

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# **Charakterisierung einer neuartigen T-Zell Stimulation durch humane neutrophile Granulozyten**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Yagmur Bülbül**

geboren in Friedrichshafen

Mainz, Juli 2021

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 17.09.2021

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Yagmur Bülbül, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

*Für Oma Anne  
und  
meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>  | <b>XI</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis.....</b>  | <b>XIII</b> |
| <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>XIV</b>  |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>XVI</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Das humane Immunsystem .....</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1.1 Angeborenes Immunsystem .....  | 1           |
| 1.1.2 Adaptives Immunsystem.....   | 2           |
| <b>1.2 Granulozyten .....</b>  | <b>3</b>    |
| 1.2.1 Basophile Granulozyten .....   | 3           |
| 1.2.2 Eosinophile Granulozyten .....   | 4           |
| 1.2.3 Neutrophile Granulozyten .....   | 4           |
| 1.2.3.1 Granulopoese .....   | 4           |
| 1.2.3.2 Granula der neutrophilen Granulozyten .....  | 6           |
| 1.2.3.3 Funktionen der neutrophilen Granulozyten .....   | 7           |
| 1.2.4 Rolle neutrophiler Granulozyten im Tumor.....  | 8           |
| 1.2.4.1 Pro-Tumorale Effekte tumor-assoziiertes neutrophiler Granulozyten .....                | 9           |
| 1.2.4.2 Anti-Tumorale Effekte tumor-assoziiertes neutrophiler Granulozyten .....               | 11          |
| <b>1.3 T-Zellen .....</b>  | <b>13</b>   |
| 1.3.1 Lymphopoese der T-Zellen.....  | 13          |
| 1.3.2 T-Zellrezeptor .....   | 13          |
| 1.3.3 Aktivierung der T-Zellen .....   | 14          |
| 1.3.4 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....  | 15          |
| 1.3.4.1 Typ 1 T-Helferzellen (Th1) .....   | 16          |
| 1.3.4.2 Typ 2 T-Helferzellen (Th2) .....   | 16          |
| 1.3.4.3 Typ 9 T-Helferzellen (Th9) .....   | 17          |
| 1.3.4.4 Typ 17 T-Helferzellen (Th17) .....   | 17          |
| 1.3.4.5 Follikuläre T-Helferzellen (Thf) .....   | 18          |
| 1.3.4.6 Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) und regulatorische Typ 1 Zellen (Tr1) ..... | 18          |
| 1.3.5 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....  | 19          |
| 1.3.6 T-Gedächtniszellen.....  | 20          |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.3.7 T-Zellen und PMN: Freunde oder Feinde? .....             | 20        |
| <b>1.4 Die Aminosäure Arginin .....</b>                        | <b>24</b> |
| 1.4.1 Arginase.....  | 25        |
| 1.4.2 Arginase 1 Inhibitoren.....                              | 26        |
| 1.4.2.1 N <sup>o</sup> -Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA) ..... | 26        |
| 1.4.2.2 INCB001158 .....                                       | 27        |
| <b>1.5 Multiples Myelom.....</b>                               | <b>29</b> |
| 1.5.1 Epidemiologie.....                                       | 29        |
| 1.5.2 Symptome und Diagnose .....                              | 29        |
| 1.5.3 Therapie des MM .....                                    | 30        |
| 1.5.3.1 Erstlinientherapie .....                               | 30        |
| 1.5.3.2 Rezidivtherapie.....                                   | 30        |
| 1.5.4 Prognose des MM .....                                    | 31        |
| 1.5.5 Anergie T-Zellen im MM .....                             | 31        |
| <b>2. Materialien .....</b>                                    | <b>32</b> |
| <b>2.1 Zelllinien und Medien .....</b>                         | <b>32</b> |
| 2.1.1 Zelllinien.....  | 32        |
| 2.1.2 Medien und Zusätze.....                                  | 32        |
| <b>2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer .....</b>              | <b>34</b> |
| 2.2.1 Chemikalien.....   | 34        |
| 2.2.2 Lösungen und Puffer .....                                | 36        |
| 2.2.3 Kits.....  | 37        |
| <b>2.3 Antikörper .....</b>                                    | <b>38</b> |
| 2.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....             | 38        |
| 2.3.2 Antikörper für den Western Blot .....                    | 38        |
| <b>2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</b>               | <b>39</b> |
| 2.4.1 Geräte und Gegenstände .....                             | 39        |
| 2.4.2 Verbrauchsmaterialien.....                               | 40        |
| <b>2.5 Software und Statistik.....</b>                         | <b>42</b> |
| <b>2.6 Ethikantrag.....</b>                                    | <b>42</b> |
| <b>3. Methoden.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>3.1 Methoden der Zellisolationen aus Vollblut .....</b>     | <b>43</b> |
| 3.1.1 Isolierung der Granulozyten .....                        | 43        |
| 3.1.2 Isolierung der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen.....            | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.3 Isolierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....                              | 44        |
| <b>3.2 Zellbiologische Methoden .....</b>  | <b>45</b> |
| 3.2.1 Kultivierung der T-Zellen.....   | 45        |
| 3.2.2 Kultivierung der NCI H929.....   | 45        |
| 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl von PBMC.....                                      | 45        |
| 3.2.4 Kryokonservierung .....  | 45        |
| 3.2.5 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen.....                             | 46        |
| 3.2.5.1 Transfektion der Phoenix Ampho Zellen.....                               | 46        |
| 3.2.5.2 Transduktion humaner PBMC .....  | 46        |
| 3.2.5.3 Restimulation transduzierter T-Zellen.....                               | 46        |
| 3.2.6 Ansetzen der Versuchsbedingungen .....                                     | 47        |
| 3.2.6.1 PMN-Sonikate.....  | 47        |
| 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen: Generierung von PMN-Überständen (PMN-ÜS).....       | 47        |
| 3.2.6.3 Direkte Co-Kultur von T-Zellen und PMN.....                              | 48        |
| 3.2.6.4 TransWell Kultur von T-Zellen und PMN.....                               | 48        |
| <b>3.3 Methoden der Durchflusszytometrie .....</b>                               | <b>49</b> |
| 3.3.1 Funktionsprinzip.....  | 49        |
| 3.3.2 Charakterisierung der Zellpopulationen .....                               | 49        |
| 3.3.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) .....                            | 50        |
| 3.3.4 Messung früh- bzw. spät-apoptotischer Zellen .....                         | 51        |
| <b>3.4 Biochemische Methoden.....</b>  | <b>52</b> |
| 3.4.1 Proliferationsassay mit <sup>3</sup> H-Thymidin.....                       | 52        |
| 3.4.2 Proliferationsassay mit MTS .....  | 52        |
| 3.4.3 T-Zellmetabolismus mittels Agilent Seahorse.....                           | 52        |
| 3.4.4 Cytospin-Proben.....   | 54        |
| 3.4.5 Luciferase Assay .....   | 55        |
| 3.4.6 Herstellung der T-Zelllysate .....   | 57        |
| 3.4.7 Herstellung der PMN-Sonikate .....   | 57        |
| 3.4.8 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry .....                           | 58        |
| 3.4.9 Messung der Arginase 1 Aktivität .....                                     | 58        |
| 3.4.10 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)..... | 59        |
| 3.4.11 Western Blot .....  | 59        |
| <b>3.5 Methoden der OMICS-Versuche .....</b>                                     | <b>61</b> |
| 3.5.1 Proteom-Analyse.....   | 61        |
| 3.5.2 Metabolom-Analyse.....   | 61        |
| 3.5.2.1 Ultra-Filtrationen der PMN-ÜS.....                                       | 61        |
| 3.5.2.2 Fraktionierung der 3 kDa Proben .....                                    | 62        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5.2.3 [ <sup>3</sup> H]Thymidin-Proliferationsassay der lyophilisierten Fraktionen .....   | 62         |
| 3.5.2.4 Massenspektrometrie der lyophilisierten Fraktionen.....  | 63         |
| <b>4. Ergebnisse.....</b>  | <b>64</b>  |
| <b>4.1 Starke Stimulation der Proliferation von T-Zellen durch humane neutrophile Granulozyten-Sonikate.....</b>   | <b>64</b>  |
| 4.1.1 Kultivierung von T-Zellen gesunder Spender in RPMI Medium mit Zugabe von PMN-Sonikat oder rekombinanter Arginase 1 .....                           | 64         |
| 4.1.2 Kultivierung von T-Zellen gesunder Spender in PMN-Überstand.....   | 66         |
| 4.1.3 Kultivierung aneurer T-Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom in PMN-Überstand.....   | 67         |
| 4.1.4 Kultivierung der Myelomzelllinie NCI A2 in PMN-ÜS.....   | 69         |
| <b>4.2 Vergleich verschiedener T-Zell- und PMN-Kulturbedingungen .....</b>   | <b>71</b>  |
| 4.2.1 Frisch isolierte T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen nach 3-tägiger Kultur.....  | 71         |
| 4.2.2 Vergleich der T-Zellkultur in PMN-ÜS mit der Co-Kultur und Transwell-Kultur .....  | 74         |
| <b>4.3 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN ist argininabhängig.....</b>  | <b>77</b>  |
| 4.3.1 Bestimmung der Argininkonzentration in PMN-ÜS vor und nach 48 h T-Zellkultur .....   | 77         |
| 4.3.2 Bestimmung der Argininkonzentration nach 48 h Co-Kultur von T-Zellen mit PMN .....   | 79         |
| 4.3.3 Argininzugabe in die fertigen PMN-ÜS führt zur Rekonstitution der T-Zellproliferation, nicht aber zu einer noch stärkeren Hyperproliferation ..... | 80         |
| <b>4.4 Die immunstimulierende Aktivität der PMN ist sehr hitzestabil, hat ein Molekulargewicht &lt; 3 kDa und ist stark hydrophil .....</b>              | <b>82</b>  |
| 4.4.1 Hitzestabilität der hyperaktivierenden PMN-ÜS .....  | 82         |
| 4.4.2 Eingrenzung des Molekulargewichtes: 3 kDa und 10 kDa Ultrafiltrationen der PMN-ÜS.....   | 83         |
| 4.4.3 Reversed Phase Chromatographie der 3 kDa Überstände .....  | 87         |
| 4.4.4 Metabolomics der < 3 kDa Fraktionen.....   | 90         |
| <b>4.5 Auswirkungen der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zellen .....</b>  | <b>92</b>  |
| 4.5.1 Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen .....   | 92         |
| 4.5.2 Untersuchung des Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen .....  | 93         |
| 4.5.3 Untersuchung der ROS Produktion in T-Zellen .....  | 97         |
| 4.5.4 Untersuchung des Zytokinprofils hyperaktivierter T-Zellen .....  | 101        |
| 4.5.5 Untersuchung der Zytotoxizität der hyperaktivierten T-Zellen .....   | 103        |
| 4.5.6 Untersuchung der Viabilität hyperaktivierter T-Zellen .....  | 107        |
| 4.5.7 Proteomanalyse hyperaktivierter T-Zellen .....   | 110        |
| <b>5. Diskussion.....</b>  | <b>112</b> |
| <b>5.1 Starke Stimulation der Proliferation von T-Zellen durch humane neutrophile Granulozyten-Überstände .....</b>                                      | <b>112</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>5.2 Vergleich verschiedener T-Zellen und PMN Kulturen in Abhängigkeit der Arginase 1</b>   |            |
| <b>Inhibition .....</b>   | <b>117</b> |
| <b>5.3 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN ist argininabhängig .....</b>  | <b>120</b> |
| <b>5.4 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN beruht auf stark hydrophilen und hitzebeständigen Molekülen mit einem Molekulargewicht &lt; 3 kDa.....</b> | <b>122</b> |
| <b>5.5 Auswirkungen der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zellen .....</b>   | <b>125</b> |
| 5.5.1 Morphologie hyperaktivierter T-Zellen.....  | 125        |
| 5.5.2 Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen.....   | 126        |
| 5.5.3 ROS-Produktion in hyperaktivierten T-Zellen .....   | 127        |
| 5.5.4 Zytokinprofil hyperaktivierter T-Zellen .....   | 129        |
| 5.5.5 Zytotoxizität hyperaktivierter T-Zellen .....   | 130        |
| 5.5.6 Viabilität hyperaktivierter T-Zellen .....  | 131        |
| 5.5.7 Proteomanalyse hyperaktivierter T-Zellen .....  | 133        |
| <b>6. Ausblick .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>137</b> |
| <b>8. Anhang .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>Danksagung .....</b>   | <b>159</b> |
| <b>LEBENS LAUF .....</b>  | <b>160</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| AK              | Antikörper   |
| °C              | Grad Celsius   |
| <sup>2</sup> H  | Deuterium  |
| <sup>3</sup> H  | Tritium  |
| Abb.            | Abbildung  |
| ABH             | <i>2-Amino-6-boronoheptanoic acid</i>                |
| ABS             | Humanes AB-Serum                                     |
| ADC             | Arginindecaboxylase                                  |
| ADCC            | <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> |
| AG              | Antigen  |
| AGAT            | Arginin:Glycin-Amidino-transferase                   |
| AK              | Antikörper   |
| APC             | Antigenpräsentierende Zelle                          |
| Arg             | Arginin  |
| Arg 1           | Arginase 1   |
| ASL             | Argininosuccinat-Lysase                              |
| ASNS            | Asparaginsynthetase                                  |
| ASS1            | Argininosuccinat-Synthase-1                          |
| ATP             | Adenosintriphosphat                                  |
| BEC             | S-(2-boronoethyl)-L-cystein                          |
| BSA             | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )   |
| Ca              | Karzinom   |
| CAT             | Kationischer Aminosäuretransporter                   |
| CB              | INCB001158   |
| CBA             | <i>Cytokine Bead Array</i>                           |
| CCL             | Chemokin, C-C Motif Ligand                           |
| CD              | <i>Cluster of Differentiation</i>                    |
| cDNA            | Komplementäre DNA                                    |
| cm <sup>2</sup> | Quadratcentimeter                                    |
| CML             | Chronisch myeloischer Leukämie                       |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                                    |
| cpm             | <i>Counts per minute</i>                             |
| CTLA-4          | <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>   |
| CXCL            | CXC-Motiv-Chemokin                                   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| CXCR                 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor                                    |
| DC                   | Dendritische Zelle  |
| dH <sub>2</sub> O    | Deionisiertes Wasser  |
| DMEM                 | Dulbecco's <i>Modified Eagle's Medium</i>                     |
| DMSO                 | Dimethylsulfoxid  |
| DPBS                 | Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i>                   |
| DPBST                | Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> mit 0,1% Tween-20 |
| ECAR                 | Extrazelluläre Ansäuerungsrate                                |
| ECL                  | <i>Enhanced Chemiluminescence</i> Reagenz                     |
| EDTA                 | Ethylendiamintetraacetat                                      |
| EPO                  | Eosinophile Peroxidase  |
| EtOH                 | Ethanol   |
| FACS                 | <i>Fluoreszent activated cell sorting</i>                     |
| FCCP                 | Trifluoromethoxy Carbocyanid Phenylhydrazon                   |
| FCS                  | Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )               |
| FITC                 | Fluoresceinisothiocyanat                                      |
| fMLP                 | Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin                          |
| FSC                  | <i>Forward scatter</i>  |
| FT                   | <i>Flow through</i>   |
| g                    | Gravitationskonstante   |
| G-CSFR               | Rezeptor des Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktors       |
| GAPDH                | Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase                      |
| GDP                  | Guanosindiphosphat  |
| GM-CSF               | Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor         |
| GMP                  | Granulozyten-Monozyten Progenitorzelle                        |
| GPCR                 | G-Protein gekoppelter Rezeptor                                |
| GTP                  | Guanosintriphosphat   |
| h                    | Stunden ( <i>hours</i> )                                      |
| H <sub>2</sub> DCF   | 2',7'-Dichlorfluorescein                                      |
| H <sub>2</sub> DCFDA | 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat                      |
| HCl                  | Salzsäure   |
| HDCT                 | Hochdosischemotherapie  |
| HILIC                | <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>          |
| HLA II               | <i>Human leucocyte antigen II</i>                             |
| HPLC                 | <i>High performance liquid chromatography</i>                 |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HRP               | Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )              |
| HSP               | Hitzeschockprotein  |
| IFN- $\gamma$     | Interferon-gamma  |
| Ig                | Immunglobulin   |
| IgG               | Immunglobulin G   |
| IL                | Interleukin   |
| INCB001158        | Arginase I Inhibitor Calithera Biosciences                            |
| iTreg             | Induzierbare regulatorische T-Zelle                                   |
| kb                | Kilobasen   |
| kDa               | Kilodalton  |
| L-Gln             | L-Glutamin  |
| L-Leu             | L-Leucin  |
| L-Lys             | L-Lysin   |
| LAT               | L-Typ Aminosäuretransporter   |
| LC-MS             | Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung          |
| LPS               | Lipopolysaccharid   |
| M                 | Molar   |
| MDSC              | Myeloische Suppressorzelle ( <i>Myeloid-derived suppressor cell</i> ) |
| MeOH              | Methanol  |
| MFI               | Mittlere Fluoreszenzintensität  |
| MGUS              | Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz                          |
| MHC               | <i>Major histocompatibility complex</i>                               |
| min               | Minuten   |
| Mio.              | Millionen   |
| mL                | Milliliter  |
| MM                | Multiplres Myelom   |
| MMP-9             | Matrix-Metalloprotease 9  |
| MnCl <sub>2</sub> | Mangan(II)-chlorid  |
| MPO               | Myeloperoxidase   |
| MPP               | Multipotent progenitor  |
| mRNA              | Messenger RNA   |
| mU                | Milliunit   |
| N                 | Nor-NOHA  |
| N1                | Pro-tumorale TAN  |
| N2                | Anti-tumorale TAN   |

|                              |   |
|------------------------------|---|
| NAC                          | N-Acetylcystein   |
| NADPH                        | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat                                  |
| NET                          | <i>Neutrophil extracellular traps</i>                                 |
| Nf-kB                        | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NK-Zellen                    | Natürliche Killerzellen   |
| nm                           | Nanometer   |
| NO                           | Stickstoffmonoxid   |
| NOHA                         | N-Hydroxy-L-Arginin   |
| nor-NOHA                     | N <sup>w</sup> -Hydroxy-nor-L-Arginin                                 |
| NOS                          | NO-Synthase   |
| O <sub>2</sub>               | Sauerstoff  |
| O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> | Superoxidanion  |
| OCR                          | Sauerstoffverbrauchsrate ( <i>oxygen consumption rate</i> )           |
| PAGE                         | Polyacrylamidgelelektrophorese  |
| PAMP                         | Pathogen-assoziierte molekulare Muster                                |
| PBMC                         | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>                             |
| PBS                          | Phosphatgepufferte Salzlösung   |
| PCR                          | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )        |
| PD-1                         | <i>Programmed cell death protein 1</i>                                |
| PD-L1                        | <i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>                       |
| PE                           | Phycoerythrin   |
| Pen/Strep                    | Penicillin/Streptomycin   |
| pg                           | Picogramm   |
| PI                           | Propidiumiodid  |
| PLC                          | Phospholipase C   |
| PMA                          | Phorbol-12-myristat-13-acetat   |
| PMN                          | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten                             |
| PMN-S                        | Sonikate der Neutrophilen   |
| PMN-ÜS                       | Überstand der Neutrophilen  |
| pmol                         | Picomol   |
| PMSF                         | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| RNA                          | Ribonukleinsäure  |
| ROS                          | Reaktive Sauerstoffspezies  |
| RPMI                         | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                                |
| RT                           | Raumtemperatur  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| SDS             | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )                      |
| SDS-PAGE        | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>            |
| sec             | Sekunden ( <i>seconds</i> )   |
| SMM             | <i>Smoldering myeloma</i>   |
| SSC             | <i>Sideward scatter</i>   |
| ST-HSC          | <i>Short-term hematopoietic stem cell</i>                                   |
| STAT3           | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>                   |
| SV              | Sekretorische Vesikel   |
| TAN             | Tumor-assoziierte Neutrophile   |
| TBS             | Trisgepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered Saline</i> )                   |
| TBST            | Trisgepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered Saline</i> ) mit 0,1% Tween-20 |
| T <sub>CM</sub> | Zentrale Gedächtniszellen   |
| TCR             | T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )                                   |
| T <sub>EM</sub> | Effektorgedächtniszellen  |
| TEMED           | N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin   |
| Tfh             | Follikuläre T-Helferzelle   |
| TGF- $\beta$    | <i>Transforming growth factor beta</i>                                      |
| Th              | T-Helferzelle   |
| TLR             | Toll-like Rezeptor  |
| TMEM            | Transmembranprotein   |
| TNF- $\alpha$   | <i>Tumor necrosis factor alpha</i>  |
| Tris            | Tris(hydroxymethyl)-aminoethan  |
| T <sub>RM</sub> | Gewebsgedächtniszellen  |
| V               | Volt  |
| VEGF            | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor                                    |
| WB              | Western Blot  |
| $\mu$ g         | Mikrogramm  |
| $\mu$ L         | Mikroliter  |
| $\mu$ M         | Mikromolar  |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Färbung von Granulozyten im Blutausschlag nach Pappenheim. ....  | 3  |
| Abbildung 2: Entstehung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark.....   | 5  |
| Abbildung 3: Gegensätzliche Eigenschaften von PMN in Tumorerkrankungen.....   | 10 |
| Abbildung 4: Aufbau eines T-Zellrezeptors.....  | 14 |
| Abbildung 5: Struktur des CD4-Rezeptormoleküls. ....  | 15 |
| Abbildung 6: Struktur des CD8-Rezeptormoleküls. ....  | 19 |
| Abbildung 7: Strukturelle Darstellung von L-Arginin, NOHA und nor-NOHA. ....  | 26 |
| Abbildung 8: Pipettierschema für <i>Seahorse Energy Phenotype Test</i> .....  | 54 |
| Abbildung 9: Bestandteile und Aufbau der Cytospin-Apparatur. ....   | 55 |
| Abbildung 10: Pipettierschema für den Luciferase Assay .....  | 56 |
| Abbildung 11: Die Proliferation von T-Zellen gesunder Spender wird durch PMN-Sonikat mit ARG 1 Inhibitoren mäßig aktiviert. ....                    | 65 |
| Abbildung 12: Die Proliferation von T-Zellen gesunder Spender wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitor stark aktiviert. ....                           | 66 |
| Abbildung 13: Die Proliferation aneurer T-Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitoren stark aktiviert. ....   | 68 |
| Abbildung 14: Die Proliferation der Myelomzelllinie NCI A2 wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitor rekonstituiert, aber nicht verstärkt.....          | 69 |
| Abbildung 15: Auch frisch isolierte T-Lymphozyten werden durch PMN-ÜS + Inhibitor hyperaktiviert.   |    |
| Abbildung 16: Eine Co-Inkubation der T-Zellen mit PMN führt zu einer Proliferationshemmung, die durch ARG 1 Inhibition nicht beeinflusst wird. .... | 73 |
| Abbildung 17: In TransWell-Kulturen mit PMN wird eine Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten induziert.....                           | 76 |
| Abbildung 18: Ausgeprägte Arginindepletion in PMN-ÜS nach 72 h Vorinkubation. ....  | 78 |
| Abbildung 19: Nur geringe Arginindepletion nach 48 h Co-Kultur. ....  | 80 |
| Abbildung 20: Arginin wird für den immunstimulierenden Effekt der PMN gebraucht. ....   | 81 |
| Abbildung 21: T-Zell immunstimulierende Aktivität im PMN-ÜS ist sehr hitzestabil. ....  | 82 |
| Abbildung 22: Die Hyperaktivierung von T-Zellen benötigt Faktor(en) im PMN-ÜS mit einem Molekulargewicht < 10 kDa.....                              | 84 |
| Abbildung 23: Die T-Zell immunstimulierende Aktivität im PMN-ÜS findet sich in der Fraktion mit einem Molekulargewicht < 3 kDa. ....                | 86 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 24: T-Zell immunstimulierende Aktivität im 3 kDa PMN-ÜS findet sich in der hydrophilen Fraktion. ....  | 89  |
| Abbildung 25: Graphische Darstellung der ersten Analyse der Metabolom Daten. ....  | 91  |
| Abbildung 26: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine ausgeprägt immunoblastische Morphologie auf. ....   | 93  |
| Abbildung 27: Hyperaktivierte T-Zellen haben einen verstärkten Metabolismus. ....  | 94  |
| Abbildung 28: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine stark erhöhte oxidative Zellatmung sowie Glykolyse auf. ....  | 96  |
| Abbildung 29: Erhöhte ROS-Produktion in T-Zellen durch PMN-ÜS. ....  | 99  |
| Abbildung 30: Die ROS-Produktion in T-Zellen nimmt im Kontext einer Co-Kultur mit PMN mit steigender Anzahl an PMN ab. ....  | 101 |
| Abbildung 31: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine verstärkte Sekretion von IL-5, IL-9 und IL-17 auf. ....   | 102 |
| Abbildung 32: Hyperaktivierte T-Zellen zeigen eine verstärkte antigenspezifische Zytotoxizität. ....   | 105 |
| Abbildung 33: Hyperaktivierte T-Zellen weisen ein verbesserte Viabilität auf. ....   | 107 |
| Abbildung 34: Verstärkte Expression der <i>cleaved</i> Caspase 3 in hyperaktivierten T-Zellen, jedoch keine erhöhte Expression pro- oder anti-apoptotischer Proteine. .... | 109 |
| Abbildung 35: Netzwerk Diagramm der Proteomdaten. ....   | 111 |
| Abbildung 36: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse. ....  | 135 |



## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Einfluss neutrophiler Granula auf die T-Zellimmunität..... | 23 |
| Tabelle 2: CRAB-Kriterien .....                                       | 30 |
| Tabelle 3: SLiM-Kriterien.....  | 30 |
| Tabelle 4: Verwendete Medien und Zusätze .....                        | 32 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung der angesetzten Medien .....               | 33 |
| Tabelle 6: Verwendete Chemikalien .....                               | 34 |
| Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer .....                       | 36 |
| Tabelle 8: Verwendete Kits .....                                      | 37 |
| Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie .....   | 38 |
| Tabelle 10: Verwendete Isotypen für die Durchflusszytometrie.....     | 38 |
| Tabelle 11: Verwendete Antikörper für den Western Blot .....          | 38 |
| Tabelle 12: Verwendete Geräte und Gegenstände .....                   | 39 |
| Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....                    | 40 |
| Tabelle 14: Verwendete Software .....                                 | 42 |
| Tabelle 15: P-Werte.....  | 42 |

## Zusammenfassung

Die Immuntherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen gilt als Durchbruch in der Medizin und stellt neben der Chemotherapie, der Bestrahlung und der Chirurgie eine weitere Therapiesäule dar. Dennoch bleiben maligne Tumorerkrankungen aufgrund ihrer sogenannten „Tumor Evasions-Mechanismen“ schwer therapierbar. Die Expression des Arginin-hydrolysierenden Enzyms Arginase 1 stellt einen dieser Evasions-Mechanismen dar. Myeloische Zellen, die vom Tumor rekrutiert werden, exprimieren Arginase 1 und depletieren konsekutiv Arginin im Tumormilieu. Da T-Zellen suffiziente Mengen der Aminosäure Arginin benötigen, um bei Aktivierung ihre Funktionen ausüben zu können, werden sie im Tumorgewebe durch den Argininmangel stark inhibiert. Zu den von Tumoren rekrutierten myeloischen Zellen zählen insbesondere auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), die eine konstitutive Arginase 1 Expression aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Arginase-Inhibition humaner PMN auf aktivierte T-Zellen untersucht. Dabei wurde erstmalig ein stark immunstimulierender Effekt von PMN auf T-Zellen beschrieben, wobei hohe PMN-Dichten und eine ausreichende Argininkonzentration erforderlich waren. Letzteres wurde entweder durch die Inhibition der Arginase 1 mit nor-NOHA oder INCB001158, oder mit der Supplementierung ausreichender Mengen Arginin gewährleistet. Die Charakterisierung des PMN-Überstandes (PMN-ÜS) zeigte, dass der immunstimulierende Faktor ein Molekulargewicht  $< 3$  kDa aufweist, stark hydrophil und sehr hitzestabil ist. Erste Auswertungen der Metabolomanalysen der PMN-ÜS deuteten darauf hin, dass es sich bei der gesuchten Substanz um Dipeptide oder Aminosäurederivate handeln könnte. Diese Ergebnisse werden in laufenden Follow-up Experimenten näher untersucht.

