der Isolierung durch das MACS-Verfahren wurden die lebenden Zellen der beiden Zellreihen über Biocoll-Zentrifugation angereichert, die Interphasen, nach zweimaligem Waschen, in frisches RPMI-Medium aufgenommen und mit rIL-2 stimuliert. Weitere Mediumwechsel erfolgten an den Tagen 7, 11 und 14, jeweils unter Zugabe von rIL-2 (100 IU/ml). Die Zellzahl wurde vor dem Mediumwechsel bestimmt und entsprechend die Menge des benötigten Mediums ermittelt, wobei generell 1,5-2x10<sup>6</sup> Zellen pro ml Medium kultiviert wurden.

#### **Expansion von PHA-Blasten**

Zur Expansion von PHA-Blasten wurden die aus dem Spenderblut isolierten PBMNCs zunächst in 5 %-FCS-Medium aufgenommen und die T-Zellen durch Zugabe von PHA (0,5 µg/ml) zur Proliferation angeregt. An Tag 4 nach Stimulation wurden die toten Zellen mittels Biocoll-Zentrifugation entfernt und die verbleibenden PHA-Blasten unter Zugabe von rIL-2 (100 U/ml) weiter expandiert.

#### **Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Aus den verbleibenden Zellen des jeweiligen Spenders wurden mittels Bisphosphonat-Stimulation  $\gamma\delta$  T-Zelllinien angelegt. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml 10 %-FCS-Medium aufgenommen und mit rIL-2 (50 IU/ml) und 2,5 mM Zoledronat stimuliert. Die mit Zoledronat stimulierten Zellen wurden ebenfalls alle zwei bis drei Tage gezählt, aber nicht zentrifugiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurde die entsprechende Menge an 10 % FCS-Medium ergänzt und rIL-2 hinzugegeben. Alle Zellreihen wurden über 14 bis 18 Tage kultiviert

### **3.4.1.5 Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie**

Die Reinheit der verwendeten T-Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Grundlage der Analyse ist der quantitative und qualitative Nachweis von Oberflächenantigenen, welche durch Fluoreszenz-markierte Antikörper detektiert werden können.

Für die Färbung mit Fluorophor-markierten Antikörpern wurden 1-2x10<sup>5</sup> Zellen in eine 96-Well-Spitzboden-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer

gewaschen (1000 rpm, 2 min, 4 °C.). Anschließend wurden die sedimentierten Zellen mit 10 µl Antikörper-Lösung (in FACS-Waschpuffer verdünnt) resuspendiert und für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 150 µl FACS-Waschpuffer gewaschen (1000 rpm, 2 min, 4 °C). Die gewaschenen Zellen wurden mit je 100 µl 1 %-PFA-Lösung fixiert, in ein Rundboden-Reagenzglas überführt und am FACS Calibur™ Durchflusszytometer vermessen.

### **3.4.1.6 Elektronenmikroskopie**

Zur Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie wurden  $5 \times 10^5$  Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen (1600 rpm, 5 min, 4 °C) und in 500 µl Phosphatpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (1600 rpm 5 min, 4 °C), der Überstand bis auf 100 µl abgesaugt und noch einmal zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, 4 °C). Nach Absaugen des gesamten Überstands wurden die Zellen in 24 µl Phosphatpuffer (mit 12,5 % BSA) aufgenommen sowie 24 µl des Polymerisationspuffers hinzugefügt und resuspendiert. Die Suspension (50 µl) wurde auf ein Stück Parafilm aufgetragen, für eine Stunde in eine *wet chamber* gelegt und im Anschluss die Polymerisierung überprüft.

## **3.4.2 Biochemische Verfahren**

### **3.4.2.1 Extraktion von Zellorganellen**

Effektorkompartimente der kultivierten Zellen wurden nach Zellhomogenisierung mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Bei diesem Verfahren wird die äußere Plasmamembran der Zellen aufgeschlossen, die Zellorganellen bleiben jedoch weitgehend intakt und können durch differenzielle Zentrifugation angereichert werden. Die angereicherten Organellen werden durch Dichtegradientenzentrifugation in sechs subzelluläre Fraktionen unterschiedlicher Dichte aufgetrennt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Mindestens  $500 \times 10^6$  Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen (1400 rpm, 5 min) und anschließend mit dem 2,7-fachen Volumen des Zellpellets an Extraktionspuffer mit Inhibitoren resuspendiert. Die Suspension wurde in einen mit 200 µl Extraktionspuffer equilibrierten Balch Homogenisator überführt und die Zellen durch ca. 15 Hübe über eine 8,004 mm Carbidkugel aufgeschlossen. Die Zellviabilität wurde dabei mehrfach mittels Trypanblau-Ausstrichs evaluiert und die Homogenisierung bis zu einer Zelltodrate von ca. 80 % fortgeführt. Das so erzeugte Gesamtzelllysat (*whole cell lysate*, WCL) wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt. Nach Spülen des Homogenisators mit 250 µl Extraktionspuffer wurden diese ebenfalls zu dem Lysat gegeben. 25 µl WCL wurden für weitere Untersuchungen abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die restliche Probe wurde bei 3400 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den angereicherten Organellen (*enriched organelles*, EO)

wurde abgenommen. Hiervon wurden ebenfalls 25 µl bei -20 °C gelagert. Die restliche Probe wurde bei 15 000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. 25 µl des resultierenden zytosolischen Überstandes wurden ebenfalls als Kontrolle eingefroren; der Rest wurde verworfen. Die sedimentierten lysosomalen Kompartimente (*crude lysosomal fraction (CLF)*) wurden in 500 µl Extraktionspuffer aufgenommen. 25 µl der CLF wurden wiederum als Kontrolle eingefroren. 455 µl CLF wurden mit 288 µl 60 %-Optiprep® und 157 µl Dilutionspuffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgenommen und diese *diluted Optiprep® fraction (DOF)* in einem Optiprep®-Dichtegradienten aufgetragen.

Dazu wurden UltraClear-Ultrazentrifugenrörchen mit Optiprep®-Lösungen unterschiedlicher Dichte und der Probe (DOF) wie folgt befüllt:

1. 500 µl 27 %-Optiprep®-Lösung
2. 800 µl 22,5 %-Optiprep®-Lösung
- 3. 900 µl 19 % eingestellte DOF**
4. 900 µl 12 %-Optiprep®-Lösung
5. 900 µl 8 %-Optiprep®-Lösung
6. 1 %-Optiprep®-Lösung (bis an den Rand des Röhrchens gefüllt)

Nach Ultrazentrifugation (XL-80 Ultrazentrifuge, Rotor SW60 Ti, 38 000 rpm, 5 h, 4 °C, ohne Bremse) wurden die an den unterschiedlichen Interphasen angereicherten Zellorganellen abgenommen und in einzelne 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt. Diese wurden auf jeweils 500 µl Homogenisierungspuffer aufgefüllt und gewaschen (15 000 rpm, 20 min, 4 °C). Die Sedimente wurden in je 50 µl 2D-Lysepuffer aufgenommen und bei -20 °C tiefgefroren.

### **3.4.2.2 Bestimmung der Proteinmenge**

Die Bestimmung der Proteinmenge einer Probe erfolgte mittels „Bradford-Assay“. Für den Nachweis wurden 5 µl der zu analysierenden Probe mit 995 µl Coomassie-Protein-Assay-Reagenz in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min inkubiert und in geeignete Messküvetten überführt. Die Messung am Photometer erfolgte bei 595 nm gegen Extraktionspuffer als Leerwert.

### **3.4.2.3 SDS-Page**

3-5 µg der zu untersuchenden Proben wurde mit NP40 Lysepuffer mit Proteininhibitoren auf 17 µl aufgefüllt und mit 3x Probenpuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl eingestellt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 100 °C im Heizblock aufgekocht und anschließend in die dafür vorgesehenen Taschen von 4-12 % Bis-Tris NuPAGE Fertiggelen pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für etwa 45 min.

#### **3.4.2.4 Westernblot**

Für den Westernblot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das SDS-Gel nach dem folgenden Schema in die Westernblot-Kassette eingespannt: Schwamm, 2x *Whatman*-Papier, Gel, Nitrozellulosemembran, 2x *Whatman*-Papier, Schwamm. Anschließend wurde die Westernblot-Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt und die Übertragung erfolgte bei 100 V für 60 min unter Eiskühlung.

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran mit  $ddH_2O$  gewaschen und eine Ponceau S-Färbung durchgeführt, welche die Proteine reversibel anfärbt. Nach Dokumentation wurde die Membran mit 1x TBS entfärbt. Anschließend wurde die Membran mit 5 %-BSA für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und danach mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert (4 °C, unter Rotation). Die Membran wurde nach erfolgter Inkubation 3 x für 10 min in TBS-T gewaschen (auf Wipptisch) und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT). Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran für 1 min in Chemilumineszenz-Detektionslösung geschwenkt und anschließend wurden in der Dunkelkammer Röntgenfilme für unterschiedliche Zeitintervalle belichtet und danach entwickelt.

##### **3.4.2.4.1 Entfernung der Primär- und Sekundärantikörper zur Wiederverwendung („Stripping“)**

Zur wiederholten Verwendung einer bereits gefärbten Membran wurde diese zunächst 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 20 min bei 56 °C in *Stripping*-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran weitere drei Male gewaschen und erneut für 20 min blockiert (5 %-BSA), bevor eine erneute Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen konnte.

#### **3.4.2.5 2D-DIGE**

Die 2D-DIGE ermöglicht den Vergleich von zwei oder mehr unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierten Proben in einem Elektrophorese-Gel. In einer ersten Dimension werden dabei die Proteine anhand ihrer isoelektrischen Punkte (pI) und in der zweiten Dimension anhand ihrer Molekulargewichte (kDa) separiert.

##### **3.4.2.5.1 Erste Dimension – isoelektrische Fokussierung**

###### Vorbereitung der Proben und *Minimal Labelling*

Zur Vorbereitung der Proben für die 2D-DIGE wurden die extrahierten Organellen zunächst aufgetaut, aufgereinigt und mittels Ultraschallbad für 20 s in Lösung gebracht, anschließend zentrifugiert (15 000 rpm, 20 min, 4 °C) und der Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nachfolgend wurde der pH-Wert der Probe mittels Teststreifen ermittelt, welcher zwischen 8 und 9 liegen sollte und dann die Proteinmenge mittels Bradford-Assay bestimmt.

Bei der Minimalmarkierung werden nur ca. 3 % der Gesamtproteinmenge markiert. Zur Anwendung kamen drei Fluoreszenzfarbstoffe (G-Dye100, 200, 300), welche kovalente Bindungen mit der Aminosäure Lysin aus den Proteinen der Probe eingehen.

Die benötigte Farbstoffmenge wurde mittels Dreisatzes unter der Maßgabe, dass 50 µg Proteinmenge 1 µl Farbstoff erhalten, ermittelt. Die Probe wurde in der errechneten Menge Farbstoff suspendiert und dann 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Prozess mit der Abstopplösung aus dem Farbstoff-Kit abgestoppt.

#### Vorbereitung der Gelstreifen für die isoelektrische Fokussierung

Zur Vorbereitung der isoelektrischen Fokussierung wurden zunächst Gelstreifen (24 cm Immobiline DryStrip, pH 3-11NL, IPG-Streifen) mit je 450 µl Rehydrierungslösung mit 0,5 % Ampholyten pro Streifen in einer dafür vorgesehenen Quellschale (*Reswelling Tray*) vorgelegt und die IPG-Streifen dann mit der Matrix-Seite nach unten in die Lösung gelegt. Zum Schutz vor Austrocknung und Oxidation wurden die Streifen in den Quellschalen anschließend mit je 3 ml Mineralöl (*Dry Strip Cover Fluid*) überschichtet und bei geschlossenem Deckel für 4-20 h rehydriert.

#### Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung der Proben im IPG-Streifen erfolgte mithilfe des Ettan™ IPGphor unter Benutzung eines Keramiktablets. Die G-Dye-markierten Proben wurden vor Beladung des IPG-Streifens mit 2x 2D-Probenpuffer (+2 % DTT, +2 % Ampholyte) auf 125 µl aufgefüllt und weitere 125 µl 2D-Lysepuffer hinzugegeben. Sie wurden anschließend in ein Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (Ultrazentrifuge TL-100, 68000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und mittels „cup loading“ auf die rehydrierten Gelstreifen appliziert. Die IPG-Streifen wurden auf dem Keramiktablett entsprechend den Herstellerangaben platziert, die Gelenden mit feuchten Papierstückchen (*paper wicks*) abgedeckt und darüber die Elektroden platziert. Schließlich wurde das gesamte Tablett, inklusive der Probe in den *Cups*, mit Öl überschichtet. Zur Fokussierung wurde das Programm wie in Abb. 3.1 dargestellt durchgeführt. Die Gesamtzeit betrug im Durchschnitt 65-70 kWh und die applizierte Stromstärke 75 µA pro Streifen.

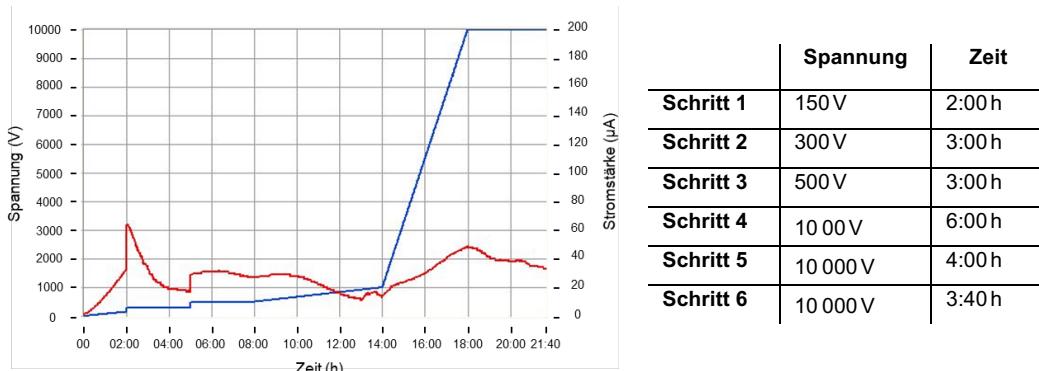


Abbildung 3.1 **Protokoll der isoelektrischen Fokussierung.** Die Grafik (links) zeigt einen repräsentativen Kurvenverlauf der isoelektrischen Fokussierung im Ettan™ IPGphor, bei vier eingelegten Streifen und einer Gesamtzeit der Fokussierung von 21:40 kWh sowie einer Stromstärke von 75 µA/Streifen; die rote Kurve stellt die gemessene Stromstärke (µA) dar, die blaue Kurve die gemessene Spannung (V). Die Tabelle (rechts) zeigt eine Auflistung der sechs Teilschritte der Fokussierung.

### 3.4.2.5.2 Zweite Dimension - Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung für die zweite Dimension wurden die Streifen equilibriert. Dafür wurden für die Reduktion 10ml Equilibrierungspuffer (EQ-Puffer) mit 100mg DTT und zur Alkylierung 10ml EQ-Puffer mit 250mg Iodacetamid (IAA) angesetzt. Beginnend mit der Reduktion wurden pro Streifen 2,5ml des jeweiligen Puffers verwendet und die Streifen für 15 min auf dem Wipptisch im Dunkeln inkubiert.

Das verwendete 12,5%-SDS-Polyacrylamidgel ermöglicht die Wanderung der Proteine entlang eines elektrischen Gradienten, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit ihrer Größe korreliert. Für das Experiment wurde das Ettan™ Dalt six System verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde ein Ansatz für 6 Gele verwendet (400 ml Gesamtvolumen). Dieser wurde 20 min auf Eis entgast, um eine langsame und gleichmäßige Polymerisierung zu ermöglichen. Kurz vor Verwendung wurden TEMED und 20 %-APS zu der Lösung hinzugefügt und diese dann in den nach Herstelleranweisungen aufgebauten Ettan™ Dalt six Gelcaster überführt. 1,5ml der Verdrängungslösung wurden in den Füllschlitz pipettiert, die Gele mit destilliertem Wasser besprüht und mit Parafilm abgedeckt. Zum Auspolymerisieren wurden die Gele mindestens 12h bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die equilibrierten Streifen wurden mit 2x Laupuffer von überschüssigem EQ-Puffer gereinigt, auf die vorbereiteten Trenngele aufgelegt und mit *low melting* Agarose fixiert.

Die belegten Gele wurden in die Ettan Dalt six Elektrophorese-Kammer gestellt, die obere Pufferkammer (*Upper buffer chamber*, UBC) mit 2x Laupuffer gefüllt und parallel die untere Pufferkammer (*Lower buffer chamber*, LBC) mit 1x Laupuffer gefüllt. Die restlichen nicht genutzten Fächer wurden mit Blindgelen belegt. Anschließend wurde die Stromquelle für die Elektrophorese (EPS 601) angeschlossen und die Elektrophorese bei 10mA/Gel, 80V, 1W/Gel gestartet und nach einer Stunde auf 16-18mA/Gel, 150V, 2W/Gel erhöht und für 18-22h unter dauerhafter Kühlung durchgeführt.

### **3.4.3 Analyseverfahren**

Zur Analyse der 2D-Gele wurden diese mit dem Fluoreszenzscanner „Typhoon Trio“ eingesannt. Bilder der gescannten Gele wurden in das Analyseprogramm DeCyder™ 2D überführt und dort mittels integrierter *Differential In-gel Analysis* (DIA)-Software analysiert. Zur Benennung der den Spots zugrunde liegenden Proteine wurde auf bereits existierende Proteomkarten zurückgegriffen, die im Rahmen von Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe erstellt wurden (Schmidt 2009a)

#### **3.4.3.1 Typhoon Trio Scanner**

Mit dem Typhoon™ Trio Scanner wurden die Gele gescannt und dadurch die aufgetrennten Proteine als fluoreszierende *Spots* sichtbar gemacht.

#### **3.4.3.2 Image Quant TL 1D v. 8.1**

Mit der Software Image Quant TL 1D v.8.1.0.0 wurden die Einstellungen des Typhoon™ Scanners überprüft und ggf. angepasst. Hierfür wurde ein Vorscan durchgeführt. Die auf dem Scan sichtbaren *Spots* wurden mit dem „*line Tool*“ der Software auf ihre Intensität überprüft und die Laserleistung in Counts  $\times 10^3$  ermittelt. Dieser Wert sollte unterhalb von  $1 \times 10^5$  Counts liegen, um später eine optimale Auswertung mit der DIA-Software zu ermöglichen.

Zu Beginn wurde in den drei Kanälen für G-Dye 100 bei 500 PMT, G-Dye 200 bei 550 PMT, und für G-Dye 300 bei 650 PMT begonnen. Nach Analyse der Spots mit dem Image Master wurden die Werte der PMT angepasst und neuerlich überprüft, bis die Counts in einem zufriedenstellenden Bereich lagen.

#### **3.4.3.3 De Cyder Software – DIA**

Mit der zur DeCyder™ Software gehörenden DIA wurden die Gele prozessiert. Dafür wurden mittels DeCyder™ Detektions-Algorhythmus 6.0 unterschiedlich erscheinende Spots automatisch markiert.

Nachfolgend wurden Filtereinstellungen vorgenommen, die Schwellenwerte für diejenigen Spots definierten, die in die Auswertung einbezogen wurden. Es wurden die Einstellungen wie folgt festgelegt und damit Spots ausgeschlossen, die eine Steigung aufwiesen, die größer als 1,2 betrug, deren Fläche kleiner als 100 und deren Volumen kleiner als  $1 \times 10^4$  war, sowie Spots, deren Ausschlag kleiner als 250 und größer als  $1 \times 10^5$  war. Als Schwellenwert für unterschiedlich stark erscheinende Spots galt die zweifache Standardabweichung (2xSA) des Spot-Volumenverhältnisses (SVV). Im Anschluss wurden manuell die Spots ausgeschlossen, die durch das System als unterschiedlich markiert wurden, da sie zwar im Scancbereich lagen, sich tatsächlich aber außerhalb des Gels bzw. an dessen Kanten befanden, oder aber die Markerbanden betrafen. Alle im Gel befindlichen und nach Festlegung der Parameter in den

Vergleichsproben unterschiedlich stark erscheinenden Spots wurden nun einzeln angeschaut und auf ihre Validität überprüft. Spots, die eindeutig als Verunreinigung (Staub) oder Unebenheiten des Gels gewertet werden konnten, wurden ausgeschlossen. Abbildung 3.2 zeigt einige Beispiele für manuell ausgeschlossene Spots. Alle zur Auswertung zugelassenen Spots wurden von der DIA-Software in ein Histogramm (s. Abbildung 3.3) eingeschlossen, welches die Anzahl der Spots, deren maximales Volumen und das logarithmierte Volumenverhältnis abbildet.

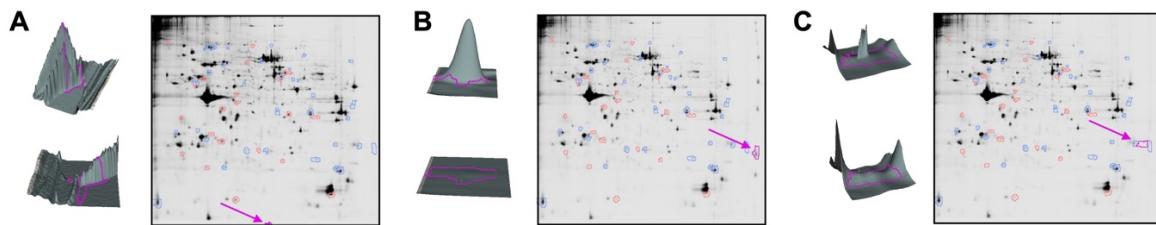


Abbildung 3.2 **Drei Beispiele für ausgeschlossene Spots aufgrund ihres Erscheinungsbildes oder Lokalisation.** **A:** Spot an der Gelkante **B:** Spot betrifft Markerbande. **C:** Verunreinigung bzw. Unebenheit im Gel.

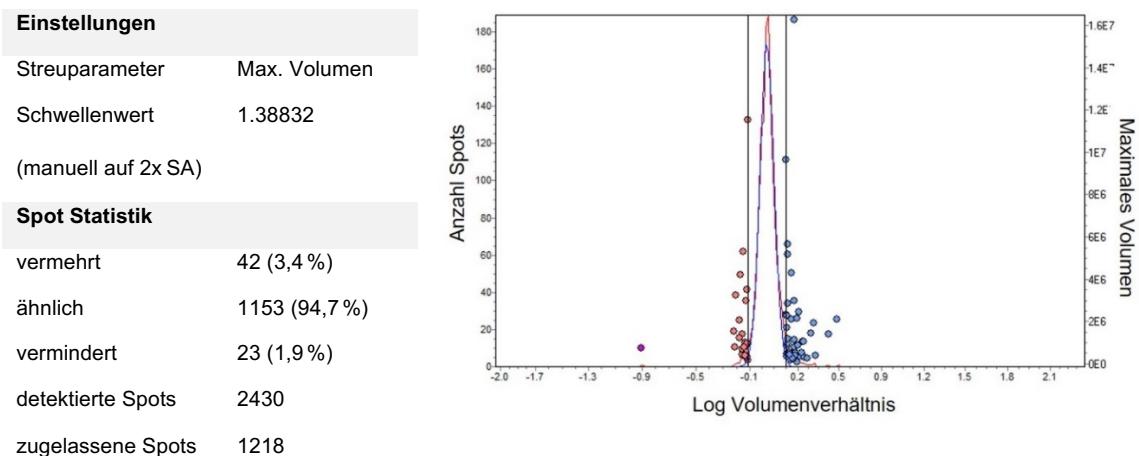


Abbildung 3.3 **Statistische Auswertung ähnlicher und differenziell abundanten Proteinspots eines repräsentativen 2D-DIGE Experiments mittels DIA-Software.** Gezeigt ist die tabellarische Auflistung (links) der angezeigten Einstellungen und ableitbaren statistischen Parameter in Bezug auf das Histogramm (rechts), welches die zur Auswertung selektierten, differenziell erscheinenden Spots zeigt; die **rote Kurve** stellt die Gesamtheit aller Spots dar; die **blaue Kurve** bildet die Gauß'sche Normalverteilung ab; die schwarzen **vertikalen Linien** markieren die 2x SA, welche den Grenzwert für differenziell abundante Spots markiert; die **roten Punkte** repräsentieren die vermindert abundanten Proteine, die **blauen Punkte** repräsentieren die vermehrt abundanten Proteine vom Vergleichsgel in Bezug auf das Referenzgel.

Die Gesamtheit der berücksichtigten Spots wurde anhand einer Kurve (rot) dargestellt. Aus dieser Kurve wurde wiederum eine Gauß'sche Regressionskurve (blau) berechnet und anhand dieser die zweifache Standardabweichung (2x SA) ermittelt. Alle Spots jenseits des unteren und oberen Grenzwertes wurden als differenziell definiert und im Referenzgel im Unterschied zum Vergleichsgel als vermindert (rot) bzw. vermehrt (blau) markiert.

#### **3.4.3.4 Identifizierung ausgewählter Spots anhand von Proteomkarten**

Zur Identifizierung differenziell detektierter Spots dienten die zuvor von der Arbeitsgruppe erstellten Proteomkarten, die im Folgenden auch als „Mastergele“ bezeichnet werden. Hierfür wurden die Abbildungen der Gele auf das Mastergel gelegt. Diejenigen Spots, die eindeutig übereinander zu liegen kamen, wurden anhand der im Gel markierten Nummer benannt, die im zugehörigen Verzeichnis hinterlegt und einem Protein zugeordnet ist.

## 4 Ergebnisse

Die durch Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität beruht nicht nur auf einem universellen Typus von Speichergranula. Die verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems verfügen über mindestens zwei distinkte zytotoxische Kompartimente mit zelltypabhängigem Proteinbesatz. Des Weiteren werden die unterschiedlichen zytotoxischen Granula wahrscheinlich kontextabhängig mobilisiert, um auf diese Weise die Spezifität einer Immunantwort zu steigern und gleichzeitig die Gefahr unbeabsichtigter Gewebeschädigung zu minimieren. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde eine vergleichende Analyse des Proteoms beider Entitäten mittels 2D-DIGE-Verfahren durchgeführt. Materialgrundlage der Untersuchungen stellten *in vitro* kultivierte CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten dar.

### 4.1 Zellexpansion und -kultivierung

Für den Vergleich der Speicherkompartimente nicht-transformierter zytotoxischer T-Lymphozyten wurde ein Protokoll zur Isolierung und Kultivierung erarbeitet, womit möglichst reine Kulturen bei gleichzeitig hoher Ausbeute erzielt werden sollten. Alle isolierten T-Lymphozyten wurden zunächst 14 Tage in Kultur belassen. Da eine besonders große Zahl an Zellen von nötigen war, wurde im Verlauf der Untersuchungen die Kultivierungsdauer auf bis zu 17 Tage verlängert. Es gelang, eine reproduzierbar große Anzahl (ca.  $600 \times 10^6$  Zellen) aller Zellreihen zu generieren.

#### 4.1.1 Phänotypische Charakterisierung der T-Zellen

Um die Reinheit der MACS-separierten und anschließend expandierten T-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen vor und nach Expansion durchflusszytometrisch phänotypisiert. Bei der Phänotypisierung aller drei T-Zelllinien wurden insgesamt neun Oberflächenmarker analysiert (s. Tabelle 4.1). CD3 und CD2 sind typische T-Zell-Marker, während CD14 auf Monozyten/Makrophagen, CD19 auf B-Zellen und CD56 auf NK-Zellen exprimiert sind. Analysiert wurde zunächst die Ausgangsprobe der PBMNC, bei der sich die Mehrheit der Zellen als CD3<sup>+</sup> und CD2<sup>+</sup> darstellte ( $\varnothing 88,9\%$ ). Im Mittel lag der Anteil CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> T-Zellen bei 45,0 %. Der durchschnittliche Anteil von CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> T-Zellen lag bei 22,9 %. Ein Anteil von 70 % der gemessenen Zellen wiesen einen  $\alpha\beta$  TZR auf, nur durchschnittlich 2,1 % trugen einen  $\gamma\delta$  TZR. Des Weiteren zeigte sich ein geringer Anteil an CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellen in der Ausgangsprobe (s. Abbildung 4.2 links). Die mit Zoledronat stimulierten PBMNC exprimierten nach 14-19-tägiger Kultivierung zu durchschnittlich 67 % einen  $\gamma\delta$  TZR (s. Abbildung 4.2 rechts). Die Messungen wiesen hierbei jedoch erhebliche Schwankungen um den Mittelwert auf (SA 18,6). Aus diesem Grund wurden einige der kultivierten Zellen nicht zur weiteren Analyse verwendet, da nur diejenigen Linien genutzt wurden, die über 75 %  $\gamma\delta$  T-Zellen enthielten.

Tabelle 4.1 **Oberflächenmoleküle (CD) der Zellen des Immunsystems, die für die durchflusszytometrische Phänotypisierung genutzt wurden.** In der Tabelle sind den jeweiligen Oberflächenmolekülen die Zelltypen zugeordnet, von denen sie typischerweise exprimiert werden.

Oberflächenmarker	Zelltyp, der Oberflächenmarker exprimiert
CD2	T-Zell-Oberflächen (LFA-2/3 Rezeptor)
CD3	TZR-CD3-Komplex
CD4	Th-Zellen
CD8	CTL
CD14	Monozyten / Makrophagen
CD19	B-Lymphozyten
CD56	NK-Zellen
$\alpha\beta$ TZR	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , und viele weitere T-Zellen
$\gamma\delta$ TZR	$\gamma\delta$ T-Zellen

In der durchflusszytometrischen Kontrolle nach der MACS-Separation waren die isolierten T-Zellen zu Ø 90,7 % CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, bzw. Ø 96,2 % CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>. Sie wiesen zu 97,3 % (CD4-MACS) bzw. 92,5 % (CD8-MACS) einen  $\alpha\beta$  TZR auf (s. Abbildung 4.3 & Abbildung 4.4 links). Nach Expansion zeigte sich ein durchschnittlicher Anteil von 95 % der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> T-Zellen und ein Anteil von im Mittel 90,3 % von CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> T-Zellen (s. Abbildung 4.3 & Abbildung 4.4 rechts). In Tabelle 4.2 sind die einzelnen Anteile der jeweiligen Population nach Expansion aufgeführt, welche mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt wurden. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse graphisch in Abb. 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.2 **Liste aller durchflusszytometrischen Messungen derjenigen T-Zelllinien, die für die 2D-DIGE Analysen verwendet wurden.** Durchflusszytometrisch ermittelte Anteile der erwünschten T-Zellpopulation an der Vergleichspopulation (CD4<sup>+</sup> gegenüber CD8<sup>-</sup> (**Spalte 1**); CD8<sup>+</sup> gegenüber CD4<sup>-</sup> (**Spalte 2**);  $\gamma\delta$  gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen (**Spalte 3**)) innerhalb der gemessenen Stichprobe der kultivierten T-Zellen. Gezeigte **Versuche (V1-V9)**, aus welchen 2D-DIGE Analysen durchgeführt wurden.

Experiment Nr.	FACS Auswertungen		
	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup>	$\gamma\delta/\alpha\beta$
V1	92,62 %	95,61 %	49,36 %
V2	97,46 %	94,86 %	48,55 %
V3	92,58 %	94,02 %	63,05 %
V4	92,15 %	88,38 %	88,84 %
V5	93,93 %	94,99 %	93,72 %
V6	91,37 %	91,41 %	41,55 %
V7	82,93 %	91,30 %	78,71 %
V8	87,21 %	92,75 %	54,64 %
V9	92,19 %	90,29 %	84,48 %

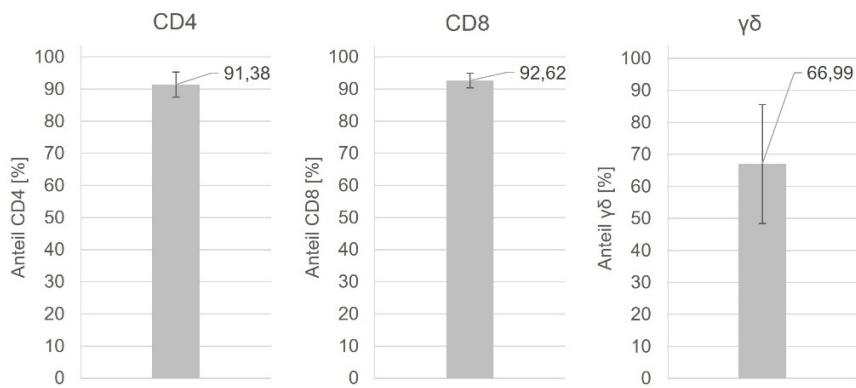


Abbildung 4.1 Reinheit der verwendeten T-Zellpopulationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchflusszytometrisch ermittelten Anteile der gewünschten Population und deren Standardabweichungen.

In den folgenden Abbildungen ist jeweils eine repräsentative Phänotypisierung einer  $\gamma\delta$ , einer CD4<sup>+</sup> sowie einer CD8<sup>+</sup> T-Zelllinie zusammengefasst.