Durch die immunstimulierende Hyperaktivierung von T-Zellen konnten bis zu 20-fach höhere Proliferationswerte bei deutlich verbesserter Viabilität beobachtet werden. Eine ausgeprägt aktivierte Morphologie dieser T-Zellen war assoziiert mit einem stark erhöhten Metabolismus, sowohl der oxidativen Phosphorylierung wie auch der aeroben Glykolyse. Des Weiteren konnte eine verstärkte Synthese von Interleukin-5 (IL-5), IL-9 und IL-17 beobachtet werden. Hyperaktivierte T-Zellen zeigten eine schnellere und stärkere anti-tumorale Zytotoxizität als konventionell aktivierte T-Zellen. Diese Beobachtungen konnten zusätzlich mittels Proteomanalyse hyperaktivierter T-Zellen bestätigt werden: erste Auswertungen dieser Daten zeigten eine erhöhte Expression von Proteinen, die an Zellteilung und Zellzyklus, sowie der Biosynthese und dem Metabolismus von Aminosäuren in hyperaktivierten T-Zellen beteiligt sind.

Von großer klinisch-translationaler Bedeutung ist auch, dass anerge und seneszente T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom durch die PMN-sezernierte immunstimulierende Aktivität unter gleichzeitiger Arginase 1-Inhibition sehr stark (re-)aktiviert werden konnten. Diese Beobachtung könnte eine wichtige Ergänzung für Immuntherapien werden, da die durch myeloische Suppressorzellen herbeigeführte T-Zellanergie ein häufig auftretendes Problem für die Anwendung einer Immuntherapie darstellt. So wird ein Arginase-Inhibitor als neuartiges Therapeutikum zur Inhibition der Tumor-induzierten Immunevasion aktuell bereits in frühen klinischen Studien evaluiert.

## Abstract

Immunotherapy for the treatment of tumor diseases is considered a breakthrough in medicine and represents a further therapeutic pillar alongside chemotherapy, radiation and surgery. Nevertheless, malignant tumors remain difficult to treat due to their so-called "tumor evasion mechanisms". Expression of the arginine-hydrolyzing enzyme arginase 1 represents one of these evasion mechanisms. Myeloid cells recruited by the tumor express arginase 1 and consecutively deplete arginine in the tumor milieu. Since T cells require sufficient amounts of the amino acid arginine to exert their various functions upon activation, they are severely inhibited in tumor tissue by arginine deficiency. These circumstances finally induce T cells which become increasingly senescent or exhausted. Myeloid cells recruited by tumors include polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN), which exhibit constitutive arginase 1 expression. In the present work, the effects of arginase inhibition of human PMN on activated T cells were investigated. Here, for the first time, a strong immunostimulatory effect of PMN on T cells was described, requiring high PMN densities and sufficient arginine concentration. The latter was ensured either by inhibition of arginase 1 with nor-NOHA or INCB001158, or with supplementation of sufficient amounts of arginine. Characterization of the PMN supernatant (PMN-SN) showed that the immunostimulatory factor has a molecular weight < 3 kDa, is highly hydrophilic, and is very heat stable. Preliminary evaluations of the metabolomic analyses of PMN-SN indicated that dipeptides or amino acid derivatives potentially qualify as the unknown hyperactivating substance. These results are being further investigated in ongoing follow-up experiments.

Immunostimulatory hyperactivation of T cells resulted in up to 20-fold higher proliferation levels with significantly improved viability. A markedly activated morphology of these T cells was associated with a strongly increased metabolism, both of oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis. Furthermore, enhanced interleukin-5 (IL-5), IL-9, and IL-17 synthesis was observed. Hyperactivated T cells showed a faster and stronger anti-tumor cytotoxicity than conventionally activated T cells. These observations were further confirmed by proteomic analysis of hyperactivated T cells: initial analysis of these data showed increased expression of proteins involved in cell division and cell cycle, as well as biosynthesis and metabolism of amino acids in hyperactivated T cells.

It is also of great clinical-translational importance that anergic and senescent T cells from multiple myeloma patients could be very strongly (re-)activated by PMN-secreted immunostimulatory activity under concomitant arginase 1 inhibition. This observation could become an important adjunct for immunotherapies, as T-cell anergy induced by myeloid-

derived suppressor cells is a common problem for the application of immunotherapy. Thus, an arginase inhibitor is currently being evaluated as a novel therapeutic agent for inhibition of tumor-induced immune evasion in early clinical trial.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Im Allgemeinen wird das Immunsystem in die unspezifische angeborene und die im Wesentlichen postnatal ausreifende spezifische Immunabwehr unterteilt. Neben dem Knochenmark, sind Milz, Thymus und Lymphknoten als lymphatische Gewebe zentrale Komponenten des Immunsystems.

Immunzellen gehen aus einer von zwei Hauptlinien der Blutbildung im Knochenmark hervor: der myeloischen und lymphatischen Linie. Hauptvertreter der myeloischen Zellreihe sind Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, wohingegen T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die wesentlichen lymphatischen Zelltypen bilden. Dendritische Zellen (DC) können aus beiden Hauptlinien hervorgehen und werden dementsprechend myeloische DC (mDC) oder plasmazytoide DC (pDC) genannt.

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene oder auch unspezifische Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegen Fremdkörper und setzt sich aus verschiedenen Abwehrmechanismen zusammen. Die erste Barriere für Krankheitserreger stellen die Haut und die Schleimhäute der Nase, des Mundes, sowie von einigen inneren Organen dar. Des Weiteren bilden zelluläre Mechanismen, bestehend aus Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und DCs einen weiteren Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Im Blutplasma enthaltene Proteine, wie Interleukine oder das Komplementsystem werden als humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems bezeichnet [1, 2].

Hoch konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die spezifisch für Bakterien, Viren, Pilze oder andere Krankheitserreger sind, ermöglichen den Immunzellen eine gezielte Erkennung körperfremder Eindringlinge durch *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Eine weitere Methode für die Erkennung von fremden Erregern stellt die Opsonierung durch das Komplementsystem dar. Hierbei binden Komponenten des Komplementsystems an die körperfremde Oberfläche und markieren so den Eindringling. Die sofortige Einleitung einer Immunantwort führt zu einer schnellen Eliminierung dieser Pathogene. Das angeborene Immunsystem arbeitet sehr schnell und unspezifisch: nach wenigen Minuten werden eingedrungene Erreger identifiziert und bereits Stunden später ist die Eliminierung dieser Erreger abgeschlossen. Zellen des

angeborenen Immunsystems sind weiterhin für die Einleitung der adaptiven Immunantwort von großer Wichtigkeit: Monozyten, Makrophagen oder DCs sind durch die Präsentation körperfremder Antigene über MHC-Klasse II Komplexe (engl. *major histocompatibility complex*) in der Lage, CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu aktivieren [1, 2].

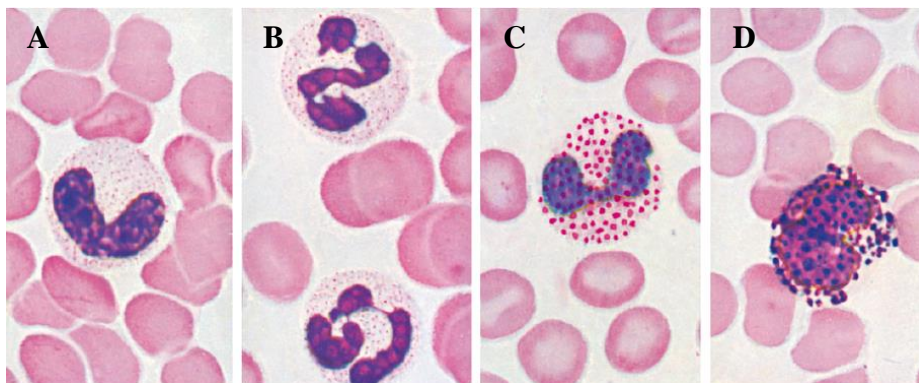
### 1.1.2 Adaptives Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive oder spezifische Immunsystem nicht von Geburt an vorhanden und wird erst Stunden oder Tage nach der angeborenen Immunität im Rahmen einer Immunantwort eingeleitet. Die adaptive Immunität wird in die zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt, wobei erstere von T-Zellen und letztere von B-Zellen umgesetzt wird. Beide Lymphozytentypen können über bestimmte Rezeptoren körperfremde Antigene erkennen, woraufhin sie aktiviert werden. In T-Zellen erfolgt die Antigenerkennung über den T Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR), wobei das Antigen über einen MHC Klasse I oder II Rezeptor von einer antigenpräsentierenden Zelle präsentiert werden muss (siehe auch 1.3 T-Zellen). B-Zellen besitzen membranständige Immunglobuline, die als Antigenrezeptoren dienen und freie Antikörper binden können. Beide Zellarten werden als Folge einer Antigenbindung aktiviert, wobei sich B-Zellen in Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren.

Nach der erfolgreichen Eliminierung aller Pathogene bilden sich T- und B-Gedächtniszellen, die das immunologische Gedächtnis bilden. Bei wiederholtem Antigenkontakt dieser Zellen mit den gleichen Antigenen erfolgt eine wesentlich schnellere adaptive Immunantwort. Gedächtniszellen können jahrelang im Blut zirkulieren [1, 2].

## 1.2 Granulozyten

Granulozyten werden in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt. Diese Einteilung basiert auf der Färbung der Zellen nach Pappenheim, wonach neutrophile Granula sich schlecht färben lassen und eine hellviolette Farbe annehmen, basophile Granula durch den basischen Farbstoff Methylenblau eine dunkelviolette Farbe und eosinophile Granula durch den sauren Farbstoff Eosin eine rötliche Farbe annehmen [3]. Neben dem Färbeverhalten weisen die Granula unterschiedliche Größen und Formen auf. Durch die Form der Zellkerne werden Granulozyten auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet.



**Abbildung 1: Färbung von Granulozyten im Blutausstrich nach Pappenheim.** (A) Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, (B) segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, (C) eosinophiler Granulozyt und (D) basophiler Granulozyt (modifiziert nach Kühnel, 2014, [4]).

### 1.2.1 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten stellen mit bis zu 2 % die kleinste Zellpopulation der Leukozyten dar. Der Fc-Teil des Immunglobulin E (IgE) bindet an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der basophilen Granulozyten, was als Charakteristikum für diese Zellen gilt. Durch die Bindung von Allergenen an IgE, kommt es zu einer Quervernetzung dieser membrangebundenen IgE-Moleküle, wodurch eine Degranulierung der basophilen Granulozyten folgt. Hierbei werden Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin, freigesetzt. Eine allergische Typ 1 Reaktion beruht auf einer Reaktivität von IgE Antikörpern gegenüber harmlosen körperfremden Stoffen, die dann als Allergene bei einem Zweitkontakt zur Degranulation und Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und weiteren Entzündungsmediatoren führen. Des Weiteren sind basophile Granulozyten an der Bekämpfung von Parasiten beteiligt [5].



## 1.2.2 Eosinophile Granulozyten

Granula eosinophiler Granulozyten enthalten proinflammatorische und zytotoxische Substanzen, wie z.B. *Major Basic Protein* (MBP), eosinophiles kationisches Protein (ECP), eosinophile Peroxidase (EPO) oder eosinophiles Neurotoxin (EDN), wodurch eosinophile Granulozyten zum einen in der Lage sind, Viren, Parasiten und Bakterien zu bekämpfen und zum anderen, weitere Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Mastzellen, DCs) zu aktivieren [6].

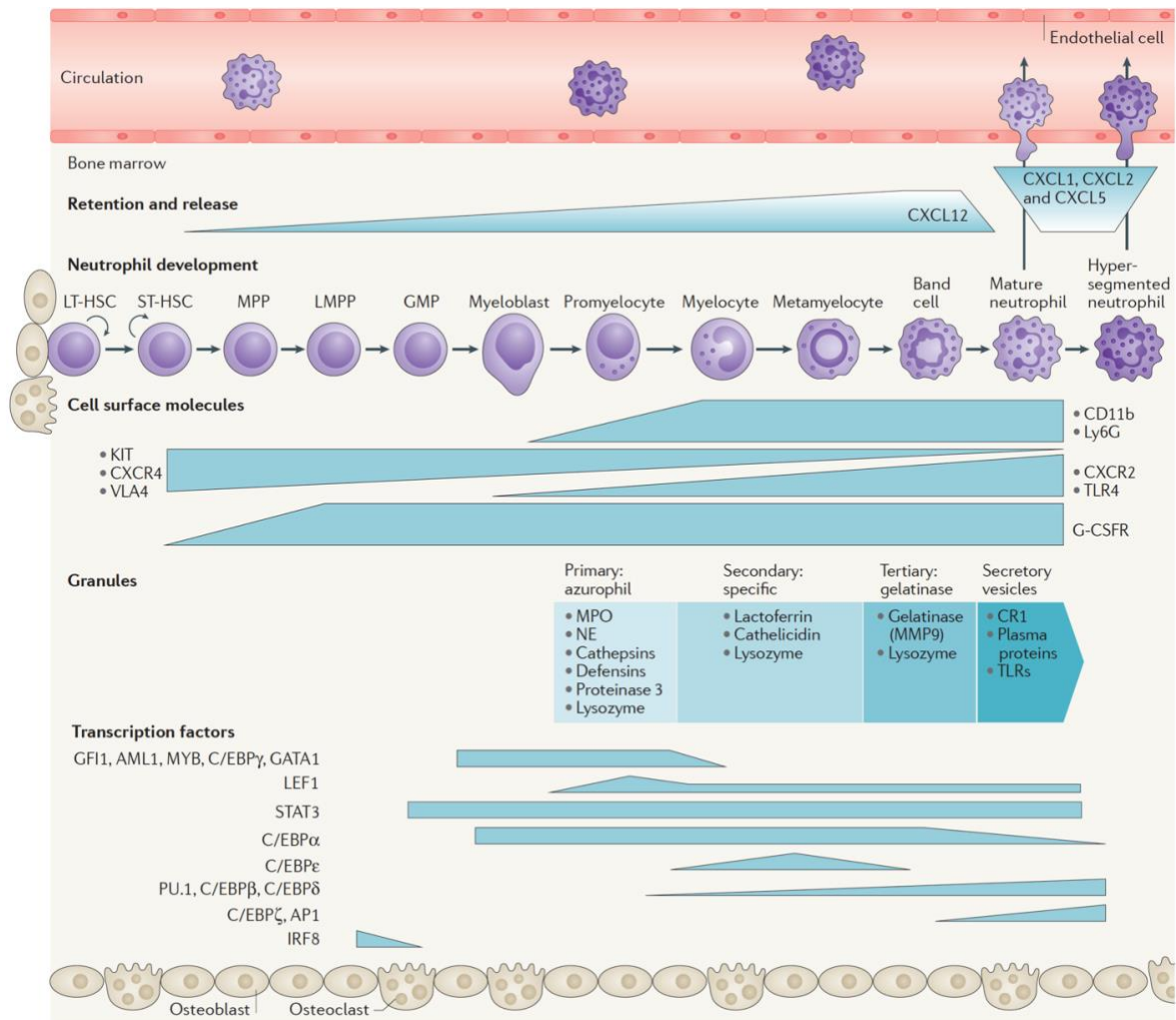
## 1.2.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen unter physiologischen Bedingungen mit 40 – 70 % den größten Anteil der Granulozyten bzw. damit auch aller Leukozyten im peripheren Blut dar und bilden als erste Verteidigungslinie gegen Entzündungen und Infektionen den zentralen Zelltyp des angeborenen Immunsystems. Mit einer Lebensdauer von in der Regel weniger als 24 h gehören neutrophile Granulozyten außerdem zu den kurzlebigsten Zelltypen. Jedoch konnte hier unter Anwendung einer <sup>2</sup>H-Markierungsmethode *in vivo* auch eine deutlich verlängerte Lebensdauer der humanen Neutrophilen von bis zu 5 Tagen gezeigt werden [7]. Im Knochenmark werden täglich  $10^{11}$  neutrophile Granulozyten gebildet [8-10].

### 1.2.3.1 Granulopoese

Die Bildung von Granulozyten läuft im Rahmen der Granulopoese im Knochenmark ab, wobei die Reifung neutrophiler Granulozyten mit der Differenzierung von myeloischen Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (GMPs) beginnt und dann über Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, stabkernigen Neutrophilen letztlich zu ausdifferenzierten segmentkernigen Neutrophilen verläuft (vgl. Abbildung 2). Hierbei werden die primären oder azurophilen Granula während der Differenzierung von Myeloblasten zu Promyelozyten gebildet [11-13]. Die Entstehung der sekundären oder spezifischen Granula findet während der Entwicklung von Myelozyten zu Metamyelozyten statt, wohingegen die Bildung der tertiären oder Gelatinase-Granula ab dem Metamyelozytenstadium und während der Umwandlung von stabkernigen zu segmentkernigen Neutrophilen abläuft. Sekretorische Vesikel sind hierbei nur in reifen Neutrophilen vorzufinden [13, 14]. Bei der Differenzierung neutrophiler Granulozyten sind viele Transkriptionsfaktoren beteiligt, wobei der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) eine besondere Rolle annimmt. Durch STAT3 wird die Expression des Rezeptors für den Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor

(G-CSFR) in allen myeloischen Linien während der Granulopoese gefördert [15]. So kann G-CSF, der Hauptregulator der Granulopoese, für die Differenzierung von Neutrophilen sorgen [16]. Im Verlauf der Granulopoese werden einige Oberflächenmoleküle, wie die Tyrosinkinase KIT, das Gefäßzelladhäsionsmolekül VLA4 (engl.: *very late antigen-4*) und der C-X-C-Chemokinrezeptor-4 (CXCR4) herunterreguliert, wohingegen andere Oberflächenproteine, wie CXCR2 und Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) hochreguliert werden.



**Abbildung 2: Entstehung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark.** Die Entwicklung neutrophiler Granulozyten startet mit der langfristigen hämatopoetischen Stammzelle (LT-HSC, engl. *long-term hematopoietic stem cell*), die sich in die kurzfristige hämatopoetische Stammzelle (ST-HSC, engl. *short-term hematopoietic stem cell*) differenziert. Mit der Differenzierung in die multipotente Vorläuferzelle (MPP, engl. *multipotent progenitor*) geht die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren (in der Abbildung als gebogene Pfeile dargestellt). Anschließend entstehen die lymphoid-geprägten multipotenten Vorläufer (LMPP, engl. *lymphoid-primed multipotent progenitor*), aus denen wiederum die Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (GMP, engl. *granulocyte-monocyte progenitor*) entstehen. Durch G-CSF oder GM-CSF gesteuert, werden die Vorstufen Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt und stabkerniger Neutrophiler gebildet. Schließlich reifen die Zellen vollständig zu segmentierten Neutrophilen [8].

### 1.2.3.2 Granula der neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granula werden in vier Gruppen unterteilt: die sekretorischen Vesikel, die primären bzw. azurophilen Granula, die sekundären bzw. spezifischen Granula und die tertiären bzw. Gelatinase-Granula. Die Aktivierung von Neutrophilen erfolgt über Liganden wie IL-8, LPS (Lipopolysaccharid) oder fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), sowie Komplementkomponente 5a (C5a), die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, engl. *G protein-coupled receptor*), Fc-Rezeptoren (Fc-R), Chemokinrezeptoren oder PRRs binden [17]. In aktivierten PMN erfolgt die Degranulation in einer sehr strikten Reihenfolge, die von Art und Intensität des jeweiligen Stimulus abhängt: zunächst sekretorische Vesikel (SV), dann tertiäre, sekundäre und letztlich primäre Granula [18].

Die primären Granula der neutrophilen Granulozyten sind durch das Vorhandensein von Peroxidasen charakterisiert, v.a. der Myeloperoxidase, MPO [19-21]. Weitere antibakterielle Proteine, wie Cathepsin G, Neutrophile Elastase (NE), Proteinase 3 und Lysozyme [22, 23], sowie Azurocidin [24], neutrophile Serinprotease 4 (NSP4) und Defensine [25, 26] sind ebenfalls in primären Granula enthalten. Somit besitzen azurophile Granula das größte Reservoir an proteolytischen und antibakteriellen Proteinen. Während der Phagozytose, bei der azurophile Granula mit Phagosomen verschmelzen, gelangen diese antimikrobiellen Effektorsubstanzen in die Phagosomen, wo es dann zur Abtötung von eingedrungenen Mikroorganismen kommt [27]. Diese mit azurophilen Granula fusionierten Phagosomen sind an Arginin depletiert. Der Nachweis, dass Arginase 1 von humanen neutrophilen Granulozyten konstitutiv in azurophilen Granula exprimiert wird, bietet die hinreichende Erklärung für die Arginindepletion in neutrophilen Phagosomen [27]. Die Membran von azurophilen Granula beinhaltet die Oberflächenproteine CD63 und CD68. Durch das Fehlen des Vesikel-assoziierten Membranproteins (VAMP-2) können azurophile Granula schlecht mobilisiert werden und weisen eine schlechte Exozytosekapazität auf. Daher werden diese Granula und ihre Funktion, wenn sie nicht bereits mit Phagosomen fusioniert sind, in der Regel erst mit dem Zerfall der Neutrophilen freigesetzt [19].

Die sekundären Granula zeichnen sich durch ihren Lactoferringehalt aus. Außerdem zählen Lysozyme, Haptoglobin, Cathelicidin (hCAP-18), Pentraxin 3 und Prodefensin zu den antibakteriellen Proteinen. Weiterhin sind die Proteasen Collagenase, Gelatinase und Urokinase Plasminogen Aktivator in den spezifischen Granula enthalten. Ihre Membran beinhaltet neben CD11b, CD15, CD18, CD66 und CD67 auch noch die Membranfusionsproteine VAMP-2 und Synaptosomal-assoziiertes Protein 23 (SNAP-23) [19]. Weitere Membranproteine sind unter anderem Cytochrom-b<sub>558</sub>, fMLP-Rezeptor und Mac-1 [19].

Charakteristisch und namensgebend für die tertiären Granula ist das Vorhandensein von Gelatinase [28]. Des Weiteren sind Lysozyme und Arginase 1 enthalten. Letzteres konnte anhand der Untersuchung der mRNA (Microarray Analyse) und Proteinexpressionsprofilen (Western Blot) von Arginase 1 und weiteren Granula-spezifischen Markerproteinen gezeigt werden, wobei die Hypothese aufgestellt wurde, dass Arginase 1 in Myelozyten bzw. Metamyelozyten (vgl. Abbildung 2) synthetisiert und in Gelatinase Granula gelagert wird [29]. Tertiäre Granula enthalten die wenigsten antibakteriellen Proteine, verglichen zu den anderen beiden Granulatypen, werden jedoch, als Folge einer Stimulation z.B. durch IL-8, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) oder Ionomycin schnell exozytiert [30].

Ihre Membran beinhaltet ebenfalls SNAP-23 und VAMP-2, sowie Mac-1 und fMLP-Rezeptor. Die sekretorischen Vesikel werden als erstes während der frühen Phase der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mobilisiert. Sie werden durch die latente alkalische Phosphatase charakterisiert, welche nur in Anwesenheit eines Detergens gemessen werden kann. Zudem zählen Cytochrom-b<sub>558</sub>, fMLP-R und Mac-1 [19, 31], sowie SNAP-23 und VAMP-2 [25] zu den Membranproteinen.

### 1.2.3.3 Funktionen der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten zirkulieren als reife Zellen im Blutkreislauf und gelangen auf diesem Weg an den Ort einer Entzündung oder Infektion im Körper. Der Austritt aus dem Blutgefäß in das Gewebe wird als Rekrutierung von Neutrophilen bezeichnet und folgt einem bestimmten Ablauf. Dieser beruht auf der Wechselwirkung von auf neutrophilen Granulozyten exprimierten Rezeptoren und Liganden, die vom entzündeten Endothel präsentiert werden [32-34]. Hierbei kommt es zunächst zu einem Selektin-abhängigen Rollen der Neutrophilen entlang des Endothels mit dem Ziel, die Geschwindigkeit der Neutrophilen im Blutstrom abzubremsen [35]. Als nächstes folgt die Ausschüttung weiterer Chemokine, was zu einer Konformationsänderung der auf den Neutrophilen enthaltenen Integrine führt und damit einhergehend die Bindung an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und ICAM-2) begünstigt. Durch diese stabile Adhäsion kommt es zu einer Zellabflachung der Neutrophilen entlang des Endothels. Den letzten Schritt dieser Rekrutierungskaskade bildet der Austritt der Neutrophilen aus dem Blutgefäß und deren gleichzeitiger Eintritt ins entzündete Gewebe (Transmigration) [32, 36]. Mit der Migration der neutrophilen Granulozyten ins entzündete Gewebe folgt die Aktivierung dieser Zellen und ihrer Effektorsignalwege [37]: Phagozytose, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Degranulierung und die Bildung von neutrophilen extrazellulären Netzen (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETosis). Zu ihren

Effektorsignalwegen gehören aber ebenso die Expression von PRRs, wie C-Typ Lectin-Rezeptor, Dectin-1 und Mac-1, um fungale Antigene zu erkennen und zu eliminieren. [38, 39]. Weiterhin existieren Toll-like Rezeptoren (TLR), welche Lipide, Peptide, Kohlenhydratketten und doppelsträngige Fremd-DNA erkennen [40]. Gram-negative und Gram-positive Peptidoglykanmoleküle können durch die zytosolischen mikrobiellen Sensoren (NOD1 und NOD2) erkannt und dann durch die PMN eliminiert werden [41]. Opsonisierte Zielmoleküle können von neutrophilen Granulozyten über die Rezeptoren CR3 (= Mac-1) und CR4 erkannt werden [37]. Außerdem besitzen Neutrophile eine Vielzahl an G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die vor allem in der Migration der Granulozyten eine Rolle spielen [37].