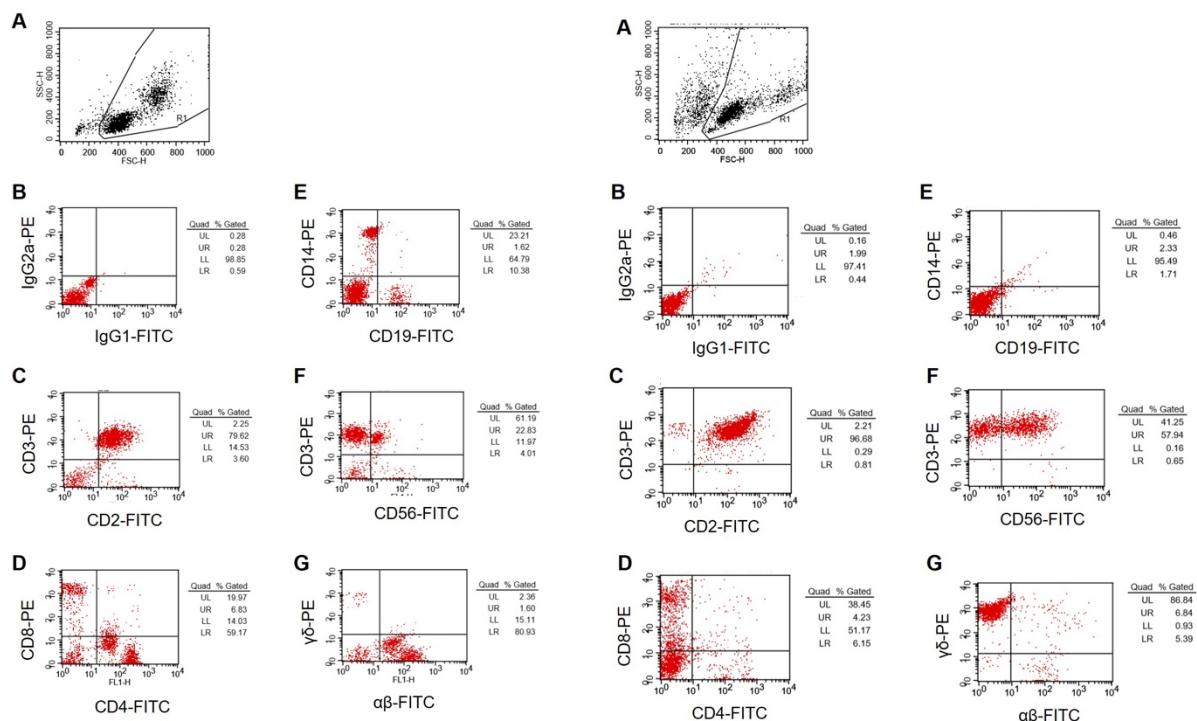
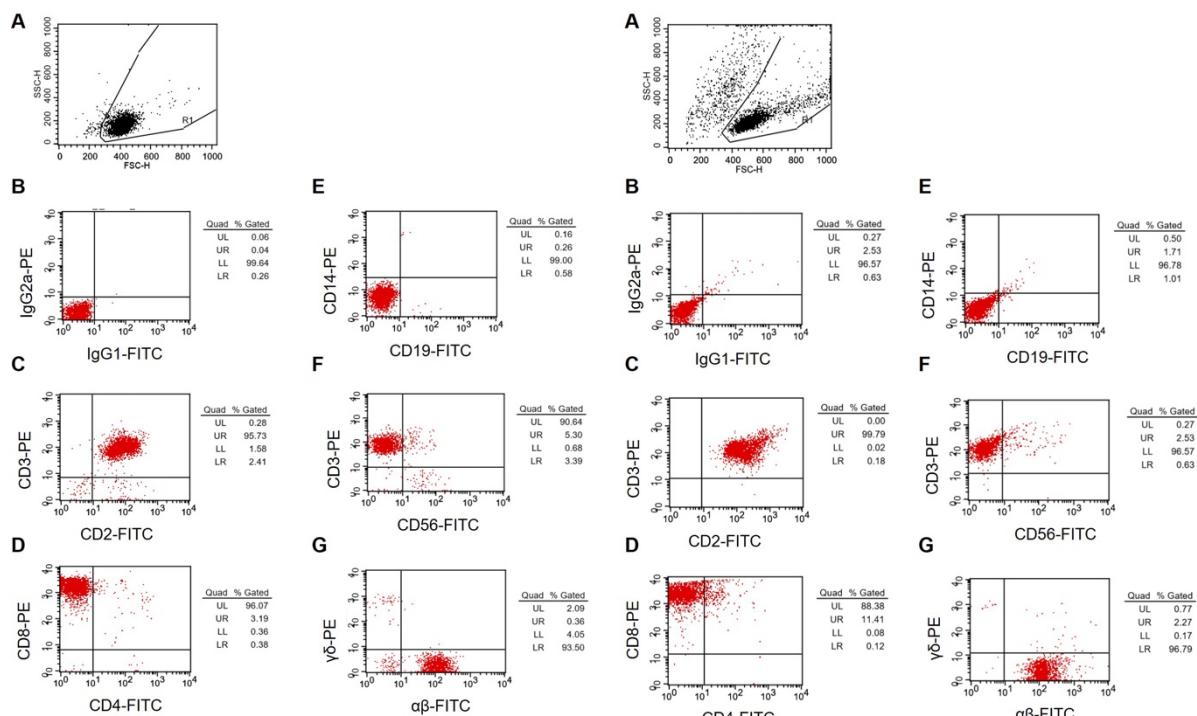
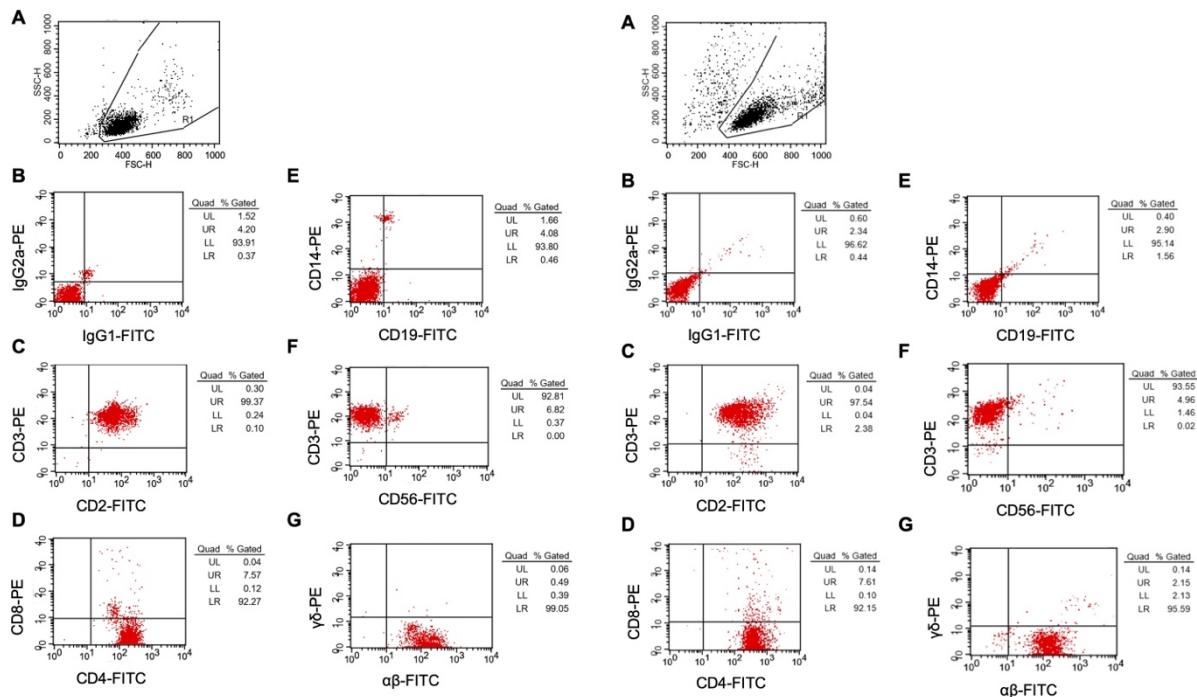


Abbildung 4.2 Durchflusszytometrische Analyse von PBMNC und einer Zoledronat-expandierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinie. Pro Färbung wurden 10 000 Ereignisse aufgenommen. Vitale Zellen wurden auf Grundlage ihrer Größe und Granularität im FSC-SSC-Dot-Plot detektiert. Dargestellt sind die 6 durchgeführten Doppelfärbungen mit je einem PE- und einem FITC-konjuguierten Antikörper, PBMNC am Tag der Separation (links), am Tag 14 nach Stimulation mit Zoledronat (rechts). (UL = upper left, UR = upper right, LL = lower left, LR = lower right)



## 4.2 Anreicherung und Auftrennung subzellulärer Fraktionen

Um die intrazellulären Organellen der expandierten T-Zelllinien analysieren zu können, mussten diese zunächst aus den Zellen extrahiert und angereichert werden. In einem nächsten Schritt wurden die unterschiedlichen intrazellulär vorliegenden Organellen entsprechend ihrer Dichte separiert, sodass schließlich die zu analysierenden F2-Vesikel und F6-Granula entnommen werden konnten. Hierfür wurde das durch die Arbeitsgruppe erstellte Protokoll zur subzellulären Fraktionierung von Organellen aus T-Zellen (Schmidt et al. 2009b) genutzt. Im Rahmen von ersten Versuchen mit PHA-Blasten und Zoledronat-expandierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde die Methode erprobt und standardisiert. Nach Homogenisierung, Anreicherung und Ultrazentrifugation konnte eine Auftrennung in die erwarteten 6 Fraktionen dokumentiert werden (s. Abbildung 4.5). Nachdem die Versuchsdurchführung entsprechend dem angepassten Protokoll für die Dichtegradientenzentrifugation reproduzierbar zur Auftrennung in 6 Fraktionen führte, stellte sich die Frage, ob sich auch die Verteilung der zytotoxischen Mediatoren innerhalb der Fraktionen analog zu den Vorbefunden verhielt. Um dies zu überprüfen und damit die Funktionalität des Versuchsaufbaus zu verifizieren, wurden anschließend Westernblot-Analysen der sechs Fraktionen durchgeführt.

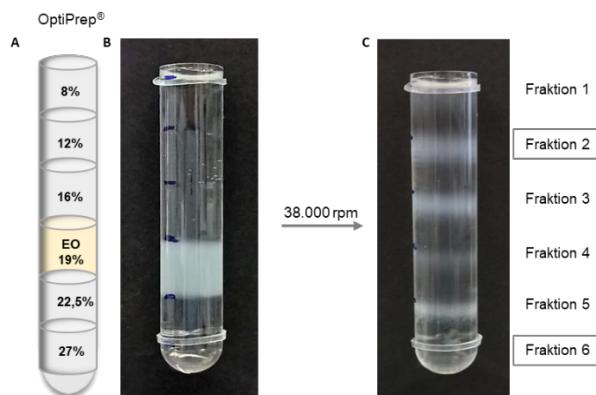


Abbildung 4.5 **Schematische Darstellung und Fotografie der subzellulären Fraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation.** Schematisches Modell der Schichtung (A) nach dem OptiPrep® System; Fotografie des diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten mit aufgetragenen angereicherten Organellen (EO) vor (B) und nach (C) vierstündiger Ultrazentrifugation bei 38 000 rpm.

### 4.2.1 Verteilung zytotoxischer Mediatoren innerhalb der subzellulären Fraktionen

Die Verteilung von zytotoxischen Mediatoren, wie Granzym B, Perforin, FasL und Granulysin innerhalb der subzellulären Fraktionen wurde in Vorarbeiten mehrfach über SDS-Page und Westernblot untersucht und das Verteilungsmuster dokumentiert (s. Einleitung Abschnitt 1.3). Im Rahmen der Pilotversuche wurde zunächst das Verteilungsmuster des zytotoxischen Mediators Granulysin in den verschiedenen Fraktionen untersucht. Da Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass sich die 15 kDa-Variante des Granulysins in F2-Vesikeln, die 9 kDa-Form hingegen in F6-Granula befindet, konnte so mit nur einer Antikörpermarkierung

die charakteristische Aufteilung der beiden Granulysin-Formen untersucht werden. Analog zu den Erkenntnissen der Vorbefunde, konnte für die beiden Granulysin-Formen eine Anreicherung in den beschriebenen Fraktionen beobachtet werden. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 4.6 gezeigt.

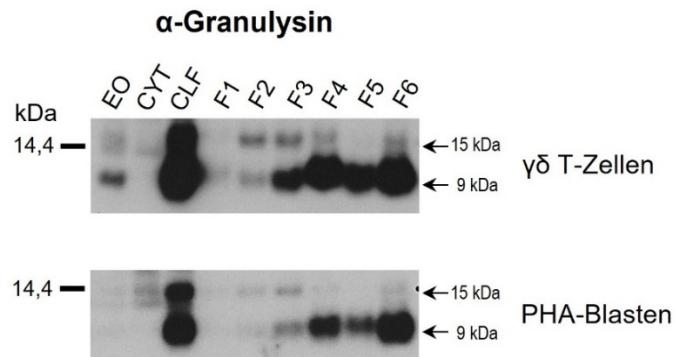


Abbildung 4.6 **Westernblot der 6 Fraktionen (F1-F6) aus der Dichtegradientenzentrifugation lysierter T-Zellen mit Kontrollen aus dem Extraktionsprozess.** Mit Zoledronat *in vitro* aktivierte und expandierte  $\gamma\delta$  T-Zellen und PHA-Blasen wurden nach 14-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert, 5 µg der Fraktionen 1-6 sowie der Kontrollen (Enriched Organelles (EO), Cytosol (CYT), Crude Lysosomal Fraction (CLF)) über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit dem polyklonalen Anti-Granulysin Antikörper (Klon Sc-2); Belichtungszeit: 10s.

Nachdem die Methode reproduzierbar eine Auftrennung der Fraktionen zeigte, wurden in einem nächsten Schritt die Untersuchungen auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen ausgeweitet und die subzelluläre Lokalisation von FasL, Granzym B, Granulysin, LAMP1 und DPP4 mittels Westernblot analysiert (Abbildung 4.7).

Der **FasL** (Abbildung 4.7A) ließ sich in allen drei untersuchten T-Zellsubpopulationen in WCL, EO, CYT, CLF sowie in der Fraktion 2 auf Höhe von etwa 45 kDa nachweisen. In den anderen Fraktionen lag FasL nur in schwacher Ausprägung vor. Entsprechend der Darstellung scheint in CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen mehr FasL exprimiert zu werden als in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Das Fehlen von FasL in Fraktion 6 entspricht den Vorbefunden in Bezug auf FasL und dessen Speicherung in sekretorischen Lysosomen aus Fraktion 2.

Der zytolytische Mediator **Granzym B** (Abbildung 4.7B) ließ sich entsprechend der Vorbefunde deutlich in allen untersuchten T-Zelllinien bei etwa 32 kDa in der Fraktion 6 nachweisen. Weitere schwächere Banden zeigten sich in der Kontrolle CLF und in den Fraktionen 4 und 5. Zudem war Granzym B bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen im Unterschied zu den CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Fraktionen 3, 4 und 5 nachweisbar. In keiner der untersuchten T-Zellsubpopulationen konnte Granzym B in der Fraktion 2 nachgewiesen werden.

In allen untersuchten T-Zellen ließen sich die beiden Formen des **Granulysins** als 15 kDa- sowie 9 kDa-Banden nachweisen (Abbildung 4.7C). Die 15 kDa-Form zeigte sich insbesondere in den Fraktionen 2 und 3, die 9 kDa-Form dagegen hauptsächlich in Fraktion 6 und nur schwach in den Fraktionen 4 und 5. Bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen überwog insgesamt die 9 kDa-Form

und hier war sie neben der ausgeprägten Expression in Fraktion 6 noch bis in die Fraktion 3 nachweisbar. Die Verteilung insbesondere in den Fraktionen 2 und 6 entspricht damit den Vorbefunden und auch den Ergebnissen aus den Pilotversuchen (s.o.). Es ist zu beachten, dass das für den Granulysin-Westernblot der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendete Gel möglicherweise etwas zu früh gestoppt wurde (Lauffront um 10 kDa).

Das Lysosomen-assoziierte Membranprotein **LAMP1/CD107a** (Abbildung 4.7D) konnte in allen Fraktionen mit Ausnahme der Fraktion 1 detektiert werden, insbesondere in der Fraktion 4 zeigten sich deutliche Banden. Daneben ergab sich ein deutlicher Nachweis in der

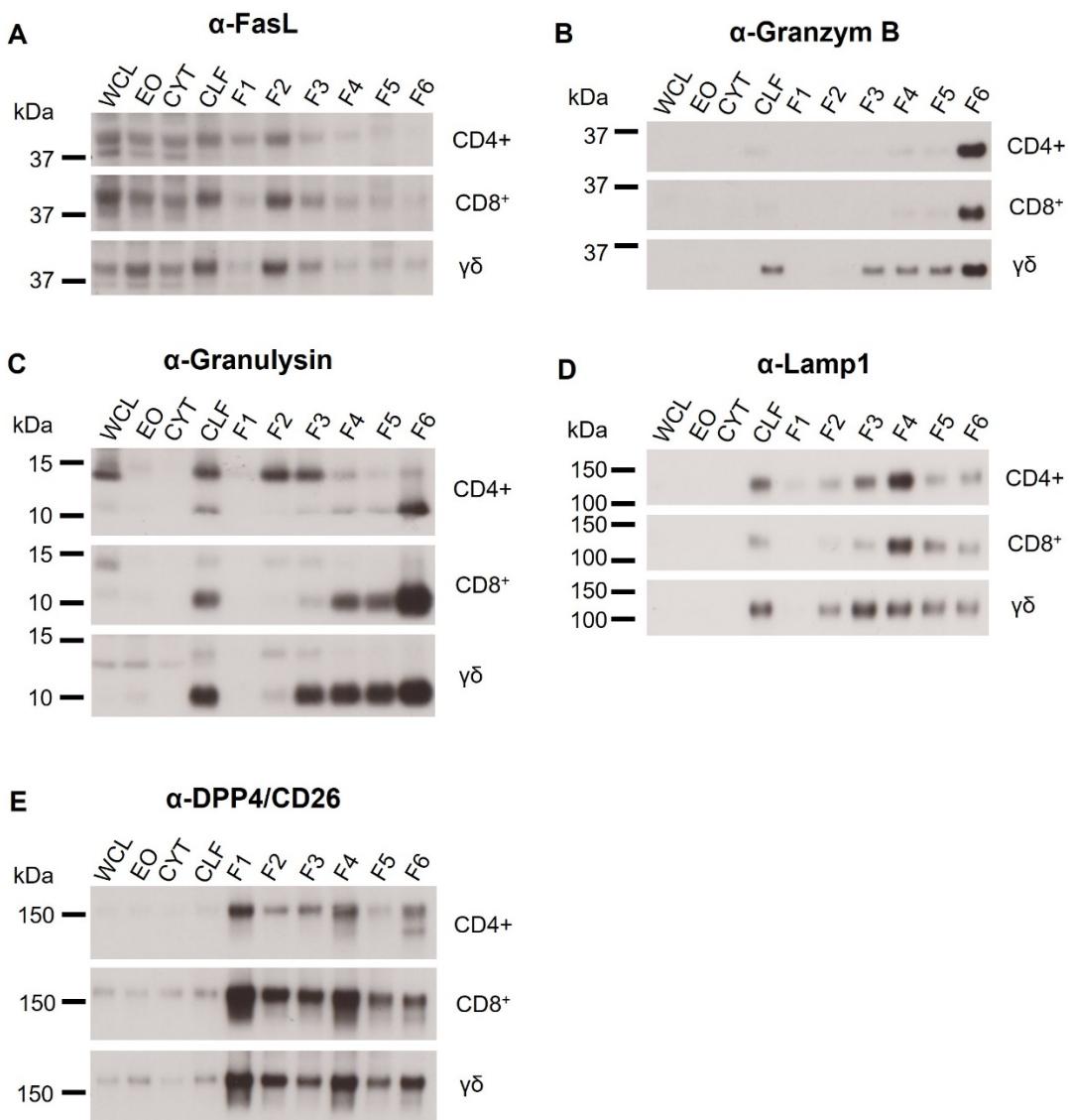


Abbildung 4.7 **Westernblots der 6 Fraktionen (F1-F6) aus der Dichtegradientenzentrifugation mit den Kontrollen (WCL, EO, CYT, CLF) aus dem Extraktionsprozess.** *In vitro* expandierte, MACS-separierte  $\alpha\beta$  T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) und mittels Zoledronat stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $\gamma\delta$ ). Alle drei Zelllinien wurden nach 14-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert, 3 µg der erhaltenen Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit folgenden Antikörpern: Anti-FasL/CD178 mAb (monoklonaler Antikörper) (Klon: G2474) (A), Anti-Granzyme B mAb (Klon: 2C5/F5) (B), Anti-Granulysin pAb (polyklonal Antikörper) (Klon: Sc-2) (C), Anti-Lamp-1 mAb (Klon: 25/Lamp1) (D) und Kaninchen Anti-DPP4/CD26 mAb (Klon: D6D8K) (E).

CLF. In Vorarbeiten war eine deutlichere Bande im Bereich von Fraktion 6 als im hier dargestellten Experiment zu beobachten. Über alle Fraktionen hinweg war LAMP1/CD107a jedoch auch in den Vorarbeiten nachweisbar.

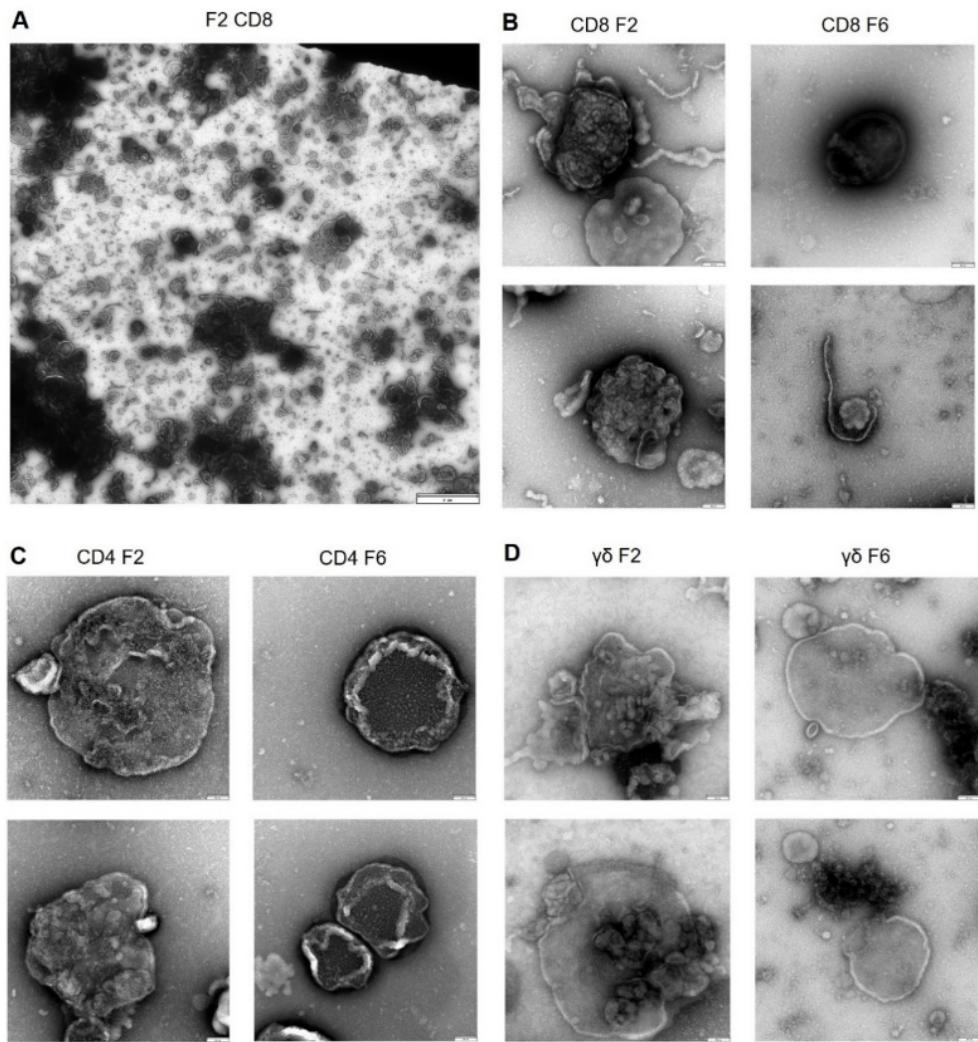
Die Ergebnisse der Westernblots deckten sich weitgehend mit den Vorbefunden und den Erkenntnissen zur Verteilung der Effektormediatoren in den beiden subzellulären Kompartimenten. Es konnte somit bestätigt werden, dass mindestens zwei voneinander unterscheidbare Kompartimente für die Speicherung von Effektormolekülen in primären polyklonal expandierten T-Zellpopulationen existieren. Weiter zeigten die Westernblots, dass sich die Separierung der Mediatoren in diese beiden Kompartimente in einem systematischen Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> CTL und CD4<sup>+</sup> sowie  $\gamma\delta$  T-Zellen für alle drei T-Zellpopulationen in großer Übereinstimmung nachweisen ließ. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass die Trennung und Anreicherung der Organellen durch die Dichtegradientenzentrifugation entsprechend dem vorgegebenen Protokoll auch für die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich war.

### 4.3 Elektronenmikroskopische Bilder

Ergänzend zur biochemischen Charakterisierung mittels Westernblot und 2D-DIGE wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Sie dienten der ultrastrukturellen Darstellung der beiden distinkten Speicherkompartimente aus CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen. So konnte neben der vergleichenden Analyse ihres Proteoms ein Eindruck über Größe, Struktur sowie Beschaffenheit des Vesikel/Granula-Inhalts und der sie begrenzenden Membran gewonnen werden. In Vorarbeiten waren bereits die aus PHA-Blasten isolierten F2-Vesikel und F6-Granula untersucht worden (Schmidt et al. 2011b). In der hier vorgelegten Arbeit konnten durch die elektronenmikroskopische Darstellung der F2-Vesikel und F6-Granula von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen bei identischer Behandlung und gleichen Maßstäben der Abbildungen erstmals deren Ähnlichkeit bzw. Unterschiede vergleichend beurteilt werden. Das Material für die Elektronenmikroskopie wurde analog zu den 2D-DIGE-Versuchen generiert. CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden 14 Tage kultiviert und mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert. Für die analysierten T-Zellen ergaben sich hierbei Anteile von 92 % für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und jeweils über 96 % für CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen (s. Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung von drei T-Zelllinien nach 13-tägiger Expansion *in vitro*.** Die Zellen wurden am Tag 14 geerntet, 10 000 Zellen mittels FACS-Färbeprotokoll gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch phänotypisiert.

Durchflusszytometrische Messung (d13)	%
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	92,06
CD8 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup>	96,57
$\gamma\delta/\alpha\beta$	96,66



**Abbildung 4.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Fraktion 2 und 6 aus CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen.** Die Übersicht A) zeigt F2-Vesikel von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Maßstab entspricht 2  $\mu$ m. Die Bilder B-D zeigen die vergrößerten Darstellungen der F2-Vesikel und F6-Granula aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B), von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) und  $\gamma\delta$  T-Zellen (D). Der Maßstab entspricht 50 nm.

Anschließend wurden die isolierten T-Zellen subzellulär fraktioniert. Die gewonnenen F2-Vesikel und F6-Granula wurden sedimentiert und mit Glutaraldehyd (2,5 %) fixiert. Am Institut für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden die fixierten Partikel anschließend elektronenmikroskopisch analysiert. Die Größe der Strukturen lag für F2-Vesikel zwischen etwa 210 nm bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4.8B links) und etwa 400 nm bei CD4<sup>+</sup> (Abbildung 4.8C links) und  $\gamma\delta$  T-Zellen (Abbildung 4.8D links). Die größten F6-Granula waren die von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit etwa 300 nm. Die kleinsten Strukturen waren mit ca. 180 nm die F6-Granula von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Membranen der Vesikel wiesen für die Fraktion 2 bei allen Strukturen in etwa eine Dicke von 4 nm auf. Die Membran der F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen war mit ca. 10 nm deutlich breiter als die der Vergleichsgruppen.

## **4.4 2D-DIGE der Fraktionen 2 und 6 der drei T-Zellsubpopulationen**

Bei der 2D-DIGE können mittels Fluoreszenzfarbstoffmarkierung bis zu drei, über eine zweidimensionale Gelelektrophorese gleichzeitig aufgetrennte Proteingemische individuell sichtbar gemacht und in ihrer Überlagerung oder in Einzelansicht analysiert werden. So kann bereits der visuelle Eindruck eine Tendenz im Hinblick auf Übereinstimmungen und Unterschiede in der Expression verschiedener Proteine vermitteln (s. Abschnitt 4.4.1). Daneben ermöglicht die 2D-DIGE in Kombination mit der DIA-Analysesoftware die Quantifizierung relativer Mengenunterschiede der fluoreszenzmarkierten Proteine innerhalb eines Proteingemisches aus zu vergleichenden Proben (s. Abschnitt 4.4.2). Zur Identifizierung der Proteine differenziell markierter Spots können massenspektrometrische Untersuchungen angeschlossen werden, oder wie im Falle der vorliegenden Arbeit, die bereits bestehenden Mastergele der Kompartimente von Fraktion 2 (Schmidt et al. 2011b) und Fraktion 6 (Schmidt 2009a) herangezogen werden (s. Abschnitt 4.4.3). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### **4.4.1 Visueller und softwaregestützter Vergleich der F2-Vesikel und F6-Granula der drei T-Zellsubpopulationen**

Der visuelle Vergleich des Proteoms der jeweiligen Organellen aus unterschiedlichen T-Zellpopulationen beruht auf den Gel-Scans und diente vor allem dazu, einen ersten Eindruck zu erhalten, wie sehr die Proteinproben einander ähneln bzw. sich unterscheiden. In einem weiteren Schritt wurden ähnlich und unterschiedlich stark erscheinende Spots softwaregestützt markiert. Im Folgenden ist je ein Beispiel für den Vergleich von CD8<sup>+</sup> mit CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen der F2-Vesikel und der F6-Granula dargestellt.

#### **4.4.1.1 F2-Vesikel**

Für den direkten Vergleich der F2-Vesikel aus CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen wurden 2D-DIGE-Experimente mit Auftragung dreier Proben durchgeführt. Hierbei wurden Granula-Lysate aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit rotem, aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit blauem und aus γδ T-Zellen mit grünem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das Ergebnis der gleichzeitigen Ansicht aller drei Scankanäle (rot, grün und blau) ist im Überlagerungsbild (Abbildung 4.9) gezeigt. Die Überlagerung ähnlich abundanten Proteine stellt sich in einer Weißfärbung dar. Im Falle des hier dargestellten Überlagerungsbildes zeigte sich für die F2-Vesikel der drei T-Zellsubpopulationen ein fast deckungsgleiches Bild. Demgegenüber wurden exemplarisch drei Spots, die sich deutlich unterschieden, mit einem Pfeil in entsprechender Farbe markiert.

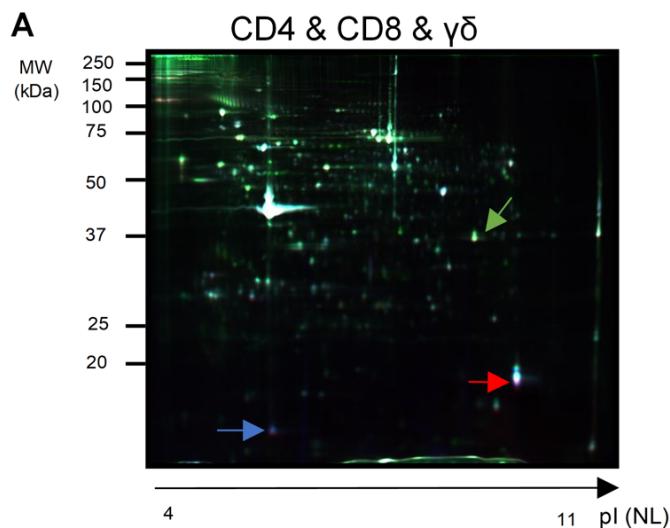


Abbildung 4.9 **2D-DIGE-Analyse von angereicherten F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Überlagerungsansicht.** Es wurden jeweils 50 µg von F2-Lysaten aus *in vitro* expandierten CD8<sup>+</sup> mit G-Dye 200 (blau), CD4<sup>+</sup> mit G-Dye 100 (rot) und  $\gamma\delta$  T-Zellen mit G-Dye 300 (grün) Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Überlagerung aller drei Fluoreszenz-Scankanäle resultiert für ähnlich abundant Proteine in einer Weißfärbung. Die Pfeile markieren unterschiedlich stark erscheinende Proteinspots.

Zur Identifizierung differenziell erscheinender Spots wurden die drei individuellen Scans mittels DIA-Software prozessiert, die entsprechenden Spots wurden markiert und jeweils innerhalb der Einzelvergleiche einander gegenübergestellt. Abbildung 4.10 zeigt den Vergleich des Proteoms der F2-Vesikel von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Überlagerung (Abbildung 4.10A) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinmengen in einer Violettfärbung. Die mit den farbigen Pfeilen markierten Spots weisen auf differenziell abundante Proteine hin, die sich auch im prozessierten Scan (Abbildung 4.10C) als solche darstellten. Das Histogramm (Abbildung 4.10B) zeigt logarithmisch die Volumenverhältnisse der Spots graphisch als Gauß'sche Verteilung, wobei Spots jenseits der beiden senkrechten schwarzen Linien, welche den Grenzwert der 2x SA darstellen, differenziell abundante Proteine markieren. Insgesamt ergab sich in diesem Vergleich des Proteoms der F2-Vesikel zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine große Übereinstimmung, die bei 92,5 % lag (s.u.).