All diese Effektorfunktionen dienen der Erkennung und Abtötung von Bakterien und Pilzen. Jedoch ist die Funktion von Granulozyten nicht auf die „first line of defense“ begrenzt. Neutrophile Granulozyten nehmen außerdem eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation und in der Regulation von Immunzellen ein [42].

Die Rekrutierung und Aktivierung von DCs und ihre Reifung mittels Lactoferrin,  $\alpha$ -Defensin und weiteren Chemokinen gehört zu den immunmodulatorischen Aufgaben von Neutrophilen [43-45]. Auch NK-Zellen können über die Sekretion von IL-18 über PMN aktiviert werden [46] und können über IFN- $\gamma$  und GM-CSF auch PMN positiv beeinflussen. Des Weiteren werden Monozyten von Neutrophilen über diverse Chemokine und Proteine zum Entzündungsherd rekrutiert [47]. Auch die Aktivität von Monozyten und Makrophagen wird durch PMN verstärkt. Apoptotische Neutrophile werden von Makrophagen phagozytiert. Neutrophile produzieren die Zytokine BAFF (engl. *B cell-activating factor*) und APRIL (engl. *a proliferation-inducing ligand*), die für die Aktivierung von B-Zellen benötigt werden [48]. Auf die Interaktion von PMN und T-Zellen wird unter 1.3.7 T-Zellen und PMN: Freunde oder Feinde? eingegangen.

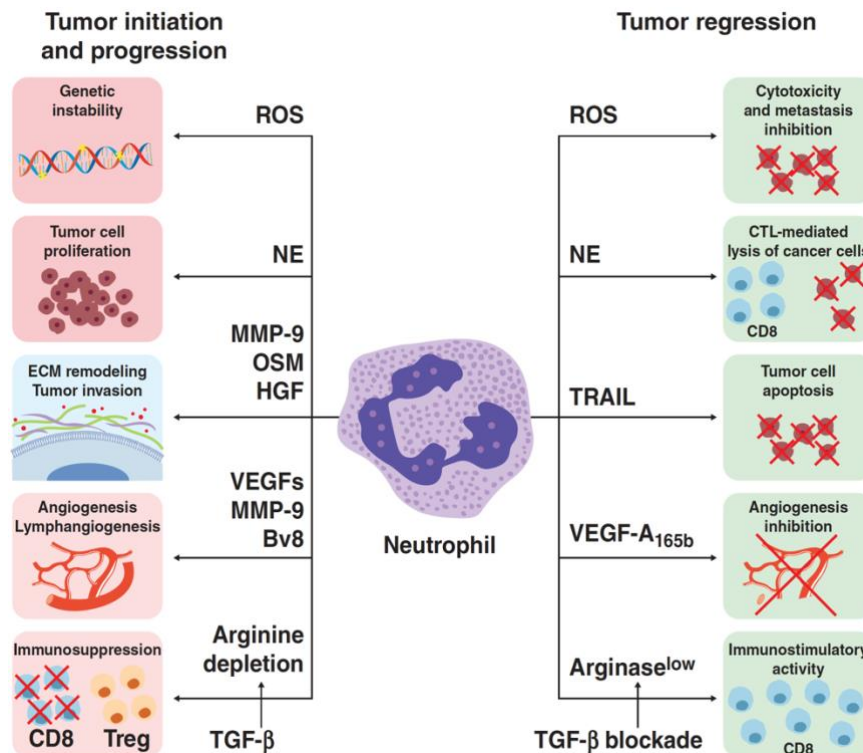
#### 1.2.4 Rolle neutrophiler Granulozyten im Tumor

Neben der Bekämpfung von Bakterien, Viren und Parasiten und der Immunmodulation [49] haben neutrophile Granulozyten auch in chronischen Entzündungen, wie beispielsweise in Tumorerkrankungen, eine zentrale Rolle. Durch die jeweils tumorspezifischen Charakteristika sowie deren komplexes Mikromilieu kommt es zur Entstehung einer heterogenen Population von Neutrophilen mit unterschiedlichen pro- oder anti-tumoralen Funktionen [50, 51]. In Tumorgewebe vorhandene Neutrophile werden als Tumor-assoziierte Neutrophile (TANs)

bezeichnet, die vom Tumor über Chemokine wie CCL3, CXCL6 und CXCL8 angelockt werden. Gemäß ihrer Eigenschaften existiert, allerdings so nur für das murine Modell gezeigt, die Einteilung in zwei Phänotypen: TANs, die eine anti-tumorale Funktion haben, werden als N1 und TANs, die pro-tumorale Eigenschaften aufweisen, als N2 bezeichnet [52]. Diese gegensätzlichen Funktionen von Neutrophilen in Tumorerkrankungen wurden in Abbildung 3 zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.

#### 1.2.4.1 Pro-Tumorale Effekte tumor-assoziiertes neutrophiler Granulozyten

Einige Substanzen aus den PMN Granula, die im Kampf gegen Viren und Bakterien Einsatz finden, zeigen auch pro-tumorale Eigenschaften. Von besonderer Bedeutung ist hier die durch Degranulation freiwerdende Arginase 1, welche im Tumormilieu eine Depletion der Aminosäure Arginin bewirkt (siehe auch 1.4 Die Aminosäure Arginin). Diese Aminosäure ist für die Expansion und Funktion zytotoxischer T-Zellen von essentieller Bedeutung und eine Mangelversorgung mit Arginin führt zum Verlust dieser Funktion. Dies konnte in Darmkrebspatienten bestätigt werden: durch CXCL8, IL-8 und GM-CSF rekrutierte TANs wurde Arginase 1 und ROS freigesetzt, was zu einer Immunsuppression von T-Zellen führte [53]. Auch die in den primären Granula befindliche Neutrophilen-Elastase gehört zu den pro-tumoralen Faktoren [54]: Sie führte zu einer verbesserten Proliferation von Tumorzellen in einer Lungen-Ca Zelllinie [55, 56], bei Brustkrebs [57], Ösophagus-Ca [58] und Magenkrebs [59]. Außerdem konnte durch die Neutrophilen-Elastase eine gesteigerte Fähigkeit zur Migration in diversen soliden Tumoren gezeigt werden [58, 60].



**Abbildung 3: Gegensätzliche Eigenschaften von PMN in Tumorerkrankungen.** Zu den rot-dargestellten pro-tumoralen Eigenschaften gehören die Induktion genetischer Instabilität (ROS), Förderung des Wachstums (Neutrophilen-Elastase (NE), Wachstumsfaktoren) und der Invasion (MMP-9, Oncostatin M, Hepazotytenwachstumsfaktor), verbesserte Angiogenese (VEGF, MMP-9, Bv8), sowie Immunsuppression (Arginase 1). Als grün-dargestellte anti-tumorale Funktionen sind eine erhöhte Zytotoxizität (ROS, NE), erhöhte Apoptose (TRAIL-Freisetzung), Inhibition der Angiogenese (VEGF-A) und Immunstimulation durch TGF-β Inhibition dargestellt [61].

Eine weitere Peptidase aus den azurophilen Granula, Cathepsin G, zeigte durch verbesserte Tumorangiogenese (über VEGF Hochregulation) und -zellmigration ebenfalls tumorfördernde Eigenschaften [62-64]. Durch Neutrophile erzeugte ROS entsteht Hypochlorsäure (HOCl), welches Matrix-Metalloproteasen (MMP-2, MMP-7, MMP-8 und MMP-9) aktivieren kann [65-67]. Durch die MMP-vermittelte Induktion von Proliferation und Angiogenese kommt es zu einer verstärkten Tumorprogression z.B. in Plattenepithelkarzinomen [68]. MMP-9 inhibiert zudem die Apoptose in Tumorzellen [69]. Neben den bereits genannten Enzymen der Neutrophilen, gibt es auch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die ein Tumorwachstum begünstigen können [70]. So führt Oncostatin-M über die Induktion von VEGF in Brustkrebszellen zu einer verbesserten Angiogenese und der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) erhöht die Invasion in hepatozellulären Karzinomzellen [71].

#### 1.2.4.2 Anti-Tumorale Effekte tumor-assoziiertes neutrophiler Granulozyten

Von Tumorzellen aufgenommene neutrophile Elastase kann zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Komplexen führen, was in einer verbesserten Immunantwort resultiert [72]. Des Weiteren kann NE durch die Spaltung von VEGF die Angiogenese inhibieren [73, 74]. Eine sehr spezifische Art, Tumorzellen in die Apoptose zu leiten, wird durch einen besonderen Liganden (engl. *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) induziert, wobei gesundes Gewebe und Zellen intakt bleiben [75-77]. Dies konnte in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) bestätigt werden: durch eine IFN- $\alpha$ -Therapie konnte in Neutrophilen TRAIL induziert werden, was eine erhöhte Apoptose in den Leukämiezellen bewirkte [78, 79]. Weiterhin konnten in Patienten mit einem frühen Stadium von Lungenkrebs TANs nachgewiesen werden, die durch eine hoch regulierte ICAM-1 Expression und herunter regulierte L-Selektin Expression charakterisiert werden konnten. Ihre anti-tumorale Funktion machte sich durch die Stimulation von T-Zellen und ihrer IFN- $\gamma$  Sekretion bemerkbar [61, 80]. In einer frühen Phase der Tumorprogression können außerdem Neutrophile durch Hypochlorit (aus ROS) Tumorzellen lysieren, wobei ein enger Zell-Zell-Kontakt gewährleistet sein muss [81, 82]. Weiterhin können gegen Tumorzellantigene gerichtete Antikörper durch Bindung an Fc-Rezeptoren eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) aktivieren, welche auch durch neutrophile Granulozyten ausgeführt werden kann [77]. Hierzu muss auf Neutrophilen Fc $\gamma$ RIIa [83, 84], Fc $\gamma$ RI (CD64) [85] oder Fc $\alpha$ RI (CD89) [86, 87] aktiviert und hochreguliert sein. Der genaue Mechanismus der ADCC-vermittelten Tumorzytotoxizität in Neutrophilen wurde noch nicht aufgeklärt.

Die Untersuchung und nachfolgende Nomenklatur von N1 und N2 Tumor-assoziierten Neutrophilen erfolgte in Mausmodellen [52]. Hier konnte der positive Einfluss von TGF- $\beta$  auf die pro-tumorale N2 Polarisierung beobachtet werden. Eine Inhibition von TGF- $\beta$  führte hingegen zu einem anti-tumoralen N1 Phänotypen mit erhöhter TNF- $\alpha$ , CCL3 und ICAM-1 Expression, sowie reduzierter Arginase 1 Expression, die mit einer erhöhten Tumorzytotoxizität einhergingen [52]. Typ-I Interferone zeigten ebenfalls eine polarisierende Wirkung auf TANs hinsichtlich eines anti-tumoralen N1 Phänotyps: Die Deletion von IFN- $\beta$  führte zu TANs mit erhöhten CXCR-4, VEGF-A und MMP-9 Expressionen [61, 88, 89]. Für die exakte Unterscheidung von N1 und N2 existieren bisher jedoch keine spezifischen Oberflächenmoleküle.



Da es sich bei diesen Untersuchungen ausschließlich um murine Modelle handelt, ist es fraglich, ob diese Beobachtungen auch bei Menschen gezeigt werden können, da zwischen humanen und murinen neutrophilen Granulozyten zahlreiche fundamentale Unterschiede existieren [90].

Nichtsdestotrotz wurden in Krebspatienten mit erhöhten Neutrophilenzahlen im Blut schlechtere Prognosen korreliert. Dieses erhöhte Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten konnte bereits in diversen soliden Tumorentitäten gezeigt werden [91, 92]. In Patienten mit Darmkrebs konnten dagegen erhöhte TANs mit hoher Arginase 1 Expression zu einer verbesserten Prognose führen [93].

## 1.3 T-Zellen

### 1.3.1 Lymphopoese der T-Zellen

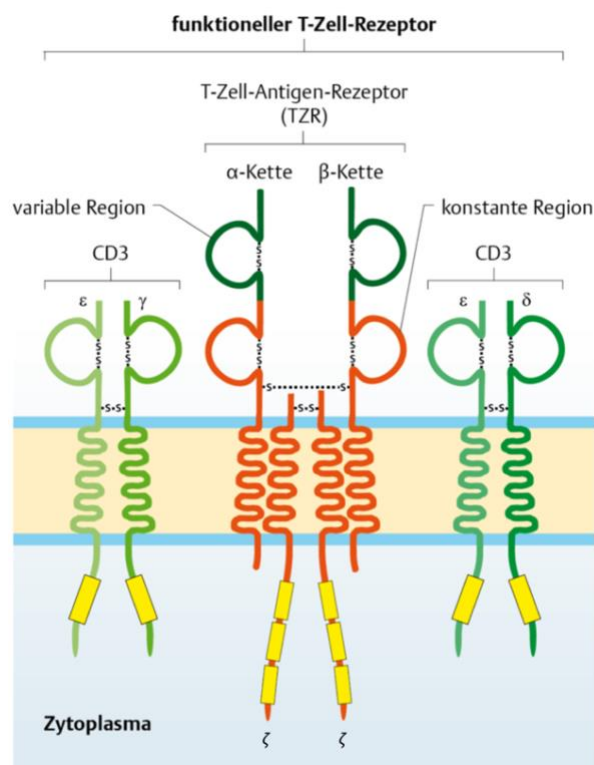
Die Entwicklung von T-Zellen leitet sich von der lymphatischen Progenitorzelle ab und beginnt im Knochenmark. Als pro-T-Zellen wandern sie aus dem Knochenmark und setzen ihre Reifung im Thymus und den sekundären lymphatischen Organen fort. Fundamental wichtig ist hierbei die Entwicklung der T-Zellrezeptoren (TCR), die je nach Art ihrer Rezeptoruntereinheiten in  $\alpha$ : $\beta$ -TCR (> 95 % aller T-Zellen) oder  $\gamma$ : $\delta$ -TCR (< 5 % aller T-Zellen) unterteilt werden [1, 2]. Wichtig für eine effiziente Immunantwort ist ein großes Repertoire an unterschiedlich spezifischen T-Zellrezeptoren, damit möglichst viele Fremdantigene erkannt und eliminiert werden können. Mit der V(D)J- oder somatischen Rekombination werden Gensegmente (*variable* Gene: V, *joining* Gene: J (nur  $\beta$ -Kette) und *diversity* Gene: D) während der T-Zellreifung zufällig miteinander zu funktionellen TCR-Genen rekombiniert [94]. Wegen der hohen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten für die einzelnen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, ergeben sich Millionen von verschiedenen hochspezifischen TCR. Diese werden in einem zweischrittigen Mechanismus geprüft: 1. Erkennung von MHC-Molekülen und 2. Erkennung von Selbst-Antigenen, wobei die T-Zellen im ersten Schritt einer positiven und im zweiten Schritt einer negativen Selektion unterzogen werden. Aussortierte nicht-funktionelle und selbst-reaktive T-Zellen gehen in Apoptose. Zurück bleiben T-Zellklone, die über mehrere Schritte weitere Oberflächenmoleküle, wie CD4 oder CD8, exprimieren. Die entstandenen naiven T-Zellen zirkulieren im Blut und den sekundären lymphatischen Organen, bis sie einer antigenpräsentierenden Zelle begegnen und aktiviert werden oder sterben.

Es gibt verschiedene T-Zellsubtypen, die sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle und Funktionen unterscheiden lassen: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen, Natürliche Killer T-Zellen und T-Gedächtniszellen (Effektor- und zentrale) [1, 2].

### 1.3.2 T-Zellrezeptor

Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette, die jeweils eine extrazelluläre konstante (c) und eine extrazelluläre variable (v) Region, sowie eine Transmembrandomäne und eine kurze C-terminale cytoplasmatische Region beinhalten. Diese beiden Ketten sind in ihren konstanten Regionen über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander

verbunden. Ein funktioneller TCR ist nichtkovalent mit drei weiteren dimeren Modulen assoziiert: zwei heterodimere CD3 Proteinkomplexe bestehend aus je zwei Untereinheiten ( $\epsilon\gamma$ -Kette bzw.  $\epsilon\delta$ -Kette), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, sowie ein homodimerer Proteinkomplex aus zwei  $\zeta$ -Ketten. Die zytosolischen Elemente der CD3- und der  $\zeta$ -Ketten weisen für die Signaltransduktion unentbehrliche ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation morif*) Sequenzen auf (vgl. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Aufbau eines T-Zellrezeptors.** Den Kern des TCR bilden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Beide Ketten besitzen jeweils eine extrazelluläre variable und konstante Region, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytosomatischen C-Terminus. Dieser TCR ist nicht-kovalent an drei weitere dimere Moleküle assoziiert:  $\epsilon\gamma$ -Kette,  $\epsilon\delta$ -Kette und zwei  $\zeta$ -Ketten. Letztere besitzen an ihren intrazellulären Ketten ITAM Module (gelb dargestellt), die für eine intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung durch ein Ag/MHC-Komplex notwendig sind [1].

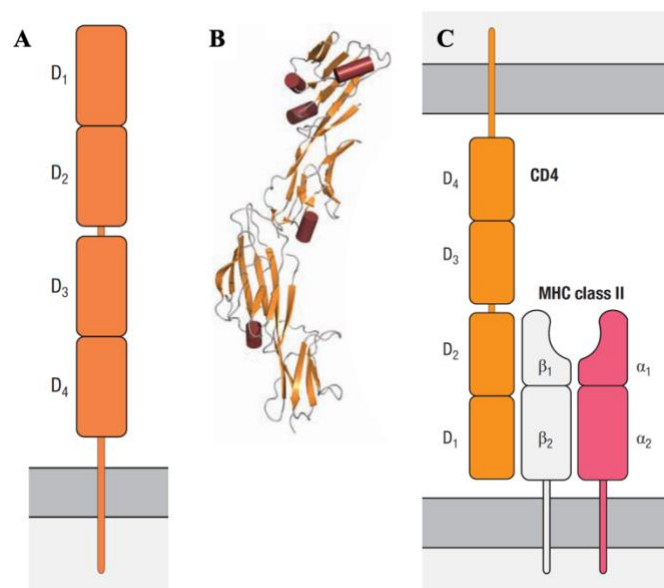
### 1.3.3 Aktivierung der T-Zellen

Für die Aktivierung von T-Zellen ist in erster Linie die Bindung an ein Peptid-Antigen erforderlich. T-Zellen können Antigene nur dann erkennen, wenn diese von antigenpräsentierenden Zellen (APC) über MHC-Moleküle der Klasse I oder II präsentiert werden. Hierbei können  $CD8^+$  T-Zellen nur über den MHC Klasse I und  $CD4^+$  T-Zellen nur über den MHC Klasse II aktiviert werden [1, 2]. Die Bindung des TCR an den MHC-Antigen-Komplex ist sehr stark und kann mehrere Tage andauern. Damit T-Zellen vollwertig aktiviert

sind, müssen zwei weitere Signale folgen: Die Bindung des co-stimulierenden Rezeptors CD28 an den Liganden B7.1 oder B7.2 der APC und die erhöhte Freisetzung von Interleukin-2 (IL-2). Sind alle Kriterien erfolgt, kommt es zu einer Signaltransduktionskaskade: Die am CD4- oder CD8-Rezeptor befindliche Tyrosinkinase Lck (engl. *lymphocyte kinase*) phosphoryliert Tyrosinreste am CD3-Rezeptor, dies wiederum aktiviert die ZAP-Kinase (engl. *zeta-associated protein*), wodurch einerseits die Phospholipase C (PLC) und andererseits Ras aktiviert wird. Die nachgeschalteten Signale führen zu erhöhten Expressionen bestimmter Zytokine und zur Proliferation und Differenzierung der aktivierten T-Zelle. Für eine Regulation der T-Zellfunktionen exprimieren aktivierte T-Zellen gegenregulatorische Proteine wie CTLA-4 oder PD-1 an ihren Oberflächen, welche denselben co-stimulierenden Liganden wie CD28 bzw. PD-L1 binden und zu einer Herunterregulation der T-Zellvermittelten Immunantwort führen [2].

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

Der CD4-Rezeptor stellt eine einzelne Proteinkette bestehend aus vier Immunglobulin-ähnlichen Domänen dar (vgl. Abbildung 5). Hierbei bilden D1 mit D2 und D3 mit D4 sehr starre Strukturen, zwischen denen befindet sich ein flexibles Element [2]. Die Bindestelle für den MHC-Klasse II Rezeptor befindet sich seitlich an D1 und räumlich von der TCR Bindestelle entfernt, somit ist gewährleistet, dass CD4 und TCR zeitgleich an MHC Klasse II binden können [2].



**Abbildung 5: Struktur des CD4-Rezeptormoleküls.** (A) Schematischer Aufbau, (B) dreidimensionale Struktur und (C) Bindung an MHC Klasse II. Modifiziert nach Murphy *et al.*, 2017 [2].

Klassischerweise werden T-Helferzellen als CD4<sup>+</sup> Subtyp charakterisiert, die in T-Helfer 1 (Th1), T-Helfer 2 (Th2), T-Helfer 9 (Th9) und T-Helfer 17 (Th17) unterteilt werden [95]. Zusätzlich wurden folliculäre T-Helferzellen (Tfh), induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) und regulatorische Typ 1 Zellen (Tr1) als CD4<sup>+</sup> Subtypen identifiziert [95]. Diese Untergruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker und ihres Zytokinprofils. Ihre Differenzierung erfolgt über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die im Folgenden näher erläutert werden.

#### 1.3.4.1 Typ 1 T-Helferzellen (Th1)

Die Differenzierung von Th1 Zellen wird von IL-12 und IFN- $\gamma$  eingeleitet, wobei IL-12 von aktivierten APCs ausgeschüttet wird und in NK-Zellen die IFN- $\gamma$  Produktion induziert. Unter den Transkriptionsfaktoren nimmt der T-Box-Transkriptionsfaktor (T-bet) die entscheidende Rolle bei der Th1 Differenzierung ein, da Gene, die zur Förderung der Th1 Differenzierung nötig sind, aktiviert werden und Gene, die zur Förderung von entgegengesetzten Zelltypen (Th2 und Th17) nötig sind, inhibiert werden [96-98]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die bei der Differenzierung von Th1 Zellen aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle spielen, sind STAT1 (engl. *transducer and activator of transcription 1*) [96], STAT4 [99], Runx3 (engl. *runt-related transcription factor 3*) [100, 101] Eomesodermin und Hlx (engl. *homeobox transcription factors*) [102]. Über die Sekretion von IFN- $\gamma$  sind Th1 Zellen in der Lage, Phagozyten (vor allem Makrophagen) zu aktivieren und sie sind so an der Pathogeneliminierung beteiligt (114). Th1 Zellen sezernieren außerdem Lymphotoxin- $\alpha$  (L $\alpha$ ) und IL-2. Ersteres gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie und ist mit Autoimmunerkrankungen assoziiert [103]. Durch IL-2 wird eine Aktivierung von CD8<sup>+</sup> Zellen und regulatorischen T-Zellen, sowie deren Funktionen, gewährleistet [104, 105].

#### 1.3.4.2 Typ 2 T-Helferzellen (Th2)

Für die Differenzierung von Th2 Zellen sind die beiden Zytokine IL-4 und IL-2 erforderlich. Durch IL-4 induziertes STAT6 mündet in die Hochregulation von GATA3, des Hauptregulators für Th2 Zellen [106, 107]. Gleichzeitig ist GATA3 für die Inhibition der Th1 Differenzierung verantwortlich [108]. Zusammen mit STAT5 induziert GATA3 die Produktion von IL-4 [109]. Weitere für die Th2 Zelldifferenzierung wichtige Transkriptionsfaktoren sind STAT3 [110], Gfi-1 (engl. *growth factor independent-1*) [111], c-Maf [112] und IRF4 (engl. *interferon regulatory factor 4*) [113]. Die wichtigsten von Th2 Zellen produzierten Interleukine sind IL-

4, IL-5 und IL-13, sowie IL-9, IL-10 und IL-25. Interleukin-4 ist durch die Regulation von IgE-Rezeptoren auf B-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten vor allem an allergischen Entzündungsreaktionen beteiligt und induziert proinflammatorische Mediatoren wie Histamin, Serotonin, VCAM-I (engl. *vascular cell adhesion protein 1*) und GM-CSF [114, 115]. Die Aktivierung von Eosinophilen läuft außerdem über die IL-5 Sekretion [116]. IL-13 wird induziert für die Bekämpfung von Helminthen sowie für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene. Des Weiteren aktiviert IL-13 Eosinophile und kann allergisches Asthma verursachen [117]. Auch IL-9 aktiviert Eosinophile, sowie Mastzellen, B-Zellen, Epithelzellen der Atemwege und Neutrophile [118]. Das entzündungshemmende Zytokin IL-10 hemmt Immunzellen des angeborenen Immunsystems, um das Gleichgewicht nach erfolgter Eliminierung von Krankheitserregern wiederherzustellen [119]. IL-25 unterstützt alle Th2 Reaktionen durch die Verstärkung von IL-4, IL-5 und IL-13 [120, 121].

#### 1.3.4.3 Typ 9 T-Helferzellen (Th9)

Th9 Zellen können einerseits aus Th2 Zellen mit Hilfe von TGF- $\beta$  differenziert werden und andererseits aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch TGF- $\beta$  in Kombination mit IL-4 entstehen [122]. Weiterhin spielt der Transkriptionsfaktor IRF4 bei der Th9 Differenzierung eine wesentliche Rolle [123]. Das Zytokinrepertoire dieser Zellen beinhaltet neben IL-9 auch IL-10 [124].