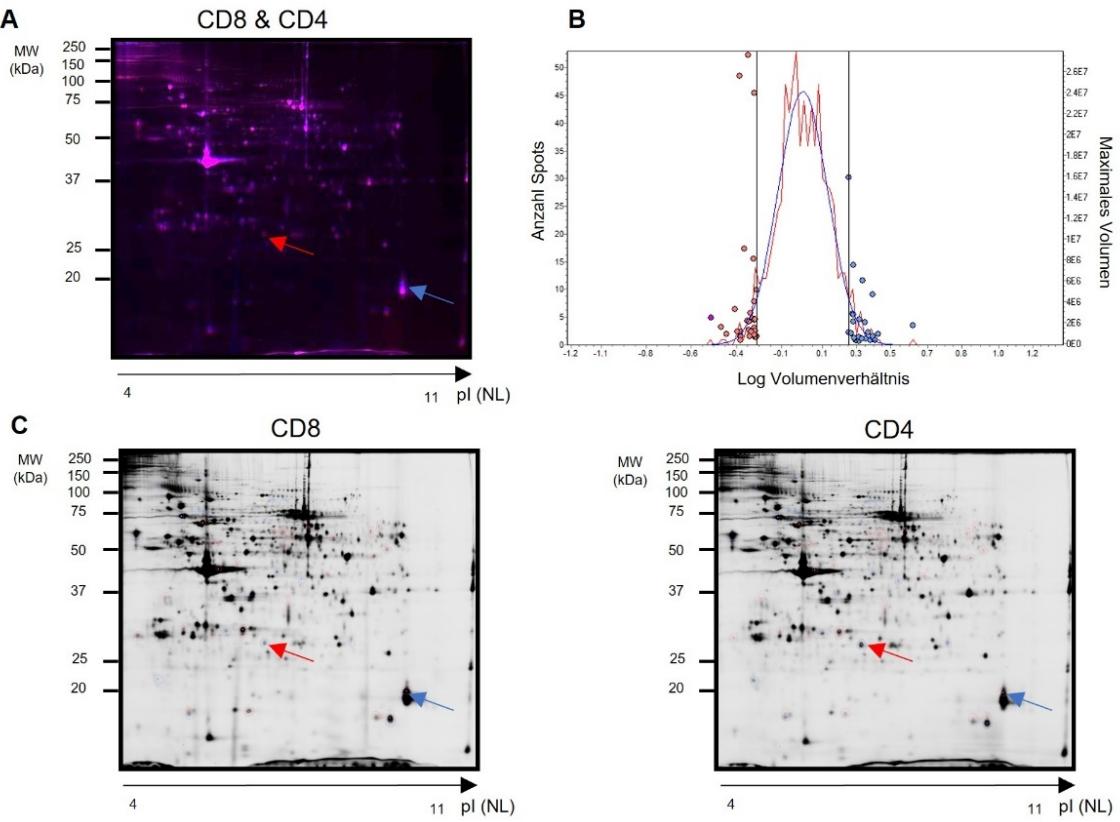
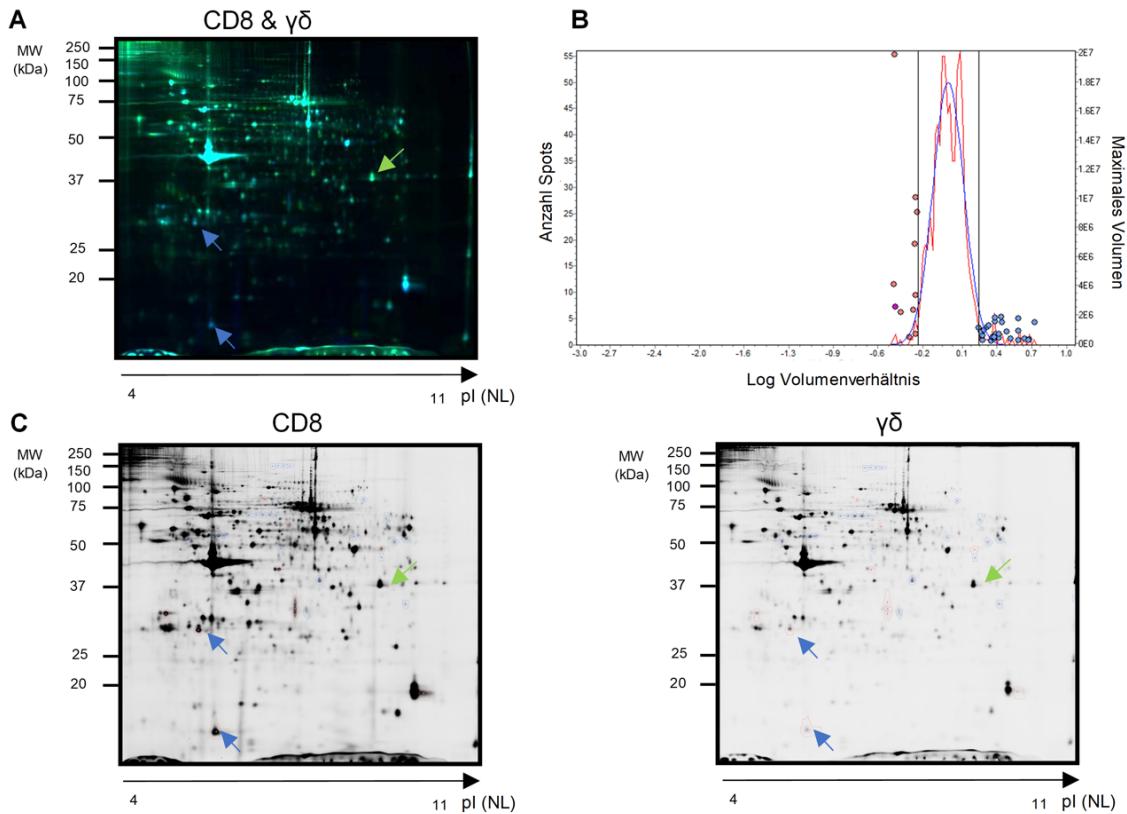


Abbildung 4.10 **Teilvergleich (1)** von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F2-Vesikeln aller drei T-Zellpopulationen. Die **Überlagerung (A)** zweier Fluoreszenz-Scankanäle (CD8<sup>+</sup> in: Blau und CD4<sup>+</sup> in: Rot) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Violettfärbung. Das **Histogramm (B)** der annotierten Spots stellt in Rot die in CD8<sup>+</sup> T-Zellen abundanten, in Blau die in CD4<sup>+</sup> T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die **Graustufenansichten (C)** stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinenden Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (rot umrandete Spots vermehrt in CD8<sup>+</sup>, blau umrandete Spots vermehrt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen).

Im nächsten Teilvergleich des Versuchs wurde derselbe Scan der F2-Vesikel aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Scan von F2-Vesikeln aus  $\gamma\delta$  T-Zellen verglichen. Das Überlagerungsbild in Abbildung 4.11A zeigt die beiden Kanäle für den grünen ( $\gamma\delta$  T-Zellen) und den blauen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) Fluoreszenzfarbstoff. In ähnlichem Ausmaß vorhandene Proteine stellten sich in der Überlagerung als Cyanfärbung dar, was für die überwiegende Anzahl der Proteinspots zutraf und daher auf eine große Ähnlichkeit des Proteoms der F2-Vesikel von CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen hinweist. Exemplarisch sind durch farbige Pfeile drei Spots markiert, die in der Überlagerungsansicht unterschiedlich erschienen. Die Prozessierung der Gele durch die DIA-Software diente der Quantifizierung dieses visuellen Eindrucks und ist in der Graustufenabbildung (Abbildung 4.11C) nachzuvollziehen. Stärker in CD8<sup>+</sup> T-Zellen erscheinende Spots sind dort rot, stärker in  $\gamma\delta$  T-Zellen erscheinende Spots blau umrandet dargestellt. Für den grün markierten Spot ergab sich kein den Grenzwert der 2x SA überschreitender Wert; für die beiden blau markierten Spots zeigte sich jedoch ein stärkeres Signal in den F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das Histogramm (Abbildung 4.11B) zeigt

logarithmisch die Volumenverhältnisse aller durch die Software detektierten Spots in Form einer Gauß'schen Verteilung. Im gezeigten Vergleich lagen 93,5% der auswertbaren Spots im Bereich der 2x SA (senkrechte Linien) und repräsentierten daher ähnlich abundante Proteine.



**Abbildung 4.11 Teilvergleich (2) von CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F2-Vesikeln aller drei T-Zellpopulationen.** Die Überlagerung (A) zweier Fluoreszenz-Scankanäle (CD8<sup>+</sup> in: Blau und γδ in: Grün) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Cyanfärbung. Das Histogramm (B) der annotierten Spots stellt in Rot die in CD8<sup>+</sup> T-Zellen abundanten, in Blau die in γδ T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die Graustufenansichten (C) stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinende Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (rot umrandete Spots vermehrt in CD8<sup>+</sup>, blau umrandete Spots in γδ T-Zellen).

Im letzten Teilvergleich (Abbildung 4.12) der 2D-DIGE-Analysen wurde das Proteom der F2-Vesikel von γδ T-Zellen mit dem von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen. Abbildung 4.12A zeigt die Überlagerung der Scans für den roten (CD4) und grünen (γδ) Fluoreszenzfarbstoff. Vergleichbare Mengen desselben Proteins resultieren in einer Gelbfärbung. Die vielen gelben Spots im abgebildeten Versuch weisen somit auf eine große Ähnlichkeit im Proteom der untersuchten Probe hin. Demgegenüber markiert der rote Pfeil einen Spot, der in der Überlagerung ein stärkeres Signal für die Probe aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte. Auch die Graustufenansicht (Abbildung 4.12C), in der stärker in γδ T-Zellen erscheinende Spots rot, stärker in CD4<sup>+</sup> T-Zellen erscheinende Spots blau umrandet sind, zeigt den entsprechenden Spot verstärkt in CD4<sup>+</sup> T-

Zellen an. Das Histogramm (Abbildung 4.12B) zeigt logarithmisch die Volumenverhältnisse aller durch die Software detektierten Spots in Form einer Gauß'schen Verteilung. Jenseits der schwarzen senkrechten Linien (2x SA) befinden sich in analoger Farbgebung zu den Graustufenabbildungen die vermehrt oder vermindert exprimierten Proteinspots. Der Anteil der innerhalb der Grenzen liegenden Spots betrug in dem dargestellten Versuch 94,8%.

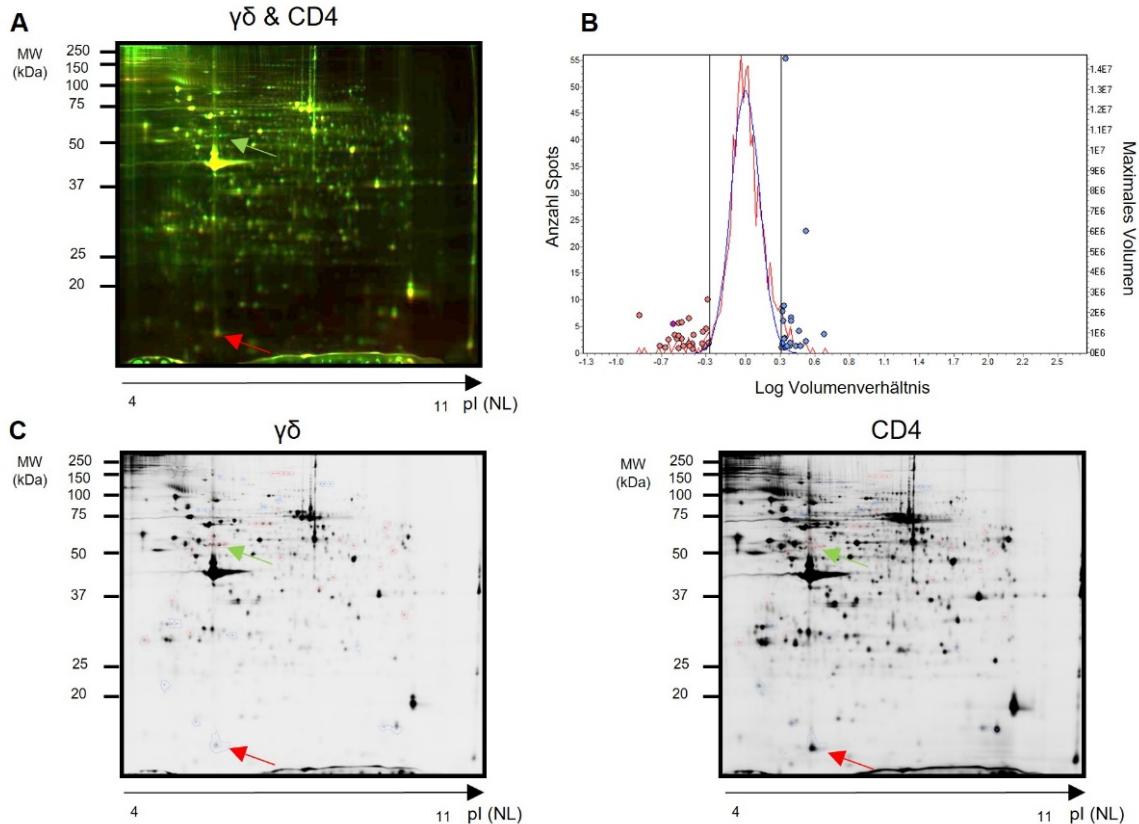


Abbildung 4.12 **Teilvergleich (3)** von  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F2-Vesikeln aller drei T-Zellpopulationen. Die **Überlagerung** (A) zweier Fluoreszenz-Scankanäle ( $\gamma\delta$  in: Grün und  $CD4^+$  in: Rot) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Gelbfärbung. Das **Histogramm** (B) der annotierten Spots stellt in Rot die in  $\gamma\delta$  T-Zellen abundanten, in Blau die in  $CD4^+$  T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die **Graustufenansichten** (C) stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinenden Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (rot umrandete Spots vermehrt in  $\gamma\delta$ , blau umrandete Spots vermehrt in  $CD4^+$  T-Zellen).

#### 4.4.1.2 F6-Granula

Für den direkten Vergleich des Proteoms der F6-Granula wurden in analoger Farbgebung zu den Analysen der F2-Vesikel 2D-DIGE-Versuche mit ebenfalls drei Proben durchgeführt, sodass sich ähnlich abundant Proteine in der Überlagerungsansicht (Abbildung 4.13) in einer Weißfärbung darstellten. Verglichen mit dem nahezu deckungsgleichen Bild der F2-Vesikel (vgl. Abbildung 4.9) zeigte sich im hier dargestellten Vergleich eine größere Varianz im Farbmuster. Dies weist auf eine größere Unterschiedlichkeit des Proteoms der F6-Granula zwischen den untersuchten T-Zellsubpopulationen hin. Exemplarisch sind einige auffällige

Spots in Abbildung 4.13 markiert, wobei die roten und blauen Pfeile Einzelfarben (CD4 bzw. CD8), der gelbe und violette Pfeil die Mischfarben der Einzelvergleiche von CD4<sup>+</sup> vs.  $\gamma\delta$  bzw. CD4<sup>+</sup> vs. CD8<sup>+</sup> T-Zellen markieren. Letztere zeigen an, dass das Protein in zwei von drei Proben gleichmäßig vorhanden war, in der dritten jedoch deutlich weniger, wodurch sich die Mischfarbe von nur zwei Proben zeigte.

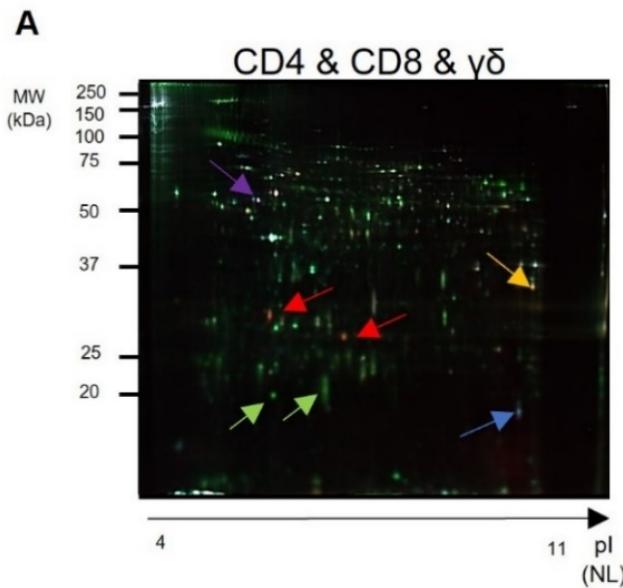


Abbildung 4.13 **2D-DIGE-Analyse von angereicherten F6-Granula von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Überlagerungsansicht.** Es wurden jeweils 7,336 µg von F6-Lysaten aus *in vitro* expandierten CD8<sup>+</sup> mit G-Dye 200 (blau), CD4<sup>+</sup> mit G-Dye 100 (rot) und  $\gamma\delta$  T-Zellen mit G-Dye 300 (grün) Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Überlagerung aller drei Fluoreszenz-Scankanäle resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Weißfärbung. Die Pfeile markieren unterschiedlich stark erscheinende Proteinspots; die Farben entsprechen den Fluoreszenzfarben der jeweiligen Proben bzw. deren Mischfarben.

Der erste Teilvergleich des Proteoms der F6-Granula ist in Abbildung 4.14 gezeigt. In der Überlagerung (Abbildung 4.14A) der beiden Kanäle für CD8<sup>+</sup> (blau) und CD4<sup>+</sup> (rot) T-Zellen stellten sich ähnlich abundante Proteine in einem Spot als Violettfärbung dar. Die überwiegend violette Darstellung spricht daher für eine große Übereinstimmung im Spotmuster. Die farbigen Pfeile zeigen demgegenüber Proteine an, die in CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt waren. Die Graustufenabbildung (Abbildung 4.14C) zeigt die prozessierten Scans. Blau umrandete Spots markieren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrte, rot umrandete Spots in CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermehrte Proteine. Die in der Überlagerung auffälligen Spots (Pfeile) erschienen sämtlich auch in den prozessierten Scans in unterschiedlichem Ausmaß. Die SVV aller ähnlich und differenziell abundanten Proteine sind auch im Histogramm (Abb. 5.20B) dargestellt.

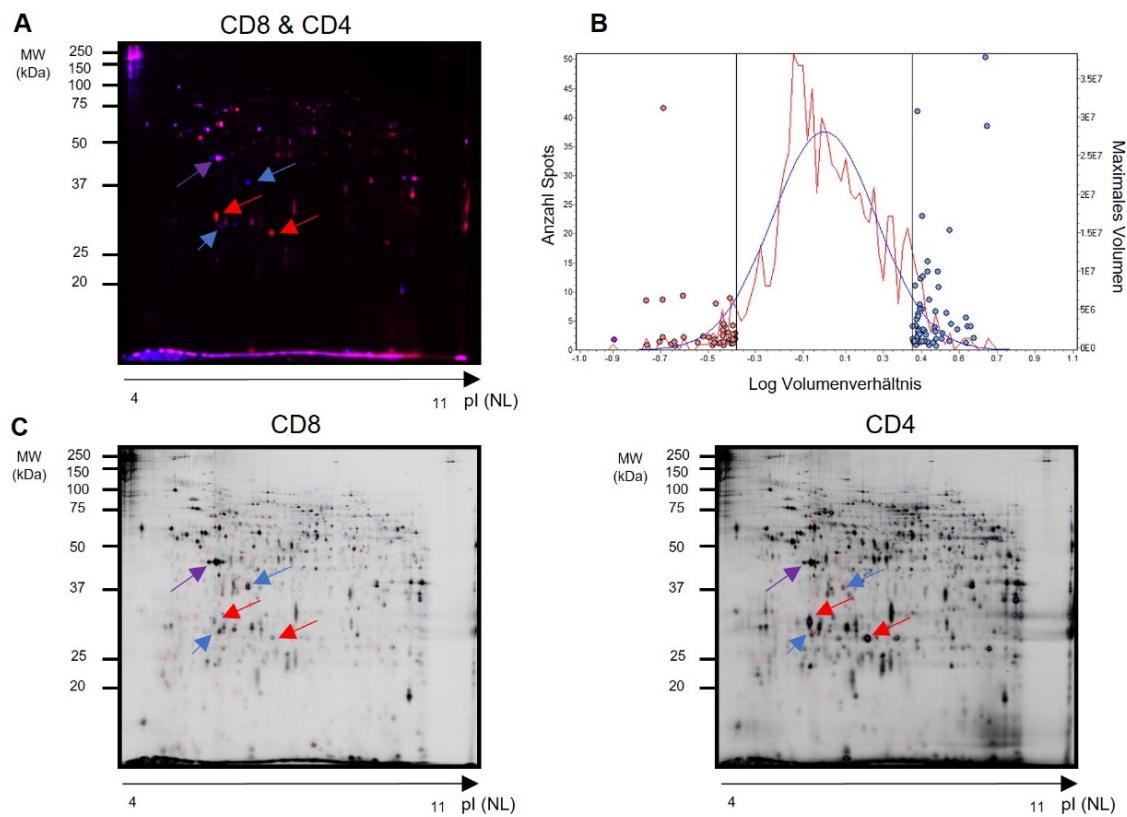


Abbildung 4.14 **Teilvergleich (1)** von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F6-Granula aller drei T-Zellpopulationen. Die **Überlagerung (A)** zweier Fluoreszenz-Scankanäle (CD8<sup>+</sup> in: Blau und CD4<sup>+</sup> in: Rot) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Violettfärbung. Das **Histogramm (B)** der annotierten Spots stellt in Rot die in CD8<sup>+</sup> T-Zellen abundanten, in Blau die in CD4<sup>+</sup> T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die **Graustufenansichten (C)** stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinenden Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (rot umrandete Spots vermehrt in CD8<sup>+</sup>, blau umrandete Spots vermehrt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen).

Der Teilvergleich der F6-Granula von CD8<sup>+</sup> mit  $\gamma\delta$  T-Zellen ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Die Abbildung 4.15A stellt den Scan von CD8<sup>+</sup> (blau) aus Abbildung 4.15 als Überlagerung mit dem Scan von  $\gamma\delta$  (grün) T-Zellen dar. Hierbei fielen die mit den entsprechend farblich markierten Pfeilen hervorgehobenen Spots auf, die sich nicht in der Cyanfärbung darstellten. Bei dem durch einen blauen Pfeil markierten Spot im linken oberen Bereich des Scans handelt es sich um den im Überlagerungsbild (Abbildung 4.13) violett markierten Spot, der hier (wie erwartet) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt erscheint. Insbesondere der mit dem gestrichelten grünen Pfeil markierte Spot stellt sich in  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl den CD4<sup>+</sup> als auch den CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber verstärkt dar. Nach Auswertung (Abbildung 4.15C) ergab sich eine Ähnlichkeit des Proteoms der F6-Granula der beiden Proben von 91,5 %. Die Gesamtheit der ähnlich und differenziell abundanten Proteine veranschaulicht abermals das Histogramm (Abbildung 4.15B).

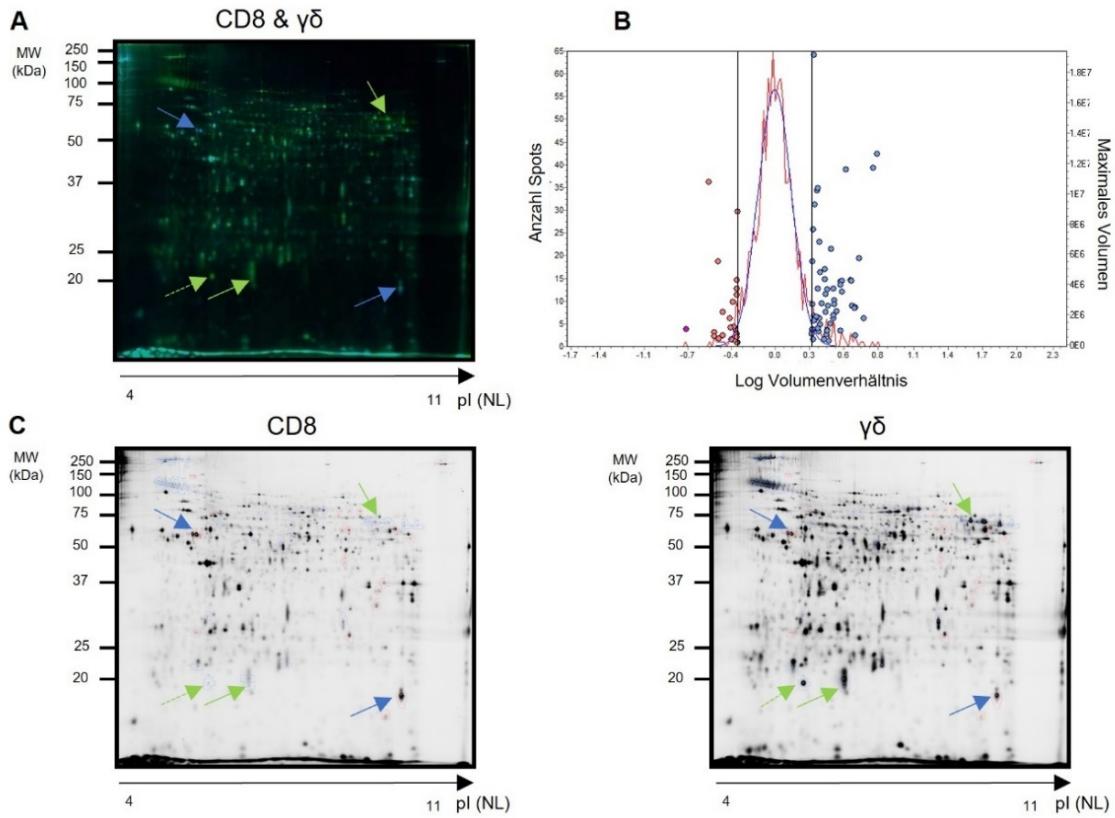


Abbildung 4.15 **Teilvergleich (2)** von CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F6-Granula aller drei T-Zellpopulationen. Die **Überlagerung (A)** zweier Fluoreszenz-Scankanäle (CD8<sup>+</sup> in: Blau und γδ in: Grün) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinen in einer Cyanfärbung. Das **Histogramm (B)** der annotierten Spots stellt in Rot die in CD8<sup>+</sup> T-Zellen abundanten, in Blau die in γδ T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die **Graustufenansichten (C)** stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinenden Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (rot umrandete Spots vermehrt in CD8<sup>+</sup>, blaue Spots vermehrt in γδ T-Zellen).

Die Ergebnisse des letzten Teilvergleiches sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Die Abbildung 4.16A zeigt den Scan des Geles von γδ T-Zellgranula (grün) im Vergleich zu F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (rot) in Überlagerung, wobei sich gleichermaßen abundant Proteine als Gelbfärbung darstellten. Auch in diesem Vergleich wurden auffällige Spots mit entsprechend farbigen Pfeilen markiert. Der bereits in Abbildung 4.15 mit dem gestrichelten grünen Pfeil markierte Spot, ist auch in diesem Vergleich in den F6-Granula von γδ T-Zellen vermehrt exprimiert. Diese und alle anderen unterschiedlich stark erscheinenden Spots sind in der Graustufenabbildung (Abbildung 4.16C) rot umrandet (in F6-Granula von γδ T-Zellen verstärkt) und blau umrandet (in CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt) dargestellt. Die logarithmischen Volumenverhältnisse aller identifizierten Spots zeigt das Histogramm in Abbildung 4.16B.

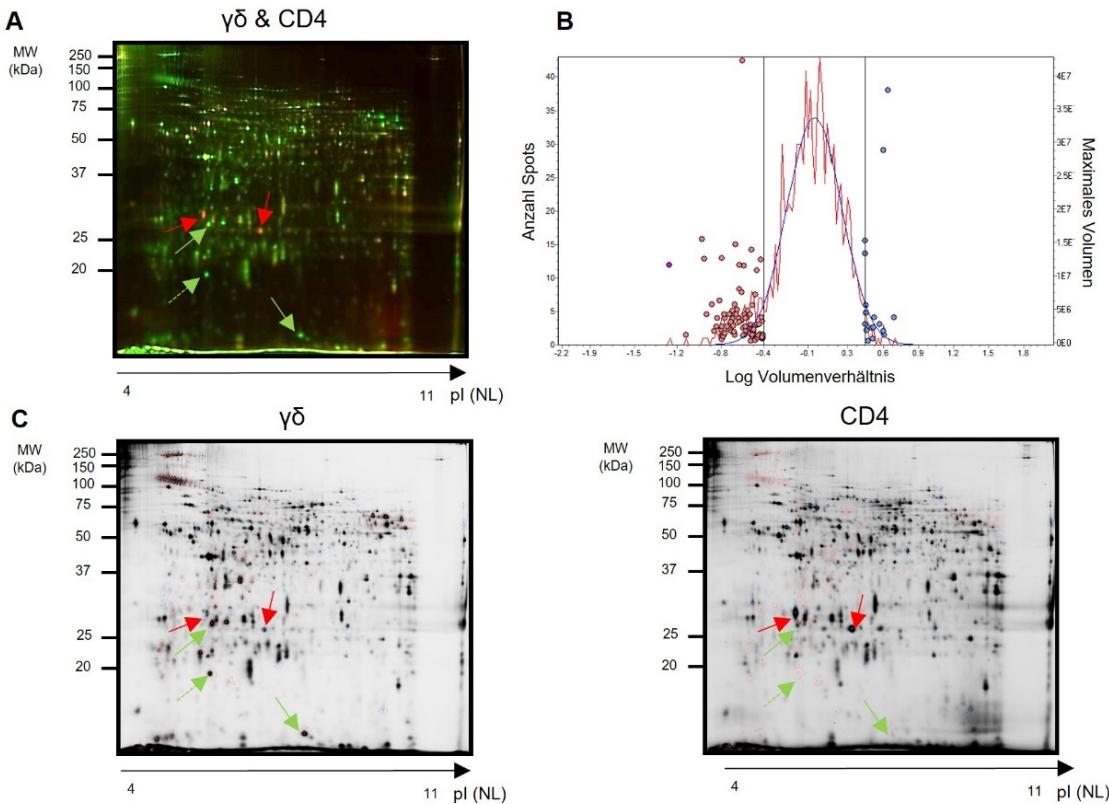


Abbildung 4.16 **Teilvergleich (3) von  $\gamma\delta$  und  $CD4^+$  T-Zellen aus der 2D-DIGE-Analyse von angereicherten F6-Granula aller drei T-Zellpopulationen.** Die **Überlagerung (A)** zweier Fluoreszenz-Scankanäle ( $CD4^+$  in: Rot und  $\gamma\delta$  in: Grün) resultiert bei ähnlich abundanten Proteinmengen in einer Gelfärbung. Das **Histogramm (B)** der annotierten Spots stellt in Rot die in  $\gamma\delta$  T-Zellen abundanten, in Blau die in  $CD4^+$  T-Zellen abundanten Proteine dar; vertikale Linien zeigen den Grenzbereich der 2x SA an. Die **Graustufenansichten (C)** stellen die prozessierten Gele mitsamt den, durch die DIA-Software annotierten, unterschiedlich stark erscheinenden Spots außerhalb des Grenzwertes der 2x SA dar (blau umrandete Spots vermehrt in  $CD4^+$ , rot umrandete Spots vermehrt in  $\gamma\delta$  T-Zellen).

#### 4.4.2 Prozentuale Übereinstimmung des Proteinmusters durch Auswertung der durch die DIA-Software generierten Daten

Mithilfe der Differential In-gel Analysis (DIA) der DeCyder™-Software wurde der Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten gescannter Gele statistisch ausgewertet. Unter Verwendung der aus Vorarbeiten ermittelten Filtereinstellungen und zusätzlichen manuellen Korrekturen wurde die Abundanz der identifizierten Proteine aus den zu analysierenden Populationen verglichen. Die Software ermittelte dabei die Anzahl und den prozentualen Anteil von ähnlich sowie verstärkt und vermindert erscheinenden Spots zwischen den zu analysierenden Proben im Gel. Die Analyse erfolgte auf Grundlage des SVV des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteingemisches von zwei oder drei Proben. Im Folgenden sind in tabellarischer Form ähnlich stark erscheinende Spots im Bereich der 2x SA und differenziell erscheinende Spots außerhalb der 2x SA der verglichenen Proben für Fraktion 2 und Fraktion 6 aufgeführt.

#### 4.4.2.1 F2-Vesikel

Für das FasL-reiche Speicherkompartiment aus Fraktion 2 zeigte sich insgesamt eine ausgesprochen hohe Übereinstimmung im Proteomvergleich über alle drei analysierten T-Zellpopulationen hinweg. Von allen durchgeführten Vergleichen konnten die größten Unterschiede beim Vergleich von CD4<sup>+</sup> mit γδ T-Zellen beobachtet werden.

#### Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Bei der Prozessierung der 2D-DIGE-Gele aus acht unabhängigen Experimenten für den Vergleich von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zwischen 2202-2486 Spots (2343 im Durchschnitt) detektiert. Nach Vorauswahl entsprechend der in Abschnitt 3.4.3.4 dargelegten Parameter (Ausschluss von Spots am Gelrand, innerhalb der Markerbanden und eindeutig als Staub identifizierbaren Spots) konnten von den detektierten Spots 740-1218 (909 im Durchschnitt) ausgewertet werden. Von diesen auswertbaren Spots lagen 685-1153 (844 im Durchschnitt) innerhalb des standardmäßig festgelegten Grenzbereichs der 2x SA für den Unterschied in den Spot-Volumina, was Anteilen von 91,2% bis 95,1% entsprach. Im Mittel erschienen lediglich 28 Spots stärker in CD8<sup>+</sup> T-Zellen und 37 Spots stärker in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Insgesamt stellte sich damit eine auffällig hohe Vergleichbarkeit dieses Kompartiments in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dar.

**Tabelle 4.4 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der F2-Vesikel von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt; Tag der Analyse (d).

Nr.	Farbstoff Labelling		Proteinmenge	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Übereinstimmung	>CD8	>CD4	2x SA
	CD8	CD4								
V1	G200	G300	50	14	2430	1218	94,7 % (#1153)	1,9 % (#23)	3,4 % (#42)	1.38832
V2	G200	G300	8,6	14	2419	816	95,1 % (#776)	1 % (#8)	3,9 % (#32)	1.8567
V3	G200	G300	40,7	14	2328	1079	91,8 % (#991)	3,2 % (#35)	4,9 % (#53)	1.77473
V4	G200	G100	13,94	16	2347	754	91,2 % (#688)	1,2 % (#9)	7,6 % (#57)	2.38438
V5	G200	G100	35,1	16	2315	1096	92,5 % (#1014)	5,3 % (#58)	2,2 % (#24)	1.80355
V6	G300	G200	13,5	17	2202	740	92,6 % (#685)	3,6 % (#27)	3,8 % (#28)	1.60117
V7	G200	G100	8,1	16	2486	809	91,8 % (#743)	3,5 % (#28)	4,7 % (#38)	1.71215
V9	G200	G100	50	17	2214	757	92,5 % (#700)	4,2 % (#32)	3,3 % (#25)	1.74655
Ø					2342,63	908,63	92,78 % #843,8	2,98 % #27,5	4,23 % #37,4	

Tabelle 4.4 zeigt die Auswertungen aller durchgeführten Versuche, bei denen die Proben aus der Fraktion 2 von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen miteinander verglichen wurden.

### **Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen**

Im direkten Vergleich der F2-Vesikel aus CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen konnten zwischen 2214 und 2486 Spots (2340 im Durchschnitt) detektiert werden, von denen zwischen 754 und 1096 (854 im Durchschnitt) ausgewertet wurden. Hiervon lagen durchschnittlich 781 Spots in den Grenzen der 2x SA und konnten somit als „ähnlich“ klassifiziert werden, was einem Anteil von durchschnittlich 91,6 % entsprach. Demgegenüber waren im Mittel 45 Spots verstärkt in CD8<sup>+</sup> T-Zellen und durchschnittlich 28 Spots verstärkt in γδ T-Zellen (s. Tabelle 4.5; >CD8 bzw. >γδ). Es zeigten sich somit nur geringfügig kleinere Übereinstimmungen als im Proteomvergleich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dennoch kann auf Grundlage der ermittelten Daten von einer großen Übereinstimmung zwischen CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen in Bezug auf das in Fraktion 2 angereicherte FasL-reiche Speicherkompartiment ausgegangen werden.

**Tabelle 4.5 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der Fraktion 2 von CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen.** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt.

Nr.	Farbstoff Labelling		Proteinmenge μg	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Übereinstimmung	> CD8	> γδ	2x SA
	CD8	γδ								
V4	G200	G300	13,94	16	2347	754	90,2 % (#679)	4,9 % (#37)	4,9 % (#37)	2.63108
V5	G200	G300	35,1	16	2315	1096	89,9 % (#985)	8,5 % (#93)	1,6 % (#18)	2.41153
V7	G200	G300	8,1	16	2486	809	91,5 % (#740)	4,8 % (#39)	3,7 % (#30)	2.07105
V9	G200	G300	50	17	2214	757	94,8 % (#718)	1,5 % (#11)	3,7 % (#28)	1.75495
Ø					2340,5	854	91,6 % #780,5	4,93 % #45	3,48 % #28,3	

### **Vergleich zwischen CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen**

Beim Vergleich von CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen konnten innerhalb von vier unabhängigen Versuchen 2214-2486 (2341 im Durchschnitt) Proteinspots detektiert werden, wovon im Mittel 854 ausgewertet werden konnten. Bei den Berechnungen auf Grundlage der 2x SA zeigten sich Anteile von 89 %-93,5 % vergleichbar abundanten Proteine an der Gesamtheit aller annotierten Spots. Im Mittel lagen 777 Spots innerhalb der 2x SA und konnten daher als ähnlich angesehen werden. Zwischen 21 und 64 (34 im Durchschnitt) Spots waren in γδ T-Zellen verstärkt, zwischen 19 und 98 (im Mittel 44) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es zeigte sich somit, im Unterschied zu

dem Vergleich der F2-Vesikel von CD4<sup>+</sup> mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen, eine deutlichere Unterschiedlichkeit hinsichtlich des Proteoms der F2-Vesikel von CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen. Die Tabelle 4.6 zeigt die gesamten Daten für den beschriebenen Vergleich.

**Tabelle 4.6 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der Fraktion 2 von γδ und CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt.

Nr.	Farbstoff Labelling	Proteinmenge	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Übereinstimmung	> γδ	> CD4	2x SA
	γδ	CD4	µg						
V4	G300	G100	13,94	16	2347	754	89,0 % (#671)	8,5 % (#64)	2,5 % (#19)
V5	G300	G100	35,1	16	2315	1096	89,0 % (#975)	2,1 % (#23)	8,9 % (#98)
V7	G300	G100	8,1	16	2486	809	93,0 % (#752)	2,5 % (#21)	4,6 % (#37)
V9	G300	G100	50	17	2214	757	93,5 % (#708)	3,6 % (#27)	2,9 % (#22)
Ø					2340,5	854	91,1 % #776,5	4,2 % #33,8	4,7 % #44

#### **4.4.2.2 F6-Granula**

Die Auswertung der 2D-DIGE-Analysen der F6-Granula wurde ebenfalls mittels DIA-Software durchgeführt. Es zeigte sich auch in dieser Fraktion eine große Ähnlichkeit des Proteoms bei allen analysierten T-Zellpopulationen. Insbesondere ergaben sich recht konstant Übereinstimmungen um 90 % und im Unterschied zur Fraktion 2 damit eine geringfügigere Streuung innerhalb der Versuche. Insgesamt zeigte sich somit eine etwas weniger ausgeprägte Übereinstimmung des Proteoms innerhalb des Speicherkompartiments der Fraktion 6. Anzumerken ist jedoch, dass die Proteinmengen, die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden konnten bei diesen Analysen deutlich geringer ausfielen als bei den Untersuchungen der Fraktion 2-Vesikel. In keinem der Versuche war es möglich, 50 µg Protein auf ein Gel aufzutragen. Deshalb wurden auch Analysen mit nur 5-8 µg Protein durchgeführt, was bei der vergleichenden Aussage berücksichtigt werden sollte.

#### **Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Im Vergleich von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich des Proteoms der lytischen Granula aus Fraktion 6 wurden von durchschnittlich 2310 detektierten Spots zwischen 783 und 1225 (im Mittel 983) ausgewertet. Von diesen auswertbaren Spots befanden sich durchschnittlich 893 innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA. Die mittlere prozentuale Übereinstimmung der in Tabelle 4.7 dargestellten Analysen lag dementsprechend bei 90,74 %. Für die F6-Granula der beiden untersuchten αβ T-Zellpopulationen ist daher von einer großen Ähnlichkeit auszugehen.

**Tabelle 4.7 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der Fraktion 6 von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt.

Nr.	Farbstoff Labelling		Protein- menge	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Überein- stimmung	> CD8	> CD4	2x SA
	CD8	CD4								
V1	G200	G300	17,5	14	2411	1225	91,5 % (#1121)	5,5 % (#67)	3,0 % (#37)	1.7849
V3	G200	G300	5	14	2144	783	91,4 % (#716)	7,4 % (#58)	1,1 % (#9)	1.91524
V5	G200	G100	20,6	16	2182	866	89,4 % (#774)	7,0 % (#61)	3,6 % (#31)	2.70381
V6	G300	G200	7,4	17	2299	1157	91,3 % (#1056)	2,3 % (#15)	7,4 % (#86)	2.11262
V7	G200	G100	7,336	16	2512	887	90,1 % (#799)	4,5 % (#40)	5,4 % (#48)	2.41925
Ø					2309,6	983,4	90,74 % #893,2	5,34 % #48,2	4,1 % #42,2	

### Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen

Die vergleichenden Analysen der F6-Granula aus CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen ergaben zwischen 2060 und 2512 (2286 im Durchschnitt) detektierbare Spots. Von diesen waren im Mittel 884 auswertbar und wiederum durchschnittlich 741 davon lagen im Grenzbereich der 2x SA, was einem Anteil von 89,7% entsprach. Bei den außerhalb des Grenzbereichs liegenden Spots, die damit als differenziell klassifiziert wurden, lag die Anzahl vermehrt abundanter Proteine für γδ T-Zellen mit durchschnittlich 65 deutlich über der von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (im Mittel 21). Die F6-Granula von CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen wiesen daher in den vier durchgeführten Versuchen (s. Tabelle 4.8) eine geringfügig stärkere Unterschiedlichkeit als die F6-Granula der αβ T-Zellen untereinander auf.

**Tabelle 4.8 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der Fraktion 6 von CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen.** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt.

Nr.	Farbstoff Labelling		Protein- menge	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Überein- stimmung	> CD8	> γδ	2x SA
	CD8	γδ								
V4	G200	G300	14,78	16	2256	723	90,5 % (#654)	0,8 % (#6)	8,7 % (#63)	2.14301
V5	G200	G300	20,6	16	2315	1096	86,4 % (#748)	4,2 % (#36)	9,5 % (#82)	3.36757
V7	G200	G300	7,336	16	2512	887	91,5 % (#812)	3,0 % (#27)	5,4 % (#48)	2.06304
V9	G200	G300	21	17	2060	828	90,5 % (#749)	1,6 % (#13)	8,0 % (#66)	2.29532
Ø					2285,8	883,5	89,7 % #740,8	2,4 % #20,5	7,9 % #64,8	

### **Vergleich zwischen CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen**

Für den Vergleich der F6-Granula aus CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen konnten nur zwei Versuche ausgewertet werden. Insgesamt zeigten sich im Vergleich von F6-Granula aus CD4<sup>+</sup> und γδ T-Zellen die meisten Unterschiede. Die Übereinstimmung innerhalb der beiden Versuche lag bei 87,6 und 88,6 %. Insbesondere die F6-Granula der γδ T-Zellen wiesen überdurchschnittlich viele Proteinspots mit einem SVV außerhalb des Grenzbereiches der 2x SA auf und wurden somit als differenziell abundant angesehen. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der beiden Versuche im Einzelnen aufgeführt.

**Tabelle 4.9 Statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche für den Vergleich der Fraktion 6 von γδ und CD4<sup>+</sup> T-Zellen** Grenzwert: 2x SA; Übereinstimmung: Anteile (%) sowie absolute Anzahl (#) der Spots, deren Volumenverhältnis innerhalb des Grenzbereiches von 2x SA liegt.

Nr.	Farbstoff Labelling		Proteinmenge	d	Detektierte Spots	Auswertbare Spots	Übereinstimmung	>γδ	>CD4	2x SA
	γδ	CD4								
V5	G300	G100	20,6	16	2182	866	87,6 % (#759)	11,5 % (#100)	0,8 % (#7)	3.41186
V7	G300	G100	7,336	16	2512	887	88,6 % (#786)	9,7 % (#86)	1,7 % (#15)	2.83078

#### **4.4.3 Differenziell abundant Proteine innerhalb der Effektorkompartimente**

Die differenziell abundant identifizierten Spots aus den DIA-Auswertungen wurden hinsichtlich der folgenden zwei verschiedenen Merkmale, unter Zuhilfenahme der Mastergele, weiter untersucht:

1. Statistisch ermittelte, maximal unterschiedlich abundant markierte Proteine.
2. Aus Vorarbeiten bekannte, biologisch relevante Proteine.

Zur Ermittlung der Proteinspots mit den größten Unterschieden in ihrer Abundanz wurde für alle Versuche und für alle innerhalb des jeweiligen Gels durchgeführten Vergleiche der maximal verstärkt erscheinende Spot ausgewählt, die unterschiedliche Ausprägung der Spots visuell verifiziert und seine Lokalisation im Gel markiert. Auf Grundlage wiederkehrender charakteristischer Spotmuster wurde der entsprechende Spot im Mastergel identifiziert und so einem Protein zugeordnet. Im folgenden Abschnitt sind alle Proteine aufgelistet, deren Benennung anhand der Nummerierung aus der Mastergel-Tabelle möglich war. In den dazugehörigen Abbildungen sind die jeweiligen 3D-Darstellungen der Proteinspots sowie die Lokalisation im Versuchs- und Mastergel dargestellt. Hier sind auch die nicht eindeutig identifizierbaren Spots abgebildet.

Für die Analyse von Punkt 2 wurden diejenigen Proteine ausgewählt, die in Vorarbeiten der AG im Kontext der Speicherkompartimente zytotoxischer T-Zellen hinsichtlich Zytoskelett-

Assoziation, Zytotoxizität und Transportfunktion in den Fokus gerückt waren. Ihre womöglich differenzielle Expression innerhalb der untersuchten T-Zellpopulationen sollte anhand der erhobenen Daten untersucht werden. Hierfür wurden diese Proteine im Mastergel gekennzeichnet und dann anhand ihrer Lokalisation in den Versuchsgelen identifiziert, wo dies eindeutig möglich war. Im Abschnitt 4.4.3.3 sind diese identifizierten Proteine dargestellt.

#### **4.4.3.1 Maximal unterschiedlich abundante Proteinspots in den F2-Vesikeln**

##### **Vergleich CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Es wurden acht Vergleiche des Proteoms von F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Hierbei konnten vier Proteinspots einem Protein zugeordnet werden, die in den F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich abakter im Vergleich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren. Tabelle 4.10 zeigt alle acht annotierten Proteinspots mit ihrer durch das DeCyder® System zugeordneten Referenznummer (Spot-ID) und dem jeweiligen SVV.

**Tabelle 4.10 In F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

<b>Versuch</b>	<b>Proteinname</b>	<b>MA-ID</b>	<b>Spot-ID</b>	<b>SVV</b>	<b>[2x SA]</b>
<b>V1</b>	Calponin 2	647	1938	8.68	1.38832
<b>V2</b>	Protein Disulfid-Isomerase A3	385	1367	2.16	1.8567
<b>V3</b>	n.i.	529	1729	3.50	1.77473
<b>V4</b>	--	n.i.	2100	3.89	2.38438
<b>V5</b>	--	n.i.	1863	3.96	1.80355
<b>V6</b>	DPP4	86	734	2.39	1.60117
<b>V7</b>	Stathmin 1/Oncoprotein	820	2270	3.01	1.71215

Wo eine Identifizierung möglich war, wurde die entsprechende Proteinnummer aus der Mastertabelle angegeben (MA-ID). Der Grenzwert ([ ]) entspricht der 2x SA der SVV und gibt den Wert an, ab dem ein Proteinspot als differenziell abundant anzusehen ist. Insbesondere für das Protein Calponin 2 zeigte sich ein SVV von 8,68 [1,39] und damit eine sehr starke Abundanz dieses Proteins in den F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In der Abbildung 4.17 sind die Proteinspots aus Tabelle 4.10 in Form einer 3D-Darstellung und ihrer Lokalisation im Versuchs- sowie Mastergel dargestellt. Bei den nicht identifizierbaren (n.i.) Spots handelte es sich um solche Spots, die entweder bereits in den Mastergelen nicht identifiziert werden konnten (s. beispielsweise MA-ID 529) oder um neue Spots, die in den Mastergelen nicht vorhanden waren (s. beispielsweise Spot-ID 2100).

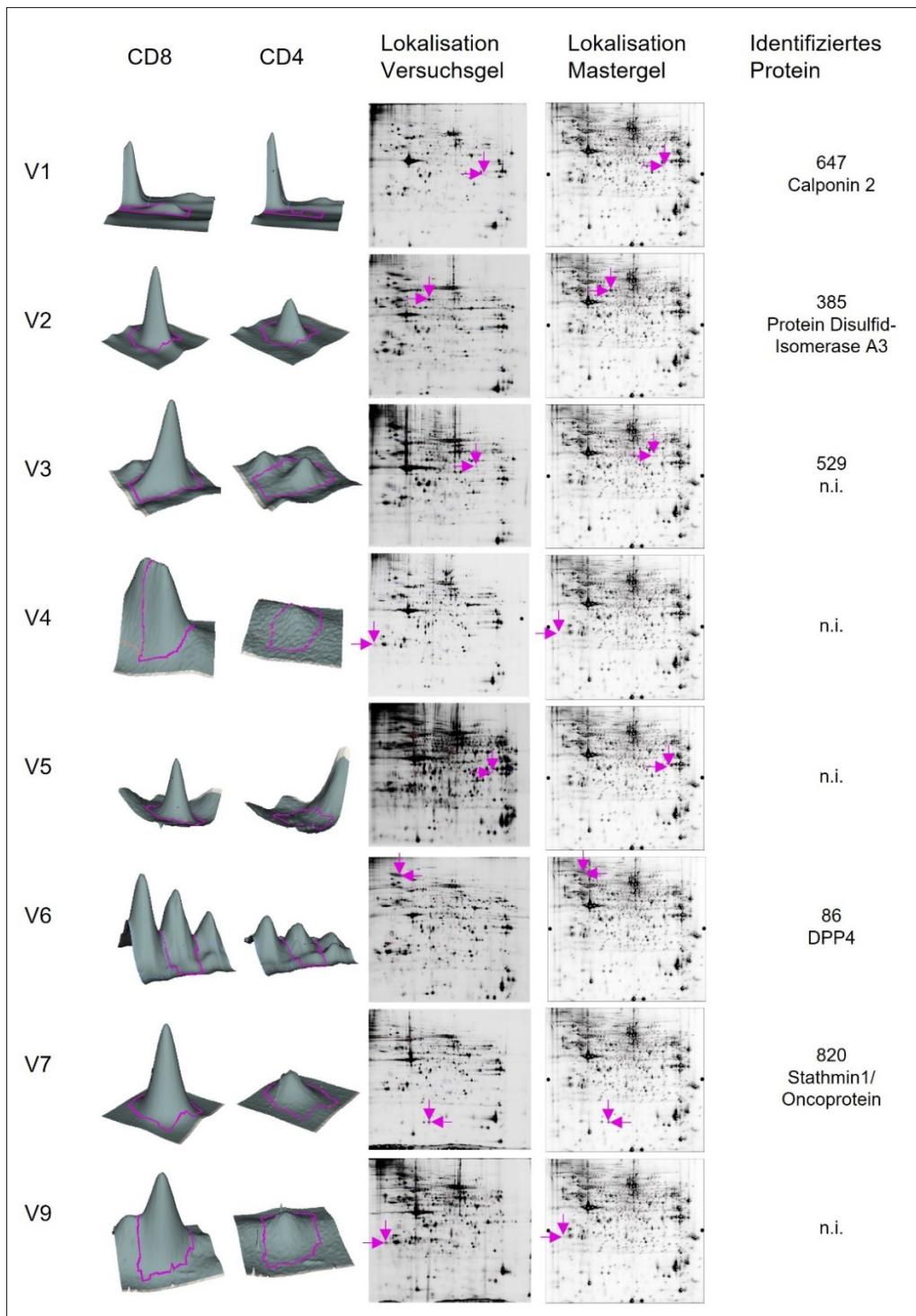


Abbildung 4.17 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis in CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD8<sup>+</sup> (links) und CD4<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-IDs und deren zugehörige Proteine; n.i. (nicht identifiziert).

In derselben Versuchsreihe konnten für sechs der acht annotierten, in F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt erscheinenden, Spots, die entsprechenden Proteine mithilfe des Mastergels identifiziert werden. Sie sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Auffällig war hierbei insbesondere

Cathepsin H, das in zwei unabhängigen Versuchen bei Grenzwerten von 1,39 (V1) und 1,71 (V7) mit SVV von 3,36 bzw. 3,68 deutlich vermehrt in den F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorkam. Cathepsin H konnte auch in den folgenden Vergleichen immer wieder deutlicher exprimiert im Kompartiment der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (s. dazu Abschnitt 4.4.3.3). Die Abbildung 4.18 zeigt die entsprechenden Proteine in 3D-Darstellung und illustriert ihre Lokalisation in dem Versuchs- sowie Mastergel.

**Tabelle 4.11 In F2-Vesikel von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

<b>Versuch</b>	<b>Proteinname</b>	<b>MA-ID</b>	<b>Spot-ID</b>	<b>SVV</b>	<b>[2x SA]</b>
<b>V1</b>	Cathepsin H	738	2159	3.36	1.38832
<b>V2</b>	--	n.i.	2456	24.24	1.8567
<b>V3</b>	Triosephosphat Isomerase (TIM)	1008	216	4.37	1.77473
<b>V4</b>	Heat shock 70kDa Protein 5	223	1105	11.98	2.38438
<b>V5</b>	Cyclophilin A	826	2371	2.87	1.80355
<b>V6</b>	--	n.i.	1347	3.19	1.60117
<b>V7</b>	Cathepsin H	738	1998	3.68	1.71215
<b>V9</b>	SHUJUN-1	795	2000	3.81	1.74655

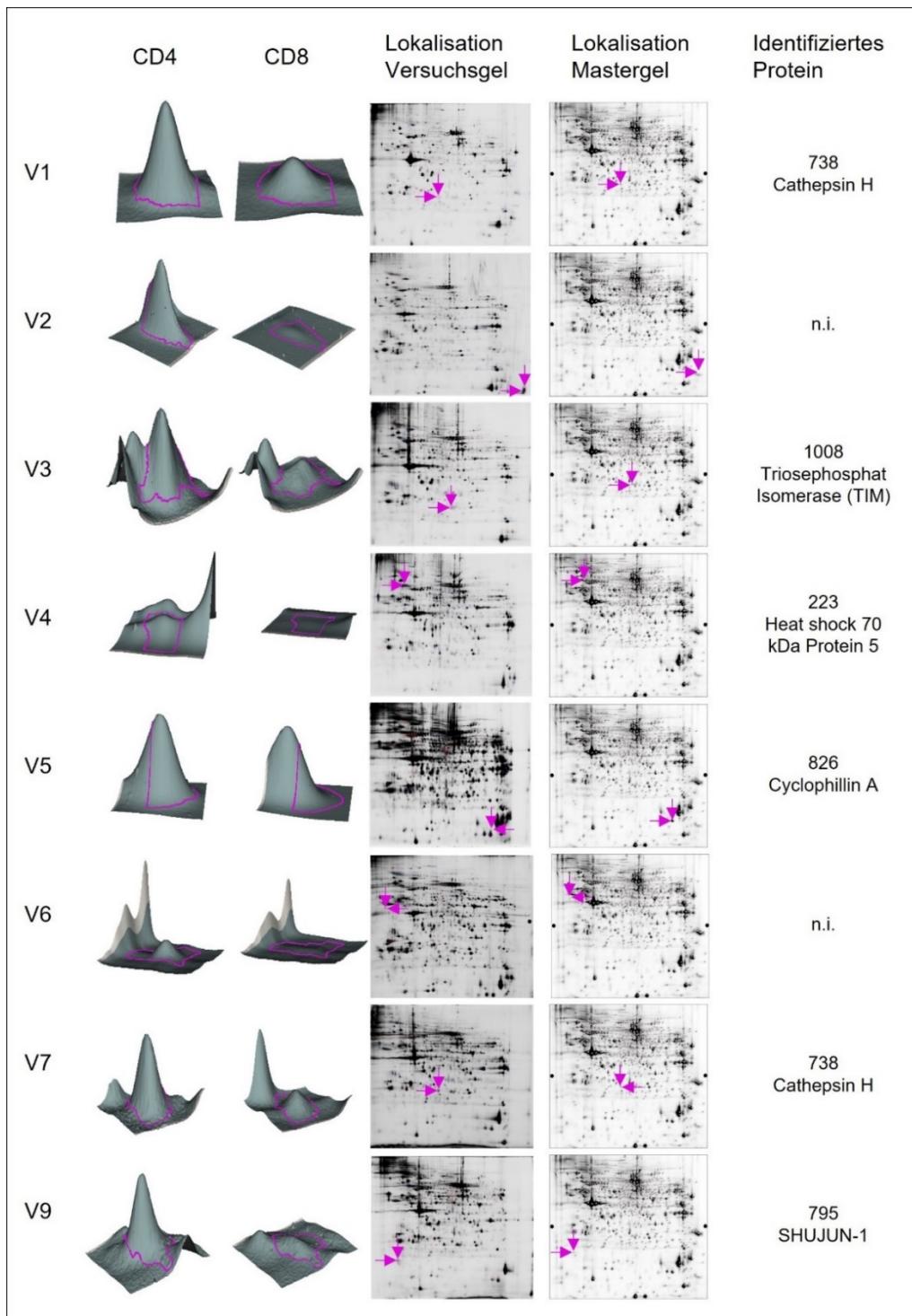


Abbildung 4.18 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD4<sup>+</sup> (links) und CD8<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchsgel sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-IDs und deren zugehörige Proteine; n.i. (nicht identifiziert)

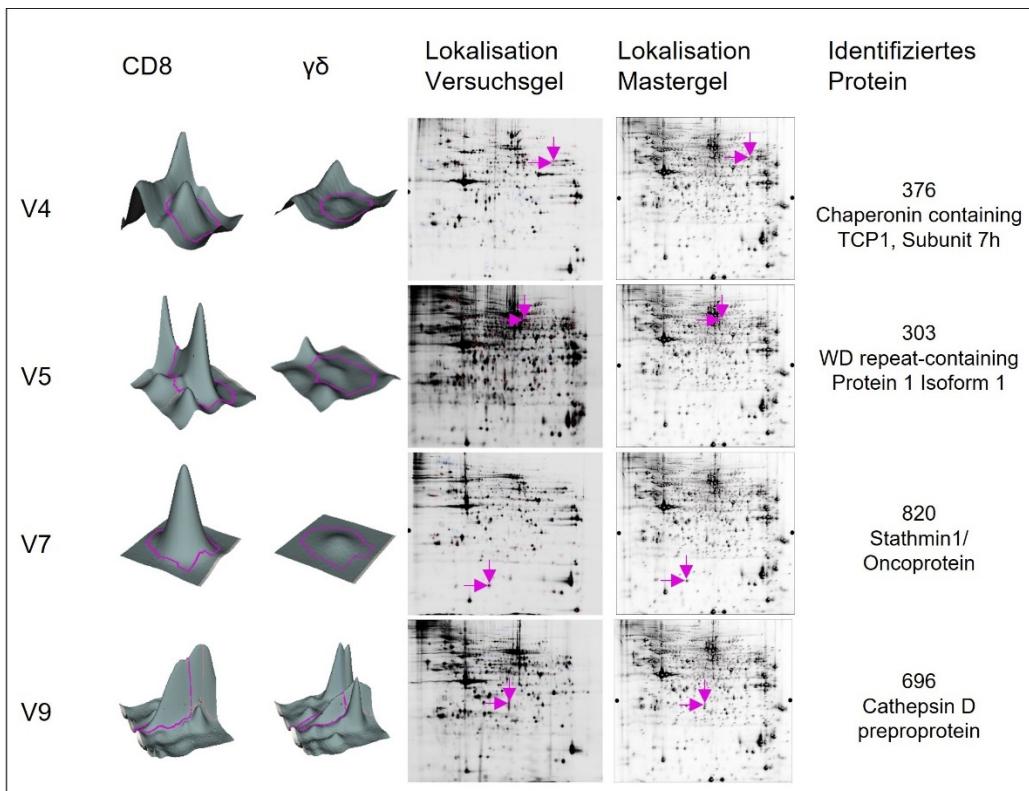
### Vergleich CD8<sup>+</sup> T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

In den vier durchgeführten Vergleichen der F2-Vesikel von CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen konnten vier in CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich abundantere Proteinspots mithilfe des Mastergels identifiziert

werden. Die Tabelle 4.12 führt sie mit entsprechender Spot-ID und Master-ID unter Angabe ihrer SVV auf. Die Abbildung 4.19 zeigt die Spots aus Tabelle 4.12 in ihrer 3D-Darstellung sowie deren Lokalisation in den Versuchsgelen und im Mastergel. Insbesondere Stathmin 1/Oncoprotein (Spot-ID 2270) zeigte sich mit einem SVV von 9,29 bei einem Grenzwert von 2.07 deutlich verstärkt in CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen und war auch im Vergleich mit CD4<sup>+</sup> (s. Tabelle 4.10; SVV 3.01) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich vermehrt. Da bereits in früheren Analysen der Arbeitsgruppe eine unterschiedliche Abundanz zwischen den untersuchten T-Zellen aufgefallen war, wurde Stathmin 1 im Abschnitt 4.4.3.3 biologisch relevanter Proteine für weitere Analysen ausgewählt.

**Tabelle 4.12 In F2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich zu  $\gamma\delta$  T-Zellen und ihre entsprechenden Proteine.** Proteinnr. aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnr. aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	Chaperonin containing TCP1, subunit 7h	376	1354	4.65	2.63108
V5	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	303	1213	9.91	2.41153
V7	Stathmin 1/Oncoprotein	820	2270	9.29	2.07105
V9	Cathepsin D preproprotein	696	1777	2.75	1.75495

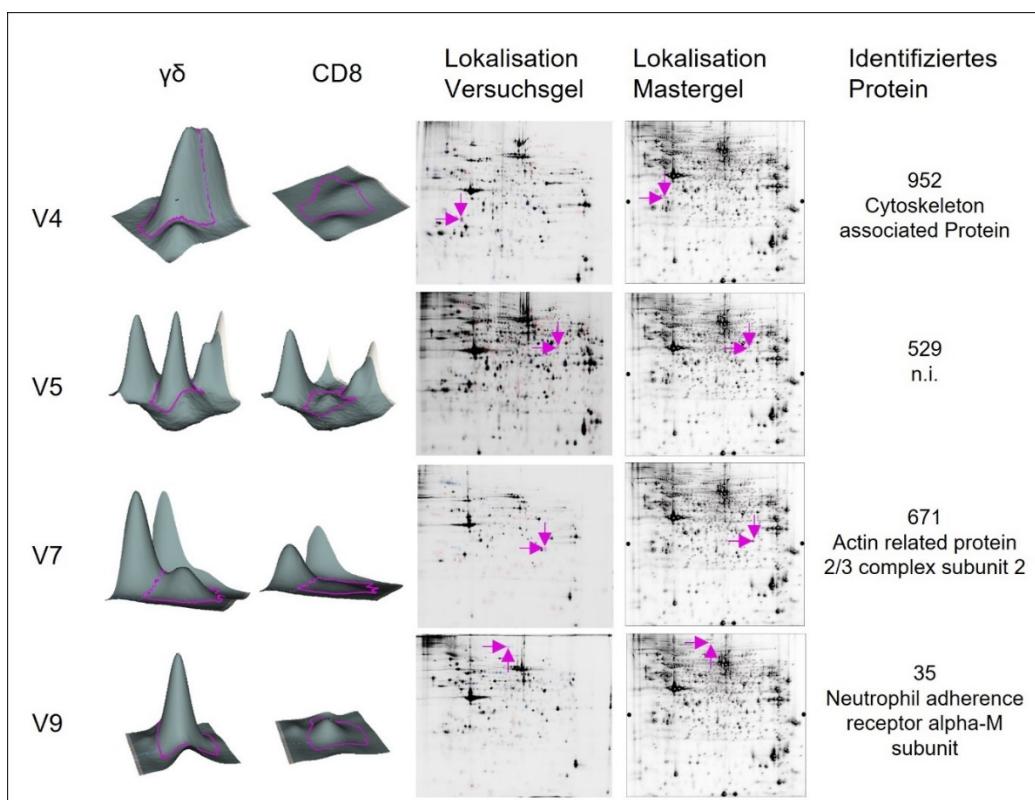


**Abbildung 4.19 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD8<sup>+</sup> (links) und  $\gamma\delta$  (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

Die maximal verstärkten Spots der F2-Vesikel von  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt die Tabelle 4.13. Sie stellt die durch das DIA-Programm vergebenen Spot-IDs und deren SVV sowie, wo dies möglich war, die Master-ID dar. Es konnte einem Spot kein Protein zugeordnet werden, da es sich bereits in dem Mastergel um ein nicht benanntes Protein handelte. Bei den identifizierten Proteinspots handelte es sich vornehmlich um Proteine mit Assoziation zum Zytoskelett. Die einzelnen Spots in ihrer 3D-Darstellung sowie deren Lokalisation in den Versuchsgelen und dem Mastergel sind in der Abbildung 4.20 gezeigt.

**Tabelle 4.13 In F2-Vesikeln von  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	Cytoskeleton-associated protein	952	1978	9.52	2.63108
V5	n.i.	529	1639	6.48	2.41153
V7	Actin related protein 2/3 complex sub-unit 2	671	1836	3.16	2.07105
V9	Neutrophil adherence receptor alpha-M subunit	35	1213	4.99	1.75495



**Abbildung 4.20 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für  $\gamma\delta$  (links) und CD8<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchsgel sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert)

## Vergleich CD4<sup>+</sup> T-Zellen und γδ T-Zellen

Bei dem Vergleich der F2-Vesikel von CD4<sup>+</sup> mit γδ T-Zellen stellten sich die in Tabelle 4.14 aufgeführten Proteine als maximal vermehrt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar. Zur Ansicht der einzelnen Spots sind diese als 3D-Darstellung und als Spot im Graustufenbild des Versuchsgels sowie im Mastergel dargestellt.