#### 1.3.4.4 Typ 17 T-Helferzellen (Th17)

Bei der dreistufigen Differenzierung von Th17 Zellen spielen die Zytokine IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- $\beta$ , sowie der Haupttranskriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (engl. *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t*) eine große Rolle [95]. Hierbei sind IL-6 und TGF- $\beta$  für die erste Stufe der Differenzierung relevant [125-127], wohingegen IL-21 in der Selbstverstärkungsphase eine signifikante Bedeutung hat [128, 129]. Während der letzten Stabilisierungsphase ist vor allem IL-23, produziert von APCs, beteiligt [130]. Weitere für die Differenzierung von Th17 Zellen benötigte Transkriptionsfaktoren sind STAT3, Runx1, Batf (engl. *basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like*), ROR $\alpha$ , IRF4 und AHR (engl. *aryl hydrocarbon receptor*). Eine negative Regulation der Th17 Differenzierung erfolgt über die Interaktion von Runx1 und FOXP3 (engl. *forkhead-box-protein P3*) [131].

Im Kampf gegen extrazelluläre Pilze und Bakterien sezernieren Th17 Zellen IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. Des Weiteren werden durch Th17 Zellen proinflammatorische Zytokine, wie

IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$ , sowie Chemokine induziert [95, 132]. Mit Hilfe von IL-21 werden diverse Immunzellen, wie T-, B- und NK-Zellen aktiviert [133].

#### 1.3.4.5 Follikuläre T-Helferzellen (Thf)

Für die Differenzierung von Thf Zellen sind die Zytokine IL-6 und IL-21, sowie der Transkriptionsfaktor STAT3 entscheidend [129, 134]. Weiterhin werden der induzierbare Co-Stimulator (ICOS) und Bcl6 (engl. *B-cell lymphoma 6 protein*) für die Thf Differenzierung benötigt [135, 136]. Namensgebend für diese CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation ist ihr Vorkommen im folliculären Bereich des lymphoiden Gewebes. Dort sind Thf Zellen an der antigen-spezifischen B-Zellimmunität beteiligt [137, 138]. Durch die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 wird die Sekretion von IgG2a (IFN- $\gamma$ ), IgG1, IgE (IL-4) und IgA (IL-10) gewährleistet [139].

#### 1.3.4.6 Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) und regulatorische Typ 1 Zellen (Tr1)

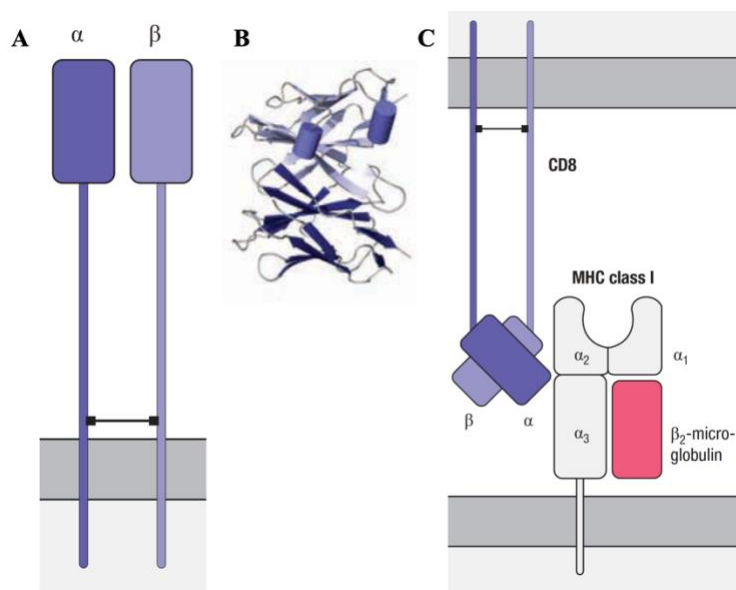
Die Differenzierung der induzierten regulatorischen T-Zellen wird mit Hilfe von TGF- $\beta$  und FOXP3 initiiert [140-143]. Des Weiteren sind die durch TGF- $\beta$  aktivierten Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3 (engl. *mothers against decapentaplegic homolog 2 or 3*), sowie STAT5 an der iTreg Differenzierung beteiligt [144-146]. Die iTreg Zellen lassen sich durch FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Expression charakterisieren, zusätzlich gibt es die natürlichen Treg Zellen, die bereits nach der Freisetzung aus dem Thymus FOXP3 exprimieren [147].

Für die Tr1 Zelldifferenzierung werden die Zytokine IL-10, IL-21 und IL-27 benötigt [148, 149], sowie die Transkriptionsfaktoren c-Maf, Ahr und ICOS. Hierbei wird IL-21 durch c-Maf induziert, welches für die Expansion der Tr1 Zellen erforderlich ist [124, 150, 151].

Die beiden T-Zellsubtypen iTreg und Tr1 nehmen eine regulatorische Funktion nach erfolgter Immunantwort ein, indem sie diese inhibieren. So werden überschießende Immunreaktionen, Entzündungs- und Autoimmunprozesse verhindert [152]. Dies wird vor allem mit dem hemmenden Zytokin IL-10, sowie TGF- $\beta$  erreicht [119, 153-155].

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

Der CD8-Rezeptor ist ein heterodimeres Molekül bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 6). Die Bindung erfolgt nur am MHC Klasse I Rezeptor, wobei die CD8 $\beta$ -Kette schwach mit der  $\alpha_2$ -Domäne und die CD8 $\alpha$ -Kette mit der  $\alpha_3$ -Domäne des MHC Klasse I Moleküls interagieren [2]. Die Bindungsstärke des CD8-MHC-Klasse-I-Komplexes wird über die Glykosylierung des CD8-Rezeptors bestimmt: je höher der Sialinsäureanteil an den Kohlenhydratelementen, desto schwächer die Wechselwirkung mit MHC-Klasse I [2].



**Abbildung 6: Struktur des CD8-Rezeptormoleküls.** (A) Schematischer Aufbau, (B) dreidimensionale Struktur und (C) Bindung an MHC Klasse I. Modifiziert nach Murphy *et al.*, 2017 [2].

CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als die klassischen zytotoxischen T-Zellen bezeichnet. Infizierte oder entartete Zellen können über zwei Mechanismen getötet werden: den Granzym-Perforin oder den Fas-Weg. In Folge der Antigenerkennung richtet sich die zytotoxische Zelle in Richtung der Zielzelle aus. Nach Ausbildung einer immunologischen Synapse zu dieser Zelle, werden Granzym und Perforin ausgeschüttet, welche in der Zielzelle eine Apoptose einleiten. Zudem exprimieren zytotoxische T-Zellen den Fas-Liganden (CD128) an ihrer Oberfläche. Wenn dieser am Fas-Rezeptor (CD95) bindet, wodurch die extrinsische Apoptose eingeleitet wird [2].



### 1.3.6 T-Gedächtniszellen

Nach erfolgter Immunantwort bilden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen Gedächtniszellen aus. Diese Zellen merken sich Antigene, mit denen bereits ein Erstkontakt gebildet wurde, um bei einem erneuten Kontakt schneller und effizienter zu reagieren [1]. Auch hier kommt es zur Entstehung unterschiedlicher Subtypen, die von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet und anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert werden können.

CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen werden in zentrale Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>), Effektorgedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) und Gewebsgedächtniszellen (T<sub>RM</sub>) unterteilt, wobei vor allem die Moleküle CD45RA und CCR7 für die Charakterisierung wichtig sind [156]:

T<sub>CM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>

T<sub>EM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup>

T<sub>RM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CD69<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> S1PR1<sup>+</sup>

T<sub>CM</sub> werden zum lymphatischen Gewebe zurückgeführt, während T<sub>EM</sub> in der Peripherie zirkulieren [157, 158]. T<sub>RM</sub> hingegen befinden sich in unterschiedlichen Geweben [159-161].

CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen werden ebenfalls in Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>), Effektorgedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) und Gewebsgedächtniszellen (T<sub>RM</sub>) unterteilt. Des Weiteren gibt es T<sub>EMRA</sub> und T<sub>PM</sub> Zellen [162]:

T<sub>CM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> Cx3Cr1<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>

T<sub>EM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Cx3Cr1<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup>

T<sub>EMRA</sub>: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>

T<sub>RM</sub>: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> Cx3Cr1<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD49a<sup>+</sup>

Die Aufenthaltsorte dieser Subgruppen entsprechen den CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen. So zirkulieren T<sub>EM</sub> und T<sub>EMRA</sub> in der Peripherie, T<sub>CM</sub> befinden sich in den lymphatischen Geweben und T<sub>RM</sub> befindet sich in diversen Geweben [157, 163].

### 1.3.7 T-Zellen und PMN: Freunde oder Feinde?

Neutrophile Granulozyten können auf T-Zellen sowohl stimulierende, als auch inhibierende Effekte besitzen. Dabei wird die Suppression von T-Zellaktivität über die Expression von Arginase 1, Erzeugung von ROS oder durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt.

Die Arginase 1 bedingte Depletion der Aminosäure L-Arginin führt in T-Zellen zu einem funktionslosen TCR (siehe auch 1.4 Die Aminosäure Arginin) [164]. Des Weiteren hat die

Arginindepletion eine Dephosphorylierung von Cofilin zur Folge, womit die Bildung einer immunologischen Synapse durch F-Actin nicht mehr möglich ist [165, 166]. Einen zusätzlichen PMN-Effektormechanismus bildet die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Das gebildete Sauerstoffradikal ist das Superoxidanion  $O_2^-$ , welches durch seine hohe Reaktivität sehr schnell weiterreagiert: zusammen mit NO bildet sich entweder das Anion Peroxynitrit [167] oder es bildet sich Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches mit Chloridionen, katalysiert durch MPO, zu Hypochlorsäure weiterreagiert [168]. Auch  $H_2O_2$  ist in der Lage die CD3 $\zeta$ -Kette herunter zu regulieren, wobei der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt wurde. Außerdem wird Cofilin oxidiert und verliert seine Funktion bei der Aktin-Depolymerisierung [165, 169]. Durch  $H_2O_2$  wird in T-Zellen die Apoptose induziert und zusätzlich wird der Nf- $\kappa$ B Signalweg inhibiert [170]. Die ROS bedingte Immunsuppression von T-Zellen erfordert hohe  $H_2O_2$  Konzentrationen, da es sich um sehr kurzlebige Moleküle handelt [169, 171]. Dies kann einerseits über eine große lokale Menge an PMN gewährleistet werden oder durch die CD11b/CD18-abhängige Ausbildung einer synaptischen Spalte, in die lokal  $H_2O_2$  freigesetzt wird [172].

Da regulatorische T-Zellen eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress aufweisen, werden sie von der neutrophilen ROS Produktion nicht beeinträchtigt und können weiterhin ihre inhibitorischen Effekte auf T-Zellen ausführen [173].

Durch Degranulierung der PMN werden Stoffe freigesetzt, die ebenfalls negative Wirkungen auf die T-Zellen haben. So können Serinproteasen, wie NE, für die T-Zellaktivierung erforderliche Moleküle wie CD25 spalten und inaktivieren [174, 175]. Auch die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  üben inhibitorische Funktionen auf T-Zellen aus [25, 176]. Cathelicidin LL-37 kann DCs, Monozyten und Makrophagen und deren Zytokinproduktion inhibieren [177].

Mittels PD-L1 Expression können Neutrophile darüber hinaus die Proliferation von T-Zellen über Zell-Zell-vermittelte Mechanismen unterdrücken [178].

Neutrophile können sich jedoch auch positiv auf T-Zellfunktionen auswirken. Durch eine IFN- $\gamma$  induzierte MHC-Klasse II Expression, sowie CD80 und CD86 sind PMN in der Lage als antigenpräsentierende Zellen Th1 und Th17 Zellen zu aktivieren [179, 180], nachdem diese Zellen von Neutrophilen über die Sekretion von CCL2, CXCL9 und CXCL10 rekrutiert wurden [181]. Hierbei können die PMN auch in die Lymphknoten wandern und dort direkt T-Zellen aktivieren oder Antigene an DCs transferieren [182-185]. Außerdem können DCs kontakt- und zytokinabhängig von PMNs aktiviert werden, die wiederum T-Zellen aktivieren [186, 187].

Durch Ausbildung von NETs können auch T-Zellen in ihrer Proliferation und Zytokinproduktion gefördert werden [188].

Neutrophile produzieren  $\alpha$ -Defensin, ein 4 kDa großes Peptid, das in niedrigen Konzentrationen die Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und DCs positiv beeinflusst und die Produktion von IL-2, IL-8 und IFN- $\gamma$  anregt [189-191]. Höhere Konzentrationen an  $\alpha$ -Defensin kehren die Wirkung in eine Reduktion der Immunantwort um [192]. Weiterhin kann Cathelicidin LL-37 aus den sekundären Granula der Neutrophilen zu einer erhöhten Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führen und die Produktion von IFN- $\gamma$  induzieren [17]. Ein weiterer immunstimulierender Mechanismus von LL-37 verläuft über die pDCs, die zu einer IFN- $\alpha$  Produktion und Reifung zu cDCs führt [193]. Auch Lactoferrin kann immunstimulierend wirken: in DCs führt Lactoferrin zu einer Aktivierung und induziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, was zu einer Aktivierung von Th1 Zellen führt [17]. Des Weiteren fördert Lactoferrin die CD4-Expression und erhöht die Proliferation [194, 195]. Ein von Lactoferrin abgespaltenes Produkt, welches die ersten 11 Aminosäuren des N-Terminus beinhaltet, erhöht die IL-6 Produktion von differenzierten DCs und somit eine Aktivierung von Th17 Zellen [196].

Weiterhin können auch Cathepsin G und D sowohl stimulierend, als auch inhibierend auf das Immunsystem wirken [17]. Die Auswirkungen neutrophiler Granula auf die T-Zellimmunität sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Dass viele aus den Neutrophilen-Granula freigesetzte Stoffe sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen erzielen können, hängt vermutlich mit den Konzentrationen der jeweiligen Stoffe sowie dem Zusammenspiel mit anderen lokal vorhandenen Faktoren ab.

Tabelle 1: Einfluss neutrophiler Granula auf die T-Zellimmunität (modifiziert nach [17]).

| Mediator                      | Granula            | Effekt auf T-Zellen/DCs  | Wirkung     |
|-------------------------------|--------------------|--|-------------|
| MPO                           | primär             | Ist ein T-Zellantigen  | aktivierend |
|                               |                    | Inhibiert T-Zellproliferation                                    | inhibierend |
|                               |                    | Inhibiert DCs und Zytokinproduktion                              | inhibierend |
| HNPs                          | primär             | Niedrige Konzentration: aktiviert DCs und Zytokinproduktion      | aktivierend |
|                               |                    | Chemoattraktant von naiven T-Zellen (und Gedächtniszellen)       | aktivierend |
|                               |                    | Induziert IFN- $\alpha$ Produktion von pDCs                      | aktivierend |
|                               |                    | Erhöht T-Zelladhäsion an das Lungenepithel                       | aktivierend |
|                               |                    | Induziert NF- $\kappa$ B Signalwege in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen | aktivierend |
|                               |                    | Anti-inflammatorische Wirkung auf DCs                            | inhibierend |
|                               |                    | Hohe Konzentration: induziert IL-8, inhibiert Aktivierung        | inhibierend |
| Elastase                      | primär             | Ist ein T-Zellantigen  | aktivierend |
|                               |                    | Starke Förderung der Th17 Zellen durch Spaltung von DC CXCL8     | aktivierend |
|                               |                    | Induziert DCs zum Priming von Tregs                              | inhibierend |
|                               |                    | Induziert DCs zur Produktion von TGF- $\beta$                    | inhibierend |
|                               |                    | Inhibiert T-Zellproliferation in einer MLR                       | inhibierend |
|                               |                    | Reduziert T-Zelltransmigration                                   | inhibierend |
|                               |                    | Inhibiert DC Reifung und Co-Stimulation                          | inhibierend |
| LL-37                         | sekundär           | Ist ein T-Zellantigen  | aktivierend |
|                               |                    | Induziert Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen            | aktivierend |
|                               |                    | Chemoattraktant für CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (FPR2 abhängig)    | aktivierend |
|                               |                    | DC Reifung und Th1 Aktivierung                                   | aktivierend |
|                               |                    | Bildet Komplex mit DNA, was von pDCs aufgenommen wird            | aktivierend |
|                               |                    | Induziert CD86 nach Internalisierung durch DCs                   | aktivierend |
|                               |                    | Inhibiert IFN- $\gamma$ Aktivierung von DC                       | inhibierend |
| Inhibiert TLR Signalweg an DC | inhibierend        |  |             |
| Lactoferrin                   | sekundär           | DC Reifung und Aktivierung                                       | aktivierend |
|                               |                    | Fördert T-Zellproliferation und Th1 Generation                   | aktivierend |
|                               |                    | Reguliert CD4 hoch   | aktivierend |
|                               |                    | Verhindert T-Zellproliferation in einer MLR                      | inhibierend |
|                               |                    | Verhindert Th1 Proliferation (aber nicht Th2)                    | inhibierend |
| Arginase I                    | primär/<br>tertiär | Inhibiert T-Zellproliferation über CD3 $\zeta$                   | inhibierend |
|                               |                    | Induziert Zellzyklusarrest                                       | inhibierend |
|                               |                    | Inhibiert die Ausbildung der immunologischen Synapse             | inhibierend |
|                               |                    |  |             |

## 1.4 Die Aminosäure Arginin

Die L-Form des Arginins stellt eine semi-essentielle proteinogene Aminosäure dar. Die Funktionen von Arginin sind sehr vielseitig. So wird L-Arginin zum einen für die Proteinbiosynthese verwendet, und zum anderen entstehen aus L-Arginin L-Prolin, was für die Kollagensynthese benötigt wird, und Polyamine, die für biologische Prozesse der Zellen wichtig sind [197-199]. Weiterhin stellt Arginin die einzige Quelle für den Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) dar. Lebensmittel mit hohem Arginingehalt sind Kürbiskerne, Pinienkerne und Walnüsse, sowie Erbsen, Fleisch, Fisch und Milchprodukte. Neben der Nahrungsaufnahme kann die basische Aminosäure auch mit Hilfe der beiden Enzyme Argininosuccinat-Synthase 1 (ASS1) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) aus Citrullin synthetisiert werden. Dabei katalysiert ASS1 die ATP-abhängige Reaktion von L-Aspartat und Citrullin. Von dem Zwischenprodukt Argininosuccinat wird in einer Folgereaktion durch ASL Fumarat abgespaltet, wobei Arginin entsteht [200, 201]. Diese Reaktionsschritte sind Teil des Harnstoffzyklus, der für die systemische Eliminierung von Stickstoff (in Form von Ammoniumionen) als Endprodukt Harnstoff relevant ist. Die Synthese von L-Arginin aus L-Citrullin kann aber auch z.B. sehr effizient in den proximalen Tubuli der Niere stattfinden [202]. Die L-Argininkonzentrationen im Körper reichen hierbei von 50 – 250  $\mu\text{M}$  im Blutplasma bis zu 1 mM im intrazellulären Raum [203-205]. Die Aufnahme von L-Arginin in Zellen erfolgt über diverse in der Plasmamembran lokalisierte Transporter, wobei die kationischen Aminosäuretransporter (CAT: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3) die wichtigsten sind [206]. So nutzen T-Zellen CAT-1 um L-Arginin aufzunehmen [207], da eine suffiziente Argininverfügbarkeit für die Funktion von T-Zellen von großer Wichtigkeit ist. Erreichen die Argininkonzentrationen einen Wert  $< 80 \mu\text{M}$ , beginnen T-Zellen die Expression ihrer CD3 $\zeta$ -Ketten herunter zu regulieren, wodurch keine erfolgreiche TCR-Funktion mehr erfolgen kann [208]. Bei Argininkonzentrationen  $< 40 \mu\text{M}$  ist die T-Zellproliferation signifikant reduziert und T-Zellen werden in die G0-G1-Phase des Zellzyklus arretiert [209]. Durch die aktivierungsabhängige Expression von ASS1 bei weitgehend konstitutiver Expression von ASL können T-Zellen bei Bedarf L-Arginin über L-Citrullin herstellen, welches sie über den L-Typ Aminosäuretransporter (LAT-1) aufnehmen [210]. L-Arginin ist das Substrat von vier unterschiedlichen Enzymgruppen: Arginasen, NO-Synthasen (NOS), Arginindecarboxylase (ADC) und Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT).

### 1.4.1 Arginase

Bei der Arginase handelt es sich um ein homotrimeres, Mangan-abhängiges Metalloenzym, welches die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff katalysiert [211]. Dieser Reaktionsschritt findet in der Leber als letzter Teil des Harnstoffzyklus statt und wird von Arginase I, auch Leber-Arginase genannt, katalysiert [212]. Zudem wird dieselbe Reaktion durch die Isoform Arginase II katalysiert, wobei hier die Funktion der Arginin-Homöostase im Vordergrund steht [213, 214]. Diese humanen Isozyme weisen eine Sequenzhomologie von 58 % und identische katalytische Zentren auf [215]. Dennoch unterscheiden sie sich neben den bereits genannten Funktionen auch in Größe und Vorkommen: die Sequenz der humanen Arginase I beinhaltet 322 Aminosäuren und sie kommt vorwiegend im Zytosol der Hepatozyten vor, wohingegen Arginase II mit 354 Aminosäuren in den Mitochondrien von zahlreichen Geweben, vor allem in Nierenzellgewebe und Prostatazellen vorkommt [208, 216]. Neben Hepatozyten weisen beim Menschen humane neutrophile Granulozyten eine konstitutive Arginase I Expression auf [27]. Des Weiteren gehört die Rekrutierung myeloischer Zellen und die Induktion der Arginase I Expression in diesen Zellen zu den Immunevasionsmechanismen von Tumorzellen. So können Makrophagen [217, 218], myeloische Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs [219, 220]), DCs und Neutrophile durch die Tumorzellen dahingehend polarisiert werden, dass sie pro-tumorale Funktionen aufweisen. So konnten in vielen unterschiedlichen Tumorpatienten hohe Arginase 1 Expressionen festgestellt werden, vor allem in Tumoren der Harnblase, Lunge, Brust und des Gastrointestinaltraktes, wobei sowohl Tumorzellen [221, 222], als auch die in das Tumorgewebe infiltrierenden myeloischen Zellen [221, 223] Arginase 1 exprimierten. Die Arginase 1-bedingte Depletion der Aminosäure L-Arginin im Tumormilieu hat eine Immunsuppression vor allem von zytotoxischen T-Zellen zur Folge, wodurch die anti-tumorale Funktion dieser Zellen blockiert wird. Dieser „Tumor-Escape“ Mechanismus inhibiert z.B. potentiell auch die Wirkungsstärke einer zellulären Krebsimmuntherapie, z.B. mit T-Zellen mit genetisch veränderten T-Zellrezeptoren [224]. Auf dieser Grundlage ist die Entwicklung klinisch anwendbarer spezifischer Arginase 1-Inhibitoren als neuartige Immuntherapeutika sinnvoll.

## 1.4.2 Arginase 1 Inhibitoren

Die gut begründete Entwicklung von Arginase Inhibitoren birgt jedoch auch Sicherheitsbedenken und Herausforderungen. Angesichts der wichtigen Funktion von Arginase 1 im Harnstoffzyklus, muss eine möglichst geringe, idealerweise gar keine, Beeinträchtigung dieses Enzyms in der Leber gewährleistet werden, um die klinischen Folgen einer Hyperammonämie zu vermeiden [208, 225]. Weiterhin stellt die Entwicklung eines spezifischen Arginase 1 Inhibitors aufgrund der 100 % Homologie der katalytischen Zentren beider Isoenzyme eine große Herausforderung dar.

Unter den Arginase Inhibitoren existieren verschiedene Gruppen, die nach ihren chemischen Strukturformeln zusammengefasst werden können. Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um Argininanaloge. Neben den Hydroxyderivaten des L-Arginins werden auch die Boronsäure- und Nitroderivate, sowie in der Natur vorkommenden zu den Arginase Inhibitoren gezählt [226]. Zu natürlich vorkommenden Arginase Inhibitoren gehören unter anderem Obacunon (in vielen Zitrusfrüchten enthalten), Salvianolsäure B (chinesische Kräutermedizin aus Rotwurz-Salbei) und das (Hydroxyl-)Sauchinon (extrahiert aus der asiatischen Molchschwanzpflanze) [226]. Die wichtigsten Vertreter der Boronsäurederivate sind ABH (2-amino-6-boronoheptanoic acid) und BEC (S-(2-boronoethyl)-L-cystein). Im Folgenden wird auf die beiden in den Versuchen verwendeten Arginase Inhibitoren nor-NOHA und INCB001158 näher eingegangen.

### 1.4.2.1 N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA)

Bei der Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO durch die NO-Synthase entsteht das Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin (NOHA), welches in einer regulatorischen Funktion einen natürlichen Arginase Inhibitor darstellt [205]. Hierbei liegt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) für Arginase I bei 20 μM [226].

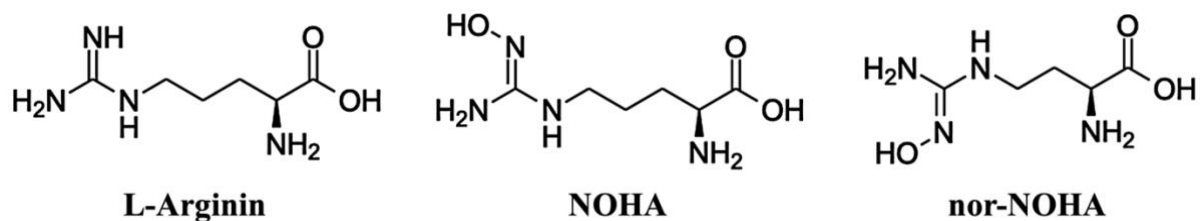


Abbildung 7: Strukturelle Darstellung von L-Arginin, NOHA und nor-NOHA.