Tabelle 4.14 In F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit γδ T-Zellen und entsprechende Proteine. Proteinnr. aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnr. aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	Seryl-tRNA Synthetase	365	1364	7.97	3.16797
V5	WD repeat domain 1, Isoform CRA_d	300	1213	15.63	2.55743
V7	Unnamed protein Product	706	1966	5.93	2.12318
V9	TC4 Protein	736	1910	4.33	1.95086

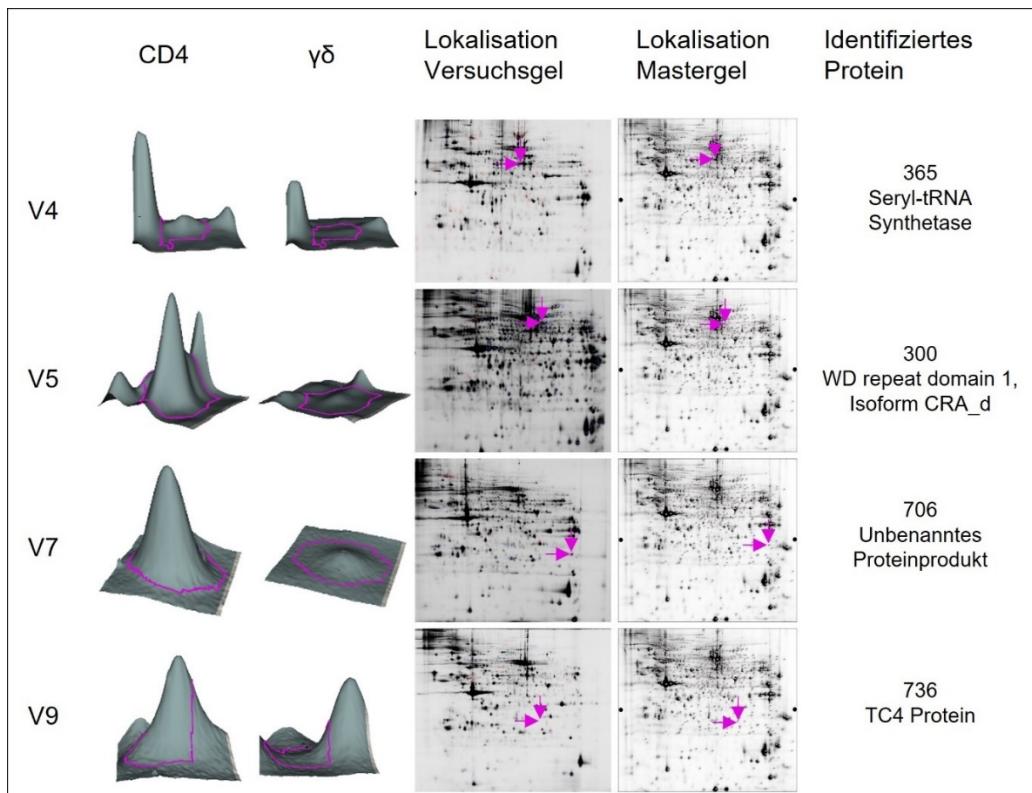


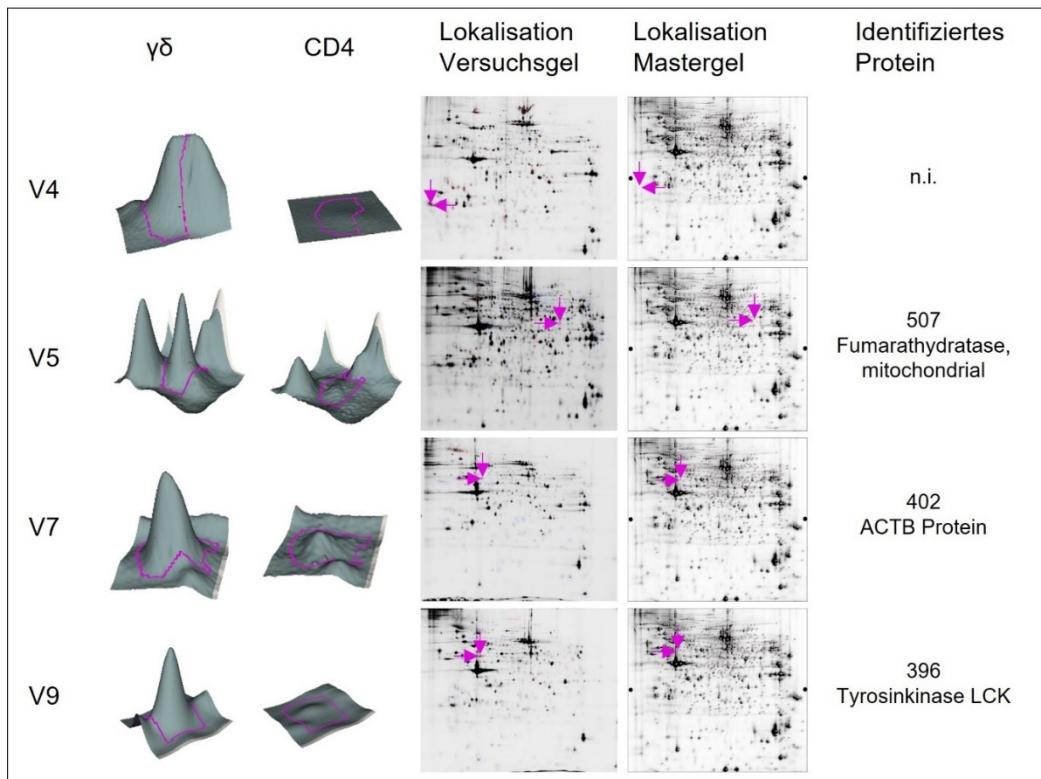
Abbildung 4.21 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber γδ T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD4<sup>+</sup> (links) und γδ (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

Im Rahmen der Analyse desselben Gelvergleiches stellten sich die in Tabelle 4.15 aufgeführten Proteine deutlich vermehrt in γδ T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar. Zur Ansicht der

Lokalisation der beschriebenen Proteinspots im Versuchsgel und im Mastergel sowie deren 3D-Darstellung siehe Abbildung 4.22.

**Tabelle 4.15 In F2-Vesikeln von  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD4 $^{+}$  T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	--	n.i.	2100	19.46	3.16797
V5	Fumarate Hydratase, mitochondrial	507	1639	7.66	2.55743
V7	ACTB-Protein	402	1314	3.65	2.12318
V9	Tyrosine kinase LCK	396	1401	7.07	1.95086



**Abbildung 4.22 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 2 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber CD4 $^{+}$  T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für  $\gamma\delta$  (links) und CD4 $^{+}$  (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

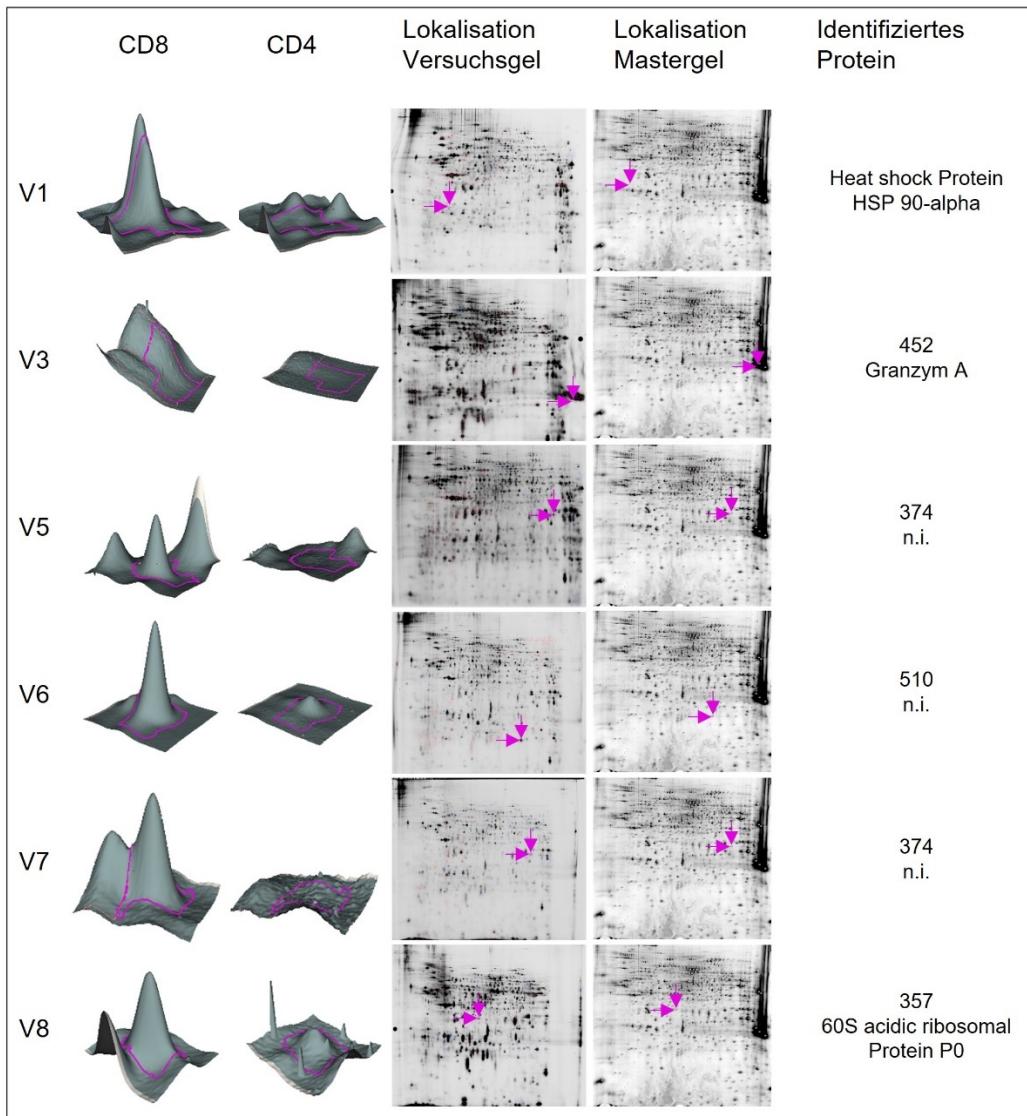
#### 4.4.3.2 Maximal unterschiedlich abundante Proteine in den F6-Granula

##### Vergleich CD8 $^{+}$ und CD4 $^{+}$ T-Zellen

Der Vergleich der F6-Granula von CD8 $^{+}$  und CD4 $^{+}$  T-Zellen ergab bei sechs durchgeföhrten Versuchen jeweils sechs maximal unterschiedlich stark erscheinende Spots aus CD8 $^{+}$  und aus CD4 $^{+}$  T-Zellen, von denen insgesamt fünf einem Protein zugeordnet werden konnten (s. Tabelle 4.16 & Tabelle 4.17.)

**Tabelle 4.16 In F6-Granula von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V1	Heat shock Protein (HSP) 90-alpha	64	1032	9.09	1.7849
V3	Granzym A	452	2046	10.54	1.91524
V5	n.i.	374	1786	9.65	2.70381
V6	n.i.	510	934	12.10	2.11262
V7	n.i.	374	1845	7.95	2.4192
V8	60S acidic ribosomal Protein P0	357	2214	44.77	2.43989



**Abbildung 4.23 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD8<sup>+</sup> (links) und CD4<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

Alle mit dem DIA-Programm annotierten, in CD8<sup>+</sup> T-Zellen maximal verstärkten Spots sind bezüglich ihrer Lokalisation im Versuchs- und im Mastergel sowie in ihrer 3D-Ansicht in Abbildung 4.23 dargestellt. Für die F6-Granula der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab sich hierbei eine deutlich

vermehrte Expression für die zytotoxische Protease Granzym A (Spot-ID 2046, MA-ID 452), welche bei einem Grenzwert von 1.9 und einem SVV von 10,54 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen als deutlich abunbanter identifiziert wurde. Granzym A wurde als mit dem F6-Kompartiment assoziiertes Protein im Rahmen der Analyse biologisch relevanter Spots im Abschnitt 5.4.4 hinsichtlich seiner Abundanz in den anderen Zellpopulationen weiter untersucht.

Für die F6-Granula der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich für das Heat shock 70 kDa Protein 5 (HSP 70; Spot-ID 2045, MA-ID 90) ein SVV von 4,1 [1,8]. Damit war es eines von sechs in F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen maximal abundanten Proteinen im Vergleich mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen (s. V1 in Tabelle 4.17). Auch in den F2-Vesikeln der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (s. Tabelle 4.11, V4, Spot-ID 1105, SVV 11,98 [2.38]) war dieses Protein bereits vermehrt vorhanden. Die anderen nicht identifizierbaren Spots sind neben den benannten Proteinen in Abbildung 4.24 in Bezug auf ihre Position im Versuchs- und Mastergel sowie als 3D-Darstellung gezeigt.

**Tabelle 4.17 In F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnr. aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnr. aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V1	Heat shock 70kDa Protein 5	90	2045	4.10	1.7849
V3	n.i.	510	2157	3.31	1.91524
V5	--	n.i.	1282	5.49	2.70381
V6	n.i.	55	2232	4.07	2.11262
V7	NDUFV2 Protein	484	2096	4.72	2.4192
V8	n.i.	473	1858	10.22	2.43989

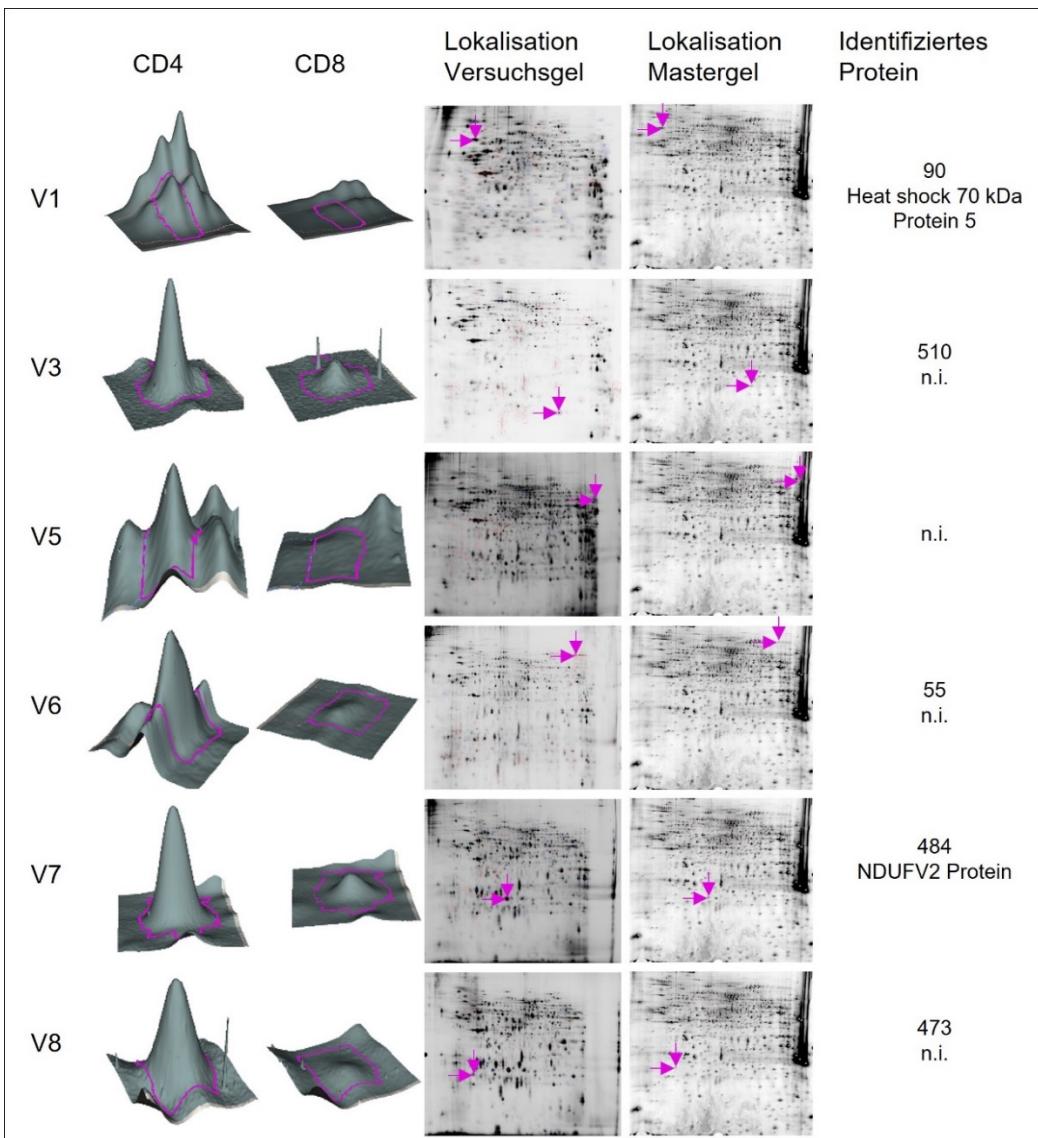


Abbildung 4.24 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD4<sup>+</sup> (links) und CD8<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

### Vergleich CD8<sup>+</sup> T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

Im Vergleich zwischen CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen war aus vier durchgeführten Versuchen nur der Spot-ID 1112 mittels Mastergel das Protein  $\beta$ -Galactosidase 1 (MA-ID142) zuzuordnen (s. Tabelle 4.18.).  $\beta$ -Galactosidase 1 war mit einem SVV von 6,12 bei einem Grenzwert von 2,6 deutlich abakterieller in CD8<sup>+</sup> T-Zellen verglichen mit  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die entsprechenden Protein-spots mit ihrer 3D-Darstellung sowie Lokalisation in Versuchs- und Mastergel sind in der Abbildung 4.25 dargestellt. Bei den anderen drei nicht identifizierbaren Spots handelte es sich um denselben Spot MA-ID 374, der im Mastergel zwar vorgekommen, das zugrundeliegende Protein aber nicht identifiziert worden war, weshalb eine Zuordnung nicht erfolgen konnte.

Tabelle 4.18 In F6-Granula von CD8<sup>+</sup> gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkte Spots und entsprechende Proteine. Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	n.i.	374	1754	7.45	2.14301
V5	n.i.	374	1786	11.50	3.37049
V7	n.i.	374	1845	5.53	2.06304
V9	$\beta$ -Galactosidase 1	142	1112	6.12	2.59532

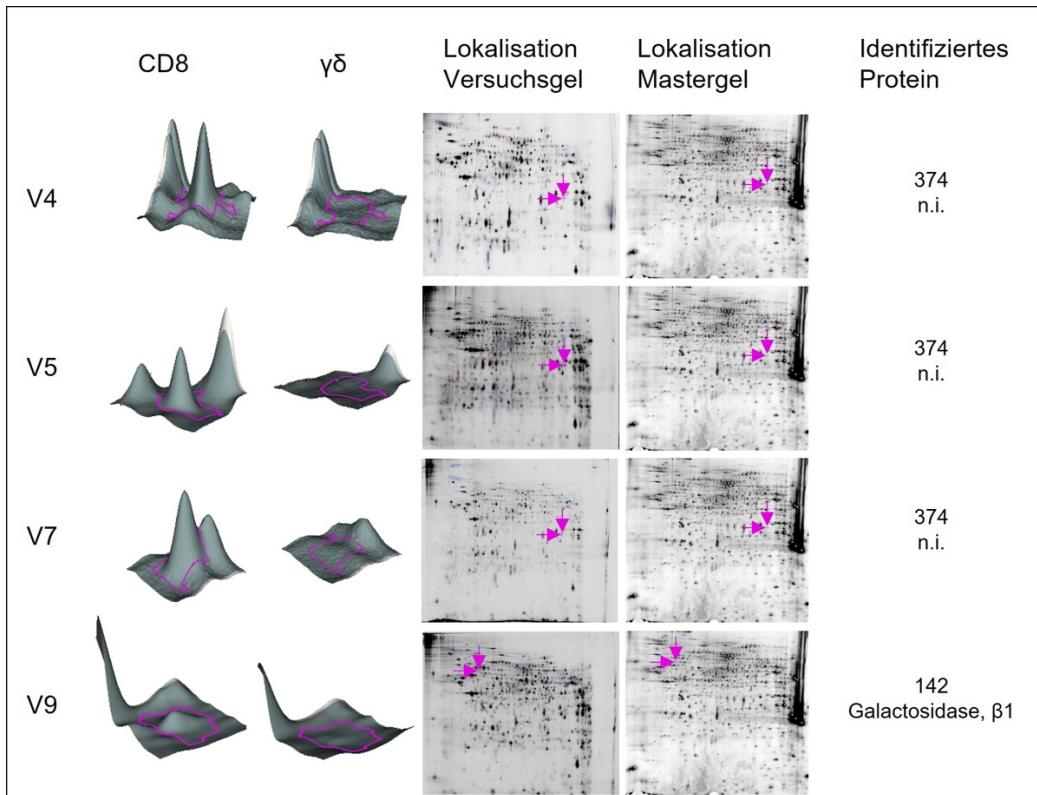
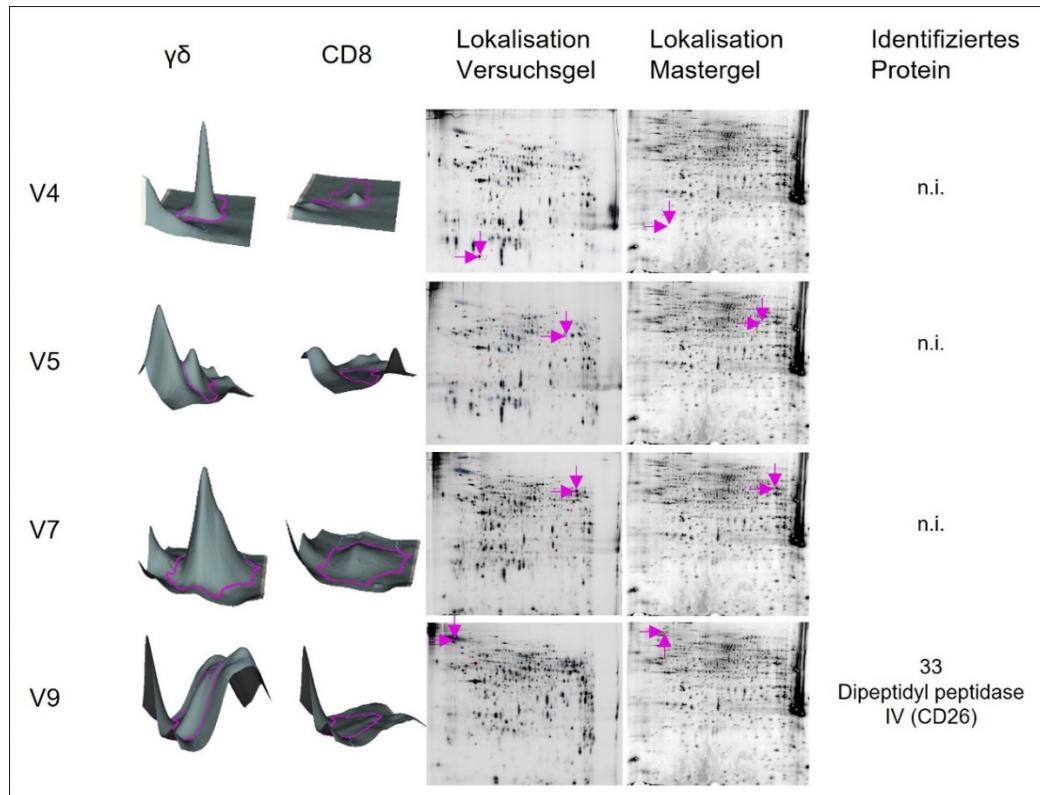


Abbildung 4.25 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD8<sup>+</sup> (links) und  $\gamma\delta$  (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

Die F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten im Spot Nr. 811 (MA-ID 33) das Enzym DPP4/CD26, welches mit einem SVV von 8.01 [2,6] deutlich abundant in  $\gamma\delta$  T-Zellen war (s. Tabelle 4.19). Diese Peptidase, welche in Vorarbeiten bereits untersucht wurde (s. Einleitung, Abschnitt 1.3.3.5), wurde in den unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen hinsichtlich ihrer Abundanz in Abschnitt 4.4.3.3 über biologisch relevante Proteine weiter analysiert. Für die anderen maximal in den F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten Proteinspots konnten im Mastergel keine Entsprechungen sicher identifiziert werden. Sie sind inklusive des Spots für DPP4/CD26 in Abbildung 4.26 in Form von Pfeilmarkierungen im Master- und Versuchsgel sowie in ihrer 3D-Darstellung gezeigt.

**Tabelle 4.19 In F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD8 $^{+}$  T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V4	--	n.i.	2231	6.68	2.14301
V5	--	n.i.	1449	34.82	3.37049
V7	--	n.i.	1231	6.80	2.06304
V9	DPP4/CD26	33	811	8.01	2.59532



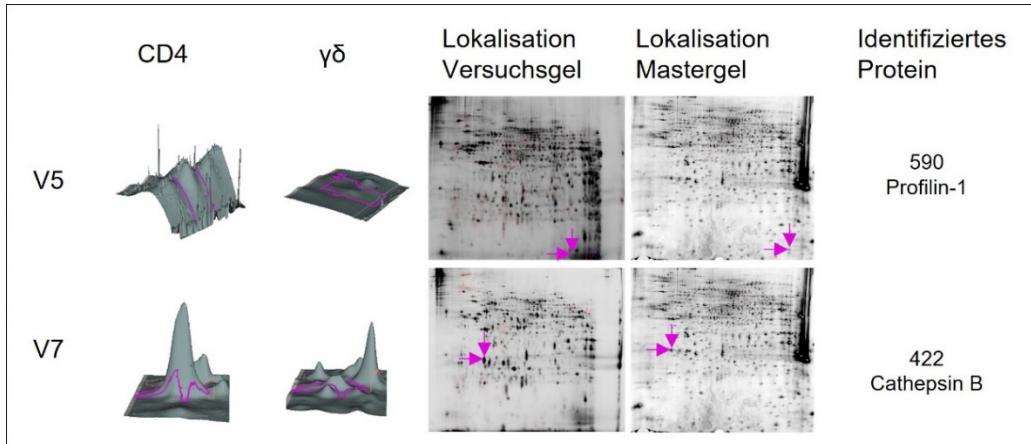
**Abbildung 4.26 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber CD8 $^{+}$  T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für  $\gamma\delta$  (links) und CD8 $^{+}$  (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

### Vergleich CD4 $^{+}$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

Bei den in CD4 $^{+}$  T-Zellen stärker erscheinenden Spots aus den beiden Vergleichsgelen der F6-Granula von CD4 $^{+}$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen handelte es sich um Profilin-1 (MA-ID 590) und Cathepsin B (MA-ID 422). Sie sind in Tabelle 4.20 mit ihren Spot-IDs sowie SVV und dem entsprechenden Grenzwert für differenzielle Spots aufgeführt. Die Protease Cathepsin B (Spot-ID 2000, SVV 4,23 [2,8]) zeigte sich, wie auch bereits das verwandte Cathepsin H in F2-Vesikeln (s. Tabelle 4.11, V1; Spot-ID 2159, SVV 3,36 [1,39]), in den F6-Granula von CD4 $^{+}$  T-Zellen deutlich stärker abundant als in  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Abbildung. 4.27 zeigt die entsprechenden Spots als 3D-Darstellung und deren Position in Versuchs- und Mastergel.

**Tabelle 4.20 In F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit  $\gamma\delta$  T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V5	Profilin-1	590	2048	6.41	3.41186
V7	Cathepsin B	422	2000	4.23	2.83078



**Abbildung 4.27 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von Fraktion 6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen.** Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für CD4<sup>+</sup> (links) und  $\gamma\delta$  (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchs- sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

Die im Rahmen des Vergleichs von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen maximal in  $\gamma\delta$  T-Zellen vorhandenen Proteinspots konnten beide nicht identifiziert werden. Die Referenzen der Spots sind in Tabelle 4.21 aufgeführt. Die 3D-Darstellung und die Positionen der Spots sowohl im Versuchsgel als auch im Mastergel lassen sich in der Abbildung 4.28 nachvollziehen.

**Tabelle 4.21 In F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkte Spots im Vergleich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen und entsprechende Proteine.** Proteinnummer aus dem Mastergel (MA-ID); Spotnummer aus den Versuchsgelen (Spot-ID); Spot-Volumen-Verhältnis (SVV), 2x SA Grenzwert ([2x SA]).

Versuch	Proteinname	MA-ID	Spot-ID	SVV	[2x SA]
V5	--	n.i.	2203	66.38	3.41186
V7	--	n.i.	2271	17.70	2.83078

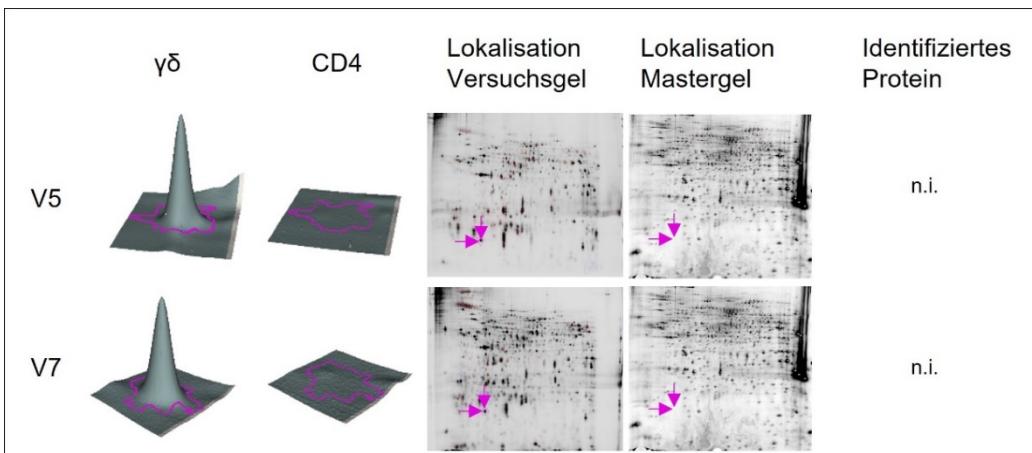


Abbildung 4.28 Proteinspots aus 2D-DIGE-Analysen von F6 mit maximal erhöhtem Spot-Volumen-Verhältnis für  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt sind die 3D-Darstellungen der gleichen Spots für  $\gamma\delta$  (links) und CD4<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen und deren Lokalisation im Versuchsgel sowie im Mastergel (Pfeile). Bei den angegebenen Nummern handelt es sich um die MA-ID und deren zugehöriges Protein; n.i. (nicht identifiziert).

#### 4.4.3.3 Abundanz biologisch relevanter Proteine innerhalb der beiden Effektorkompartimente

Die erhobenen Daten dienten neben dem morphologischen und dem auf der DIA-Analyse basierenden Vergleich auch der Überprüfung und Ergänzung der Erkenntnisse aus Vorarbeiten. Hierfür wurden Proteine, die in Vorarbeiten in den beiden Effektorkompartimenten und T-Zellsubpopulationen eine unterschiedliche Expression zeigten oder aber auffällig homogen exprimiert waren als „biologisch relevant“ bezeichnet. Diese ausgewählten Proteine sind in Tabelle 4.22 mit kurzer Erklärung ihrer Funktion aufgeführt.

Tabelle 4.22 Liste biologisch relevanter Proteine und deren Funktion. Sortiert nach Fraktionen, in denen sie auf Basis von Vorarbeiten am stärksten abundant waren.

Protein	Funktion
<b>Fraktion 2</b>	
Cathepsin D Prepro	Proteolytisches Enzym, Aspartatpeptidase; kommt in Lysosomen vor.
Stathmin 1/Oncoprotein	Zytoplasmatisches Phosphoprotein mit Mikrotubuli-destabilisierender Eigenschaft.
Cathepsin H	Lysosomale Aminopeptidase, dient der Protein degradation. Zudem wurde eine proGranzym B-Convertase-Aktivität beschrieben (D'Angelo et al. 2010).
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment Protein $\alpha$ ( $\alpha$ -SNAP)	Vesikeltransport im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Netzwerk; an der Freisetzung sekretorischer Lysosomen beteiligt; bildet Teil des SNARE-Komplexes.
ACTB ( $\beta$ -Aktin)	Essentielle Komponenten des Zytoskeletts; an Zellmigrationsprozessen beteiligt.
Annexin A1	Inhibitor der Phospholipase A2 und der Synthese von Eicosanoiden, es kann kalziumabhängig an Phospholipidmembranen binden.

Protein	Funktion
<b>Fraktion 2</b>	
Gelsolin-like capping Protein	Dient der Regulierung der Dynamik von Aktinfilamenten; $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung.
IL-16	Chemokin, Wachstums- und Differenzierungsfaktor im hämatopoietischen System und bei Immunantworten; der Ligand ist CD4.
Extended Synaptotagmin 1 (E-Syt1)	Protein des Endoplasmatischen Retikulums (Saheki und Camilli 2017); bewirkt kalziumabhängige Annäherung von ER-Membran und Plasmamembran.
<b>Fraktion 6</b>	
DPP7	Lysosomales Protein mit degradativer Funktion; intrazellulär lokalisiert.
Cathepsin W	Cystein-Protease, hauptsächlich in Immunzellen exprimiert; Komponente des ER, Cathepsin W wird eine regulierende Funktion der zytolytischen Aktivität von T-Zellen zugesprochen.
Granzym A	s. Einleitung
Granzym B	s. Einleitung
Perforin-1	s. Einleitung
Myosin 9 (Myosin II)	Motorprotein am Aktin, an der Membranfusion von lytischen Granula beteiligt.
<b>Fraktion 2 &amp; 6</b>	
DPP4	Oberflächenantigen von T-Zellen, das auch proteolytische Eigenschaften aufweist.
Moesin	Verbindet reversibel das kortikale Aktin-Zytoskelett mit der Plasmamembran, beeinflusst damit die Form der Zelloberfläche.
Cathepsin B	Lysosomale Cystein-Protease; Degradative Funktion, zelluläre Homöostase, zusätzlich involviert in tumorigene Prozesse, Inflammation und neurodegenerative Erkrankungen (Mijanović et al. 2019).
Cathepsin S	lysosomale Cystein-Protease, vornehmlich in Zellen des Immunsystems exprimiert, spielt eine Rolle im Rahmen von Zytotoxizität.

Zur Beurteilung der Expression dieser biologisch relevanten Proteine wurden diejenigen Versuchsgele verwendet, die Proben aller drei Zelltypen enthielten. Hierdurch konnte ein direkter Vergleich aller drei T-Zellpopulationen gewährleistet werden. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurden aus dem Gesamtvergleich von  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD4}^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen die Einzelvergleiche zwischen  $\text{CD8}^+$  und  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$  und  $\gamma\delta$  sowie zwischen  $\text{CD4}^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen in Teilabschnitte untergliedert. Die Daten dieser Analysen sind daher in drei separaten Tabellen als Teilvergleiche dargestellt. Bei den analysierten Spots handelt es sich jedoch um dieselben Spots, das heißt, die Spot-IDs der jeweiligen Master-IDs stimmen tabellenübergreifend miteinander überein.

Um die Abundanz der ausgewählten Proteine von Fraktion 2 und 6 zwischen den T-Zellen zu vergleichen, wurden zunächst die entsprechenden Spots aus den Versuchsgelen mit denen im Mastergel visuell korreliert und dann mittels Mastertabelle die zugehörigen Proteine identifiziert. Die Spot-Volumenverhältnisse wurden jeweils notiert. Im Folgenden sind einige der ausgewählten Proteine in ihrem Expressionsmuster dargestellt, wie es sich innerhalb der hier erhobenen Daten zeigte.