Ausgehend von NOHA konnte ein weiteres Hydroxyderivat von L-Arginin mit einer verbesserten Affinität zur Arginase entwickelt werden: N<sup>o</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA) unterscheidet sich strukturell von NOHA lediglich um die Reduktion einer Methylengruppe und erwies sich mit einer IC<sub>50</sub> von 0,5 µM für Arginase 1 als effizienter Inhibitor [226, 227]. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von nor-NOHA konnten mittels *in vivo* Versuchen näher untersucht werden [228, 229]: durch mehrfaches intravenöses oder intraperitoneales Applizieren von nor-NOHA konnte eine knapp 100 %ige Bioverfügbarkeit festgestellt werden. Dabei konnte durch eine tägliche Applikation über zwei Monate keine toxische Wirkung von nor-NOHA nachgewiesen werden. Mit einer Halbwertszeit von bis zu 30 min wird nor-NOHA schnell eliminiert. Ursachen hierfür können eine chemische Instabilität des Moleküls, wie auch eine schlechte Löslichkeit und pH-abhängige Ionisation sein [226, 229]. Trotzdem konnte eine Wirksamkeit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erfolgreich bewiesen werden. In einem *in vitro* Prostata-Ca Modell konnte durch nor-NOHA in Kombination mit einem NO-Synthase Inhibitor eine Arginase 1 Inhibition und damit einhergehend die Wiederherstellung der T-Zellzytotoxizität gezeigt werden [230]. Weiterhin konnte die Immunsuppression durch PMN bei eitrigen Entzündungen durch nor-NOHA rückgängig gemacht werden [231]. In mehreren Mausmodellen konnte die Wirksamkeit von nor-NOHA in Lungentumoren und metastasiertem Brustkrebs gezeigt werden [221, 232, 233], was sich durch ein reduziertes Tumorwachstum und verbesserte Zytotoxizität der T-Zellen zeigte.

#### 1.4.2.2 INCB001158

In klinischen Studien werden derzeit nur zwei Arginase Inhibitoren getestet, die beide von Calithera Biosciences entwickelt wurden: INCB001158 und CB-280. CB-280 wird in einer Phase 1b Studie verwendet, in der die Arginase Inhibition zu erhöhten bronchialen NO-Mengen in Mukoviszidosepatienten führen soll mit der möglichen Folge einer verbesserten Lungenfunktion (NCT04279769) [216]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Inhibitor INCB001158 verwendet. Dieser niedermolekulare Arginase I Inhibitor hat eine orale Bioverfügbarkeit und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) für Arginase I beträgt 86 nM und für Arginase II 296 nM [223]. Die Wirksamkeit von INCB001158 wurde *in vitro* und *in vivo* getestet. So konnte die Proliferation und Zytokinsekretion von L-Arginin-auxotrophen NK- und T-Zellen in Co-Kulturen mit Neutrophilen oder granulozytären MDSCs durch die Zugabe von INCB001158 wiederhergestellt werden [223]. Die pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften von INCB001158 wurden in Mäusen getestet. Den Mäusen wurde über knapp 6 Wochen täglich zweimal INCB001158 verabreicht, wobei eine gute



Verträglichkeit ohne Nebenwirkungen beobachtet werden konnte. In Mausmodellen konnte zudem ein signifikant reduziertes Tumorwachstum von Brust-, Lungen-, Darm- und Hautkrebs unter INCB001158 Supplementierung gezeigt werden [223]. In Kombination von INCB001158 mit Checkpoint-Inhibitoren, Gemcitabin oder adaptiver T-Zell- bzw. NK-Zelltherapie führte zu einer verstärkten Wirkung der Therapien verglichen zu einer Monotherapie ohne Arginase Inhibitor [223]. Mit dem INCB001158 Inhibitor rekrutieren aktuell vier klinische Studien. So wird in einer Phase 1/2 Studie die Wirkung von INCB001158 als Monotherapie oder in Kombination mit dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab in fortgeschrittenen oder metastasierten soliden Tumoren untersucht (NCT02903914). Die Kombinationstherapie mit einem Antikörper gegen CD38 wird in einer weiteren Phase 1/2 Studie eruiert. Hier wird die Therapie mit Daratumumab mit der Kombination aus Daratumumab und INCB001158 in Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplen Myelom verglichen (NCT03837509). Zudem wird die Kombination von INCB001158 mit klassischer Chemotherapie in einer Phase 1/2 Studie an Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten soliden Tumoren getestet, wobei die Zytostatika aus den Gruppen der Antimetabolite, Platinderivate, Pyrimidinanaloga oder Taxane stammen (NCT03314935). Die vierte klinische Studie untersucht die Monotherapie von INCB001158 und von Retifanlimab (PD-1 Antikörper), sowie die Kombinationstherapie beider Substanzen in Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten soliden Tumoren (NCT03910530).

## 1.5 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist die zweithäufigste bösartige hämatologische Tumorerkrankung. Es ist durch die Ausbreitung entarteter monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert. Die unkontrollierte Produktion von monoklonalen Immunglobulinen, so genannten Paraproteinen, oder von Immunglobulin-Leichtketten kann im Serum und/oder im Urin nachgewiesen werden [234]. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung generieren die Myelomzellen eine pro-tumorale Umgebung, die nicht nur das eigene Wachstum, sondern auch die Suppression von T-Zellfunktionen fördert. Dies wird unter anderem durch die Rekrutierung von myeloischen Suppressorzellen (MDSCs) und TAMs erreicht [235], die pro-tumorale Eigenschaften aufweisen. Daher ist die Re-Aktivierung zytotoxischer anti-tumoraler T-Zellen sowie weiterer Komponenten des Immunsystems ein vielversprechender neuer Ansatz für die Bekämpfung des Multiplen Myeloms mittels Tumorimmuntherapie.

### 1.5.1 Epidemiologie

Die klinischen Vorstufen des MM sind die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das sogenannte schwelende Myelom (engl. *smoldering myeloma*; SMM). Die jährliche Anzahl der Erstdiagnosen in Deutschland beträgt bei Männern 3.600 Fälle und bei Frauen 2.900 Fälle, wobei das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose bei ca. 70 Jahren liegt. Patienten mit Multiplem Myelom weisen im Mittel eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40 % auf [236].

### 1.5.2 Symptome und Diagnose

Das Multiple Myelom führt zu diversen klinisch hochrelevanten Problemen. Unter den häufigsten Beschwerden imponieren v.a. Knochenschmerzen und Hyperkalzämie aufgrund osteolytischer Destruktionen, erhöhte Infektneigung bei Immunglobulinmangel sowie Schwäche und Reduktion des Allgemeinzustandes bei Anämie [236]. Für die Diagnosestellung werden die Kriterien der *International Myeloma Working Group* (IMWG) herangezogen, welche die CRAB- und SLiM-Kriterien beinhalten [237]. Die CRAB-Kriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst und in Tabelle 3 sind die ergänzenden SLiM-Kriterien enthalten.

**Tabelle 2: CRAB-Kriterien**

| Abkürzung | Bedeutung           | Erläuterung   |
|-----------|---------------------|---|
| C         | Hypercalcemia       | Serumkalzium > 0,25 mmol/ oberhalb der oberen Norm oder > 2,75 mmol/l   |
| R         | Renal insufficiency | Kreatininclearance < 40 ml/min oder Serumkreatinin > 2 mg/dl  |
| A         | Anemia              | Hämoglobin > 2 g/dl unterhalb der Norm oder < 10 g/dl   |
| B         | Bone lesions        | mindestens 1 Osteolyse in Computertomographie, Positronenemissionstomographie-Computertomographie oder Skelettröntgenuntersuchung |

**Tabelle 3: SLiM-Kriterien**

| Abkürzung | Bedeutung     | Erläuterung   |
|-----------|---------------|---|
| S         | Sixty percent | klonale Plasmazellinfiltration im KM $\geq 60$ %                          |
| Li        | Light chain   | Verhältnis der freien Leichtketten (beteiligte : unbeteiligte) $\geq 100$ |
| M         | MRI           | $\geq 2$ fokale Läsionen mit einem Mindestdurchmesser von 5 mm            |

### 1.5.3 Therapie des MM

#### 1.5.3.1 Erstlinientherapie

Ist eines der in Tabelle 3 zusammengefassten CRAB-Kriterien erfüllt, wird eine Therapie eingeleitet. Für „fite“ Patienten (Alter < 70 Jahre ohne relevante schwere Komorbiditäten) besteht die Erstlinientherapie aus Induktion, Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation und Erhaltungstherapie. Die Erstlinientherapie für Patienten, die nicht für eine Hochdosistherapie geeignet sind, setzt sich aus unterschiedlichen Kombinationen des Proteasominhibitors Bortezomib, den Zytostatika Cyclophosphamid und Melphalan, den Immunmodulatoren Thalidomid, Lenalidomid und den Steroidhormonen Dexamethason und Prednison zusammen. Die Wahl der Kombinationen und die Dosierung wird hierbei an den Patienten angepasst.

#### 1.5.3.2 Rezidivtherapie

Auch in der Rezidivtherapie wird auf Proteasominhibitoren (Carfilzomib, Ixazomib) und Immunmodulatoren (Lenalidomid, Pomalidomid) zurückgegriffen. Diese werden teilweise in einer Kombinationstherapie mit monoklonalen Antikörpern (anti-CD38: Daratumumab, Isatuximab, anti-SLAMF7: Elotuzumab) eingesetzt. Nur noch selten werden klassische Zytostatika wie Bendamustin (Stickstoff-Lost-Derivat) oder Melphalan im Rezidiv verwendet. Im Jahr 2021 wird dagegen die erste Zulassung eines CAR-T-Produktes (engl. *chimeric antigen receptor T cell therapy*; Idecaptogene Vicleucel) für Patienten mit rezidiviertem Multiplem

Myelom erwartet. Diese zelluläre Immuntherapie erreichte in der Zulassungsstudie Ansprechraten von mehr als 80 % mit vielen kompletten Remissionen bei umfangreich vorbehandelten Patienten [238]. Hauptproblem dieser modernen, extrem effektiven Immuntherapie ist noch die fehlende dauerhafte Persistenz der Krankheitskontrolle.

#### 1.5.4 Prognose des MM

In den letzten Jahren haben zahlreiche neue Therapieoptionen die Behandlung und Prognose des Multiplen Myeloms wesentlich verbessert. Dennoch handelt es sich in den meisten Fällen um eine nicht kurative Therapiestrategie und das mediane Gesamtüberleben für transplantationsfähige Patienten beträgt ca. 8 – 10 Jahre. Mittels allogener Stammzelltransplantation lassen sich bei ca. 20 % der Patienten Langzeitremissionen von > 10 Jahren im Sinne einer Kuration erreichen.

#### 1.5.5 Anerge T-Zellen im MM

Wie bereits erwähnt, befinden sich die entarteten Plasmazellen bei Myelompatienten in den meisten Fällen ausschließlich im Knochenmark. Hierbei wurden veränderte T-Zellphänotypen im Tumormilieu beobachtet: erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Zelltypen, die sich durch erhöhte Expression von PD-1, CTLA-4, 2B4 und CD169 auszeichnen und seneszente T-Zelltypen, die durch CD57<sup>+</sup> und CD28<sup>-</sup> charakterisiert sind [239]. Dieses immunsuppressive Tumormilieu führte in den anergen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum einen zu einer deutlich erniedrigten Proliferation und zum anderen zu gestörten und beeinträchtigten Effektorfunktionen [239]. Für eine erfolgreiche Therapie ist ein funktionierendes Immunsystem jedoch sehr relevant, so dass die anti-tumoralen Eigenschaften dieser T-Zellen wiederhergestellt werden müssen.

## 2. Materialien

### 2.1 Zelllinien und Medien

#### 2.1.1 Zelllinien

Die humane Zelllinie NCI H929 (Multiples Myelom) wurde von Prof. Dr. med. Hundemer (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Alle Transduktionen dieser Zelllinie wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Theobald (III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Die Transduktion mit Luciferase (pBullet\_luc\_IRES\_puro) erfolgte durch Dr. Amann. Diese NCI\_luc Zellen wurden wiederum durch C. Müller retroviral entweder mit HLA.A2-p53(264-272) (pMx\_puro[sc-A2kb-b2m-p53]) oder mit HLA.A2-mdm2(81-88) (pMx\_puro[sc-A2kb-b2m-mdm2]) transduziert.

Die Phoenix Ampho Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) wurden zur Transduktion humaner T-Zellen verwendet und vom Hersteller *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

#### 2.1.2 Medien und Zusätze

**Tabelle 4: Verwendete Medien und Zusätze**

| Bezeichnung   | Artikelnummer | Hersteller               |
|---|---------------|--------------------------|
| D-Glucose   | G7021         | Sigma-Aldrich            |
| Dialysiertes FCS, hitzeinaktiviert  | F0392         | Sigma-Aldrich            |
| DMEM, Glukose hochkonzentriert, ohne L-Gln  | 11960-044     | Gibco™                   |
| Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert   | F7524         | Sigma-Aldrich            |
| HEPES, 1 M Lösung   | 882120        | Lonza                    |
| Humanes AB-Serum (ABS), hitzeinaktiviert  | –             | Transfusionszentrale UMM |
| L-Arginin, Stock: 100 mM in PBS   | A-8094        | Sigma-Aldrich            |
| L-Glutaminlösung, 200 mM  | G7513         | Sigma-Aldrich            |
| L-Leucin, Stock: 100 mM in dH <sub>2</sub> O  | 61819         | Sigma-Aldrich            |
| L-Lysin, Stock: 100 mM in dH <sub>2</sub> O   | L-5626        | Sigma-Aldrich            |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, Stock: 10 mM  | A2087,0100    | AppliChem                |
| Natriumpyruvat  | S8636         | Sigma-Aldrich            |
| RPMI 1640 Medium mit NHCO <sub>3</sub> , ohne L-Gln                                       | R0883         | Sigma-Aldrich            |
| RPMI 1640 Medium mit L-Gln und NHCO <sub>3</sub> , ohne L-Arg, L-Lys, L-Leu und Phenolrot | R1780         | Sigma-Aldrich            |

**Fortsetzung Tabelle 4: Verwendete Medien und Zusätze**

| Bezeichnung                     | Artikelnummer | Hersteller           |
|---------------------------------|---------------|----------------------|
| Seahorse XF RPMI Medium, pH 7,4 | 103577-100    | Agilent Technologies |

**Tabelle 5: Zusammensetzung der angesetzten Medien**

| Bezeichnung                                    | Zusammensetzung   | Verwendung   |
|--|---|--|
| DMEM   | 500 mL DMEM<br>10 % FCS<br>1 % L-Gln<br>1 % Pen/Strep<br>3 % HEPES  | Kultivierung der Phoenix Ampho Zellen                                  |
| Humanes RPMI Medium<br>(= Kultivierungsmedium) | 500 mL RPMI (#0883)<br>10 % ABS<br>1 % L-Gln<br>1 % Pen/Strep<br>3 % HEPES  | Kultivierung der T-Lymphozyten   |
| Mangelmedium                                   | 50 mL RPMI (#1780)<br>10 % dial. FCS<br>1 % L-Gln<br>1 % Pen/Strep<br>20 µM MnCl <sub>2</sub><br>220 µM L-Lys<br>400 µM L-Leu | Für argininfreie Bedingungen   |
| RPMI Medium                                    | 500 mL RPMI (#0883)<br>10 % FCS<br>1 % L-Gln<br>1 % Pen/Strep   | Kultivierung der NCI A2 Zelllinien                                     |
| Seahorse Medium                                | 9,7 mL XF RPMI Medium, pH = 7,4<br>0,1 mL 1 M D-Glucose<br>0,1 mL Na-Pyruvat<br>0,1 mL L-Glutamin                             | Medium für das Seahorse Experiment                                     |
| Versuchsmedium                                 | Mangelmedium<br>150 µM L-Arg  | Medium für das Ansetzen der<br>Vorinkubationen und Kontrollbedingungen |

## 2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

### 2.2.1 Chemikalien

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien**

| Chemikalie   | Artikelnummer | Hersteller               |
|--|---------------|--------------------------|
| 2-Propanol ROTIPURAN $\geq 99,8\%$                 | 6752.3        | Carl Roth                |
| [ <sup>3</sup> H]Thymidinlösung, 5 mCi/185 MBq     | NET027E005MC  | Perkin Elmer             |
| 2-Propanol ROTISOLV® $\geq 99,95\%$                | AE73.2        | Carl Roth                |
| Acetonitril ROTISOLV® $\geq 99,98\%$ , Ultra LC-MS | HN40.1        | Carl Roth                |
| Acrylamidstammllösung 30 %                         | 3029.1        | Carl Roth                |
| Ammoniumchlorid                                    | K298.1        | Carl Roth                |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)                        | A3678         | Biorad                   |
| AMPure XP  | A63881        | Beckman Coulter          |
| Bovines Serum Albumin (BSA)                        | sc-2323       | Santa Cruz Biotechnology |
| Calcein AM, 1 mg/mL in DMSO                        | 80011-2       | Biotium                  |
| D-Luciferin, Stock: 16,67 mg/mL                    | 122796        | Perkin Elmer             |
| ProLong™ Glass Antifade Mountant mit NucBlue™      | P36985        | Invitrogen               |
| Dextransulfat Natriumsalz 500                      | A4970,0100    | AppliChem                |
| Dimethylsulfoxid                                   | A994.2        | Carl Roth                |
| Dulbecco's <i>Phosphat buffered Saline</i> (PBS)   | D8537         | Sigma-Aldrich            |
| Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28              | 11131D        | Thermo Fisher Scientific |
| Eisessig   | 3738.1        | Carl Roth                |
| Ethanol, absolut                                   | 32205         | Sigma-Aldrich            |
| Ethanol, vergällt                                  | K928.3        | Roth                     |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                    | 8040.3        | Carl Roth                |
| FuGene6  | E2692         | Promega                  |
| Geneticin, Stock: 100 mg/mL                        | 11811-031     | Gibco                    |
| Glycin   | 3908.2        | Carl Roth                |
| Harnstoff (Urea)                                   | 51458         | Fluka                    |
| Histopaque® -1077                                  | 10771-500ML   | Sigma-Aldrich            |
| INCB001158, Stock: 200 mM in dH <sub>2</sub> O     |               | Incyte                   |
| Proleukin® S (IL-2), Stock: 6000 U/mL              |               | Novartis                 |
| Kaliumhydrogencarbonat                             | P748.1        | Carl Roth                |
| Laemmli 2x Probenpuffer                            | S3401         | Sigma-Aldrich            |
| Leupeptin, Stock: 1 mg/mL in dH <sub>2</sub> O     | L2884         | Sigma-Aldrich            |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat                     | A2087,0100    | AppliChem                |
| Methanol   | 0082.3        | Carl Roth                |
| Methanol ROTISOLV® HPLC Ultra Gradient Grade       | X948.2        | Carl Roth                |
| Milchpulver  | T145.1        | Carl Roth                |
| N-Acetylcystein (NAC), Stock: 1 M                  | A7250         | Sigma-Aldrich            |
| Natriumchlorid                                     | 3957.1        | Carl Roth                |

**Fortsetzung Tabelle 6: Verwendete Chemikalien**

| Chemikalie  | Artikelnummer | Hersteller     |
|---|---------------|----------------|
| Natriumdodecylsulfat                                    | L3771         | Sigma-Aldrich  |
| Natriumfluorid, Stock: 1000 mM in dH <sub>2</sub> O     | S7920         | Sigma-Aldrich  |
| Natriumorthovanadat, Stock: 100 mM in dH <sub>2</sub> O | S-6508        | Sigma-Aldrich  |
| nor-NOHA Acetatsalz, Stock: 125 mM in dH <sub>2</sub> O | 4027934.1000  | Bachem         |
| o-Phosphorsäure   | 6366.1        | Carl Roth      |
| OKT-3, Stock: 2,7 mg/mL                                 |               |                |
| Para-Formaldehyd  | P6148         | Sigma-Aldrich  |
| Pepstatin, Stock: 1,5 mg/mL in MeOH                     | P5318         | Sigma-Aldrich  |
| Phenylmethylsulfoniumfluorid, Stock: 100 mM in EtOH     | P7626         | Sigma-Aldrich  |
| Poly-D-Lysin  | 3439-100-1    | R&D Systems    |
| Polybrene, Stock: 5 mg/mL                               | H9268         | Sigma-Aldrich  |
| Precision Plus Protein™ Dual Color Standards            | 161-0374      | Bio-Rad        |
| Precision Protein™ HRP Konjugat                         | 161-0380      | Bio-Rad        |
| QIAzol Lysis Reagent                                    | 79306         | QIAGEN Science |
| Salzsäure, rauchend 37 %                                | 4625.2        | Carl Roth      |
| Schwefelsäure   | 4623.1        | Carl Roth      |
| Szintillationslösung Rotiszint® Eco Plus                | 0016.3        | Carl Roth      |
| TEMED   | T9281         | Sigma-Aldrich  |
| Tris  | 4855.2        | Carl Roth      |
| Triton X-100  | T-8532        | Sigma-Aldrich  |
| Trypanblau-Lösung 0,4 %                                 | T8154-20ML    | Sigma-Aldrich  |
| Trypsin-EDTA Lösung                                     | T3924-100ML   | Sigma-Aldrich  |
| Tween® 20   | 9127.1        | Carl Roth      |
| Wasser ROTISOLV® Ultra LC-MS                            | HN43.1        | Carl Roth      |
| $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon                        | I3502         | Sigma-Aldrich  |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                | 4227.3        | Carl Roth      |



## 2.2.2 Lösungen und Puffer

**Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer**

| Lösung/Puffer           | Zusammensetzung  |
|-------------------------|--|
| 0,1 % Trypanblau-Lösung | 0,1 % Trypanblau in PBS  |
| 1 % PFA-Lösung          | 0,33 M PFA<br>2 mM EDTA  |
| 10x SDS-Laufpuffer      | 250 mM Tris<br>1,9 M Glycin<br>10 % einer 10 %igen SDS-Lösung  |
| 10x TBS                 | 100 mM Tris/HCl, pH 8<br>1,5 M NaCl  |
| 3 % Dextranlösung       | 3 % Dextran in Dulbecco´s PBS, steril filtrieren   |
| 6 % ISPF-Lösung         | 6 % ISPF in EtOH-Lösung  |
| Blockierlösung WB       | 5 % Milchpulver in TBST  |
| Blottingpuffer WB       | 20 mM Tris<br>150 mM Glycin<br>20 % Methanol   |
| Brij-Lysepuffer         | 1 % Brij in 50 mM Tris/HCl, pH = 7,5<br>2,19 µM Pepstatin<br>2,34 µM Leupeptin<br>1 mM PMSF<br>10 mM NaF<br>10 mM Na-o-van                       |
| Ery-Lyse Puffer         | 174 mM NH <sub>4</sub> Cl<br>10 mM KHCO <sub>3</sub><br>0,1 mM EDTA<br>pH = 7,3, steril filtrieren   |
| MACS-Puffer             | Dulbecco´s PBS<br>2 % FCS<br>1 mM EDTA   |
| PBS/EDTA                | 1 mM EDTA in Dulbecco´s PBS  |
| Sammelgelpuffer         | 0,5 M Tris/HCl, pH = 6,8<br>0,4 % SDS  |
| Säuregemisch            | 64 % H <sub>2</sub> O<br>27 % einer 85 %igen H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung<br>9 % einer 97 %igen H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lösung |
| TBST                    | 0,1 % Tween20 in 1x TBS  |
| Trenngelpuffer          | 1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8<br>0,4 % SDS  |
| Triton Lysepuffer       | 1 % Triton X-100 in H <sub>2</sub> O<br>50 mM Tris/HCl; beide Komponenten 1:1 mischen  |

## 2.2.3 Kits

**Tabelle 8: Verwendete Kits**

| Kit  | Bestandteile   | Artikelnummer | Hersteller             |
|--|--|---------------|------------------------|
| BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I    | 10x Annexin V Bindung Buffer<br>FITC Annexin V<br>Propidiumiodid Staining Solution | 556547        | BD Biosciences         |
| CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay | AQueous One<br>Solution Reagent  | G3582         | Promega                |
| DC™ Protein Assay Reagents Package                         | Reagent A<br>Reagent B<br>Reagent S  | 5000116       | Bio-Rad                |
| EasySep™ Human CD8 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit      | Human CD8 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail<br>D Magnetic Particles          | 19053         | Stemcell™ Technologies |
| EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit                       | Human T cell Enrichment Cocktail<br>D Magnetic Particles                           | 19051         | Stemcell™ Technologies |
| Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit                | ROS Assay Buffer<br>1000X ROS Label<br>250X ROS Inducer                            | K936-100      | BioVision              |
| Seahorse FluxPaks  | XFp Sensor Cartridges<br>XFp Cell Culture Miniplates<br>XFp Calibrant Solution     | 103022-100    | Agilent Technologies   |
| Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test Kit                | Oligomycin<br>FCCP   | 103275-100    | Agilent Technologies   |
| Shandon Kwik-Diff™ Stain Kit                               | Solution #1, Fixation<br>Solution #2, Eosin<br>Solution #3, Methylenblue           | 9990700       | Thermo Scientific      |
| Western Lightning® Plus ECL                                | Oxidizing Reagent Plus<br>Enhanced Luminol Reagent Plus                            | NEL103001EA   | Perkin Elmer           |

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie**

| Antikörper  | Fluorophor | Ursprung | Isotyp          | Artikelnummer | Hersteller            |
|-------------|------------|----------|-----------------|---------------|-----------------------|
| CD3         | PE         | murin    | IgG 1, $\kappa$ | 555333        | Becton Dickinson GmbH |
| CD4         | APC        | murin    | IgG 1, $\kappa$ | 555349        | Becton Dickinson GmbH |
| CD8         | FITC       | murin    | IgG 1, $\kappa$ | 555634        | Becton Dickinson GmbH |
| CD66b       | FITC       | murin    | IgM, $\kappa$   | 561927        | Becton Dickinson GmbH |
| V $\beta$ 3 | PE         | human    | IgG 1, $\kappa$ | 130-109-850   | Miltenyi Biotech      |

**Tabelle 10: Verwendete Isotypen für die Durchflusszytometrie**

| Isotyp          | Fluorophor | Ursprung | Artikelnummer | Hersteller            |
|-----------------|------------|----------|---------------|-----------------------|
| IgG 1, $\kappa$ | PE         | murin    | 555749        | Becton Dickinson GmbH |
| IgG 1, $\kappa$ | APC        | murin    | 555751        | Becton Dickinson GmbH |
| IgG 1, $\kappa$ | FITC       | murin    | 555748        | Becton Dickinson GmbH |
| IgM, $\kappa$   | FITC       | murin    | 551448        | Becton Dickinson GmbH |
| IgG 1, $\kappa$ | PE         | human    | 130-104-612   | Miltenyi Biotech      |

### 2.3.2 Antikörper für den Western Blot

**Tabelle 11: Verwendete Antikörper für den Western Blot**

| Primärantikörper  | Verdünnung | Verdünnungspuffer | Artikelnummer | Hersteller     |
|-------------------|------------|-------------------|---------------|----------------|
| Bak               | 1:1000     | 5% BSA/TBST       | 6947          | Cell Signaling |
| Bax               | 1:1000     | 5% BSA/TBST       | 5023          | Cell Signaling |
| Bcl-xL            | 1:1000     | 5% BSA/TBST       | 2764          | Cell Signaling |
| Caspase-3         | 1:1000     | 5% Milch/TBST     | 9662          | Cell Signaling |
| cleaved Caspase-3 | 1:1000     | 5% Milch/TBST     | 9661          | Cell Signaling |
| Vinculin          | 1:1000     | 5% BSA/TBST       | 4650          | Cell Signaling |

Der Ursprung aller verwendeten Western Blot Antikörper ist Kaninchen. Daher wurde als Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Peroxidase, in einer Verdünnung von 1:2000 in 5 % BSA/TBST verwendet (#7074S, Cell Signaling).

## 2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.4.1 Geräte und Gegenstände

**Tabelle 12: Verwendete Geräte und Gegenstände**

| Gerät                                   | Modell                          | Hersteller                     |
|---|---------------------------------|--------------------------------|
| 37 °C Inkubator, CO <sub>2</sub> -frei  | B15                             | Heraeus                        |
| Abzug                                   | 2-453-GAHD                      | Köttermann                     |
| Bioanalyser Instrument                  | 2100 Bioanalyser                | Agilent                        |
| Blottingkammer                          | Trans-Blot® Cell                | Bio-Rad                        |
| Counter (1450 LSC & Lumineszenz)        | MicroBeta TriLux                | Perkin Elmer                   |
| Durchflusszytometer                     | BD FACS Canto II                | BD Biosciences                 |
| Durchflusszytometer, Sorting            | BD FACS Diva III                | BD Biosciences                 |
| EasySep™ Magnet "The Big Easy"          | 18001                           | Stemcell Technologies          |
| Energieversorgung SDS                   | Power PAC™ 3000                 | Bio-Rad                        |
| Energieversorgung WB                    | Power PAC™ HC                   | Bio-Rad                        |
| EVOS Mikroskop                          | M5000                           | Invitrogen                     |
| Fluorometer                             | Qubit® 2.0                      | Invitrogen                     |
| Gefriertrockner                         | UNIVAPO-100H                    | Uniequip                       |
| Gelkammer SDS                           | Mini-PROTEAN® Tetra System      | Bio-Rad                        |
| Gelkammer SDS, groß                     | 45-2020                         | Peqlab                         |
| Harvester 96                            | Mach 3                          | Tomtec                         |
| Heizblock                               | Thermostat Plus 1,5 mL          | Eppendorf                      |
| Heizblock                               | Thermomixer5436                 | Eppendorf                      |
| iBright™                                | CL1000                          | Thermo Fisher Scientific       |
| Inkubator                               | Funktion Line                   | Heraeus                        |
| Magnet                                  | Magnetic Stand-96               | Invitrogen                     |
| Magnet                                  | 6-Tube Magnetic Separation Rack | Cell Signaling                 |
| Magnet (Dynabeads), 50 mL               | Dynal® MPC-50                   | Dynal Biotech                  |
| Magnet (Dynabeads), 15 mL               | MPC-L                           | Dynal Biotech                  |
| Magnet (Dynabeads), 1,5 mL              |                                 | Boehringer Mannheim Biochemica |
| Mikroskop                               | AE2000                          | Motic                          |
| Mikrovolumen-Spektrophotometer          | NanoDrop™ One                   | Thermo Fisher Scientific       |
| Platereader (Proteinbestimmungen, etc.) | MRX <sub>C</sub>                | DYNEX Technologies             |
| Platereader (nur Luciferase Assay)      | FLUOstar Omega                  | BMG Labtech                    |
| Seahorse                                | XFp Analyzer                    | Agilent Technologies           |
| Sonificator                             | Bioruptor® Plus                 | Diagenode                      |
| Sterilbank                              | Hera Safe HS18                  | Heraeus                        |
| Thermocycler                            | Labcycler                       | SensoQuest                     |
| Vortexer                                | REAX 2000                       | Heidolph                       |
| Vortexer                                | Vortex Genius 3                 | IKA Labortechnik               |
| Vortexer                                | G-560 E                         | Scientific Industries          |

**Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Geräte und Gegenstände**

| Gerät            | Modell               | Hersteller               |
|------------------|----------------------|--------------------------|
| Wasserbad        | 1003                 | GFL                      |
| Zentrifuge       | Heraeus Megafuge 16R | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge groß  | Heraeus Megafuge 40R | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge klein | 5417 R               | Eppendorf                |
| Zytozentrifuge   | Shandon Cytospin 4   | Thermo Fisher Scientific |

## 2.4.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

| Artikel                                | Artikelnummer | Hersteller                                 |
|--|---------------|--|
| 0,2 mL PCR Reaktionsgefäße (AG Bopp)   | 10733087      | Fisher Scientific                          |
| 1,5 mL Reaktionsgefäße                 | 616-201       | Greiner Bio-one                            |
| 14 mL Röhrchen (T cell Enrichment Kit) | 352057        | Falcon®                                    |
| 15 mL Reaktionsgefäße                  | 188271        | Greiner Bio-one                            |
| 2 mL Reaktionsgefäße                   | 72.695.500    | Sarstedt                                   |
| 24-well Platte                         | 662 160       | Greiner Bio-one                            |
| 50 mL Reaktionsgefäße                  | 227261        | Greiner Bio-one                            |
| 6 cm Petrischale                       | 353004        | Falcon®                                    |
| 6-well-Platte                          | 657160        | Greiner Bio-one                            |
| 96-well Platte mit Flachboden          | 655180        | Greiner Bio-one                            |
| 96-well Platte mit Flachboden, schwarz | 655086        | Greiner Bio-one                            |
| 96-well Platte mit Rundboden           | 650180        | Greiner Bio-one                            |
| Amicon Ultra-15 10 kDa Filtereinheit   | UFC901024     | Merck                                      |
| Amicon Ultra-15 3 kDa Filtereinheit    | UFC900324     | Merck                                      |
| Deckgläser                             | 10563462      | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH und Co. KG |
| FACS Röhrchen, 5 mL                    | 352008        | Falcon®                                    |
| Filterpapier, 96-well Format           | 1450-421      | Perkin Elmer                               |
| Kryoröhrchen                           | 122279        | Greiner Bio-one                            |
| Nitrozellulosemembran, 0,2 µm          | 10600001      | GE Healthcare                              |
| Pipettenspitzen, blau                  | S1111-6001    | Star Lab                                   |
| Pipettenspitzen, farblos               | 70.3021       | Sarstedt                                   |
| Pipettenspitzen, gelb                  | 70.760.012    | Sarstedt                                   |
| Plastikbehältnis für Filterpapier      | 1450-432      | Perkin Elmer                               |
| PVDF Membran, 0,45 µm                  | 10600023      | GE Healthcare                              |
| Sep-Pak® Vac tC18 Kartuschen, 6 cc     | WAT036790     | Waters™                                    |
| Shandon Cytoslide™                     | 5991056       | Thermo Scientific                          |
| Shandon Filter Cards                   | 5991022       | Thermo Scientific                          |
| Spritze, 50 mL                         | 300866        | Becton Dickinson GmbH                      |
| Sterilfilter Filtrapur S, 0,2 µm       | 83.1826.001   | Sarstedt                                   |

**Fortsetzung Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

| Artikel  | Artikelnummer | Hersteller        |
|--|---------------|-------------------|
| Szintillationsröhrchen                         | S207          | Fisher Scientific |
| TransWell Inserts 24-well Platte, 0,4 µm       | 353495        | Falcon®           |
| Zählkammer, Neubauer                           | 718605        | Blaubrand®        |
| Zellkulturflaschen, 550 mL 175 cm <sup>2</sup> | 660175        | Greiner Bio-one   |
| Zellkulturflaschen, 250 mL 175 cm <sup>2</sup> | 658175        | Greiner Bio-one   |
| Zellkulturflaschen, 50 mL 175 cm <sup>2</sup>  | 640175        | Greiner Bio-one   |

## 2.5 Software und Statistik

**Tabelle 14: Verwendete Software**

| Programm                  | Hersteller                             | Verwendung                            |
|---------------------------|--|---------------------------------------|
| 1450 LSC & Luminescence   | Perkin Elmer                           | Radioaktivitätsmessung                |
| EndNote X8                | EndNote™                               | Zitierungsprogramm                    |
| FlowJo™ 10.7.1            | Becton Dickinson GmbH                  | Auswertung der FACS Daten             |
| iBright Analysis Software | Thermo Fisher Scientific               | Auswertung der WB Daten               |
| Image J                   | Open Source, Entwickler: Wayne Rasband | Normierung der Seahorse Daten         |
| Microsoft Excel           | Microsoft                              | Erstellung der Tabellen, Statistik    |
| Microsoft PowerPoint      | Microsoft                              | Bearbeitung der Abbildungen           |
| Microsoft Word            | Microsoft                              | Erstellung der Textdokumente          |
| Prism 6.0                 | GraphPad Software                      | Erstellung der Abbildungen, Statistik |
| Wave 2.0                  | Agilent Technologies                   | Auswertung der Seahorse Daten         |

Für das Netzwerkdiagramm der Proteomicsdaten wurde die Internetseite [string.org](https://string.org) (<https://string-db.org>) zusammen mit den Informationen aus UniProtKD (<https://www.uniprot.org/uniprot/>) verwendet.

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Die erhaltenen Werte wurden zunächst mit *one-way* bzw. *two-way* ANOVA (*analysis of variance*) und anschließend mit dem *Tukey*-Test analysiert. Es wurden p-Werte mit  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

**Tabelle 15: P-Werte**

| Symbol | p-Wert  |
|--------|---------|
| ***    | < 0,001 |
| **     | < 0,01  |
| *      | < 0,05  |
| n.s.   | > 0,05  |

## 2.6 Ethikantrag

Diese Studie wurde im Rahmen des Teilprojekts TP06 („*Molecular T cell immunotherapy and inhibition of tumor immune escape mechanisms*“) von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Antrag vom 14.09.2017, Bearbeitungsnummer: 837.119.10 (7128)). Blutspender und Patienten mit Multiplem Myelom gaben ihre schriftliche Einwilligung nach der Deklaration von Helsinki.

## 3. Methoden

### 3.1 Methoden der Zellisolationen aus Vollblut

#### 3.1.1 Isolierung der Granulozyten

Das heparinisierte periphere Vollblut wurde zunächst 2:1 mit PBS/EDTA vermischt. In einem 50 mL Reaktionsgefäß wurden 15 mL des auf Raumtemperatur gebrachten HISTOPAQUE®-1077 vorgelegt und vorsichtig mit 35 mL Blut überschichtet. Anschließend wurde bei 1183g für 15 min und ohne Bremse zentrifugiert. Die trübe Interphase, welche v.a. die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) beinhaltet, wurde abgenommen und in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation der T-Zellen aus der PBMC-Phase wird im Folgenden unter 3.1.2 Isolierung der T-Zellen beschrieben. Nach Abnahme der Interphase wurde der restliche Überstand verworfen und das rote erythrozyten- und granulozytenreiche Pellet in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nachdem mit PBS/EDTA 1:1 verdünnt wurde, erfolgte die Dichtesedimentation mittels 3 %iger Dextranlösung: In einem Volumenverhältnis von 1:1 wurde die kalte 3 %ige Dextranlösung zum Erythrozyten/Granulozyten-Gemisch pipettiert, gut vermischt und 30 min bei RT ruhen gelassen. Nach Absenkung der Erythrozyten wurde die obere granulozytenreiche Phase in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 503g und 4 °C zentrifugiert. Um die restlichen Erythrozyten zu lysieren wurde das rötliche Pellet in 20 mL Ery-Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min auf RT inkubiert. Im Anschluss wurde 5 min bei 503g und 4 °C zentrifugiert und das helle Pellet mit reinen Granulozyten wurde 3× mit PBS/EDTA gewaschen. Sofern das Pellet nach erfolgter Erythrozytenlyse weiterhin rötlich gefärbt war, musste die Lyse vor den Waschschrinen wiederholt werden.

#### 3.1.2 Isolierung der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte mit dem negativen Selektionskit *Human T-cell Enrichment Kit* und dem EasySep™ Magneten *The Big Easy* gemäß dem Protokoll des Herstellers STEMCELL Technologies. Hierbei wurden die PBMC in einem 14 mL Röhrchen mit MACS-Puffer auf eine Konzentration von  $50 \times 10^6$  Zellen/mL gebracht. Es wurden 50 µL/mL des *Enrichment Cocktails* hinzugegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach sehr gründlichem Vortexen der *Magnetic Beads* wurden 50 µL/mL davon zu den PBMC pipettiert, gut durchmischt und 5 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit MACS-Puffer im Anschluss auf ein Volumen von insgesamt 5 mL gebracht. Das Röhrchen wurde dann in den



Magneten *The Big Easy* platziert und 5 min stehen gelassen. In einer fließenden Bewegung wurde der Inhalt des 14 mL Röhrchens in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß gekippt und auf 20 mL mit dem MACS-Puffer aufgefüllt. Die isolierten T-Zellen wurden entweder in Co-Kulturversuchen bzw. TransWell-Kulturversuchen direkt verwendet oder für 3 Tage kultiviert (siehe 3.2.1 Kultivierung der T-Zellen).

### 3.1.3 Isolierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Aus den reinen CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels *EasySep<sup>TM</sup> Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* und dem *EasySep<sup>TM</sup>* Magneten *The Big Easy* nach Herstellerangaben isoliert.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung der T-Zellen

Die isolierten T-Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  T-Zellen/mL in humanem RPMI Medium für maximal 3 Tage kultiviert. Im Inkubator herrschte eine konstante Temperatur von 37 °C und ein CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %.

### 3.2.2 Kultivierung der NCI H929

Als Medium für die Zelllinie NCI A2 wurde das RPMI Medium verwendet. Bei konfluentem Zellwachstum wurden die Zellen zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:5 passagiert.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl von PBMC

Die in der PBMC-Phase befindlichen Erythrozyten wurden vor der Zellzahlbestimmung eliminiert. Hierbei wurde die PBMC-Zellsuspension 1:1 mit einer 4 %igen Essigsäurelösung vermischt. 50 µL davon wurden anschließend mit 50 µL einer 0,1 %igen Trypanblaulösung vermischt. Ca. 8 µL dieser Lösung wurden zwischen Deckglas und Neubauer Objektträger mit Zählkammer-Raster pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei von vier Quadraten einer Zählkammer ausgezählt, mit dem Mittelwert wurde die Zellzahl/mL gemäß Herstellerangaben der Zählkammer bestimmt.

Für die Bestimmung der Zellzahl reiner Zellpopulationen bzw. Zelllinien wurden 50 µL der Zellsuspension direkt mit 50 µL der 1 %igen Trypanblaulösung vermischt.

### 3.2.4 Kryokonservierung

Die Myelomzelllinien NCI A2 und T-Zellen, die mit einem p53-spezifischen T-Zellrezeptor transduziert worden waren, wurden nach Beendigung der Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierbei wurden die Zellpellets in 1 mL FCS/10 % DMSO aufgenommen und in 1,5 mL Kryoröhrchen überführt. Bei der Kryokonservierung von Zellen muss beachtet werden, dass der Einfrierprozess schrittweise erfolgt, um die Bildung intrazellulärer Eiskristalle zu vermeiden. Diese führen zu Zellschäden und damit einhergehend zu einer schlechteren Überlebensrate der Zellen. Demnach erfolgte die Kühlung zunächst bei -80 °C, anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

### 3.2.5 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen

#### 3.2.5.1 Transfektion der Phoenix Ampho Zellen

Zunächst wurden am Tag 0 Phoenix Ampho Zellen aufgetaut und in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/15 mL *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert. An Tag 3 wurden  $1,2 \times 10^6$  Phoenix Ampho Zellen in 8 mL DMEM in eine Petrischale ( $\varnothing = 10$  cm) ausgesät. Am nächsten Morgen (Tag 4) wurde ein Mediumwechsel mit 6 mL DMEM durchgeführt und 4 h später wurde die Transfektion der Phoenix Ampho Zellen wie folgt durchgeführt: in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 800  $\mu$ L DMEM (ohne weitere Zusätze) vorgelegt und 35  $\mu$ L Fugene6 direkt ins Medium pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10  $\mu$ g des TCR Vektors *pBullet\_p53scTCR\_neo* und je 5  $\mu$ g der beiden Helferplasmide (pHit60 und pColt-Galv [240, 241]) dazugegeben und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser DNA-Ansatz wurde vorsichtig auf die Phoenix Ampho Zellen pipettiert und die Zellen zurück in den Inkubator gestellt. An Tag 5 (ca. 16 Uhr) wurde ein Mediumwechsel mit 8 mL humanem RPMI Medium durchgeführt.

#### 3.2.5.2 Transduktion humaner PBMC

An Tag 4 der Transduktion wurden die PBMC aus einer Vollblutkonserve isoliert (siehe 3.1.1) und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^6$  PBMC/well in 1 mL humanem RPMI Medium mit 30 ng/mL OKT-3 Antikörper und 600 U/mL IL-2 in einer 24-well Platte ausgesät. Die Transduktion der PBMC fand immer an Tag 6 statt. Hierbei wurde der virale Überstand der Phoenix Ampho Zellen geerntet und 10 min bei 872g und 32 °C zentrifugiert. Zur selben Zeit wurden die PBMCs (die zwei Tage zuvor ausgesät worden waren) geerntet und 5 min bei 490g zentrifugiert. Die PBMCs wurden im zellfreien, viralen Überstand so aufgenommen, dass eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  PBMC/0,5 mL erreicht wurde. Nach der Zugabe von Polybrene (5  $\mu$ g/mL) wurden 0,5 mL der Zellsuspension pro well in eine 24-well Platte ausgesät und 90 min bei 872g (ohne Bremse) und 32 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMCs über Nacht im Brutschrank kultiviert.

An Tag 7 wurden die PBMCs nach 3.2.5.3 Restimulation transduzierter T-Zellen restimuliert.

#### 3.2.5.3 Restimulation transduzierter T-Zellen

Die T-Zellen wurden in ein 50 mL Reaktionsgefäß geerntet und 5 min bei 654g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL humanem RPMI Medium pro  $0,5 \times 10^6$  T-Zellen resuspendiert und

nach der Zugabe von 2  $\mu\text{L}$  anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads pro  $5 \times 10^6$  T-Zellen und 600 U/mL IL-2 wurden 2 mL/well Zellsuspension in einer 24-well Platte vorgelegt und kultiviert.

Die Restimulation transduzierter T-Zellen wurde wöchentlich  $1 \times$  wiederholt, möglichst immer am selben Wochentag. Vor jeder Restimulation wurden die anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads entfernt. Hierzu wurde das 50 mL Reaktionsgefäß mit den geernteten T-Zellen für 5 min in einen Magneten gestellt. Anschließend wurde die dynabeadfreie Zellsuspension in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt.

### 3.2.6 Ansetzen der Versuchsbedingungen

#### 3.2.6.1 PMN-Sonikate

Die PMN-Sonikate (PMN-S) wurden nach 3.4.7 Herstellung der PMN-Sonikate generiert. Anschließend wurden die T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5  $\mu\text{L}$  Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) stimuliert für 48 h in folgenden Bedingungen inkubiert:

1. Versuchsmedium  $\pm$  polyklonale Aktivierung
2. Mangelmedium
3. 300 mU/mL Arginase 1 Aktivität  $\pm$  1 mM nor-NOHA
4. 600 mU/mL Arginase 1 Aktivität  $\pm$  1 mM nor-NOHA
5. 600 mU/mL rekombinante Arginase 1  $\pm$  1 mM nor-NOHA

#### 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen: Generierung von PMN-Überständen (PMN-ÜS)

Der Ansatz der PMN-Vorinkubation richtete sich nach der Anzahl an T-Zellen pro Volumen und Bedingung und wurde dementsprechend für jeden Versuch individuell angepasst. Im Folgenden wird das Vorgehen am Beispiel eines Proliferationsassays beschrieben.

Nach erfolgter Isolation der PMN aus Vollblut wurden diese in Versuchsmedium mit und ohne Zusatz des Arginase 1 Inhibitors nor-NOHA (1 mM) bzw. INCB001158 (0,1 mM) inkubiert. Hierbei wurden ausgehend von 50.000 T-Zellen/200  $\mu\text{L}$  unterschiedliche PMN:T-Verhältnisse ausgerechnet, in einer 24-well Platte angesetzt und für 72 h inkubiert:

- |      |  |
|------|--|
| 1:1  | 0,25 $\times 10^6$ PMN/1 mL $\pm$ Arginase 1 Inhibitor |
| 5:1  | 1,25 $\times 10^6$ PMN/1 mL $\pm$ Arginase 1 Inhibitor |
| 10:1 | 2,5 $\times 10^6$ PMN/1 mL $\pm$ Arginase 1 Inhibitor  |
| 20:1 | 5,0 $\times 10^6$ PMN/1 mL $\pm$ Arginase 1 Inhibitor  |

Während der Vorinkubation wurden die T-Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  T-Zellen/mL in humanem RPMI Medium kultiviert.

Nach der Vorinkubation wurden die PMN-Bedingungen jeweils in frische 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 2012g zentrifugiert. Währenddessen wurden die T Zellen gezählt (50.000 T-Zellen pro *well* in Triplets), 3× mit Mangelmedium gewaschen und in 10 µL/*well* Mangelmedium aufgenommen. Pro Bedingung wurden Triplets angesetzt. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µL Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) versehen und pro *well* wurden 10 µL der Zellsuspension vorgelegt. Anschließend wurden 190 µL PMN-Überstand (oder Medium) in die *wells* pipettiert und die Platte wurde 1 min bei 106g zentrifugiert. Die T-Zellen wurden für 48 h in den unterschiedlichen Bedingungen kultiviert.

### 3.2.6.3 Direkte Co-Kultur von T-Zellen und PMN

In diesem Versuchsaufbau wurden die T-Zellen und PMN nach Isolation für 48 h co-kultiviert. Dazu wurden zunächst die T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in die *wells* der 96-*well* Platte mit Rundboden vorgelegt und anschließend wurden die PMN in unterschiedlichen Verhältnissen (siehe 3.2.6.1) jeweils mit und ohne nor-NOHA bzw. INCB001158 hinzugefügt.

### 3.2.6.4 TransWell Kultur von T-Zellen und PMN

Die TransWell Kultur wurde in 24-*well* Platten angesetzt. Es wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen/800 µL pro *well* in Versuchsmedium mit und ohne nor-NOHA bzw. INCB001158 vorgelegt. Nachdem die Inserts in die *wells* platziert wurden, wurden die PMN in unterschiedlichen Verhältnissen (siehe 3.2.6.1 unter Berücksichtigung der T-Zellzahl in diesem Versuch) in 200 µL in die Inserts vorgelegt und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen in eine 96-*well* Platte mit Rundboden transferiert: Die Inserts mit PMN wurden verworfen und die *wells* mit den T-Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Anschließend wurden pro Bedingung Triplets mit jeweils 200 µL Zellsuspension in eine 96-*well* Platte mit Rundboden pipettiert.

## 3.3 Methoden der Durchflusszytometrie

### 3.3.1 Funktionsprinzip

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine quantitative Methode, die ein sehr breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten bietet. Zu diesen gehören unter anderem Zellcharakterisierungen, Zellzyklusanalysen, Metabolismus- und Viabilitätsmessungen und weitere funktionelle Analysen. Entscheidend bei der Durchflusszytometrie ist, dass die Zellen möglichst einzeln durch eine Flusszelle gesaugt werden und dort auf einen fokussierten Laserstrahl treffen. Hierbei wird ein zelltyp-spezifisches Streulicht erzeugt, welches von Detektoren erfasst wird. Es wird zwischen Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) unterschieden, wobei ersteres ein Maß für die Lichtbeugung ist und die Zellgröße angibt und letzteres ein Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel ist und die Zellgranularität angibt. Zusätzlich zu den oben genannten Streulichtdetektoren, beinhaltet ein Durchflusszytometer auch Fluoreszenzdetektoren. Diese erfassen die von den Fluorochromen emittierte Wellenlänge, nach Anregung durch den Laserstrahl. Die Fluorochrome sind an Antikörper gekoppelt, die wiederum an zelluläre Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine binden und so ein positives Signal auslösen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die Charakterisierung der aus dem Vollblut isolierten Zellpopulationen verwendet. Außerdem wurde die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Anzahl apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

### 3.3.2 Charakterisierung der Zellpopulationen

Um die Reinheit der isolierten Zellpopulationen zu ermitteln wurden die Zellen mit Antikörpern markiert, die gegen CD-Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Diese in der *Cluster of Differentiation* Nomenklatur durchnummerierten Proteine sind zellmembrangebundene Moleküle, die teilweise von bestimmten Zelltypen alleine oder in Kombination (relativ) spezifisch exprimiert werden. Daher werden sie oft zum Definieren einer Zellpopulation verwendet, wobei die exakte Bestimmung die Kombination verschiedener CD-Moleküle beinhaltet. In diesem Versuch wurde ein PE-gekoppelter anti-human CD3 Antikörper für die Charakterisierung von T-Zellen und ein FITC-gekoppelter anti-human CD66b Antikörper für die Charakterisierung von PMN verwendet.

Für die Färbung wurden pro Zelltyp jeweils 3 FACS-Röhrchen á  $2 \times 10^5$  Zellen verwendet:

- 1) Ungefärbte Probe
- 2) Spezifischer Antikörper, z.B. FITC Maus anti-human CD66b (IgM,  $\kappa$ )
- 3) Unspezifischer Antikörper (= Isotypkontrolle), z.B. FITC Maus IgM,  $\kappa$

Mit der Messung einer Isotypkontrolle, kann die Spezifität des eigentlichen Antikörpers gezeigt werden, indem über die Bindung des Isotyp-Kontrollantikörpers der Grad der unspezifischen Positivität definiert wird. Nachdem in jedes FACS-Röhrchen  $2 \times 10^5$  Zellen vorgelegt worden waren, wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und 1  $\mu$ L der Antikörperlösung in den Rücklauf pipettiert. Nach kurzem Vortexen aller Proben, wurden diese 15 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit je 1 mL PBS gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Anschließend wurden die Zellpellets in 200  $\mu$ L 4 % PFA-Lösung resuspendiert und fixiert. Die Proben wurden innerhalb von 3 Tagen mit dem Durchflusszytometer FACS Canto II gemessen.