#### 4.4.3.3.1 F2-Vesikel

Die lysosomale Cystein-Protease **Cathepsin H** (MA-ID 738) war in CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt (s. Tabelle 4.23). In allen drei ausgewerteten Versuchen zeigten sich SVV jenseits des Grenzwertes von 2x SA (Spot-ID 1918 SV: 2,35 [1,75]; Spot-ID 1998 SV: 3,68 [1,71]; Spot-ID 2123 SV: 3,8 [2,38]). Auch im Vergleich mit  $\gamma\delta$  T-Zellen war Cathepsin H mit der Spot-ID 1998 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt abundant (SVV: 4,61 [2,21]), während dieser Unterschied zwischen CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen weniger ausgeprägt war. Im Spot 2123 von V4 zeigte sich einmalig eine erhöhte Expression jenseits des Grenzwertes von 2x SA [2.63] bei  $\gamma\delta$  T-Zellen (SVV: 3.06). Das SVV von **Cathepsin S** (MA-ID 749) lag insbesondere im Spot 2059 mit 2,63 [2,1] für CD8<sup>+</sup> und 5,66 [2,21] für CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich außerhalb des Grenzwertes von 2x SA und zeigte somit eine stark erhöhte Expression in  $\alpha\beta$  T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Tabelle 4.23 **Biologisch relevante Proteine aus F2-Vesikeln (Teil 1: CD8 vs.CD4)**. Mastergel-ID (**MA-ID**); Spotnummer im entsprechenden Versuchsgel (**Spot-ID V9, V7, V4**); Grenzwerte von 2x SA ([ ]); Spot-Volumenverhältnisse außerhalb der 2x SA ( $>\text{CD8}$ )/( $>\text{CD4}$ )/( $>\gamma\delta$ ).

Vergleich CD8 – CD4							
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.74655]	V7 2x SA [1.71215]	V4 2x SA [2.38438]
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>696</b>	1777	--	--	-1.80	--	--
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>709</b>	1799	--	--	-1.57	--	--
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>704</b>	1853	1924	2086	<b>-1.82 (&gt;CD8)</b>	1.09	2.14
<b>Stathmin 1/Onco-protein</b>	<b>820</b>	2094	2270	2434	<b>-2.28 (&gt;CD8)</b>	<b>-3.01 (&gt;CD8)</b>	<b>-3.35 (&gt;CD8)</b>
<b>Cathepsin S</b>	<b>749</b>	1948	2059	2208	1.02	<b>2.16 (&gt;CD4)</b>	2.17
<b>Cathepsin H</b>	<b>738</b>	1918	1998	2123	<b>2.35 (&gt;CD4)</b>	<b>3.68 (&gt;CD4)</b>	<b>3.87 (&gt;CD4)</b>
<b>Cathepsin B</b>	<b>691</b>	1837	1899	--	-1.11	1.09	--
<b>Cathepsin B</b>	<b>682</b>	--	--	2039	--	--	-1.94
<b>Alpha SNAP</b>	<b>652</b>	1764	1799	1935	-1.43	-1.40	-1.01
<b>Annexin A1</b>	<b>615</b>	1675	--	1799	1.34	--	1.15

Tabelle 4.23 ff.

Vergleich CD8 – CD4							
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.74655]	V7 2x SA [1.71215]	V4 2x SA [2.38438]
Annexin A1	604	1666	1676	1774	-1.42	-1.03	-1.22
Gelsolin-like cap-ping Protein	586	1639	--	--	1.02	--	--
Gelsolin-like cap-ping Protein	572	1640	1598	1713	-1.48	<b>-2.32 (&gt;CD8)</b>	-1.56
Serpin	548	1613	1580	1685	<b>1.99 (&gt;CD4)</b>	1.25	1.30
Moesin	251	1165	1021	1154	1.02	-1.15	-1.37
Moesin	250	1178	1030	1160	1.09	-1.00	-1.04
Moesin	249	1134	1022	--	1.09	1.46	--
Moesin	248	1140	983	1142	1.04	1.66	1.06
Moesin	240	1115	980	--	1.09	1.03	--
IL-16	218	1091	926	1101	-1.04	1.41	1.19
IL-16	217	1099	935	1100	-1.01	1.39	1.17
IL-16	210	1100	927	1096	1.16	1.34	1.48
IL-16	209	1066	928	1076	1.30	1.33	1.44
E-Syt1	156	978	824	981	1.19	1.14	-1.23
E-Syt1	155	983	820	979	1.27	1.23	1.02
DPP4	77	897	739	841	1.27	-1,06	1.08
DPP4	67	890	736	856	1.33	-1.02	1.57
DPP4	81	863	742	876	1.39	-1.07	1.33
DPP4	83	--	--	877	--	--	1.16
ACTB	652	1593	--		-1.23	--	
ACTB	500	--	--	1585	--	--	1.31
ACTB	516	1590	1554	--	-1.07	1.02	--
ACTB	518	--	15555	--	--	1.16	--
ACTB	485	1507	1493	1586	-1.47	-1.08	-1.16
ACTB	392	1399	1416		-1.23	-1.15	--
ACTB	1040	1477	1433		-1.51	-1.07	--
ACTB	27	--	646		--	1.25	1.43
ACTB	18	--	618		--	1.15	-

**Stathmin 1 (Oncoprotein18) (MA-ID 820)** stellte sich in allen drei unabhängigen Versuchen in CD8<sup>+</sup> abunbanter verglichen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar (s. Tabelle 4.23; Spot-ID 2094, SVV: 2,28 [1,75]; Spot-ID 2270, SVV: 3,01 [1,71]; Spot-ID 2434, SVV: 3,35 [2,38]). Auch im Vergleich mit

$\gamma\delta$  T-Zellen war eine gesteigerte Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem Versuch deutlich (s. Tabelle 4.4; Spot-ID 2270, SVV: 9,29 [2,07]), welcher gleichzeitig in diesem Gesamtvergleich auch der maximal verstärkt erscheinende Spot war (s. Tabelle 4.12). **Annexin A1** (Lipocortin 1) (MA-ID 615/604) war in deutlich ausgeprägterem Umfang in den  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen vorhanden. So lag beispielsweise das SVV im Spot 1774 zwischen CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen bei 8,5 [2,6] und zwischen  $\gamma\delta$  und CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei 12,81 [3,17].

Tabelle 4.24 **Biologisch relevante Proteine aus F2-Vesikel (Teil 2: CD8 vs.  $\Gamma\delta$ )** Mastergel-ID (MA-ID); Spotnummer im entsprechenden Versuchsgel (Spot-ID V9, V7, V4); Grenzwerte von 2x SA ([ ]); Spot-Volumenverhältnisse außerhalb der 2x SA ( $>\text{CD8}$ )/( $>\text{CD4}$ )/( $>\gamma\delta$ ).

Vergleich CD8 – $\gamma\delta$							
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.75495]	V7 2x SA [2.07105]	V4 2x SA [2.63108]
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>696</b>	1777	--	--	<b>-2.75 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	--	--
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>709</b>	1799	--	--	<b>-1.92 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	--	--
<b>Cathepsin D Prepro</b>	<b>704</b>	1853	1924	2086	-1.68	-2.00	1.62
<b>Stathmin 1/Oncoprotein</b>	<b>820</b>	2094	2270	2434	-1.58	<b>-9.29 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	1.54
<b>Cathepsin S</b>	<b>749</b>	1948	2059	2208	-1.40	<b>-2.63 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	1.35
<b>Cathepsin H</b>	<b>738</b>	1918	1998	2123	1.27	-1.25	<b>3.06 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>
<b>Cathepsin B</b>	<b>691</b>	1837	1899	--	-1.17	1.35	--
<b>Cathepsin B</b>	<b>682</b>	--	--	2039	--	--	-1.10
<b>Alpha SNAP</b>	<b>652</b>	1764	1799	1935	-1.13	1.30	<b>2.30 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>
<b>Annexin A1</b>	<b>615</b>	1675	--	1799	<b>2.37 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>	--	<b>7.46 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>
<b>Annexin A1</b>	<b>604</b>	1666	1676	1774	<b>2.57 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>	1.86	<b>8.50 (<math>&gt;\gamma\delta</math>)</b>
<b>Gelsolin-like capping Protein</b>	<b>586</b>	1639	--	--	1.05	--	--
<b>Gelsolin-like capping Protein</b>	<b>572</b>	1640	1598	1713	<b>-2.68 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	<b>-2.76 (<math>&gt;\text{CD8}</math>)</b>	-1.49
<b>Serpin</b>	<b>548</b>	1613	1580	1685	1.12	2.02	1.47
<b>Moesin</b>	<b>251</b>	1165	1021	1154	1.20	1.93	2.12
<b>Moesin</b>	<b>250</b>	1178	1030	1160	1.44	1.39	2.51
<b>Moesin</b>	<b>249</b>	1134	1022	--	1.21	-1.37	--
<b>Moesin</b>	<b>248</b>	1140	983	1142	1.23	-1.27	2.22
<b>Moesin</b>	<b>240</b>	1115	980	--	1.12	1.10	--
<b>IL-16</b>	<b>218</b>	1091	926	1101	1.12	-1.21	1.25
<b>IL-16</b>	<b>217</b>	1099	935	1100	1.09	-1.23	1.05
<b>IL-16</b>	<b>210</b>	1100	927	1096	1.22	-1.32	1.91

Tabelle 4.25 ff.

Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.75495]	V7	V4
						2x SA [2.07105]	2x SA [2.63108]
IL-16	209	1066	928	1076	-1.08	-1.26	2.01
E-Syt1	156	978	824	981	-1.00	1.17	2.05
E-Syt1	155	983	820	979	1.05	1.21	2.05
DPP4	77	897	739	841	1.26	<b>2.92 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	-1.48
DPP4	67	890	736	856	1.37	<b>2.85 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	1.10
DPP4	81	863	742	876	1.04	<b>2.90 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	-1.23
DPP4	83	--	--	877	--	--	-1.28
ACTB	652	1593	--		-1.17	--	
ACTB	500	--	--	1585	--	--	-1.72
ACTB	516	1590	1554	--	-1.30	1.17	--
ACTB	518	--	15555	--	--	1.16	--
ACTB	485	1507	1493	1586	-1.23	1.10	-1.76
ACTB	392	1399	1416		<b>2.70 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	1.07	--
ACTB	1040	1477	1433		-1.09	1.06	--
ACTB	27	--	646		--	1.05	1.62
ACTB	18	--	618		--	1.03	--

**CD26/DPP4** (MA-IDs 67,77,81) war in den Spot-Ids 739, 736, 742 mit SVV von 2,85 und 2,90 sowie 2,92 [alle 2,07] für den Vergleich mit CD8<sup>+</sup> (s. V7 in Tabelle 4.24) und mit SVV von 2,90 und 2,97 sowie 3,10 [alle 2,21] für den Vergleich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (s. V7 in Tabelle 4.26) überwiegend vermehrt in F2-Vesikeln von  $\gamma\delta$  T-Zellen vorhanden.

In den Scans zeigte sich für **ACTB** (MA-Ids 392, 485, 500, 516, 518, 1040) eine gleichmäßige Expression in den untersuchten Populationen. Bei einigen identifizierten Spots in V9 konnten jedoch höhere SVV in CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen verglichen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (s. Spot-ID 1399).

Tabelle 4.26 Biologisch relevante Proteine aus F2-Vesikel (Teil 3:  $\gamma\delta$  vs. CD4) Mastergel-ID (MA-ID); Spot-nummer im entsprechenden Versuchsgel (Spot-ID V9, V7, V4); Grenzwerte von 2x SA ([ ]); Spot-Volumenverhältnisse außerhalb der 2x SA ( $>\text{CD4}$ )/( $>\text{CD4}$ )/( $>\gamma\delta$ ).

Vergleich $\gamma\delta$ – CD4							
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.95086]	V7 2x SA [2.20787]	V4 2x SA [3.16797]
Cathepsin D Prepro	696	1777	--	--	1.57	--	--
Cathepsin D Prepro	709	1799	--	--	1.26	--	--
Cathepsin D Prepro	704	1853	1924	2086	-1.05	2.16	1.07
Stathmin 1/Oncoprotein	820	2094	2270	2434	-1.40 ( $>\gamma\delta$ )	3.09 ( $>\text{CD4}$ )	-6.38 ( $>\gamma\delta$ )
Cathepsin S	749	1948	2059	2208	1.47	5.66 ( $>\text{CD4}$ )	1.30
Cathepsin H	738	1918	1998	2123	1.91	4.61 ( $>\text{CD4}$ )	1.02
Cathepsin B	691	1837	1899	--	1.08	-1.24	--
Cathepsin B	682	--	--	2039	--	--	-2.18
Alpha SNAP	652	1764	1799	1935	-1.23	-1.82	-2.87
Annexin A1	615	1675	--	1799	-1.72	--	-7.99 ( $>\gamma\delta$ )
Annexin A1	604	1666	1676	1774	-3.55 ( $>\gamma\delta$ )	-1.92	-12.81 ( $>\gamma\delta$ )
Gelsolin-like capping Protein	586	1639	--	--	1.00	--	--
Gelsolin-like capping Protein	572	1640	1598	1713	1.86	1.19	-1.30
Serpin	548	1613	1580	1685	1.83	-1.62	-1.40
Moesin	251	1165	1021	1154	-1.14	-2.22 ( $>\gamma\delta$ )	-3.58 ( $>\gamma\delta$ )
Moesin	250	1178	1030	1160	-1.29	-1.40	-3.23 ( $>\gamma\delta$ )
Moesin	249	1134	1022	--	-1.08	2.01	--
Moesin	248	1140	983	1142	-1.15	2.11	-2.59
Moesin	240	1115	980	--	1.01	-1.07	--
IL-16	218	1091	926	1101	-1.13	1.72	-1.29
IL-16	217	1099	935	1100	-1.07	1.71	-1.11
IL-16	210	1100	927	1096	-1.02	1.76	-1.59
IL-16	209	1066	928	1076	1.45	1.67	-1.72
E-Syt1	156	978	824	981	1.23	-1.03	-3.11
E-Syt1	155	983	820	979	1.25	1.02	-2.46
DPP4	77	897	739	841	1.04	-2.97 ( $>\gamma\delta$ )	1.33
DPP4	67	890	736	856	-1.01	-2.90 ( $>\gamma\delta$ )	1.16
DPP4	81	863	742	876	1.38	-3.10 ( $>\gamma\delta$ )	1.33
DPP4	83	--	--	877	--	--	1.20
ACTB	652	1593	--		-1.02	--	

Tabelle 4.27 ff.

Vergleich $\gamma\delta$ – CD4							
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V9	Spot-ID V7	Spot-ID V4	V9 2x SA [1.95086]	V7 2x SA [2.20787]	V4 2x SA [3.16797]
ACTB	500	--	--	1585	--	--	1.83
ACTB	516	1590	1554	--	1.25	-1.15	--
ACTB	518	--	15555	--	--	1.00	--
ACTB	485	1507	1493	1586	-1.17	-1.18	1.23
ACTB	392	1399	1416	--	-3.22 (> $\gamma\delta$ )	-1.23	--
ACTB	1040	1477	1433	--	-1.34	-1.13	--
ACTB	27	--	646	--	--	1.19	1.87
ACTB	18	--	618	--	--	1.11	--

Für alle untersuchten T-Zellen zeigte sich eine überwiegend ähnliche Expression von **Moesin** (MA-ID 240, 248-251). Eine Ausnahme stellte der Vergleich  $\gamma\delta$  vs. CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar (s. Tabelle 4.26). Hier ergaben sich in drei von vier Spots (Spot-IDs 1154, 1160 und 1021) SVV-Werte von 3,58 und 3,23 [beide 3,17] sowie 2,22 [2,21], die somit oberhalb des Grenzwerts der 2x SA lagen. Damit zeigte sich hier Moesin verstärkt in  $\gamma\delta$  T-Zellen.

#### 4.4.3.3.2 F6-Granula

Neben F2-Vesikeln findet sich **Moesin** (MA-ID 94) auch in F6-Granula. Hier scheint es in  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu  $\alpha\beta$  T-Zellen leicht verstärkt exprimiert zu sein (s. V5, Tabelle 4.28; Spot-ID 1088, SV: 3,35 [3,37]). Allerdings wurde in keinem der ausgewerteten Versuche der Grenzwert von 2x SA überschritten.

Tabelle 4.28 Biologisch relevante Proteine aus F6-Granula (Teil 1: CD8 vs. CD4, CD8 vs.  $\gamma\delta$ ) Mastergel-ID (MA-ID); Spotnummer im entsprechenden Versuchsgel (Spot-ID V9, V7, V4); Grenzwerte von 2x SA ([ ]); Spot-Volumenverhältnisse außerhalb der 2x SA (>CD8)/(>CD4)/(> $\gamma\delta$ ).

				Vergleich CD8-CD4		Vergleich CD8- $\gamma\delta$	
Proteinname	MA-ID	Spot-ID V5	Spot-ID V7	V5 2x SA [2.70381]	V7 2x SA [2.41925]	V5 2x SA [3.36757]	V7 2x SA [2.06304]
<b>Moesin</b>	94	1088	1118	2.08	1.09	3.35	1.62
<b>Myosin 9</b>	63	931	977	-1.08	1.21	1.16	1.29
<b>Myosin 9</b>	62	--	974	--	1.11	--	-1.11
<b>Cathepsin W</b>	532	2151	2222	-1.00	2.04	-1.89	-1.01
<b>Cathepsin B</b>	422	--	2000	--	4.66 (>CD4)	--	-1.02

Tabelle 4.29 ff.

Proteinname	MA-ID	Spot-ID V5	Spot-ID V7	Vergleich CD8-CD4		Vergleich CD8- $\gamma\delta$	
				V5 2x SA	V7 2x SA	V5 2x SA	V7 2x SA
				[2.70381]	[2.41925]	[3.36757]	[2.06304]
<b>Cathepsin S</b>	<b>481</b>	1989	2145	-1.03	-1.10	<b>3.92 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	<b>2.54 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>
(Granzym A)	452	--	2050	--	1.37	--	1.10
(Granzym B)	430	2006	1936	1.55	2.16	<b>5.89 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	1.02
DPP4	29		846	--	-1.83	--	<b>2.20 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>
DPP7	206	1451	1467	1.26	1.88	-1.73	-1.01
Perforin-1	136	1139	1065	2.24	1.66	1.94	-1.32

**Myosin 9** (MA-ID 62) zeigte sich überwiegend gleichmäßig exprimiert. Die SVV der verglichenen Proteinspots (Spot-IDs 931, 974, 977) lagen alle im Bereich von 1, was bei Grenzwerten von 2,4 bis 3,4 eine fast identische Abundanz anzeigen.

**Cathepsin B** (MA-ID 430) war in CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Spot-ID 2000, SVV: 4,66 [2,42]) sowie gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen (Spot-ID 2000 SVV: 4,23 [2,81]) vermehrt abundant.

**Cathepsin S** (MA-ID 481) hingegen war in den ausgewerteten Versuchen (Spot-IDs 1989 und 2145) mit SVV von 3,92 [3,34] und 1,54 [2,1] im Vergleich mit  $\alpha\beta$  T-Zellen stärker in  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert.

Für die klassischen zytotoxischen Mediatoren Granzym A und B war eine Aussage nur eingeschränkt möglich, da eine sichere Identifikation im Gel erschwert war. Zudem konnte **Granzym A** (MA-ID 452) nur in einem Versuch eindeutig identifiziert werden (Spot-ID 2050), zeigte sich dort aber in allen T-Zellpopulationen gleichermaßen exprimiert (SVV: 1,37 [2,42]; SVV: 1,10 [2,1]).

**Granzym B** (MA-ID 430) zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Expression zwischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, war jedoch in  $\gamma\delta$  verglichen mit  $\alpha\beta$  T-Zellen in einem von beiden Versuchen vermehrt abundant (Spot-IDs 1936, SVV: 5,89 [3,37]).

Tabelle 4.30 Biologisch relevante Proteine aus F6-Granula (Teil 2:  $\gamma\delta$  vs. CD4) Mastergel-ID (MA-ID); Spot-nummer im entsprechenden Versuchsgel (Spot-ID V9, V7, V4); Grenzwerte von 2x SA ([ ]); Spot-Volumenverhältnisse außerhalb der 2x SA ( $>\text{CD8}$ )/( $>\text{CD4}$ )/( $>\gamma\delta$ ).

Proteinname	MA-ID	Spot-ID V5	Spot-ID V7	Vergleich $\gamma\delta$ -CD4	
				V5	V7
				2x SA 3.41186	2x SA 2.8078
<b>Moesin</b>	<b>94</b>	1088	1118	-1.71	-1.67
<b>Myosin 9</b>	<b>63</b>	931	977	-1.33	-1.20
<b>Myosin 9</b>	<b>62</b>	--	974	--	1.09
<b>Cathepsin W</b>	<b>532</b>	2151	2222	1.78	1.82
<b>Cathepsin B</b>	<b>422</b>	--	2000	--	<b>4.23 (&gt;CD4)</b>
<b>Cathepsin S</b>	<b>481</b>	1989	2145	<b>-4.28 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	2.49
(Granzym A)	<b>452</b>	--	2050	--	1.11
(Granzym B)	<b>430</b>	2006	1936	<b>-4.02 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>	1.87
<b>DPP4</b>	<b>29</b>	--	846	--	<b>-4.54 (&gt;<math>\gamma\delta</math>)</b>
<b>DPP7</b>	<b>206</b>	1451	1467	-1.73	1.69
<b>Perforin-1</b>	<b>136</b>	1139	1065	1.09	1.95

**DPP7** (DPPII) (MA-ID 206) war gleichmäßig in allen untersuchten T-Zellpopulationen exprimiert; es zeigten sich in beiden durchgeföhrten Vergleichen SVV-Werte von unter 2 bei Grenzwerten von 2,1 - 3,4.

Auch in der Expression von **Perforin-1** konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den T-Zellpopulationen beobachtet werden. Allerdings waren die Schwankungen innerhalb der Versuche etwas stärker ausgeprägt, ohne dabei einer eindeutigen Verteilung zu folgen.

## 5 Diskussion

Sekretorische Lysosomen als Speicher- und Sekretionsorganellen von CTL für die Vermittlung zytotoxischer Effekte wurden initial durch Peters et al. im Jahre 1991 charakterisiert. In einer vielzitierten Arbeit analysierten Blott und Griffiths (2002) diese bifunktionellen Organellen weiter und entwickelten das Konzept eines Speicherkompartiments, welches bei Degranulation zytotoxischer T- und NK-Zellen seinen Inhalt in die Zielzelle entlässt. Sie beschrieben überdies beispielsweise das lysosomale Membranprotein LAMP1 sowie das Transmembranprotein FasL als Markerstrukturen für diese sekretorischen Lysosomen. Neben He und Ostergaard, die zunächst 2007 feststellten, dass die Degranulation der zytotoxischen Mediatoren Granzym B und Perforin nicht vollständig mit der Oberflächenexpression des FasL korrelierte, konnte unsere Arbeitsgruppe 2008 erste Hinweise dafür vorlegen, dass nicht eine, sondern mindestens zwei voneinander unterscheidbare Speicherorganellen existieren (Schmidt et al. 2008). Damit wurde das verbreitete Modell mit nur einer einzigen Speicherstruktur für alle zytotoxischen Mediatoren in Frage gestellt. Im Anschluss an diese ersten Erkenntnisse galten weitere Analysen den Mobilisierungseigenschaften und der Identifikation von Membranproteinen sowie zytotoxischen Mediatoren der beiden Entitäten von sekretorischen Lysosomen. Ergebnisse dieser Analysen führten zu der Modellvorstellung von mindestens zwei voneinander unterscheidbaren Speicherstrukturen, deren Proteinbesatz, Funktion und Zytoskelett-Assoziation sowie Freisetzung sich fundamental unterscheiden. Aufgrund ihrer Lokalisation in entsprechenden Dichtegradienten werden diese Entitäten hier als F2-Vesikel und F6-Granula bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass alle untersuchten zytotoxischen T-Zell-Subpopulationen die zuvor charakterisierten Speicherstrukturen aufweisen und dass diese mit Übereinstimmungen in ihrem Proteom von 86,4-95,1 % auch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich sind. Die elektronenmikroskopischen Bilder der Effektorkompartimente unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen desselben Spenders erlaubten überdies eine morphologisch vergleichende Analyse. Im folgenden Abschnitt sollen die erhobenen Daten in den wissenschaftlichen Kontext gestellt und vor diesem Hintergrund bewertet werden.

### 5.1 Elektronenmikroskopie

In Vorarbeiten waren bereits die aus PHA-Blasten isolierten F2-Vesikel und F6-Granula elektronenmikroskopisch dargestellt worden. Dabei zeigten sich in der Fraktion 2 membranumhüllte vesikuläre Strukturen mit einer variablen Größe zwischen 300 und 700 nm. Sie zeigten ein dichtes, homogenes Lumen umgeben von einer Doppelmembran; teilweise stellten sich hier auch multivesikuläre Strukturen dar (Schmidt et al. 2011a). In der Fraktion 6 befanden sich etwa 150-300 nm große Granula, die ebenfalls durch eine Membran begrenzt

waren. Neben der Größe unterschieden sich die Organellen aus den verschiedenen Fraktionen hinsichtlich Struktur und Elektronendichte (Schmidt et al. 2011b). Die Granula aus Fraktion 6 wiesen ein charakteristisches Erscheinungsbild mit einem elektronendichteren Inneren und einer daran angelagerten kreisförmigen, membranumgebenen Struktur auf (Schmidt et al. 2011a). In der Literatur finden sich aufgrund der Tatsache, dass nach wie vor meist nur von einem einzigen Effektorkompartiment zytotoxischer Lymphozyten ausgegangen wird, auch nur Darstellungen von einem Typ zytotoxischer Granula. Diese werden jedoch auch als membranumschlossen und mit einem elektronendichten Kern mit intraluminalen kleinen Vesikeln beschrieben (Öllinger und Appelqvist 2017; Raposo et al. 2007). Auch in den hier gezeigten Aufnahmen (s. Abbildung 4.8) der F2-Vesikel und F6-Granula der drei unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen ließen sich membranumhüllte Strukturen erkennen. Hinsichtlich der Größe entsprachen sich die Befunde ebenfalls weitgehend. Auffällig schien die Dicke der Membran der F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche deutlich breiter ausfiel als die der anderen T-Zellsubpopulationen. Für die F6-Granula zeigte sich ein homogeneres Inneres, was im Einklang mit der Beobachtung der elektronendichteren Struktur steht. Die Polarisierung und Abgrenzung eines inneren Bereiches ließen sich jedoch nicht nachweisen. Es muss bei der Betrachtung darauf hingewiesen werden, dass die vesikulären Strukturen zum Teil stark beschädigt waren und es möglicherweise auch durch die Aufbereitung zum Schrumpfen der Vesikel kam. Letzteres könnte auch eine Erklärung für die besonders auffällige Dicke der Membran der F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sein.

## **5.2 Westernblot-Analysen**

Die Ergebnisse aus den Westernblot-Analysen zeigten eine unterschiedliche Verteilung von FasL einerseits und von 9 kDa-Granulysin und Granzym B andererseits innerhalb der sechs Fraktionen des Dichtegradienten aus isolierten CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten. Auch für das lysosomale Markerprotein LAMP1 konnte in den Analysen ein Signal in den Fraktionen 2 bis 6 sowie insbesondere in der CLF festgestellt werden, was als Nachweis galt, dass es sich bei den angereicherten Fraktionen in der Tat um LREV oder deren Reifungsstadien handelte. Neben der Überprüfung der Zuverlässigkeit der Methode und der Bestätigung bisheriger Beobachtungen konnte mit den hier durchgeführten Experimenten erstmals ein systematischer Vergleich der drei T-Zellsubpopulationen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ ) hinsichtlich des Verteilungsmusters der genannten Effektormoleküle unternommen werden.

In allen drei untersuchten zytotoxischen T-Zellsubpopulationen war die Anreicherung von **FasL** in Fraktion 2 und das Fehlen in Fraktion 6 zu beobachten. Dies deutet auf eine gleiche Speicherung dieses zytotoxischen Mediators innerhalb verschiedener Lymphozyten mit zytotoxischer Eigenschaft hin. Dieser Befund ist insofern beachtlich, da es sich bei den untersuch-

ten T-Zellsubpopulationen, wie einleitend beschrieben, um sehr unterschiedliche Zellen handelt, welche bezüglich ihrer Aufgaben im Immunsystem, den individuellen Voraussetzungen für eine Aktivierung sowie hinsichtlich des exprimierten Rezeptorprofils enorme Unterschiede aufweisen. Die beobachteten schwächeren Signale für FasL in den der Fraktion 2 benachbarten Fraktionen spiegeln wahrscheinlich lediglich den Anreicherungsprozess wider. Bei der subzellulären Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation kann zwar eine gute Auf trennung erreicht werden, eine teilweise Vermischung von Proteinbestandteilen in nebeneinander aufgetragenen Fraktionen lässt sich aber nicht komplett ausschließen (s. Abschnitt 5.4 Limitationen). Weiterhin ist denkbar, dass es sich bei den Signalen in den angrenzenden Fraktionen um Transportkompartimente des FasL im Rahmen der T-Zellaktivierung handelt, die aber bereits FasL enthalten (Saint Basile et al. 2010).

**Granzym B** war in den sekretorischen Lysosomen aller untersuchten T-Zellpopulationen mit zytotoxischer Eigenschaft enthalten. Es konnte in keinem der durchgeföhrten Untersuchungen ein Signal in Proben der F2-Vesikel detektiert werden, wohingegen eine deutliche Anreicherung in den Proben von F6-Granula vorlag. Die Verteilung ist innerhalb der beiden charakterisierten Speicherkompartimente damit so, wie sie bereits in Vorarbeiten für NK-Zellen sowie PHA-aktivierte T-Zell-Blasten und zum Teil auch für MACS-separierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden konnte (Schmidt 2009a; Schmidt et al. 2009b; Schmidt et al. 2008). Die Westernblot-Analyse der Expression von Granzym B in  $\gamma\delta$  T-Zellen ergab positive Signale in mehreren über das F6-Kompartiment hinausgehenden Fraktionen, die sich daher deutlicher von den  $\alpha\beta$  T-Zellen unterschieden und für eine stärker ausgeprägte Expression von Granzym B in  $\gamma\delta$  T-Zellen sprechen könnten (s. Abbildung 4.7B).

Das zytotoxische Effektorprotein **Granulysin** konnte in seinen beiden biologischen Varianten (9 und 15 kDa) in allen drei untersuchten T-Zellpopulationen in LREV nachgewiesen werden, wobei sich die 15 kDa-Form in erster Linie in den leichten F2-Vesikeln, die 9 kDa-Form hingegen in den dichten F6-Granula nachweisen ließ. Insgesamt zeigte sich eine stärkere Expression von Granulysin in den Effektorkompartimenten von  $\gamma\delta$  T-Zellen und hierbei auch insbesondere der zytotoxisch aktiven 9 kDa-Variante. Auf den Westernblot-Analysen aufbauend konnten weitere Analysen der Arbeitsgruppe zu Expression und Mechanismen der Degranulation von Granulysin eine stärkere Expression in Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen) und den *innate-like*-Immunzellen ( $\gamma\delta$  T-Zellen) bestätigen (Lettau et al. 2019). Es wäre denkbar, dass in den Zellen des angeborenen Immunsystems das konstitutiv exprimierte Granulysin in größerem Umfang vorgehalten wird, während es bei den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Prozess der T-Zellaktivierung erst aus der 15 kDa-Form prozessiert wird. Dies könnte einen Erklärungsansatz für das nur geringfügig ausgeprägte Signal von 15 kDa-Granulysin im Westernblot der  $\gamma\delta$  T-Zellen bieten. Die eindeutige Verteilung der 9 kDa und 15 kDa-Form des Granulysins in Fraktion 2 und Fraktion 6 in allen

T-Zellsubpopulationen konnte zudem die Zuverlässigkeit von Granulysin als Markerprotein für die beiden Speicherkompartimente bestätigen.

**DPP4/CD26** konnte in den hier besprochenen Westernblot-Analysen ebenfalls in allen untersuchten T-Zellsubpopulationen nachgewiesen werden. Ein Signal ergab sich in allen sechs subzellulären Fraktionen und damit auch in den F2-Vesikeln und den F6-Granula. Somit zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine klare Assoziation von DPP4/CD26 mit den charakterisierten Effektor- kompartimenten zytotoxischer T-Zellen und konnten ein intrazelluläres Vorkommen in aktivierten T-Lymphozyten demonstrieren. Weiterführende Analysen der Arbeitsgruppe zur Lokalisation von DPP4/CD26 legten insbesondere eine deutliche Kolokalisation mit den Proteinen Granzym A, B und Perforin nahe (Lettau et al. 2020). Dass sich in den Westernblot-Analysen eine über die Fraktion 6 hinausgehende Verteilung zeigte, könnte auf eine Speicherung oder den Transport von DPP4 in anderen unterschiedlich dichten, bisher aber nicht weiter charakterisierten Speicherkompartimenten hinweisen. Des Weiteren könnte auch der Aktivierungs- zustand der T-Zellen Unterschiede in der subzellulären Lokalisation erklären (Lettau et al. 2020).

### **5.3 2D-DIGE-basierte vergleichende Analyse**

Mit den vergleichenden Proteomanalysen mittels 2D-DIGE wurden die beiden Formen sekretorischer Lysosomen innerhalb der verschiedenen Subpopulationen zytotoxischer T-Zellen charakterisiert. Methodisch wurde sich für diese Technik entschieden, weil sie im Gegensatz zu der nicht ausreichend gegebenen Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben in individuellen Westernblots einen direkten, statistisch objektivierbaren Vergleich des Proteinbesatzes der angereicherten Organellen ermöglicht (Aquino et al. 2017; Tannu und Hemby 2006). Ein weiterer Grund für die Entscheidung für diese Methode waren die bereits in Vorarbeiten generierten Proteomkarten und -tabellen (Mastergel und -tabelle) der F2-Vesikel und F6-Granula, auf deren Grundlage eine erste Proteinbenennung möglich war.

Die Analyse der mittels 2D-DIGE erhobenen Daten umfasste drei Teilschritte, zunächst die allgemeine Vergleichbarkeit über eine visuelle Analyse der unprozessierten Scans, im Anschluss die statistische Auswertung der mittels DIA-Programm prozessierten Gele und schließlich die Analyse der unterschiedlichen Abundanz differenziell exprimierter und biologisch relevanter Proteine unter Nutzung der Mastergele für beide Fraktionen.