### 3.3.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Messung von ROS wurde mit dem *Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* von BioVision durchgeführt. Der zellmembrangängige Farbstoff H<sub>2</sub>DCFDA wird im Zytosol durch Esterasen zum H<sub>2</sub>DCF, eine nicht-fluoreszierende und nicht-membrangängige Substanz, gespalten. Intrazellulär vorhandene ROS oxidieren H<sub>2</sub>DCF, wodurch ein fluoreszierendes Produkt entsteht. Hierbei korreliert die Stärke der Fluoreszenzintensität mit der Menge an ROS. Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in PMN-ÜS wurden die T-Zellen in 1,5 mL Eppis geerntet und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 100  $\mu$ L 1 $\times$  ROS Label resuspendiert, wobei die ungefärbte Kontrolle nur in 100  $\mu$ L ROS Assay Puffer resuspendiert wurde. Die Zellen wurden 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und, mit Ausnahme von zwei Proben, anschließend in FACS Röhrchen überführt. Die übrigen zwei Proben wurden zentrifugiert und das Pellet in 100  $\mu$ L 1 $\times$  ROS Inducer (Positivkontrolle) oder 1 mM NAC (Negativkontrolle) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in FACS Röhrchen überführt und für die Lebend-/Toddiskriminierung wurde zu den Proben 1  $\mu$ L Propidiumiodid pipettiert. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Canto II.

### 3.3.4 Messung früh- bzw. spät-apoptotischer Zellen

Durch die Färbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid, lassen sich früh- und spät-apoptotische Zellen nachweisen. Zellen, die in die Apoptose eingeleitet wurden, weisen schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt einen sogenannten Serin-Flip auf. Hierbei handelt es sich um eine Translokation des Membranproteins Phosphatidylserin von der intrazellulär lokalisierten Membranschicht in die nach extrazellulär weisende Phospholipidmembranschicht der Zelle, Diese Translokation wird durch das Enzym Scramblase katalysiert und stellt für Makrophagen ein Phagozytosesignal dar [242]. Annexin V bindet von extrazellulär Phosphatidylserin spezifisch und markiert so die apoptotischen Zellen. Der DNA-Interkalator Propidiumiodid kann die intakte Zellmembran nicht passieren, so dass nur Zellen, in denen die Apoptose sehr fortgeschritten ist, ein positives Signal auslösen. Sofern eine doppelpositive Population vorliegt, handelt es sich demnach um spät-apoptotische Zellen, wobei eine einfach Annexin V positive Population die früh-apoptotischen Zellen definiert. Sind doppelnegative Populationen detektierbar, handelt es sich um vitale Zellen.

Nach 48 h, 96 h oder 144 h Inkubation der T-Zellen in PMN-ÜS wurden pro Bedingung  $2 \times 10^5$  T-Zellen in FACS Röhren geerntet und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 4  $\mu$ L Annexin V, sowie 2  $\mu$ L Propidiumiodid in den Rücklauf pipettiert. Neben den Doppelfärbungen wurden auch Einzelfärbungen für die Kompensation der beiden Fluorochrome FITC (Annexin V) und Propidiumiodid (PE) angesetzt, da die Fluorochrome teilweise in die anderen Kanäle bzw. Detektoren strahlen können und folglich das positive Signal nicht mehr zugeordnet werden kann. Alle Proben wurden 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend in 250  $\mu$ L 1x Annexin V Binding Puffer aufgenommen. Die Messung am FACS Canto II erfolgte direkt im Anschluss.



## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Proliferationsassay mit <sup>3</sup>H-Thymidin

Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in PMN-Sonikat (3.2.6.1), PMN-Überstand (3.2.6.2), direkter Co-Kultur mit PMN (3.2.6.3) oder indirekter TransWell-Kultur mit PMN (3.2.6.4) wurde die Proliferation der T-Zellen bestimmt. Hierfür wurde in die 96-well Platte mit rundem Boden 1 µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin pro well pipettiert und für weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurde die 96-well Platte bei -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut, um die im Rahmen der S-Phase des Zellzyklus radioaktiv markierte DNA der T-Zellen in den Überstand freizusetzen. Die einzelnen Bedingungen wurden mittels Harvester96 auf ein Filterpapier übertragen und die Radioaktivität (*counts per minute*, cpm) im 1450 LSC & Luminescence Counter erfasst.

### 3.4.2 Proliferationsassay mit MTS

Als weitere Methode, um die Proliferation von T-Zellen in verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurde der MTS Assay *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* von Promega herangezogen. Bei dieser colorimetischen Methode wird das gelbe MTS Reagenz von metabolisch aktiven Zellen in das bräunliche Formazan-Produkt reduziert. Diese Reaktion wird durch NADPH oder NADH katalysiert. Der Farbumschlag, dessen Intensität mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen korreliert, kann anschließend bei einer Absorption von 490 nm detektiert werden.

Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in PMN-ÜS wurden 20 µL MTS Reagenz pro well in die 96-well Platte pipettiert und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption bei 490 nm erfolgte mit dem MRXc Platereader.

### 3.4.3 T-Zellmetabolismus mittels Agilent Seahorse

Diese Methode ermöglicht eine gleichzeitige Bestimmung der mitochondrialen Zellatmung (über die Messung des Sauerstoffverbrauchs) und der Glykolyse (über die Messung des extrazellulären pH-Wertes). Durch den *Agilent Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test* können drei Parameter des Energiestoffwechsels der Zelle eruiert werden: der Basisphänotyp, der Stress-Phänotyp und das metabolische Potential. Dies geschieht unter Verwendung der beiden Substanzen Oligomycin und FCCP (Trifluoromethoxy Carbocyanid Phenylhydrazon). Durch den Inhibitor der ATP-Synthase Oligomycin wird die ATP-Produktion in den Mitochondrien gehemmt, wodurch es zu einem kompensatorischen Anstieg der Glykolyse

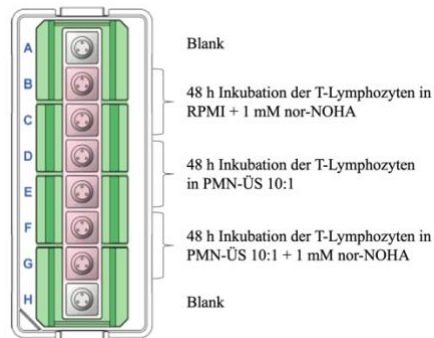
kommt, da die Zellen versuchen, den Energiebedarf über den glykolytischen Weg zu decken. Die damit einhergehende erhöhte Produktion und Ausschleusung von Laktat führt zu einer extrazellulären pH-Wertsenkung. Diese pH-Wertänderung wird als extrazelluläre Ansäuerungsrate (engl. *extracellular acidification rate*, ECAR) erfasst und dient als Maß für die Glykolyserate der Zellen.

Durch das mitochondriale Entkopplungsmittel FCCP werden Protonen über die Mitochondrienmembran transportiert, wodurch die ATP-Synthese unterbrochen wird. Dies führt zu einem ungehinderten Elektronenfluss über die Elektronentransportkette, was wiederum zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch des Komplex IV führt. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration (engl. *oxygen consumption rate*, OCR) im Testmedium dient als Maß für die mitochondriale Zellatmung.

Am Vorabend des Versuchstages wurde die XFp Sensor Kartusche hydriert: 200 µL Kalibrierlösung wurden in die inneren kleinen wells (A-H) und 400 µL in die äußeren großen wells vorgelegt. Die XFp Sensor Kartusche wurde über Nacht bei 37 °C in einer CO<sub>2</sub>-freien Umgebung und mit ausreichend Feuchtigkeit inkubiert.

Damit T-Zellen in der Zellkultur Miniplatte adhärent kultiviert werden können, muss diese Platte mit Poly-D-Lysin behandelt werden. Hierzu wurden 50 µL Poly-D-Lysin in die wells A-H vorgelegt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Poly-D-Lysin vorsichtig herunter pipettiert und die wells vorsichtig mit 200 µL dH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Wasser wurde verworfen und die Zellkultur Miniplatte 1 h bei RT getrocknet. Währenddessen wurde das Seahorse Medium angesetzt.

Es wurden 80 µL des Seahorse Mediums in die wells A-H der Zellkultur Miniplatte pipettiert und 1 h bei 37 °C in einer CO<sub>2</sub>-freien Umgebung mit ausreichend Feuchtigkeit inkubiert. Zeitgleich wurden die T-Zellen nach 48 h Inkubation in den Bedingungen „150 µM Arg RPMI, CD3/CD28, 1 mM nor-NOHA“, „PMN-ÜS 10:1“ und „PMN-ÜS 10:1 + 1 mM nor-NOHA (N)“ geerntet, die CD3/CD28 Dynabeads entfernt und die Zellzahl bestimmt. Pro *well* wurden  $1,25 \times 10^5$  T-Zellen in 40 µL Seahorse Medium aufgenommen, jede Bedingung wurde in Duplikaten wie folgt angesetzt:

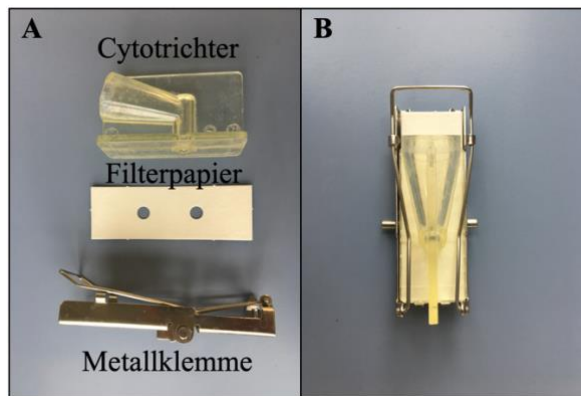


**Abbildung 8:** Pipettierschema für *Seahorse Energy Phenotype Test* [243]

Nachdem in die *wells* B – G die jeweiligen T-Zellen und in die *wells* A + H nur Seahorse Medium vorgelegt wurde, wurde die Miniplatte für 1 min bei 300g zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig 135 µL Seahorse Medium in die *wells* A – H pipettiert und in die äußeren *wells* wurden 320 µL der Kalibrierlösung vorgelegt. Es wurde 1 h bei 37 °C in einer CO<sub>2</sub>-freien Umgebung mit ausreichend Feuchtigkeit inkubiert. Der StressMix wurde exakt nach Herstellerangaben angesetzt und 20 µL davon in alle Ports „A“ der Sensor Kartusche vorgelegt, so dass eine Endkonzentration von 1 µM für Oligomycin und FCCP erreicht wurde. Die Messung erfolgte im Agilent Seahorse XFp Analyzer mit dem Protokoll *Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test*. Zunächst wurde das Gerät mit der Sensor Kartusche beladen und kalibriert (etwa 20 min) anschließend wurde die Zellkultur Miniplatte in das Gerät eingeführt und das Experiment gestartet. Im Anschluss an das Experiment wurden die Zellen mit Calcein gefärbt, um im GFP-Kanal die Zellzahl in allen *wells* aufzunehmen. Diese Normierung ist nötig, damit die Unterschiede in den Zellzahlen der einzelnen *wells* bei der Analyse der Ergebnisse berücksichtigt werden können.

### 3.4.4 Cytospin-Proben

Dieser Versuch diente der Untersuchung der T-Zellmorphologien nach Inkubation der T-Zellen in unterschiedlichen Bedingungen. Hierzu wurde die PMN-Vorinkubation in einem PMN:T-Verhältnis von 20:1 wie zuvor beschrieben angesetzt, inkubiert und geerntet. Die Bedingungen für die T-Zellen Inkubation betrug in diesem Versuch  $0,2 \times 10^6$  T-Zellen in 800 µL Volumen. Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in den unterschiedlichen Bedingungen, wurden die Zellen geerntet, die Dynabeads entfernt und die Zellen anschließend  $1 \times$  mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden in 200 µL MACS-Puffer resuspendiert und in die Apparatur aus Abbildung 9 pipettiert. Es wurde 5 min bei 300g zentrifugiert und anschließend wurden die Objektträger 10 min getrocknet.



**Abbildung 9: Bestandteile und Aufbau der Cytospin-Apparatur.** (A) Die Bestandteile werden in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Metallklemme, Objektträger (nicht abgebildet), Filterpapier und Cytotrichter. (B) Zusammengebaute Cytospinapparatur; die Zellsuspension wird in den Cytotrichter pipettiert.

Es erfolgte die Fixierung und Färbung der Objektträger mit Hilfe des *Shandon Kwik-Diff<sup>TM</sup> Stain Kits* nach folgendem Schema: zunächst wurden die Objektträger 5× für einige Sekunden in die Fixierlösung getaucht. Nach kurzem Abtropfen der überschüssigen Fixierlösung wurden die Objektträger 5× für einige Sekunden in die Eosinlösung getaucht, wobei das Cytoplasma der T-Zellen angefärbt wurde. Erneut wurde überschüssige Lösung einige Minuten abgetropft und abschließend wurden die Objektträger 5× für einige Sekunden in die Methylenblaulösung getaucht, wobei die Zellkerne der T-Zellen angefärbt wurden. Die Objektträger wurden 30 min bei RT abgedeckt stehen gelassen, um sie zu trocknen. Anschließend wurden die Objektträger mit 2 µl ProLong<sup>TM</sup> Antifade-Lösung und Deckgläsern verschlossen. Die Untersuchung der Proben erfolgte unter dem EVOS Mikroskop.

### 3.4.5 Luciferase Assay

Für diesen Assay wurden die T-Zellen wie unter 3.2.5.2 Transduktion humaner PBMC beschrieben mit einem Einzelketten-T-Zellrezeptor (*single chain T cell receptor, sc TCR*) mit Spezifität gegen p53(264-272) retroviral transduziert. Diese T-Zellen erkennen die Aminosäuresequenz an den Positionen 264-272 des p53 Proteins. Das entsprechende Peptid wurde nach exogener Beladung von den NCI A2 Myelomzellen präsentiert. Die NCI A2 Zellen exprimieren zudem das Enzym Luciferase. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige oxidative Dephosphorylierung von D-Luciferin, wobei Licht erzeugt wird. Die Stärke dieser Lichterzeugung korreliert mit der Zellviabilität der NCI A2 Zellen. Somit geht eine Abnahme der Lichterzeugung mit einer verringerten NCI A2 Zellzahl bzw. einer stärkeren cytotoxischen Wirkung der T-Zellen einher. Um die Spezifität dieser Zytotoxizität zu bestimmen, werden

zusätzlich NCI A2 Zellen, die kein p53(264-272) Peptid präsentieren und NCI A2 Zellen, die das mdm2(81-88) Peptid präsentieren, verwendet.

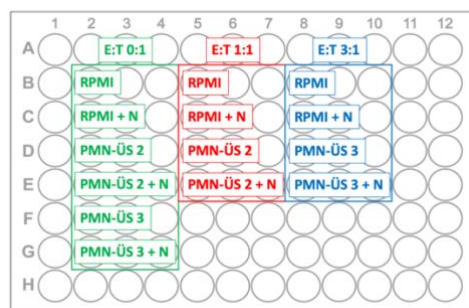
Beim Ansetzen der PMN-Vorinkubation für den Luciferase-Assay muss beachtet werden, dass hier 3 unterschiedliche PMN-ÜS generiert werden müssen:

- 1) PMN-ÜS für die 48 h Inkubation der T-Zellen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/1 mL)
- 2) PMN-ÜS für den Luciferase-Assay mit einem Effektor:Target Verhältnis 1:1  
( $1 \times 10^4$  T-Zellen/200  $\mu$ L)
- 3) PMN-ÜS für den Luciferase-Assay mit einem Effektor:Target Verhältnis 3:1  
( $3 \times 10^4$  T-Zellen/200  $\mu$ L)

Hierbei wurde in allen drei Fällen nur das PMN:T Verhältnis von 10:1 mit und ohne Zugabe des Arginase 1 Inhibitors nor-NOHA (Endkonzentration 1 mM) angesetzt und 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Versuch wie unter 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen beschrieben, angesetzt und die mit anti-CD3/anti-CD28 stimulierten T-Zellen 48 h in den folgenden 4 Bedingungen inkubiert:

- A) 150  $\mu$ M Arginin RPMI-Versuchsmedium
- B) 150  $\mu$ M Arginin RPMI-Versuchsmedium mit Zusatz von 1 mM nor-NOHA
- C) PMN-ÜS PMN:T 10:1 ohne Inhibitor
- D) PMN-ÜS PMN:T 10:1 mit Zusatz von 1 mM nor-NOHA

Um das Ansetzen der verschiedenen Bedingungen für den Luciferase Assay besser zu verdeutlichen, wird die folgende Abbildung, die das Pipettierschema der schwarzen 96-well Platte darstellt, herangezogen.



**Abbildung 10: Pipettierschema für den Luciferase Assay.** E:T = Effektor:Target-Verhältnis, E = T-Zellen, T = NCI A2

Zunächst wurden die NCI A2 Zellen gezählt und die benötigte Anzahl so verdünnt, dass pro 10  $\mu\text{L}$  Zellsuspension  $1 \times 10^4$  NCI A2 Zellen in jedes farblich markierte *well* ausgesät werden konnten. Anschließend wurden die T-Zellen gezählt. Hierbei musste die Zellzahl  $4 \times$  bestimmt werden, da die T-Zellen in ihren unterschiedlichen Bedingungen (A – D) geerntet wurden. Für das Aussäen der T-Zellen mussten insgesamt  $8 \times 1,5 \text{ mL}$  Eppis vorbereitet werden, da zu den 4 Bedingungen auch noch die unterschiedlichen E:T-Verhältnisse hinzugekommen sind.

Die Zellsuspensionen wurden so verdünnt, dass in die rot markierten *wells*  $1 \times 10^4$  T-Zellen und in die blau markierten *wells*  $3 \times 10^4$  T-Zellen pro 10  $\mu\text{L}$  pipettiert werden konnten. Als letztes mussten die einzelnen Mediumbedingungen für den Luciferase Assay pipettiert werden. Die PMN-ÜS 2 und 3 wurden aufgetaut und 1200  $\mu\text{L}$  in 1,5 mL Eppis vorgelegt. Außerdem wurden 1800  $\mu\text{L}$  RPMI und RPMI + N in 2,0 mL Eppis vorgelegt. Zum Schluss wurde in jedes Eppi D-Luciferin (Stock 16,67 mg/mL) pipettiert (16,2  $\mu\text{L}$  in die RPMI  $\pm$  N Eppis und 10,8  $\mu\text{L}$  in die PMN-ÜS Eppis) und anschließend gut gevortext. Es wurden insgesamt 180  $\mu\text{L}$  in jedes *well* pipettiert, wobei hier nach dem Pipettierschema vorgegangen wurde.

Die 96-*well* Platte wurde 1 min bei 106g zentrifugiert und anschließend inkubiert. Die Messung im Fluoreszenz-Plattenreader konnte mehrmals erfolgen.

### 3.4.6 Herstellung der T-Zelllysate

Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in den unterschiedlichen Bedingungen wurden die T-Zellen in frische 15 mL Reaktionsgefäße geerntet und 5 min bei 503g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL MACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension dabei in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Waschen wurden die T-Zellpellets in 50  $\mu\text{L}$  Lysepuffer resuspendiert und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht gelagert. Die eingefrorene Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut, anschließend 30 min auf Eis gelagert und alle 10 min für 10 sec gevortext. Nach der 10 min Zentrifugation bei 13.900g und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden stets auf Eis gelagert.

### 3.4.7 Herstellung der PMN-Sonikate

Nach Isolation der PMN aus Vollblut wurden  $50 \times 10^6$  PMN in 500  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert und die Zellsuspension bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Es wurden keine Proteaseinhibitoren oder Detergenzien beigefügt, da die Lysate in den folgenden Schritten in der T-Zellenkultur (3.2.1) verwendet wurden. Nach dem Auftauen der Zellsuspensionen wurden diese sonifiziert: 6 Zyklen bestehend aus 90 sec Beschallung und 5 sec Pause.

### 3.4.8 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry ist eine colorimetrische Methode, die auf einer zweistufigen Reduktion in einem alkalischen Milieu basiert. Zunächst wird das Kupfer(II)tartrat durch im Protein enthaltene Tyrosin- und Tryptophanreste reduziert und anschließend wird das gelbliche Folin-Reagenz durch den entstandenen Kupfer-Protein-Komplex reduziert, wobei die charakteristisch blaue Farbe entsteht. Da diese Methode keine Absolut-, sondern eine Relativmethode ist, muss zur Berechnung der Proteinkonzentration ein Standard mit bekannten Protein-Konzentrationen herangezogen werden.

Die Proteinkonzentration wurde mit dem *DC<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* von Bio-Rad bestimmt. Dabei wurden Lösungen A und S im Verhältnis 1:50 vermischt und 25 µL davon in eine 96-well Platte vorgelegt. Die Standardverdünnungsreihe zur Bestimmung der Eichgeraden wurde mit Rinderserumalbumin in den folgenden Konzentrationen angesetzt: 4000 µg/mL, 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL und 0 µg/mL (= Blank). Für die Standardreihe wurden Zweifachbestimmungen, für die Proben Dreifachbestimmungen pipettiert, wobei jeweils 5 µL verwendet wurden. Nach der Zugabe von 200 µL Lösung B in jedes *well*, wurde 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend die Extinktion bei 690 nm gemessen.

### 3.4.9 Messung der Arginase 1 Aktivität

Nach erfolgter Proteinkonzentrationsbestimmung wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß 3,3 µg Protein mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 100 µL gebracht. Pro Probe wurden 2 Reaktionsgefäße vorbereitet. Für die Aktivierung des Enzyms wurden 20 µL einer 10 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung pro Reaktionsgefäß zugegeben und für 8 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µL der 0,5 M L-Argininlösung in eines der beiden Reaktionsgefäße zugegeben und alle Reaktionsgefäße 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgefäß ohne Argininzugabe diente als Negativkontrolle. Die Reaktion wurde mit 200 µL Säuregemisch gestoppt und 40 µL einer 6 %igen α-Isonitrosopropionphenon (ISPF) Lösung in jede Bedingung pipettiert, gut gevortext und 30 min im Dunkeln bei 95 °C und anschließend weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Arginase 1 setzt L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff um. Der dabei entstehende Harnstoff geht eine Farbreaktion mit der chemischen Substanz ISPF ein, wobei ein violetter Farbumschlag zu beobachten ist. Die Intensität der violetten Farbe korreliert mit der Menge an Harnstoff und kann bei einer Wellenlänge von 530 nm photometrisch bestimmt werden. Da es sich bei dieser Methode um eine Relativmethode handelt, wird eine Standard-Harnstoffreihe benötigt: 60 µg,

45 µg, 30 µg, 15 µg, 7,5 µg und 0 µg (= Blank). Aus der gebildeten Harnstoffmenge kann die Arginaseaktivität wie folgt bestimmt werden:

$$\text{mU/mg Protein} = \frac{\mu\text{g Harnstoff} \times 1000 \times 303}{60 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{Inkubationszeit [min]}}$$

Hierbei wird für µg Harnstoff der Wert aus dem Enzymassay eingefügt, die Inkubationszeit betrug stets 120 min und 60 g/mol entspricht der molaren Masse von Harnstoff. 1 U Enzymaktivität entspricht der Produktion von 1 µmol Harnstoff/min.

### 3.4.10 SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die Lysate wurden im Verhältnis von 1:1 mit 2x Laemmli Probenpuffer [244] vermischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Pro Bedingung wurden 30 µg Protein eingesetzt. Es wurden ein 12 %iges oder 15 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel hergestellt. Als Marker wurde *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* von Bio-Rad verwendet. Die SDS-PAGE wurde bei einer konstanten Spannung von 130 V durchgeführt.

| <u>12 % Trenngel, 10 mL</u> | <u>15 % Trenngel, 10 mL</u> | <u>6 % Sammelgel, 10 mL</u> |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 3,5 mL dH <sub>2</sub> O    | 2,6 mL dH <sub>2</sub> O    | 6,1 mL dH <sub>2</sub> O    |
| 2,5 mL Trenngelpuffer       | 2,3 mL Trenngelpuffer       | 2,5 mL Sammelgelpuffer      |
| 4 mL 30 % Acrylamid         | 5 mL 30 % Acrylamid         | 1,3 mL 30 % Acrylamid       |
| 100 µL 10 % APS             | 100 µL 10 % APS             | 50 µL 10 % APS              |
| 7 µL TEMED                  | 4 µL TEMED                  | 10 µL TEMED                 |

### 3.4.11 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Tankblotting (*wet blotting*) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte in einem 4 °C Kühlraum über Nacht bei konstanter Spannung von 40 V. Während des ganzen Vorgangs wurde mit einem Rührfisch gerührt, um eine homogene Temperatur des Blotting Puffers zu gewährleisten. Anschließend wurde die Membran 3× 10 min mit TBST gewaschen, die freien Bindungsstellen 1 h mit 5 %iger Milch/TBST-Lösung blockiert und erneut 3× 10 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte auf einem Schüttler bei 4 °C und über Nacht. Die Membran wurde 3×10 min mit TBST gewaschen. Währenddessen wurde der Sekundäntikörper zusammen mit dem HRP-Konjugat (1:5000) angesetzt. Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundäntikörper/HRP-Konjugat-Gemisch auf



einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend  $3 \times 10$  min mit TBST gewaschen und mit dem *Western Lightning® Plus ECL* entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein nicht-radioaktives, lichtemittierendes System. Die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase* HRP; gekoppelt an den 2. AK) katalysiert und erzeugt ein irisierendes Licht.

## 3.5 Methoden der OMICS-Versuche

### 3.5.1 Proteom-Analyse

Für diesen Versuch wurden  $1 \times 10^6$  T-Zellen pro 1 mL kultiviert. Die PMN-ÜS wurden nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen in Triplikaten angesetzt und geerntet. Nach 48 h Inkubation der T-Zellen in den unterschiedlichen Bedingungen, wurden die Zellen geerntet, die Dynabeads entfernt und die Zellen anschließend  $1 \times$  mit MACS-Puffer gewaschen.