#### **5.3.1 Visuelle und statistische Analyse der 2D-DIGE-Experimente der F2-Vesikel und F6-Granula**

Für die visuelle Analyse wurden die Überlagerungsansichten der Scans betrachtet. Ähnlich erscheinende Spots stellten sich in einer Mischfarbe, unterschiedlich stark erscheinende

Spots entsprechend in der Farbe ihrer initialen Markierung dar. Eine gleichförmige Darstellung der Mischfarbe zeigte sich bei Vergleichen der Fraktion 2 insbesondere beim Vergleich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen. Für die Gelvergleiche der F6-Granula zeigte sich ein insgesamt leicht heterogeneres Bild. Dieser erste Eindruck der visuellen Beurteilung ließ sich nachfolgend unter Nutzung der DIA-Software objektivieren. Hier zeigten sich prozentuale Übereinstimmungen des Proteoms von F2-Vesikeln der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Ø 92,8 %, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen von Ø 91,6 % sowie  $\gamma\delta$  und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Ø 91,1 %. Für das Proteom der F6-Granula ergaben sich Übereinstimmungswerte zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Ø 90,74 %, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen von Ø 89,7 % und  $\gamma\delta$  und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 87,6 % bzw. 88,6 %. Insbesondere die Übereinstimmung zwischen CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche hinsichtlich ihrer Funktion im Immunsystem doch sehr unterschiedlich sind, von noch immerhin 91,1% im Durchschnitt (Maximum 93,5%) scheint dabei bemerkenswert. Die außerordentlich große Übereinstimmung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bereits in Voruntersuchungen beobachtet worden (Schmidt 2009a) und konnte in den hier durchgeführten Analysen in insgesamt acht Versuchen mit Übereinstimmungswerten von bis zu 95,1 % bestätigt werden. Hinsichtlich ihrer Funktionalität insbesondere in Bezug auf das zytotoxische Effektorpotential wurde eine gewisse Übereinstimmung zwischen CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen erwartet und mit durchschnittlich 91,6 % und maximal 94,8 % stellte sie sich tatsächlich ebenfalls sehr ausgeprägt dar. Demgegenüber zeigten sich für die F6-Granula die ausgeprägtesten Unterschiede im Vergleich von  $\gamma\delta$  mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wobei jedoch die Anzahl von nur zwei erfolgreich durchgeführten Experimenten bei dieser Aussage berücksichtigt werden muss (s. Tabelle 4.21). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass sich die FasL-tragenden F2-Vesikel in unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen bezüglich ihres Proteinbesatzes stark ähneln, während sich die F6-Granula insbesondere von CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen stärker unterscheiden. Die beobachteten Unterschiede in den F6-Granula, welche klassische, lösliche, zytotoxische Effektoren enthalten, könnten damit den unterschiedlichen Funktionen der T-Zellen, insbesondere hinsichtlich ihres Effektorpotentials, Rechnung tragen.

### **5.3.2 Differenziell exprimierte Proteine der F2-Vesikel und F6-Granula von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Zellen**

Für die Analyse der differenziell exprimierten Proteine wurden unterschiedlich abundant klassifizierte Spots aus den F2-Vesikeln und F6-Granula der T-Zellsubpopulationen anhand von charakteristischen Spotmustern im Mastergel identifiziert. Ihnen wurden dann die korrespondierenden Proteine anhand der Mastergeltabelle zugeordnet. Daneben wurden ausgesuchte biologisch relevante Proteine über das Mastergel in den Versuchsgelen markiert und deren Abundanz verglichen. Da sich die Ergebnisse der maximal abundanten und

biologisch relevanten Proteine in Teilen überschneiden, sollen sie hier gemeinsam besprochen werden. Bei den biologisch relevanten Proteinen handelte es sich um solche Proteine, die in Vorarbeiten ein besonders ausgeprägtes Vorkommen in entweder der Fraktion 2 oder 6 oder aber beiden Fraktionen zeigten. In erster Linie handelte es sich hierbei um Proteine, die mit dem Zytoskelett und damit funktionell mit der Mobilisierung assoziiert sind. Auch Proteine, die eine unterschiedliche Kinetik während der T-Zellaktivierung aufwiesen, wurden teilweise berücksichtigt. Die Auswahl der Proteine wurde auf Basis der Dissertation von H. Schmidt (2009) getroffen und betrifft die 2D-DIGE-Analysen von  $\alpha\beta$  T-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen sowie NK-Zellklonen.

### **5.3.2.1 F2-Vesikel**

In den F2-Vesikeln gehörten einige Proteine mit Assoziation zum Zytoskelett, wie **Aktin-related protein 2/3 Complex subunit 2** (Arp 2/3 Komplex, (MA-ID 671)) und das **Cytoskeleton-associated Protein** (MA-ID 952), zu den maximal differenziell abundanten Proteinen. Bei dem Vergleich der F2-Vesikel von  $\gamma\delta$  mit CD8 $^{+}$  T-Zellen war der Arp 2/3-Komplex (Spot-ID 1836, SVV 3,16, [2,07]) und das **Cytoskeleton-associated Protein** (Spot-ID 1978, SVV 9,52, [2,63]) in  $\gamma\delta$  T-Zellen stärker exprimiert als in den Vergleichspopulationen. Die 2D-DIGE-Analysen der F2-Vesikel von CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Lymphozyten direkt nach Isolierung aus Spenderblut und an Tag 14 nach Stimulation, wie sie in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, zeigten eine Assoziation des F2-Kompartimentes mit dem Arp 2/3-Komplex. Dort zeigte sich ein deutlich vermehrtes Vorkommen von Arp 2/3 in naiven CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen (Schmidt 2009a). In aktivierten CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen lagen dagegen geringere Mengen des Arp 2/3-Komplexes (Reduzierung des SVV um 3,16 [2,5] zwischen Tag 0 und Tag 14) vor (Schmidt 2009a).

Als weiteres Zytoskeletteinprotein wurde **Aktin  $\beta$**  (ACTB) (MA-ID 402) in einem Vergleich von  $\gamma\delta$  vs. CD4 $^{+}$  T-Zellen (Spot-ID1314) mit einem SVV 3,65 [2,12] in  $\gamma\delta$  T-Zellen als am stärksten exprimierte Protein markiert. Für die weitere Analyse wurden neben der MA-ID 402 weitere Spots, die laut Mastergel ACTB enthalten, zur Auswertung hinzugenommen. Im Einzelnen handelte es sich hierbei um die MA-IDs 18, 27, 392, 485, 500, 516, 518, 652 und 1040. Hierbei zeigte sich für ACTB insgesamt eine eher gleichmäßige Verteilung in den untersuchten T-Zellsubpopulationen. Neben diesem Spot (Spot-ID1314) zeigten sich auch bei einem weiteren identifizierten Spot (MA-ID 392, Spot-ID 1399) Ausschläge im SVV (2,70 [1,75]  $\gamma\delta$  vs. CD8 & 3,22 [1,95]  $\gamma\delta$  vs. CD4), die anzeigen, dass ACTB in  $\gamma\delta$  T-Zellen abundant sein könnte als in  $\alpha\beta$  T-Zellen. In Vorarbeiten war für ACTB lediglich eine deutliche Assoziation mit den F2-Vesikeln beschrieben worden, ohne zwischen den unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen zu differenzieren. Die hier ermittelten Daten blieben diesbezüglich ebenfalls uneindeutig.

Für **Stathmin 1/Oncoprotein 18** (MA-ID 820) zeigte sich im Spot 2270 mit einem SVV von 3,01, [1,71] gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einem SVV von 9,29, [2,07] gegenüber γδ T-Zellen eine maximale Abundanz in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auch bei der Auswertung der SVV dieses Proteins in zwei weiteren durchgeführten Versuchen zeigte sich Stathmin 1 in drei von vier Spots in CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt abundant (s. Spot-IDs 2094, 2434 in Tabelle 4.23 und

Tabelle 4.24). Für Stathmin 1 war in Vorarbeiten eine vermehrte Expression in αβ T-Zellen gegenüber γδ T-Zellen festgestellt worden, was sich in den hier durchgeführten Analysen bestätigen ließ. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die F2-Vesikel der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehr Stathmin 1 enthalten als die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei Stathmin 1 handelt es sich um ein zytoplasmatisches Phosphoprotein mit Mikrotubuli-destabilisierender Eigenschaft (Machado-Neto et al. 2014). Es hat Einfluss auf die Polarisierung des MTOC und damit auf die Ausbildung der zytotoxischen Synapse und die Zytotoxizität von CTL (Filbert et al. 2012).

Das Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Familienmitglied **Moesin** (MA-IDs 240, 248-251) war in den hier durchgeführten Analysen in allen untersuchten Populationen in sehr ähnlichem Umfang exprimiert. Im Vergleich γδ vs. CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sich demgegenüber grenzwertüberschreitende Werte in drei von vier Spots (Spot-ID 1021, SVV 2,22 [2,20]; Spot-ID 1154 SVV 3,58 & Spot-ID 1160 SVV 3,23 [beide 3,17]), die dafürsprechen, dass Moesin leicht vermehrt in γδ T-Zellen vorkommt. Moesin verbindet reversibel das kortikale Aktin-Zytoskelett mit der Plasmamembran und beeinflusst damit Formveränderungen der Zelloberfläche (Parameswaran und Gupta 2013). Für **N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment Protein alpha** (α-SNAP) (MA-ID 652) ergab sich in keinem der drei ausgewerteten Gelvergleiche ein über den jeweiligen Grenzwert von 2x SA hinausgehender SVV-Wert (s. Spot-IDs 1764, 1799, 1935). Es zeigte sich damit eine innerhalb der untersuchten T-Zellsubpopulationen gleichmäßig ausgeprägte Abundanz dieses Proteins. In Vorarbeiten zeigte sich α-SNAP deutlich in den F2-Vesikeln angereichert (Schmidt 2009a). Analysen zur differenziellen Expression zwischen unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen waren bisher nicht erfolgt. α-SNAP ist am Vesikeltransport im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Netzwerk, aber auch an der Freisetzung sekretorischer Lysosomen beteiligt. Es bildet einen Teil des SNARE-Komplexes, der zur Membranfusion an der zytotoxischen Synapse ausgebildet wird (Stenbeck 1998).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gelen zeigte sich für **Annexin A1** (auch Lipocortin 1) (MA-IDs 604, 615) in den γδ T-Zellen gegenüber αβ T-Zellen (s. Spot-IDs 1675, 1666, 1799, 1774) ein deutlicher, den jeweiligen Grenzwert von 2x SA überschreitender SVV-Wert. Im Proteomvergleich aktiverter und nicht-aktiverter zytotoxischer T-Zellen hatte sich für Annexin A1 in Vorarbeiten eine Reduktion der Expression mit zunehmender Aktivierung gezeigt (Schmidt 2009a).

In den Gelanalysen fanden sich im SVV des **Gelsolin-like capping Protein** (Cap G) (MA-IDs 572,586) nur geringfügige Unterschiede zwischen den analysierten Proben. Nur in einer 2D-DIGE-Analyse der F2-Vesikel von CD8<sup>+</sup> vs. γδ T-Zellen zeigte sich für CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Steigerung (2.68) über den Grenzwert [1.75] für CapG (Spot-ID 1640). Berücksichtigt man auch kleinere Ausschläge, kann insgesamt ein leicht vermehrtes Auftreten von CapG in αβ T-Zellen im Vergleich zu γδ T-Zellen beobachtet werden. CapG gehört der Gelsolin-Superfamilie an und unterliegt einer kalziumabhängigen Aktivierung. Zudem spielt es eine Rolle bei der Regulierung der Dynamik von Aktinfilamenten (Onoda et al. 1993).

Für **Extended Synaptotagmin 1** (E-Syt1) (MA-ID 155, 156) zeigte sich in den hier durchgeführten Gelvergleichen in allen drei T-Zellsubpopulationen eine auffällig ähnliche Abundanz. Nur in einem der Vergleiche von γδ vs. CD4<sup>+</sup> T-Zellen näherte sich das SVV (3.11) dem Grenzwert [3.17] an (Spot-ID 981). E-Syt1 war in Voranalysen eindeutig mit den F2-Vesikeln assoziiert gewesen. Ein Vergleich der Abundanz dieses Proteins zwischen den T-Zellsubpopulationen war bisher allerdings nicht erfolgt. E-Syt1 bewirkt (in Kombination mit E-Syt2 und 3) eine kalziumabhängige Annäherung von ER-Membran und Plasmamembran. Es spielt zudem eine Rolle im Lipidtransport zwischen Membranen (Idevall-Hagren et al. 2015). Anders als die klassischen Synaptotagmine bewirken die Extended Synaptotagmine keine tatsächliche Membranfusion, sie sind jedoch wie die klassischen Synaptotagmine auf saure Phospholipide in der für die Annäherung/Fusion anvisierten Membran und einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration angewiesen (Idevall-Hagren et al. 2015).

Insbesondere bei den **Cathepsinen** zeigten sich größere Schwankungen in der Expression zwischen den unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen, wobei sich insgesamt eher eine vermehrte Abundanz innerhalb der αβ T-Zellen zeigte. In zwei Gelvergleichen von CD4<sup>+</sup> vs. CD8<sup>+</sup> T-Zellen war **Cathepsin H** (MA-ID 738) das in F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen maximal differenziell exprimierte Protein (s. Tabelle 4.11; Spot-ID 2159; SVV 3,36 [1,39]; Spot-ID 1998; SVV 3,68 [1,71]). Auch in den darüber hinaus analysierten Gelen lag der Wert für das SVV von Cathepsin H mehrfach jenseits des Grenzwerts (2x SA), was für eine vermehrte Expression in den F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> bzw. γδ T-Zellen spricht. Cathepsin H war in Vorarbeiten CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich vermehrt gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar gewesen (SVV -1.79 bei [+/-1,5]). Die Ergebnisse der hier durchgeführten 2D-DIGE-Analysen entsprachen damit weitgehend diesem Befund.

Für **Cathepsin S** (MA-ID 749) ergab sich eine mehrfach den Schwellenwert überschreitende Erhöhung in αβ T-Zellen gegenüber γδ T-Zellen (z.B. Spot-ID 2059: CD8 vs. γδ, SVV: 2,63 [2,07] & CD4 vs. γδ, SVV: 5,66 [2,21]). Insgesamt zeigte sich auch hier eine vermehrte Abundanz des Proteins in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vorbefunde zu Cathepsin S zeigten eine vermehrte Expression in den F2-Vesikeln aktiverter Lymphozyten gegenüber naiven und eine vermehrte Abundanz in den F2-Vesikeln von γδ T-Zellen gegenüber αβ T-Zellen (Schmidt 2009a). Somit

widersprachen die hier durchgeföhrten Analysen demnach im letzten Punkt den Erkenntnissen aus Vorarbeiten.

Hinsichtlich der Expression von **Cathepsin B** (MA-ID 682, 691) zeigten die hier durchgeföhrten Analysen eine eher homogene Abundanz über alle untersuchten T-Zellsubpopulationen hinweg, wenn auch mit einer dezenten, aber stets unter dem Schwellenwert der 2x SA verbleibenden Erhöhung in  $\alpha\beta$  T-Zellen gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen. In Vorstudien ergab sich für Cathepsin B, analog zu Cathepsin H, eine gesteigerte Abundanz in CD4 $^{+}$  T-Zellen, welche hier so nicht beobachtet werden konnte. Damit stellen die Ergebnisse zwar keinen Widerspruch zu den bisherigen Analysen dar, können diese jedoch auch nicht bestätigen.

Bei der Analyse von **Cathepsin D Prepro** (MA-ID 704) ließ sich nur der Spot mit der MA-ID 704 in allen Versuchen identifizieren. Die MA-IDs 696 und 709 waren nur in einem Versuch identifizierbar. MA-ID-696 war hier jedoch auch gleichzeitig der in dem Vergleich CD8 vs.  $\gamma\delta$  am deutlichsten unterschiedlich erscheinende Spot (Spot-ID 1777, SVV: 2,75, [1,75]). Insgesamt zeigte sich eine vermehrte Abundanz in den F2-Vesikeln von CD8 $^{+}$  T-Zellen gegenüber CD4 $^{+}$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen und über alle Versuche hinweg eine vermehrte Abundanz in den F2-Vesikeln von  $\alpha\beta$  T-Zellen.

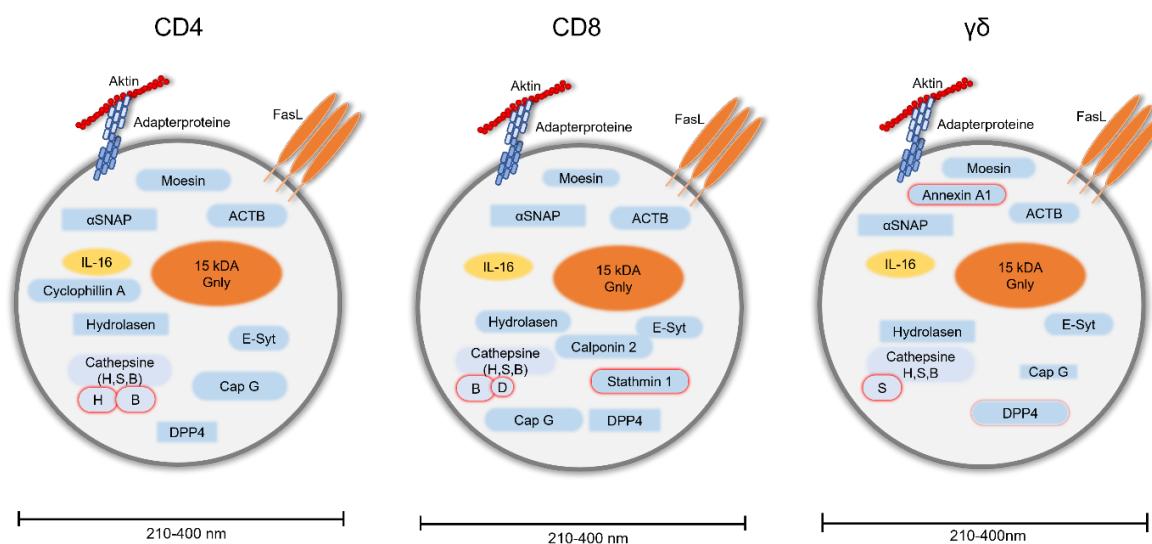


Abbildung 5.1 Modelle der F2-Vesikel von CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen. Dargestellt sind die F2-Vesikel mit deren Transmembran- und Cargo-Proteinen. Rot umrandet sind jene Proteine, die eine eindeutige Verteilung zeigten.

In den hier durchgeföhrten Analysen war **DPP4/CD26** (MA-ID 67, 77, 81, 83, 86) insgesamt leicht vermehrt in  $\gamma\delta$  T-Zellen und geringfügig abunstanter in CD4 $^{+}$  T-Zellen als in CD8 $^{+}$  T-Zellen. In einem der Einzelvergleiche von CD4 $^{+}$  vs. CD8 $^{+}$  T-Zellen war DPP4 jedoch einmalig auch der maximal differenziell erscheinende Spot in den F2-Vesikeln von CD8 $^{+}$  T-Zellen (MA-ID 86, Spot-ID 734, SVV 2,39, [1,6]). In den 2D-DIGE-Analysen der Arbeitsgruppe war die Menge von DPP4 in aktivierte T-Zellen gegenüber naiven  $\alpha\beta$  T-Zellen deutlich erhöht

(Schmidt 2009a). Die Menge von DPP4 änderte sich also während des Aktivierungsprozesses.

Die Analysen für **Interleukin 16** (IL-16) (MA-IDs 209, 210, 217, 218) ergaben über alle Vergleichspopulationen hinweg eine fast identische Abundanz mit nur geringfügigen Schwankungen im SVV um 1. Auch in Vorarbeiten war IL-16 in vergleichbarem Umfang in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und auch in NK-Zellen des F2-Kompartiments nachgewiesen worden. Bei IL-16 handelt es sich um ein regulatorisches Protein, das im Rahmen von Immunprozessen an der Zell-Rekrutierung und Aktivierung beteiligt ist (Cruikshank und Little 2008).

Zu den mehrfach als maximal differenziell abundant identifizierten Proteinen gehörte auch die Gruppe der **Heat-shock-Proteine (HSPs)**. In den hier durchgeföhrten Analysen ergab sich für das **70 kDa HSP 5** (MA-ID 223) eine maximal vermehrte Abundanz in F2-Vesikeln von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Spot-ID: 1105, SVV: 11,98, [2,38]) gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In Vorarbeiten war bereits in mehreren 2D-DIGE-Analysen unterschiedlicher T-Lymphozyten eine zwischen den T-Zellsubpopulationen differenzielle Expression aufgefallen. Diese war jedoch aufgrund der normalerweise eher im Zytosol befindlichen Proteine nicht im Detail diskutiert worden (Schmidt 2009a).

### **5.3.2.2 F6-Granula**

Für die F6-Granula konnten aus der Gruppe mit dem Zytoskelett assoziierter Proteine einerseits **Profilin-1** (MA-ID 590) und andererseits **Myosin 9** (Myosin II; MA-ID 62, 63) sowie **Moesin** (MA-ID 94) hinsichtlich ihrer Abundanz in den zytotoxischen Granula von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht werden. Hierbei zeigte sich Profilin-1 in einem der Vergleiche von CD4<sup>+</sup> vs.  $\gamma\delta$  T-Zellen (Spot-ID 2048: SVV von 6,41, [3,41]) in den F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen maximal vermehrt exprimiert. Bei Profilin-1 handelt es sich um ein ubiquitär exprimierte Regulatorprotein des Aktinzytoskeletts, welches eine Schlüsselrolle bei der Polymerisierung von Aktin einnimmt (Ding et al. 2012). Myosin 9 hingegen zeigte sich in den hier besprochenen Versuchen überwiegend gleichmäßig exprimiert. Die SVV der verglichenen Proteinspots lagen alle um +/-1, was bei Grenzwerten für als differenziell exprimiert klassifizierte Spots zwischen 2 und 3.4 für eine nahezu identische Abundanz spricht. Die Expression von Myosin 9 war in Vorarbeiten schon deutlich mit den F6-Granula in Verbindung gebracht worden und unterlag in den hier vorgestellten Untersuchungen keinen nennenswerten zelltypspezifischen Unterschieden. Damit konnte die Vermutung, dass die F6-Granula maßgeblich über Myosin 9 mit dem Zytoskelett assoziiert sind, weiter unterstützt werden. Das Motorprotein Myosin 9 beeinflusst über eine ATP-abhängige F-Aktin-Kontraktion Bewegungen und Konformationsänderungen innerhalb der Zelle und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von lytischen Granula, was sich durch Versuche mit Inhibierung von Myosin 9 durch Blebbistatin zeigen ließ (Andzelm et al. 2007). Das ebenfalls

in den F2-Vesikeln vorhandene Protein **Moesin** war in den lytischen Granula aus Fraktion 6 in  $\gamma\delta$  T-Zellen tendenziell vermehrt abundant gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen, wobei in keinem der ausgewerteten Versuche eine Erhöhung um mehr als die 2x SA zu beobachten war. Nur in einem der durchgeführten Versuche  $\gamma\delta$  vs. CD8 $^+$  T-Zellen fand sich ein dem Grenzwert von 2x SA [3,37] annähernd entsprechendes SVV (3,35) für Moesin mit vermehrter Abundanz in den F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen (s. Spot-ID 1088).

Die zytotoxische Effektorprotease **Granzym A** (MA-ID 452) war im Rahmen der Gelvergleiche dreier applizierter Proben nur in einem einzigen Versuch nachweisbar (Spot-ID: 2050) und hier war es über alle Populationen hinweg in sehr ähnlichem Ausmaß abundant. Demgegenüber war Granzym A in einem Einzelvergleich von CD8 vs. CD4 im Spot 2046 und einem SVV von 10,54 [1,92] sehr deutlich in CD8 $^+$  T-Zellen verstärkt. **Granzym B (MA-ID 430)** zeigte sich in CD8 $^+$  und CD4 $^+$  T-Zellen in ähnlichem Ausmaß exprimiert, jedoch leicht vermehrt in den F6-Granula von  $\gamma\delta$  gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen. Für **Perforin-1** (MA-ID 136) konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Die Schwankungen innerhalb der Versuche waren jedoch etwas stärker ausgeprägt, ohne einer eindeutigen Verteilung zu folgen. Vorarbeiten zur Expression von Perforin zeigten, dass CD8 $^+$  T-Zellen direkt nach Isolation aus den PBMNC die größte Menge Perforin enthielten, Perforin jedoch auch in CD4 $^+$  T-Zellen bereits vor Stimulation enthalten war. Im Verlauf der Kultivierung nahm die Menge identifizierbaren Perforins ab und wurde gegen Ende (nach 18 Tagen der Zellkultur) wieder aufgefüllt, ohne jedoch das Ausgangsniveau zu erreichen (Schmidt 2009a).

In Analogie zu den Ergebnissen der Fraktion 2, waren auch in der Fraktion 6 insbesondere bei den **Cathepsinen** Unterschiede auszumachen. Identifiziert wurden Cathepsin W, B und S. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich **Cathepsin W** (MA-ID532) in allen untersuchten T-Zellen annähernd gleichmäßig exprimiert (max. Spot-ID 2222: SVV 2.04, [2,4]). Für **Cathepsin B** (MA-ID 422) konnte eine vermehrte Abundanz in CD4 $^+$  T-Zellen gegenüber CD8 $^+$  T-Zellen detektiert werden (Spot-ID 2000, SVV: 4,66 [2,42]). Auch gegenüber  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte sich dieser Spot für Cathepsin B in CD4 $^+$  T-Zellen stärker ausgeprägt (SVV: 4,23 [2,81]) und stellte in diesem Versuch auch den maximal differenziell erscheinenden Spot dar. **Cathepsin S** (MA-ID 481) war im Unterschied zu Cathepsin W und B in beiden Versuchen stärker in  $\gamma\delta$  T-Zellen als in  $\alpha\beta$  T-Zellen exprimiert. Auffällig war der fast identische Umfang der Expression zwischen CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T-Zellen, der um den Wert 1 im SSV lag. Die differenzielle Expression von Cathepsin S innerhalb der F6-Granula war in Vorarbeiten nicht untersucht worden. Für F2-Vesikel war, wie bereits oben beschrieben, eine vermehrte Expression in  $\gamma\delta$  gegenüber  $\alpha\beta$  T-Zellen aufgefallen.

Die Peptidase **DPP4/CD26** (MA-ID 33) war in  $\gamma\delta$  T-Zellen abundant als in  $\alpha\beta$  T-Zellen. In den Gesamtvergleichen konnte DPP4 nur in einem der beiden Vergleichsgele nachgewiesen

werden. Der entsprechende Spot (Spot-ID 846) wies im Gelvergleich  $\gamma\delta$  vs. CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein SVV von 4,54 [2,8] auf und war damit deutlich vermehrt in den F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen vorhanden. Daneben war der Spot 811 für DPP4 in einem Einzelvergleich ( $\gamma\delta$  vs. CD8) mit einem SVV von 8,01 [2,6] ebenfalls in den F6-Granula von  $\gamma\delta$  T-Zellen maximal exprimiert. Demgegenüber war **DPP7** (MA-ID 206) in beiden analysierten Versuchen (s. Spot-IDs 1451 & 1467) gleichmäßig in allen untersuchten T-Zellsubpopulationen vorhanden.

Wie auch schon für die F2-Vesikel beschrieben, zeigten sich die Heat-Shock Proteine in der Analyse differenziell erscheinender Spots mehrfach als maximal unterschiedlich abundante Proteine. **HSP 90** (MA-ID 64) lag im Gelvergleich von CD4 vs. CD8 im Spot 1032 mit einem SVV von 9,09 [1,78] sehr deutlich vermehrt in den F6-Granula von CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor. Für HSP 70 (MA-ID 90) zeigte sich demgegenüber beim Vergleich von CD8 vs. CD4 im Spot 2045 bei einem SVV 4,2 [1,78] eine vermehrte Expression in F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Neben den beschriebenen ließ sich wiederkehrend der Spot mit der **MA-ID 374** als maximal differenziell abundant in CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren. Es handelt sich um einen Spot mit dem ungefähren Molekulargewicht von 36 kDa im pH-Bereich zwischen 7,0 und 8,0. Der Spot war in der massenspektrometrischen Untersuchung der Vorarbeiten zwar markiert worden, ihm konnte jedoch kein Protein zugeordnet werden.

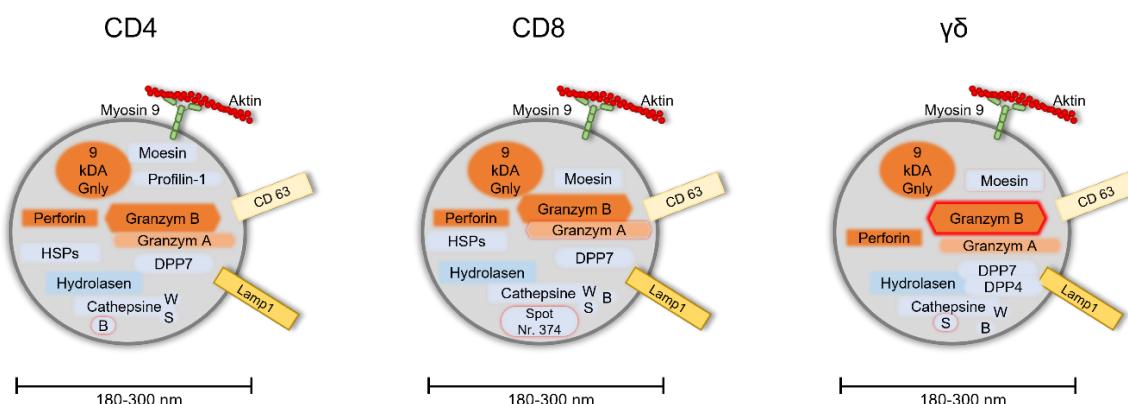


Abbildung 5.2 **Modelle der F6-Granula von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen.** Dargestellt sind die F6-Granula mit deren Transmembran- und Cargo-Proteinen. Rot umrandet sind solche Proteine, die eine eindeutige Verteilung zeigten.

### Funktioneller Zusammenhang

Innerhalb der Proteine, bei denen es sich um Bestandteile des Zytoskeletts handelt oder die entsprechend ihrer bisher charakterisierten Funktion in anderen Organellen an Mobilisierungsprozessen beteiligt sind, zeigten sich insgesamt wenige Expressionsunterschiede. Viele der besprochenen Proteine (E-Syt1,  $\alpha$ -SNAP, Moesin, CapG) wiesen innerhalb der F2-Vesikel der unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen eine eher gleichmäßige Verteilung auf. Dies spricht

dafür, dass der Assoziation ans Zytoskelett und der Mobilisierung der F2-Vesikel in den untersuchten T-Zellpopulationen ähnliche Mechanismen zugrunde liegen. Die Assoziation vieler dieser Proteine mit Kalzium weist auf deren Beteiligung an der kalziumabhängigen Degranulation der sekretorischen Vesikel hin.

Für die Gruppe der Cathepsine ließen sich eindeutigere Unterschiede nachweisen. Bei den Cathepsinen handelt es sich um proteolytische Enzyme; sie werden unterschieden in Serin- (Cathepsin A und G), Aspartat- (Cathepsin D und E) und Cystein-Proteasen. Von den 11 verschiedenen Cystein-Proteasen wurden hier die Cathepsine H, S, B und W identifiziert, von den Aspartat-Cathepsinen zudem Cathepsin D. **Cathepsin W** wird eine Rolle in zytotoxischen Prozessen, ähnlich denen von Granzym, zugeschrieben (Stoeckle et al. 2009). Die gleichmäßige Abundanz in den zytotoxischen F6-Granula spricht ebenso für diese Annahme. Gemeinsam mit **Cathepsin C** hat **Cathepsin H** eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von Perforin und Granzymen (D'Angelo et al. 2010). Da sich die Effektormediatoren Perforin und Granzym nach unseren Erkenntnissen in den F6-Granula befinden, spielt deren Aktivierung für die F2-Vesikel, in denen die Proteasen vorrangig nachgewiesen wurden, wahrscheinlich eher keine Rolle. Es ist aber durchaus denkbar, dass Cathepsin H auch in den F2-Vesikeln (insbesondere in denen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen) regulierende Eigenschaften aufweist. **Cathepsin S** gehört ebenfalls zu den lysosomalen Cystein-Proteasen. Neben der klassischen degradativen Funktion spielt Cathepsin S auch eine Rolle bei der MHC-II-abhängigen Antigen-Präsentation. Es kann darüber hinaus sezerniert werden und so auf extrazelluläre Substrate wirken und ist auch im neutralen pH-Bereich aktiv (Wilkinson et al. 2015). Auch eine Apoptose-induzierende Wirkung wurde Cathepsin S zugeschrieben (Droga-Mazovec et al. 2008). **Cathepsin B** gilt sowohl als Endopeptidase als auch Peptidylpeptidase und ist am frühen und späten lysosomalen Proteinverdau beteiligt (Mort und Buttle 1997). Es wurde angenommen, dass Cathepsin B, welches bei der Degranulation an die Lymphozytenoberfläche transportiert wird, die Perforin-Moleküle, die zurück zur zytotoxischen T- oder Killerzelle diffundieren, spaltet und inaktiviert und damit die zytotoxische Zelle vor ihren eigenen Effektormediatoren schützt (Balaji et al. 2002). Diese Theorie wurde von Baran et al. 2006 in Frage gestellt, die zeigten, dass rekombinantes Perforin tatsächlich nur in geringem Maße durch Cathepsin B gespalten wird und dass CD8<sup>+</sup> CTL von Cathepsin B-Knockout-Mäusen *in vitro* und *in vivo* bei gleicher Effizienz der Zielzellelimination, keinen Schaden durch die toxische Wirkung der Effektormediatoren nehmen. Es ist also nicht sicher zu sagen, welche Funktion Cathepsin B genau in den F2-Vesikeln und F6-Ganula übernimmt. Insbesondere ist deren Rolle in zytotoxischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bisher nicht untersucht.

**DPP4/CD26** ist ein Oberflächen-Antigen von T-Zellen, das ebenfalls proteolytische Eigenschaften aufweist (s. Abschnitt 1.3.3.5). Für DPP4/CD26 war, wie bereits erwähnt, eine deutliche Kolokalisation mit Granzym B, Perforin und 9 kDa-Granulysin beschrieben worden (s.o.). Die Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse konnten jedoch DPP4/CD26, wie auch schon in den Westernblots beobachtet, mehrfach ebenfalls in der Fraktion 2 nachweisen. Diese Beobachtungen unterstützen daher die Annahme, dass unterschiedliche Aktivierungszustände der T-Zellen mit einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation und Expression von DPP4/CD26 einhergehen könnten.

Die Bedeutung von **Moesin** für die Lymphozytenfunktion konnte durch Lagresle-Peyrou et al. 2016 im Rahmen von genetischen Analysen von 7 männlichen Patienten mit klinischen Zeichen von Immundefekten in Form von Leukopenie, gestörter T-Zellmigration und -proliferation demonstriert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Patienten eine X-chromosomal hemizygote Mutation im Moesin-Gen vorlag, die sie für den Phänotyp der Patienten verantwortlich machten. Weitere Studien zeigten, dass die Mutation zur Unfähigkeit von Thymozyten führte, die durch Chemoattraktoren ausgelösten Veränderungen der Zellform zu vollziehen (Avery et al. 2021). Neben der Funktion von Moesin bei der Zellmotilität zeigten Hébert et al. 2008, dass Moesin in aktivierten menschlichen T-Zellen mit Fas assoziiert und dass Moesin (und Ezrin) in Jurkat-Zellen die Fas-Rezeptor-Aggregation sowie die Aktivierung von Caspase-8 und die Induktion von Apoptose erleichtert. Die genaue Funktion von Moesin in den sekretorischen Lysosomen von zytotoxischen T-Zellen ist im Kontext aktueller Forschung daher von Interesse und würde sich für weitere Analysen eignen. Eine gleichmäßige Abundanz in den untersuchten T-Zellpopulationen unterstreicht dabei die besondere Bedeutung von Moesin für grundlegende Funktionen von T-Lymphozyten. Das beobachtete leicht vermehrte Vorkommen in beiden Effektorkompartimenten (F2 und F6) in den  $\gamma\delta$  T-Zellen verglichen mit  $\alpha\beta$  T-Zellen könnte dabei auch durch spenderspezifische Unterschiede hervorgerufen worden sein.

Bei den **HSPs** handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die zu den Chaperonen zählen und vornehmlich im Zytosol lokalisiert sind. Sie werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert und dienen der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen. Sie erleichtern die Faltung *de novo* synthetisierter Proteine, unterstützen die Translokation von Vorläuferproteinen in Organellen und sind für den Abbau geschädigter Proteine unter Stressbedingungen verantwortlich (Zininga et al. 2018). Die hier beobachtete vermehrte Abundanz von HSP 70 in F2-Vesikeln und F6-Granula von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Tatsache, dass sich die HSPs in mehreren Versuchen nachweisen ließen und dass ein Vorkommen in Lysosomen beschrieben wurde, könnten Hinweis darauf sein, dass es sich um differenziell exprimierte Proteine aus den beiden Effektorkompartimenten handelt und diese eine Aufgabe in der Homöostase innerhalb der vesikulären Speicherstrukturen übernehmen könnten, in

denen die enthaltenen Effektormediatoren streng reguliert werden müssen. Demgegenüber könnten die HSPs jedoch auch eine „Verunreinigung“ aus dem Zytosol darstellen, wofür die hohen Werte des SVV von 11,98 [2,38] für das F2-Kompartiment sowie die Ergebnisse für das HSP 90 im Vergleich CD4<sup>+</sup> vs. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (SVV 9,09 [1,78] in CD4 vs. CD8) der F6-Granula sprechen würden.

## **5.4 Limitationen**

Im Hinblick auf Limitationen der Methode muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der Probenvorbereitung für die Dichtegradientenzentrifugation lediglich um eine Anreicherung unterschiedlicher subzellulärer Strukturen handelt (Schmidt et al. 2009b), weshalb auch immer Verunreinigungen insbesondere durch stark exprimierte Proteine beispielsweise aus dem mitochondrialen Kompartiment zu erwarten sind. Bei einigen der Spots, die in der hier vorgelegten Arbeit als maximal verstärkt oder vermindert identifiziert wurden, könnte es sich somit um hochabundante Proteine handeln. Hierbei zu nennen wären beispielsweise die aus den Vergleichen der F2-Vesikel maximal in CD4<sup>+</sup> vermehrt gegenüber γδ T-Zellen abundanten Proteine Seryl-tRNA-Synthetase und TC4 Protein oder der in γδ T-Zellen maximal vermehrt gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten mitochondrialen Fumarat-Hydratase. Auch im Falle der F6-Granula im Vergleich zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag das mitochondriale Protein NDUFV2 maximal vermehrt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor. Es liegt auf der Hand, dass diese „zufällig“ in die Probe gelangten Proteine nicht (in gleichem Maße) in der Vergleichsprobe zu detektieren sind, weshalb sich leicht Spot-Volumen-Unterschiede im Bereich von 7.66 [2,56], wie im Falle der mitochondrialen Fumarat-Hydratase (Spot-ID 2100) ergeben konnten. Bei einigen Proteinen, denen über die Funktion nicht so eindeutig ein subzelluläres Kompartiment zugeordnet werden kann, stellt sich die Interpretation erschwert dar, da sie sowohl Verunreinigungen als auch tatsächlich differenziell abundante Proteine darstellen können. Ein Beispiel hierfür sind die HSPs, wie oben bereits dargelegt wurde.

Daneben wurde in dem Versuchsaufbau kein interner Standard mitgeführt. Dieser ist in 2D-DIGE-Analysen gängig, um die Gele aus unterschiedlichen Versuchen untereinander vergleichbar zu machen (Tannu und Hemby 2006). Dies ist der Grund dafür, dass aus den erhobenen Daten mit Ausnahme des Mittelwertes keine über die individuellen Gele hinausführende statistische Auswertung vorgenommen wurde. Die Gele sind untereinander auch insofern nicht direkt vergleichbar, da die applizierten Proteinmengen sehr stark variierten und die Tage der Kultivierung zwischen den Versuchen angepasst wurden, um größere Mengen an Zellen zu erhalten. Es wurde sich für den Verzicht eines internen Standards entschieden, weil die Zielsetzung dieser Arbeit einen Vergleich aller drei Populationen in einem Gel anstrebte, sodass ein und derselbe Spot in seiner Ausprägung mit den beiden anderen Vergleichspopulationen verglichen werden konnte. Es ging nicht darum, in erster

Linie das Speicherkompartiment an sich zu analysieren, was bereits umfangreich erfolgt war, sondern um die Analyse der Ähnlichkeit dieser bereits charakterisierten Effektorkompartimente innerhalb der Vergleichsgruppen. Die Ergebnisse sind daher als individuelle Experimente zu betrachten. Wiederholt differenziell erscheinende Spots können aber als klares Indiz dafür herangezogen werden, dass das dem Spot zugrundeliegende Protein in dem Effektor-Kompartiment der entsprechenden T-Zell-Subpopulation vermehrt oder verminder exprimiert wird, wie dies beispielsweise im Falle der Cathepsine oder Stathmin 1 der Fall war. Neben den ausgewählten Proteinen wäre die Abundanz der in den Westernblot-Analysen untersuchten Markerproteine (s.o.) von großem Interesse gewesen. Diesbezüglich muss auf zwei Limitationen hingewiesen werden. Zum einen ist der Nachweis transmembraner Proteine in der 2D-DIGE nur bedingt möglich. Dies liegt daran, dass besonders hydrophobe Proteine, wie zum Beispiel Membranbestandteile, nur schwer löslich sind und sich daher nicht gut in den 2D-DIGE-Gelen abbilden lassen. Aus diesem Grund zeigen sich FasL und LAMP1 in keiner der Proben und sind auch nicht in den Mastergelen enthalten. Dies war bereits in Vorarbeiten festgestellt worden, weshalb FasL und LAMP1 im Rahmen der Westernblot-Analysen ergänzend untersucht wurden. Zum anderen konnte ein Gelabschnitt wiederholt nicht in den Scans dargestellt werden. Hierbei handelt es sich um den Bereich, der sich als weiße Fläche im höheren pH-Bereich der Gele darstellt und keine Proteinspots enthält. Wahrscheinlich liegt hier eine mangelhafte isoelektrische Fokussierung in dem hinteren Abschnitt des IPG-Streifens vor (erste Dimension), weshalb keine Proteine in der zweiten Dimension in das Gel eingewandert sind. Da sich in diesem Gelbereich viele der zytotoxischen Effektormediatoren befinden, war z. B. die Analyse von Granzym A und B für das F6-Kompartiment nicht adäquat möglich.

## **5.5 Ausblick**

Die Behandlungsmöglichkeiten von Tumorerkrankungen haben sich in den letzten Jahren stark verbessert. Dies liegt maßgeblich an der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien, die darauf abzielen, zytotoxische Zellen des Immunsystems gegen Tumorzellen zu mobilisieren. Eine Form dieser Therapien sind die sogenannten BiTE-Antikörper („Bispezifische T-Zell-Engager“). Der erste zugelassene Wirkstoff aus dieser Gruppe nennt sich „Blinatumomab“ und ist zur Therapie der rezidivierenden bzw. therapierefraktären lymphoblastischen B-Zell Leukämie im Einsatz. Dieser BiTE-Antikörper bindet sowohl an das Oberflächenprotein CD19, welches auf B-Zellen, aber auch auf Leukämie- und Lymphomzellen exprimiert wird, als auch an die CD3-ε-Untereinheit des TZR (Nagorsen und Baeuerle 2011). Durch die Bindung an diese beiden Oberflächenstrukturen bewirkt der Antikörper eine räumliche Annäherung von Ziel- und T-Zelle, wodurch diese in der Folge aktiviert wird, eine zytotoxische Synapse ausbildet, Effektor-Kompartimente zielgerichtet

mobilisiert und schließlich die Apoptose der Zielzelle induziert (Nagorsen und Baeuerle 2011). Hierbei erfolgt die Erkennung unabhängig von der Spezifität des TZR. Eine weitere Neuentwicklung im Bereich der Tumortherapie sind die sogenannten CAR-T-Zellen (*Chimeric Antigen Receptor-T-Zellen*). Bei dieser Form der Immuntherapie werden T-Zellen gentechnisch so verändert, dass sie einen chimären antigenspezifischen Rezeptor exprimieren, der Tumorzell-assoziierte Antigene erkennt. CARs kombinieren so die Spezifität einer hochaffinen Erkennungsdomäne, die meist von einem monoklonalen Antikörper (mAb) stammt, mit den zytotoxischen Eigenschaften von T-Zellen, die in der Sekretion von zytotoxischen Effektormediatoren und pro-inflammatorische Zytokinen besteht (Labanieh et al. 2018). Mit CARs modifizierte T-Zellen (CAR-T-Zellen) haben eine sehr gute Wirksamkeit gegen hämatologische Malignome gezeigt. Derzeit wird an entsprechenden Therapien für solide Tumoren geforscht (Zhang et al. 2022).

Die Immunaktivierung, welche für die mit Blinatumomab und der CAR-T-Zelltherapie beobachtete Wirksamkeit entscheidend ist, ist auch für eine spezielle behandlungsbedingte Toxizität verantwortlich (Frey und Porter 2016). Diese systemische Immunreaktion nennt sich Zytokinfreisetzungssyndrom (auch „Zytokinsturm“ oder engl. *Cytokine-Release-Syndrom*, CRS) und ist ein potenziell lebensbedrohlicher Zustand, der mit der unphysiologischen Aktivierung von T-Zellen zusammenhängt. Es ist gekennzeichnet durch hohes Fieber, laborchemisch erhöhte Akute-Phase-Proteine (CRP, Ferritin) und Zytokinkonzentrationen (INF- $\gamma$ , IL-6) (Frey und Porter 2016). In seiner Maximalausprägung kann das CRS zu einem distributiven (durch Vasodilatation) Schock und zu respiratorischer Insuffizienz führen. Diese lebensbedrohliche Komplikation ist selten; wenn sie aber auftritt, stellt sie den therapielimitierenden Faktor dar.

Vor dem Hintergrund dieser unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist der Nachweis, dass es mindesten zwei unterschiedliche Entitäten von zytotoxischen Effektorvesikeln gibt, insofern von Bedeutung, da er die Möglichkeit nahelegt, dass T-Zellen kontextabhängig ein unterschiedliches, der Situation entsprechendes „Zelltodprogramm“ nutzen können. Diese Annahme könnte es zukünftig erlauben, Spezifität und Effektivität T-Zell-basierter Immuntherapien zielgerichtet zu beeinflussen und gleichzeitig assoziierte Nebenwirkungen, wie beispielsweise das CRS, zu minimieren.

In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass neben den klassischen CD8 $^{+}$  CTLs auch weitere T-Zellsubpopulationen die entsprechenden Effektorkompartimente ausbilden und diese sich in ihrer Beschaffenheit stark ähneln. Die untersuchten T-Zellsubpopulationen weisen unterschiedliche TZR auf und reagieren auf unterschiedliche Aktivierungssignale. Sie könnten daher, bei ähnlicher zytotoxischer Wirkung, zusätzliche Zielstrukturen für bispezifische Antikörper bieten und so ebenfalls Möglichkeiten zur Optimierung und besseren Verträglichkeit zielgerichteter Therapien wie Blinatumomab oder CAR-T-Zellen eröffnen.

Ein profunderes Verständnis über die sekretorischen zytotoxischen Vesikel von T-Zellen und deren Wirkweise sowie die Beantwortung der Frage, ob T-Zellen tatsächlich in unterschiedlichen Szenarien ein unterschiedliches Zelltodprogramm induzieren können, würde die Möglichkeit eröffnen, die Spezifität T-Zell-basierter Immuntherapien zu erhöhen, um die Verträglichkeit der bestehenden Therapien zu verbessern und damit größere Remissions- bzw. Heilungschancen zu bieten.

## **6 Zusammenfassung**

Zytotoxische T-Zellen eliminieren virusinfizierte oder transformierte Zellen durch den Einsatz von speziellen sekretorischen Vesikeln, die auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet werden. Diese mobilisierbaren intrazellulären Strukturen enthalten spezielle Effektormediatoren, die zur Apoptose in der Zielzelle führen. Dafür werden sie nach Ausbildung eines speziellen Zell-Zellkontaktes, den man zytotoxische Synapse nennt, lokal in die Zielzelle entlassen bzw. auf der Zelloberfläche der zytotoxischen Zelle exponiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es zwei biochemisch und morphologisch unterscheidbare Typen dieser intrazellulären Speicher- und Sekretionsstrukturen gibt. Einerseits die Fraktion 2-Vesikel, die den membranständigen Todesfaktor Fas-Ligand als zytotoxischen Faktor speichern, andererseits die sogenannten Fraktion 6-Granula, die vor allem lösliche Effektorproteine wie Granzyme, Perforin und die 9 kDa-Form des Granulysins speichern. Proteomanalysen unserer Arbeitsgruppe legten nahe, dass die unterschiedlichen Typen von Granula auch mit distinkten Zytoskelett-Proteinen assoziiert sind. Dies impliziert, dass die verschiedenen Organellen kontext-abhängig mobilisiert werden können und sich deren Freisetzungsmechanismen unterscheiden. Zur Analyse, ob unterschiedliche T-Zellsubpopulationen mit  $\alpha\beta$  T-Zellrezeptor (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) und  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor diese Effektorkompartimente in gleicher Weise enthalten, wurden angereicherte T-Zellen aus Leukozytenkonzentraten gesunder Spender verwendet. Die T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps wurden über etablierte Standardverfahren polyklonal aktiviert, expandiert, durchflusszytometrisch charakterisiert und im Anschluss die unterschiedlichen Granula mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Es wurden elektronenmikroskopische Bilder der beiden Entitäten von Effektorkompartimenten aller drei T-Zellsubpopulationen erstellt. Daneben wurden Westernblot-Analysen der klassischen Effektormediatoren durchgeführt und deren Verteilungsmuster innerhalb der 6 Fraktionen des Dichtegradienten und zwischen den T-Zellsubpopulationen durchgeführt. Anschließend wurden die drei T-Zellsubpopulationen mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese hinsichtlich des Proteoms der beiden distinkten Effektorkompartimente miteinander verglichen. Hierbei wurden maximal unterschiedlich abundante und aus Vorarbeiten als biologisch relevant klassifizierte Proteine näher analysiert. Die Analysen konnten die Hinweise aus Vorarbeiten bestätigen, dass mindestens zwei distinkte Speicher- und Sekretionsstrukturen sowohl in  $\alpha\beta$  als auch in  $\gamma\delta$  T-Zellen existieren und diese sich in ihrem Proteom zelltypübergreifend sehr stark ähneln. Die größten Ähnlichkeiten wiesen die FasL-tragenden Vesikel von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Unterschiede auf Proteinebene ergaben sich insbesondere unter den Cathepsinen und bei Stathmin 1, welches in den Fraktion 2-Vesikeln von CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich stärker abundant war. Übereinstimmung zeigte sich insbesondere bezüglich des Zytoskelettproteins

Moesin, welches in allen untersuchten T-Zelltypen in sehr ähnlichem Umfang nachgewiesen werden konnte.

## 7 Literatur

- Alter, G., Malenfant, J. M., Altfeld, M. (2004): CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods* 294 (1-2), 15–22
- Andzelm, M. M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J. S., Strominger, J. L. (2007): Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 2285–2291
- Antón, I. M., Lu, W., Mayer, B. J., Ramesh, N., Geha, R. S. (1998): The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20992–20995
- Aquino, A., Guest, P. C., Martins-de-Souza, D. (Hrsg.) (2017): Multiplex biomarker techniques methods and applications. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media LLC, New York
- Avery, L., Robertson, T. F., Wu, C. F., Roy, N. H., Chauvin, S. D., Perkey, E., Vanderbeck, A., Maillard, I., Burkhardt, J. K. (2021): A murine model of X-linked moesin-associated immunodeficiency (X-MAID) reveals defects in T cell homeostasis and migration. *Frontiers in immunology* 12, 726406
- Balaji, K. N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., Henkart, P. A. (2002): Surface cathepsin B protects cytotoxic cymphocytes from self-destruction after degranulation. *Journal of Experimental Medicine* 196, 493–503
- Baran, K., Ciccone, A., Peters, C., Yagita, H., Bird, P. I., Villadangos, J. A., Trapani, J. A. (2006): Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *Journal of Biological Chemistry* 281, 30485–30491
- Barry, M., Bleackley, R. C. (2002): Cytotoxic T lymphocytes. All roads lead to death. *Nature reviews. Immunology* 2, 401–409
- Blott, E. J., Griffiths, G. M. (2002): Secretory lysosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 122–131
- Bonneville, M., O'Brien, R. L., Born, W. K. (2010): Gammadelta T cell effector functions. A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews. Immunology* 10, 467–478
- Bowman, S. L., Bi-Karchin, J., Le, L., Marks, M. S. (2019): The road to lysosome-related organelles. Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic* 20, 404–435
- Chien, Y.-h., Meyer, C., Bonneville, M. (2014):  $\gamma\delta$  T cells. First line of defense and beyond. *Annual review of immunology* 32, 121–155
- 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. *Journal of immunology* 188, 6119–6126
- Cruikshank, W., Little, F. (2008): Interleukin-16. The ins and outs of regulating T-cell activation. *Critical reviews in immunology* 28, 467–483
- D'Angelo, M. E., Bird, P. I., Peters, C., Reinheckel, T., Trapani, J. A., Sutton, V. R. (2010): Cathepsin H is an additional convertase of pro-granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* 285, 20514–20519
- Dieckmann, N. M. G., Frazer, G. L., Asano, Y., Stinchcombe, J. C., Griffiths, G. M. (2016): The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. *Journal of cell science* 129, 2881–2886
- Ding, Z., Bae, Y. H., Roy, P. (2012): Molecular insights on context-specific role of profilin-1 in cell migration. *Cell adhesion & migration* 6, 442–449

- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G. S., Stoka, V., Turk, V., Turk, B. (2008): Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *Journal of Biological Chemistry* 283, 19140–19150
- Eskelinen, E.-L. (2006): Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular aspects of medicine* 27, 495–502
- Filbert, E. L., Le Borgne, M., Lin, J., Heuser, J. E., Shaw, A. S. (2012): Stathmin regulates microtubule dynamics and microtubule organizing center polarization in activated T cells. *Journal of immunology* 188, 5421–5427
- Frey, N. V., Porter, D. L. (2016): Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program* 1/2016, 567–572
- Fukuda, M. (1991): Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 266, 21327–21330
- Hébert, M., Potin, S., Sebbagh, M., Bertoglio, J., Bréard, J., Hamelin, J. (2008): Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *Journal of immunology* 181, 5963–5973
- 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. *Journal of immunology* 184, 555–563
- He, J.-S., Ostergaard, H. L. (2007): CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *Journal of immunology* 179, 2339–2348
- Holtmeier, W., Kabelitz, D. (2005): gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 86, 151–183
- Idevall-Hagren, O., Lü, A., Xie, B., Camilli, P. de (2015): Triggered Ca<sup>2+</sup> influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering. *The EMBO journal* 34, 2291–2305
- Kabelitz, D., Lettau, M., Janssen, O. (2017): Immunosurveillance by human γδ T lymphocytes. The emerging role of butyrophilins. *F1000Research* 6, 782–792
- Klemann, C., Wagner, L., Stephan, M., Hörsten, S. von (2016): Cut to the chase. A review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clinical and experimental immunology* 185 (1), 1–21
- Krensky, A. M., Clayberger, C. (2009): Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue antigens* 73, 193–198
- La Roche, M. de, Asano, Y., Griffiths, G. M. (2016): Origins of the cytolytic synapse. *Nature reviews Immunology* 16, 421–432
- Labanieh, L., Majzner, R. G., Mackall, C. L. (2018): Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nature biomedical engineering* 2, 377–391
- Lagresle-Peyrou, C., Luce, S., Ouchani, F., Soheili, T. S., Sadek, H., Chouteau, M., Durand, A., Pic, I., Majewski, J., Brouzes, C., Lambert, N., Bohineust, A., Verhoeven, E., Cosset, F.-L., Magerus-Chatinet, A., Rieux-Lauca, F., Gandemer, V., Monnier, D., Heijmans, C., van Gijn, M., Dalm, V. A., Mahlaoui, N., Stephan, J.-L., Picard, C., Durandy, A., Kracker, S., Hivroz, C., Jabado, N., Saint Basile, G. de, Fischer, A., Cavazzana, M., André-Schmutz, I. (2016): X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138, 1681–1689
- Lettau, M., Dietz, M., Vollmers, S., Armbrust, F., Peters, C., Dang, T. M., Chitadze, G., Kabelitz, D., Janssen, O. (2020): Degranulation of human cytotoxic lymphocytes is a major source of proteolytically active soluble CD26/DPP4. *Cellular and molecular life sciences* 77, 751–764

- Lettau, M., Dietz, M., Dohmen, K., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2019): Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles (LREV) and get mobilized by either classical or non-classical degranulation. *Molecular Immunology* 107, 44–53
- 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. *International immunology* 2018, 215–228
- Lettau, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2015): Lysosome-related effector vesicles in T lymphocytes and NK cells. *Scandinavian journal of immunology* 82, 235–243
- Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., Janssen, O. (2007): Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunology letters* 108 (1), 10–19
- Lieberman, J. (2010): Granzyme A activates another way to die. *Immunological reviews* 235 (1), 93–104
- Lowin, B., Mattman, C., Hahne, M., Tschoopp, J. (1996): Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *International immunology* 8 (1), 57–63
- Machado-Neto, J. A., Saad, S. T. O., Traina, F. (2014): Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB reports* 47, 660–665
- Marshall, N. B., Swain, S. L. (2011): Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *Journal of biomedicine & biotechnology Article-ID* 954602, 1–8
- Masson, D., Tschoopp, J. (1985): Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 260, 9069–9072
- Mijanović, O., Branković, A., Panin, A. N., Savchuk, S., Timashev, P., Ulasov, I., Lesniak, M. S. (2019): Cathepsin B. A sellword of cancer progression. *Cancer Letters* 449, 207–214
- Mort, J. S., Buttle, D. J. (1997): Cathepsin B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 715–720
- Murphy, K., Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie. 9. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg
- Nagata, S., Golstein, P. (1995): The Fas death factor. *Science* 267, 1449–1456
- Nagorsen, D., Baeuerle, P. A. (2011): Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Experimental cell research* 317, 1255–1260
- Nussbaumer, O., Thurnher, M. (2020): Functional phenotypes of human Vy9Vδ2 T cells in lymphoid stress surveillance. *Cells* 9, 772–786
- 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. *Cellular immunology* 181 (1), 93–100
- Öllinger, K., Appelqvist, H. (2017): Lysosomes. Methods and Protocols. Bd. 1594. Springer Science+Business Media LLC 2017, New York
- Onoda, K., Yu, F. X., Yin, H. L. (1993): gCap39 is a nuclear and cytoplasmic protein. *Cell motility and the cytoskeleton* 26, 227–238
- O'Sullivan, E., Kinnon, C., Brickell, P. (1999): Wiskott-Aldrich Syndrome protein, WASP. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 383–387
- Parameswaran, N., Gupta, N. (2013): Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration. *Immunological reviews* 256 (1), 63–79
- Peters, C., Kabelitz, D., Wesch, D. (2018): Regulatory functions of γδ T cells. *Cellular and molecular life sciences* 2018, 2125–2135
- Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krähenbühl, O., Tschoopp, J., Slot, J. W., Geuze, H. J. (1991): Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine* 173, 1099–1109

- Raposo, G., Marks, M. S., Cutler, D. F. (2007): Lysosome-related organelles. Driving post-Golgi compartments into specialisation. *Current opinion in cell biology* 19, 394–401
- Ribot, J. C., Ribeiro, S. T., Correia, D. V., Sousa, A. E., Silva-Santos, B. (2014): Human  $\gamma\delta$  thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling. *Journal of immunology* 192, 2237–2243
- Romagnani, S. (1999): Th1/Th2 cells. *Inflammatory bowel diseases* 5, 285–294
- Rossin, A., Miloro, G., Hueber, A.-O. (2019): TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases. Towards an Increasing Complexity. *Cancers* 11, 639–657
- Rousalova, I., Krepela, E. (2010): Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *International journal of oncology* 37, 1361–1378
- Rudd-Schmidt, J. A., Trapani, J. A., Voskoboinik, I. (2019): Distinguishing perforin-mediated lysis and granzyme-dependent apoptosis. *Methods in enzymology* 629, 291–306
- Russell, J. H., Ley, T. J. (2002): Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 20, 323–370
- Saheki, Y., Camilli, P. de (2017): The Extended-Synaptotagmins. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1864, 1490–1493
- Saint Basile, G. de, Ménasché, G., Fischer, A. (2010): Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews Immunology* 10, 568–579
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Lucius, R., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2011a): Effector granules in human T lymphocytes. Proteomic evidence for two distinct species of cytotoxic effector vesicles. *Journal of Proteome Research* 10, 1603–1620
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Lucius, R., Leippe, M., Kabelitz, D., Janssen, O. (2011b): Effector granules in human T lymphocytes. The luminal proteome of secretory lysosomes from human T cells. *Cell communication and signaling* 9, 1603–1620
- Schmidt, H. (2009a): Charakterisierung sekretorischer Lysosomen aus humanen T- und NK-Zellen. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Lucius, R., Nebendahl, M., Leippe, M., Janssen, O. (2009b): Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunology* 10 (41), 1–12
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Watzl, C., Kabelitz, D., Leippe, M., Janssen, O. (2008): 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics* 8, 2911–2925
- Shiromizu, C. M., Jancic, C. C. (2018):  $\gamma\delta$  T Lymphocytes. An effector cell in autoimmunity and infection. *Frontiers in immunology* 9, 2389–2397
- Sparrow, E., Bodman-Smith, M. D. (2020): Granulysin. The attractive side of a natural born killer. *Immunology letters* 217, 126–132
- Spicer, B. A., Conroy, P. J., Law, R. H. P., Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. (2017): Perforin–A key (shaped) weapon in the immunological arsenal. *Seminars in cell & developmental biology* 72, 117–123
- Stalder, T., Hahn, S., Erb, P. (1994): Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology* 152, 1127–1133
- Stenbeck, G. (1998): Soluble NSF-attachment proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 573–577
- Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., Tolosa, E. (2009): Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Experimental hematology* 37, 266–275

- Takeuchi, A., Saito, T. (2017): CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. *Frontiers in immunology* 8, 194.1-194.7
- Tannu, N. S., Hemby, S. E. (2006): Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nature protocols* 1, 1732–1742
- Trambas, C. M., Griffiths, G. M. (2003): Delivering the kiss of death. *Nature immunology* 4, 399–403
- Vantourout, P., Hayday, A. (2013): Six-of-the-best. Unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nature reviews Immunology* 13 (2), 88–100
- Veltman, D. M. , Insall, R. H. (2010): WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Molecular biology of the cell* 21, 2880–2893
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A. (2015): Perforin and granzymes. Function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews Immunology* 15, 388–400
- Wagner, L., Klemann, C., Stephan, M., Hörsten, S. von (2016): Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. *Clinical and experimental immunology* 184, 265–283
- Wilkinson, R. D. A., Williams, R., Scott, C. J., Burden, R. E. (2015): Cathepsin S. Therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biological chemistry* 396, 867–882
- Xiong, N., Raulet, D. H. (2007): Development and selection of gammadelta T cells. *Immunological reviews* 215, 15–31
- Zhang, Z.-Z., Wang, T., Wang, X.-F., Zhang, Y.-Q., Song, S.-X., Ma, C.-Q. (2022): Improving the ability of CAR-T cells to hit solid tumors. Challenges and strategies. *Pharmacological research* 175 (106036), 1–14
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W. E. (2010): Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology* 28, 445–489
- Zininga, T., Ramatsui, L., Shonhai, A. (2018): Heat shock proteins as immunomodulants. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (2846), 1–17

## **8 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 Herrn Prof. Dr. Ottmar Janßen dafür, dass er mir die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und an dem interessanten Forschungsthema ermöglicht hat. Ich danke ihm für seine außerordentlich gute Betreuung während meiner Laborarbeit, seine große Unterstützung bei der Vorbereitung der Kongressbeiträge und Präsentationen und seine Ruhe und Verlässlichkeit.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. Marcus Lettau bedanken, für seine bewundernswerte Fähigkeit, komplexe Themen verständlich zu erklären, für seine Ausdauer und Geduld, die offenbar grenzenlos sind, seine fachkundige Unterstützung während meiner Zeit im Labor und für seine hervorragenden Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge beim Verfassen dieser Arbeit.

Ina Martens danke ich für die kompetente und stetige Unterstützung im Labor, ihren Frohsinn, den sie scheinbar immer verbreitet, unsere vielen guten Gespräche und ihr offenes Ohr für mich und meine Arbeit.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Daniela Wesch und ihrer Arbeitsgruppe sowie Frau Dr. Steppat und ihrem Team aus dem Institut für Transfusionsmedizin bedanken, die für die reibungslose Organisation und Bereitstellung der Spenderlymphozyten und damit für die Materialgrundlage meiner Arbeit gesorgt haben.

Außerdem bedanke ich mich unbekannterweise bei Herrn Dr. Hendrik Schmidt und Frau Melanie Nebendahl, die mit ihrer Arbeit die Basis für mein Forschungsthema und damit auch der hier vorgestellten Ergebnisse gelegt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius und Herrn Dr. Philipp Arnold vom Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die gute Zusammenarbeit beim Erstellen der elektronenmikroskopischen Bilder.

Bei der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich mich für die Auswahl zur Stipendiatin des Promotionsstipendiums und das damit zum Ausdruck gebrachte Vertrauen in das Forschungsthema und die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Janßen bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und deren Partnern sowie meiner Schwester für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebensbereichen, für das große Vertrauen in mich und meine Entscheidungen und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann. Außerdem danke ich meinen Freunden, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen und mich bei meinen Vorhaben begleiten und bestärken.

## **9 Veröffentlichungen**

### **9.1 Zeitschriftenartikel**

Lettau M, Dietz M, Vollmers S, Armbrust F, Peters C, Dang TM, Chitadze G, Kabelitz D, Janssen O. “*Degranulation of human cytotoxic lymphocytes is a major source of proteolytically active soluble CD26/DPP4.*” *Cell Mol Life Sci.* 2020Feb;77(4):751-764. doi: 10.1007/s00018-019-03207-0.

Lettau M, Dietz M, Dohmen K, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O. “*Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles (LREV) and get mobilized by either classical or non-classical degranulation.*” *Mol Immunol.* 2019 Mar; 107:44-53. doi: 10.1016/j.molimm.2018.12.031.

Lettau M, Armbrust F, Dohmen K, Drews L, Poch T, Dietz M, Kabelitz D, Janssen O. “*Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human T cells.*” *Int Immunol.* 2018 Apr 25;30(5):215-228. doi: 10.1093/intimm/dxy007.

### **9.2 Tagungsbeiträge**

Lettau M., Dietz M., Dohmen K., Armbrust F., Poch T., Drews L., Janssen O.: Lysosomerelated 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.: Lysosomerelated 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

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß §7 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU), dass ich die vorgelegte Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janßen und PD Dr. Marcus Lettau selbstständig verfasst habe. Hierbei sind die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft eingehalten worden.

Ich versichere weiterhin, dass ich keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe und daraus entnommene wörtliche oder inhaltliche Stellen von mir als solche kenntlich gemacht wurden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Fachtagungen und in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Beurteilung vorgelegt.

Berlin, den 10.08.2023

Michelle Dietz