Die Zellpellets wurden bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Proteomanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Tenzer, Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz. Die Proben wurden von Mitarbeitern der AG Tenzer per *Filter-Aided Sample Preparation* (FASP) aufbereitet [245]. Hierzu wurden die T-Zellpellets in einem Puffer lysiert, der chaotrope Substanzen, wie (Thio-)Harnstoff, enthält. Diese dienen einer erleichterten Proteinfaltung. Weitere Pufferkomponenten sind CHAPS (3-[(3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, Lösungsmittel für Transmembranproteine) und DTT (Dithiothreit, Reduktionsmittel). Nach erfolgter Lyse müssen alle nichtproteinhaltigen Komponenten entfernt werden, damit ein erfolgreicher proteolytischer Verdau stattfinden kann. Die Reinigung und der Verdauung der Proteine wurde mittels FASP-Verdau durchgeführt. Die Proteine wurden auf Ultrafiltrationsspinsäulen aufgetragen. So konnten Verunreinigungen gewegewaschen werden und anschließend wurden die Proteine reduziert und alkyliert. Nach dem proteolytischen Verdau wurden die Peptide mit Ammoniumbicarbonatpuffer gesammelt, was eine anschließende Entsalzung der Proben erübrigte.

### 3.5.2 Metabolom-Analyse

#### 3.5.2.1 Ultra-Filtrationen der PMN-ÜS

Die PMN-ÜS wurden nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen angesetzt und geerntet. Der zellfreie PMN-ÜS wurde in eine Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa überführt und 30 min bei  $2739g$  zentrifugiert. Der konzentrierte Rückstand mit Proteinen, die größer als 10 kDa sind, wurde mit Versuchsmedium auf das ursprünglich eingesetzte Volumen verdünnt. Der Durchfluss dieser ersten Ultra-Filtration wurde in eine Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze von 3 kDa überführt und 30 min bei  $2739g$  zentrifugiert. Der konzentrierte Rückstand mit Proteinen, die ein Molekulargewicht zwischen 3 kDa und 10 kDa

aufweisen, wurde mit Versuchsmedium auf das ursprünglich eingesetzte Volumen verdünnt. Für den [<sup>3</sup>H]Thymidin-Proliferationsassay wurden jeweils 1300 µL Probe aufgehoben, die restlichen Proben wurden bis zur Fraktionierung bei -80 °C eingefroren. Die für den [<sup>3</sup>H]Thymidin-Proliferationsassay vorbereiteten Proben wurden mit und ohne der Zugabe von 10 % dialysiertem FCS getestet.

### 3.5.2.2 Fraktionierung der 3 kDa Proben

Der Durchfluss nach der 2. Ultra-Filtration enthält Moleküle, die kleiner als 3 kDa sind. Für die Testung der Hydrophobizität wurde dieser Durchfluss im nächsten Schritt fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgte mittels *reversed-phase* Chromatographie, bei der eine unpolare stationäre Phase auf Kieselgelbasis verwendet wurde. Diese tC18 Säulen ermöglichen eine Auftrennung niedermolekularer Substanzen basierend auf deren hydrophoben Eigenschaften. Durch die Wahl der mobilen Phase können die unterschiedlichen Komponenten schrittweise eluiert werden. In diesem Versuch wurden die tC18 Säulen zunächst mit 5 mL 100 % MeOH aktiviert und anschließend mit 5 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Säule wurde dann mit der 3 kDa-Probe beladen, wobei der Durchfluss aufbewahrt wurde. Im Idealfall befinden sich im Durchfluss (*flow through*, FT) jedoch keine Substanzen mehr, da diese an die Säule gebunden haben. Stark hydrophile Komponenten wurden mit 100 % H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert, anschließend wurde die mobile Phase durch die Zugabe von MeOH zunehmend unpolarer: die zweite Fraktion wurde mit 90 % H<sub>2</sub>O/10 % MeOH eluiert, die dritte Fraktion mit 80 % H<sub>2</sub>O/20 % MeOH. Nachdem mit 100 % MeOH eluiert wurde, folgten für die stark hydrophoben Komponenten 100 % Isopropanol und abschließend 100 % Acetonitril. Alle Fraktionen wurden lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.5.2.3 [<sup>3</sup>H]Thymidin-Proliferationsassay der lyophilisierten Fraktionen

Das Lysophisat wurde mit Versuchsmedium gelöst, so dass man zunächst eine 10-fach konzentrierte Probe erzielte. Anschließend wurde dieser 10× Stock für die Assaybedingungen erneut mit Versuchsmedium verdünnt: pro Bedingung wurden jeweils 450 µL einer 5× Lösung, einer 2× Lösung und einer 1× Lösung angesetzt und für den Proliferationsassay in Dubletten angesetzt, der nach 3.4.1 Proliferationsassay mit <sup>3</sup>H-Thymidin durchgeführt wurde. Als Kontrolle dienten zuvor eingefrorene Proben aus 3.5.2.1 Ultra-Filtrationen der PMN-ÜS, die nicht fraktioniert wurden.

#### 3.5.2.4 Massenspektrometrie der lyophilisierten Fraktionen

In Kooperation mit Herrn Dr. Michael Witting, Metabolomics and Proteomics Core des HelmholtzZentrum München, wurden die lyophilisierten Proben näher untersucht. Hierbei wurden die einzelnen Fraktionen in 50 µL Acetonitril/H<sub>2</sub>O (1:1 v:v) gelöst und 40 µL davon in den *Autosampler* überführt. Die restlichen 10 µL dienten der Qualitätskontrolle. Die Proben wurden mit einem ExionLC AD UHPLC analysiert, der an einen Sciex X500R QToF im positiven Ionisationsmodus gekoppelt war. Die Auftrennung der Metaboliten erfolgte unter Verwendung einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z-Säule (2,1 mm x 150 mm, 2,7 µm Partikelgröße, PEEK ausgekleidet), wobei als Elutionsmittel A 10 mM Ammoniumformiat in H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure und als Elutionsmittel B 10 mM Ammoniumformiat in H<sub>2</sub>O/Acetonitril (1:9 v:v) mit 0,1 % Ameisensäure. Die Säulentemperatur betrug konstante 25 °C und die Fließgeschwindigkeit 0,25 mL/min. Alle 7 Proben wurde eine QC-Probe injiziert. Die Daten wurden mittels Genedata Expressionist für MS13.5 verarbeitet einschließlich Peak-Picking, Alignment und Isotopengruppierung. Die Weiterverarbeitung der Daten erfolgte mit dem Paket *genedataRutils* (<https://github.com/michaelwitting/genedataRutils>). Für die Rekonstruktion der Isotopenmuster wurden die Informationen der Peaks und Isotopencluster verwendet und anschließend zusammen mit den MS<sup>2</sup>-Spektren für Sirius und CSI:FingerID als .ms Datei exportiert [246-248].

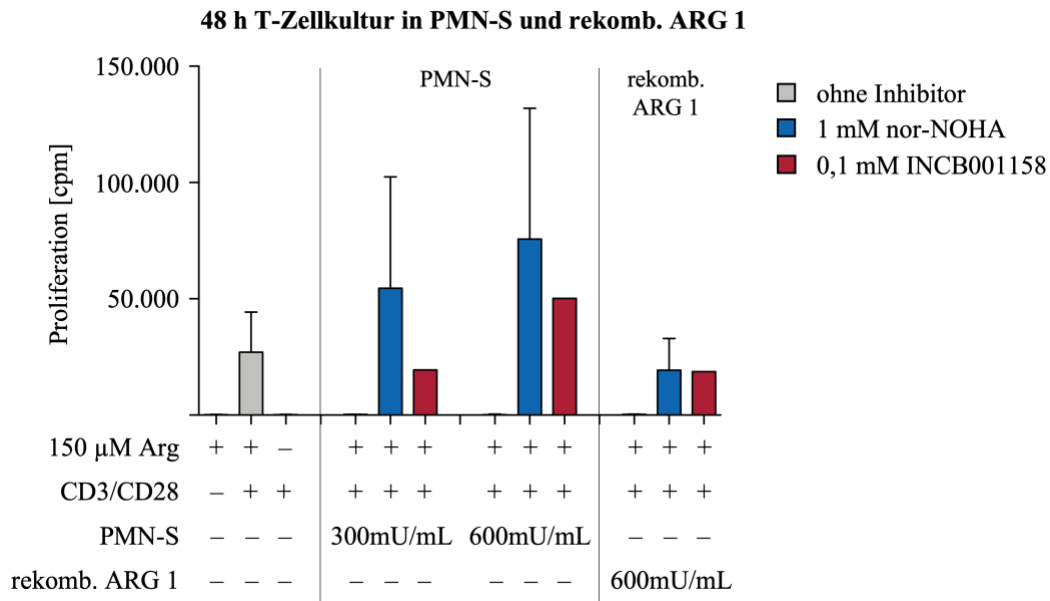
Die Datenanalyse erfolgte zusammen mit Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Tenzer (Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz). Hierbei wurde eine Korrelation zwischen den Proliferationswerten aus Abbildung 24 und der Peakintensität der Metaboliten hergestellt, um die Suche nach immunstimulierenden Metaboliten eingrenzen zu können.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Starke Stimulation der Proliferation von T-Zellen durch humane neutrophile Granulozyten-Sonikate

#### 4.1.1 Kultivierung von T-Zellen gesunder Spender in RPMI Medium mit Zugabe von PMN-Sonikat oder rekombinanter Arginase 1

In diesem Versuch wurden die Arginase 1 abhängigen immun-inhibierenden und -stimulierenden Effekte von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) auf T-Zellen untersucht. Dazu wurden PMN und T-Zellen aus einer frischen Vollblutkonserve isoliert. Eine repräsentative Reinheitskontrolle isolierter T-Zellen und PMN ist im Anhang, Abbildung A1 dargestellt. Hierbei betrug die durchschnittliche Reinheit der CD3<sup>+</sup> T-Zellen 98,3 % und der CD66b<sup>+</sup> Neutrophilen 98,9 %. Nach Isolation wurden die PMN nach 3.4.7 Herstellung der PMN-Sonikate lysiert. Die mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktivierten T-Zellen wurden für 48 h in den unter 3.2.6.1 PMN-Sonikate beschriebenen Bedingungen kultiviert und anschließend wurde die Proliferation dieser Zellen mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation gemessen. In Abbildung 11 stellen die ersten 3 Bedingungen die experimentellen Kontrollen dar. Hierbei wiesen T-Zellen nach 48 h Inkubation in Versuchsmedium ohne polyklonale Aktivierung ( $224 \pm 119$  cpm) und in Mangelmedium (ohne Arginin) mit Aktivierung ( $207 \pm 62$  cpm) keine Proliferation auf, wohingegen T-Zellen nach 48 h Inkubation in Versuchsmedium mit polyklonaler Aktivierung Proliferationswerte von  $27.100 \pm 17.182$  cpm erreichten. Durch die Zugabe von PMN-Sonikat mit einer finalen Arginase 1 Aktivität von 300 mU/mL oder 600 mU/mL wurde eine Inhibition der Proliferation erreicht, die mit der Proliferation von T-Zellen nach 48 h Inkubation in Mangelmedium vergleichbar war (300 mU/mL:  $275 \pm 82$  cpm, 600 mU/mL:  $241 \pm 136$  cpm). Dieser Effekt wurde auch bei der Zugabe von 600 mU/mL Enzymaktivität der rekombinanten Arginase 1 (Proliferation:  $252 \pm 196$  cpm) beobachtet. Durch die Anwesenheit eines Arginase 1 Inhibitors konnte diese Inhibition der T-Zell Proliferation verhindert werden: T-Zellen, die in Vollmedium mit PMN-Sonikat (300 mU/mL Arginase 1 Aktivität) + 1 mM nor-NOHA inkubiert wurden, wiesen mit  $54.613 \pm 47.848$  cpm etwa doppelt so hohe Proliferationswerte auf wie in der Kontrollbedingung (Versuchsmedium + Aktivierung). Für T-Zellen in PMN-S-haltigem Vollmedium mit einer Arginase-Aktivität von 600 mU/mL + 1 mM nor-NOHA wurden mit  $75.735 \pm 56.174$  cpm fast verdreifachte Proliferationswerte verglichen zur Kontrolle gemessen.

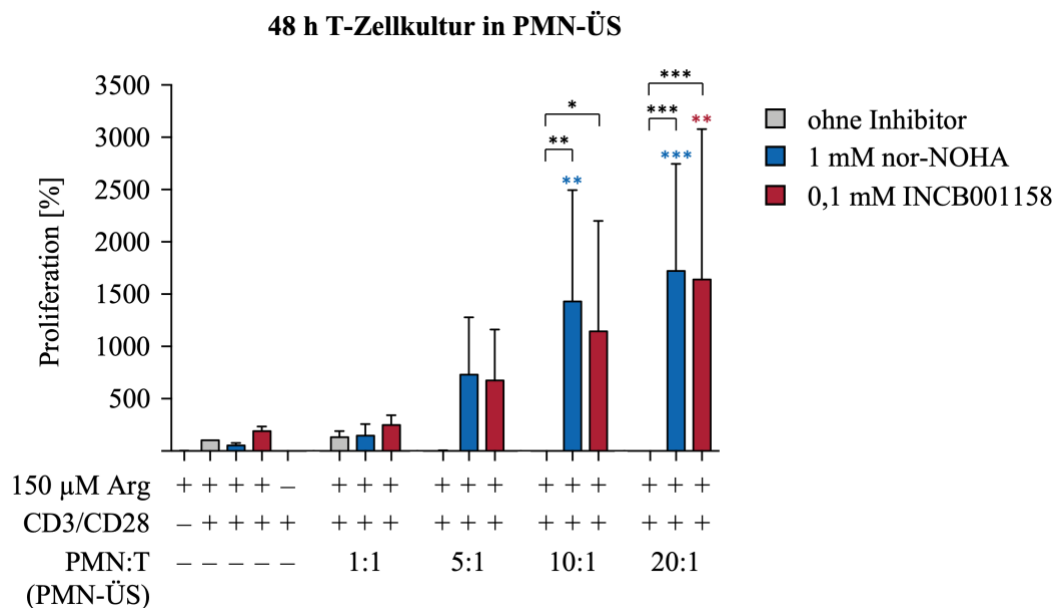


**Abbildung 11: Die Proliferation von T-Zellen gesunder Spender wird durch PMN-Sonikat mit ARG 1 Inhibitoren mäßig aktiviert.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. PMN wurden sonifiziert und die Arginaseaktivität dieser PMN-S bestimmt. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von PMN-S mit 300 mU/mL bzw. 600 mU/mL finaler Arginaseaktivität  $\pm$  1 mM nor-NOHA (n = 2) bzw. 0,1 mM INCB001158 (n = 1), sowie in Versuchsmedium mit Zugabe einer rekombinanten Arginase 1 mit 600 mU/mL finaler Aktivität  $\pm$  1 mM nor-NOHA bzw. INCB001158 stimuliert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Zellen mittels [ $^3$ H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test*.

Dieser Anstieg der Proliferationswerte wurde in den Bedingungen mit Zugabe rekombinanter Arginase 1 (Aktivität final: 600 mU/mL) + 1 mM nor-NOHA nicht beobachtet, so dass ein direkt stimulierender Effekt durch Arginase 1 oder den Arginase 1 Inhibitor ausgeschlossen werden konnte. In den Bedingungen mit Zugabe eines alternativen Arginase-Inhibitors (0,1 mM INCB001158) zeigte sich bei Zugabe von PMN-Sonikaten einer Arginase-Aktivität von 300 mU/mL eine Rekonstitution der T-Zell Proliferation (19.384 cpm), bei einer Arginase-Aktivität von 600 mU/mL eine Verstärkung der Proliferation (50.060 cpm), analog den Ergebnissen bei nor-NOHA Zugabe.

#### 4.1.2 Kultivierung von T-Zellen gesunder Spender in PMN-Überstand

Um den immunstimulierenden Effekt eingehender zu untersuchen, wurden die T-Zellen im nächsten Versuch in PMN Überständen (PMN-ÜS) mit und ohne Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren kultiviert. Die isolierten PMN wurden hierbei zunächst für 72 h in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen angesetzt. Anschließend wurden die T-Zellen in den zellfreien PMN Überständen für 48 h kultiviert und die Proliferation dieser Zellen mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt.



**Abbildung 12: Die Proliferation von T-Zellen gesunder Spender wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitor stark aktiviert.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. PMN wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 angesetzt und 72 h inkubiert. T-Zellen wurden in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h stimuliert und anschließend wurde die T-Zellproliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt (n = 7 unabhängige Spender). Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Rot gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit INCB001158. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*) p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Abbildung 12 zeigt die normierten Proliferationswerte der T-Zellen in den unterschiedlichen Bedingungen. Die Kontrollbedingungen mit Versuchsmedium beinhalten hierbei auch die Einflüsse der Arginase 1 Inhibitoren auf die Proliferation. Alle Proliferationswerte wurden vor dem Hintergrund der interindividuellen Spendervariabilität auf die Kontrollbedingung Versuchsmedium + Aktivierung (erster grauer Balken) normiert, wobei diese Bedingung auf 100 % gesetzt wurde und daher in der Abbildung keine Fehlerbalken aufweist. Wie bereits in

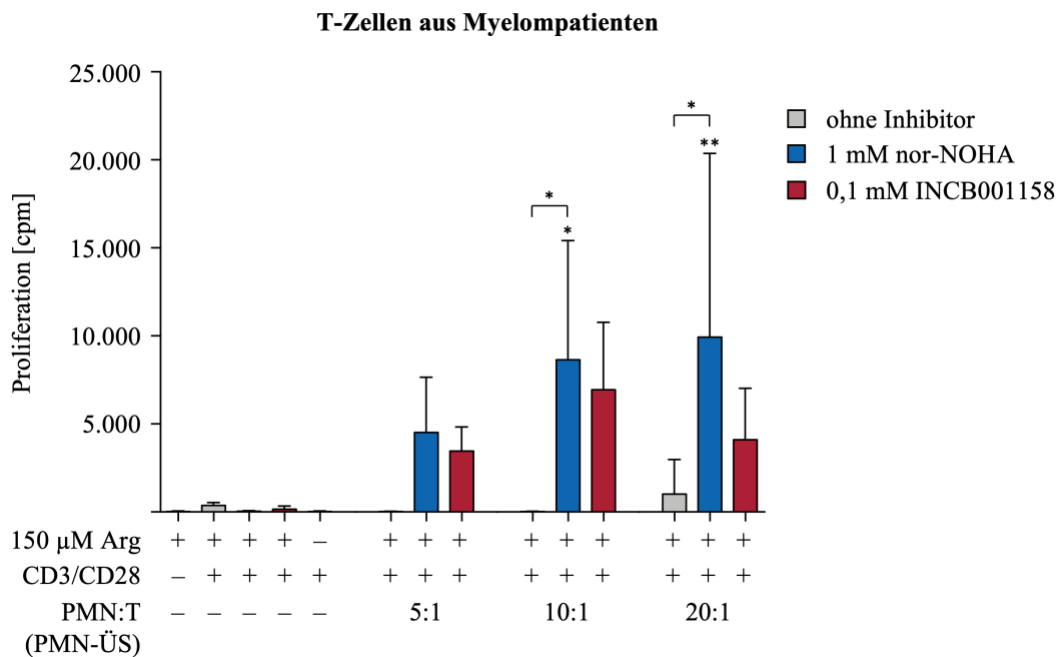
Abbildung 11 zu beobachten war, zeigten T-Zellen nach 48 h Inkubation in Versuchsmedium ohne Aktivierung ( $1,7 \pm 1,9$  % der Kontroll-Proliferation) und in Mangelmedium mit Aktivierung ( $1,0 \pm 0,8$  %) keine Proliferation. Die Zugabe von 1 mM nor-NOHA zum Versuchsmedium führte in den T-Zellen zu einer Verringerung der Proliferation auf  $58,6 \pm 25,2$  %, wohingegen bei der Zugabe von 0,1 mM INCB001158 zum Versuchsmedium eine Erhöhung der Proliferation ( $192,2 \pm 42,2$  %) zu beobachten war. Ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 wurde die Proliferation von T-Zellen in PMN-ÜS ohne Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren nahezu komplett inhibiert (PMN/T 5:1 =  $2,8 \pm 3,2$  %; PMN/T 10:1 =  $1,0 \pm 0,9$  %; PMN/T 20:1 =  $1,4 \pm 0,7$  %). Durch die Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren während der Generierung der PMN-ÜS konnte diese Inhibition der T-Zell Proliferation nicht nur verhindert werden, sondern in diesen PMN-ÜS wurde eine sehr starke Aktivierung der T-Zell Proliferation gemessen. Hierbei stieg die Hyperaktivierung der T-Zellproliferation proportional zur PMN-Dichte an: Bei einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 wurde mit beiden Inhibitoren eine knapp 7-fache Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur normierten Kontrollbedingung erreicht (nor-NOHA:  $678 \pm 518$  %; INCB001158:  $676 \pm 486$  %). Im PMN-ÜS mit einem PMN:T-Verhältnis von 10:1 mit Zugabe von 1 mM nor-NOHA stiegen die Proliferationswerte signifikant ( $p = 0,0047$ ) auf  $1.312 \pm 1.021$  % an. Auch mit dem INCB001158 Inhibitor konnte eine knapp 12-fache Erhöhung der Proliferation erreicht werden ( $1.145 \pm 1.055$  %). Die Proliferationswerte der T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Verhältnis von 20:1 konnten mit beiden Inhibitoren signifikant auf das 16-fache der Kontrollproliferation erhöht werden (1 mM nor-NOHA:  $1.605 \pm 985$  %,  $p = 0,0001$ ; 0,1 mM INCB001158:  $1.642 \pm 1.435$  %,  $p = 0,0066$ ).

#### 4.1.3 Kultivierung aneurer T-Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom in PMN-Überstand

T-Zellen sind die Grundlage für viele Tumormimmuntherapien. Jedoch kommt es im Tumormilieu häufig zu einer starken Inhibition der T-Zellen. In Patienten mit Multiplem Myelom konnte eine erhöhte Seneszenz von T-Zellen in der Tumorumgebung nachgewiesen werden, was mit einer reduzierten Proliferation und Funktion einhergeht [239]. Diese Anergie in T-Zellen wurde in diesem Versuch im Hinblick auf die zuvor beobachtete Hyperaktivierung durch PMN-ÜS in Anwesenheit eines Arginase 1 Inhibitors untersucht. Hierzu wurden die T-Zellen und PMN aus Vollblut von Patienten mit aktiver Myelomerkrankung isoliert und die PMN in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen mit und ohne Arginase 1 Inhibitor für 72 h



kultiviert. Anschließend wurden die T-Zellen des jeweils selben Patienten im zellfreien PMN-ÜS für weitere 48 h inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymininkorporation ermittelt. Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der T-Zellproliferationen aus 6 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus jeweils unterschiedlichen Patienten.



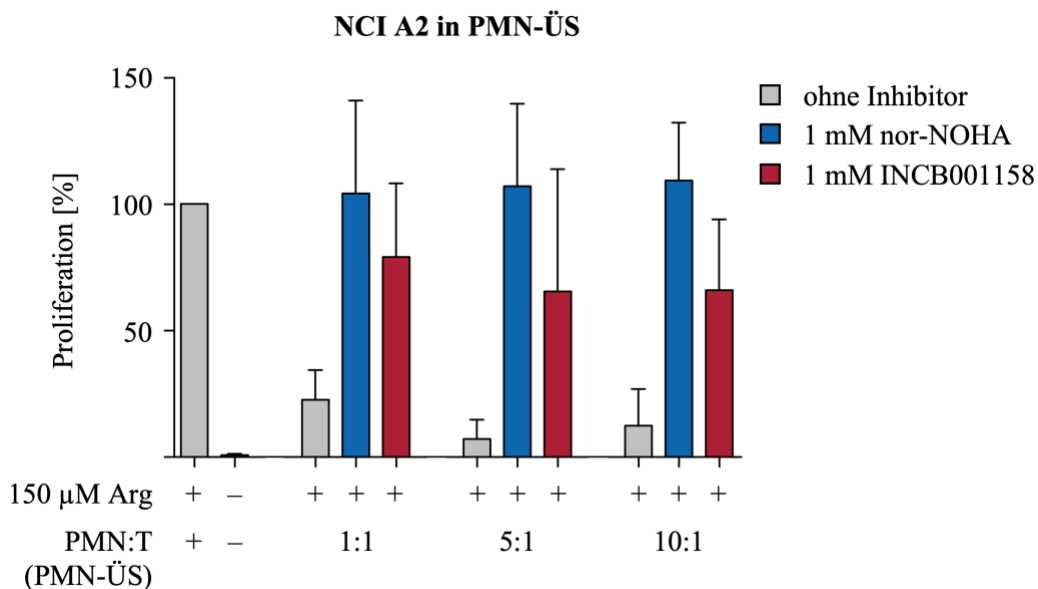
**Abbildung 13: Die Proliferation aneurer T-Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitoren stark aktiviert.** PMN und T-Zellen wurden aus Vollblut von Patienten mit aktiver Myelomerkrankung isoliert. PMN wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 angesetzt und 72 h inkubiert. T-Zellen wurden in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h stimuliert und anschließend wurde die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymininkorporation über 16 h ermittelt (n = 6 separate Experimente mit Zellen aus unterschiedlichen Patienten). Sofern nicht gekennzeichnet, beziehen sich die Signifikanzen auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium ohne ARG 1 Inhibitoren. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Um die Anergie dieser T-Zellen zu verdeutlichen, wurden die Mittelwerte der Proliferations-Rohwerte nicht normiert. Die Proliferationswerte in T-Zellen nach 48 h Inkubation in den Kontrollbedingungen lagen für das Versuchsmedium nur bei  $366 \pm 157$  cpm, was durch die alleinige Zugabe der beiden Arginase 1 Inhibitoren noch weiter supprimiert wurde (nor-NOHA:  $39 \pm 37$  cpm, n = 3; INCB001158:  $153 \pm 192$  cpm, n = 2). T-Zellen in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 und 10:1 waren in ihrer Proliferation inhibiert, wohingegen im PMN-ÜS (Verhältnis 20:1) diese Inhibition ausblieb. In dieser Bedingung machte sich die immunstimulierende Wirkung der PMN-ÜS bereits bemerkbar: die Proliferationswerte sind mit  $1.010 \pm 1.971$  cpm etwa 3× so hoch, wie in der Kontrollbedingung mit Versuchsmedium.

Durch die Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren konnten in den T-Zellkulturen in allen PMN-ÜS deutlich höhere Proliferationswerte beobachtet werden. Die Proliferation der anergen T-Zellen konnte mit PMN-ÜS 20:1 + 1 mM nor-NOHA z.B. auf das 26-fache erhöht werden ( $9.940 \pm 10.431$  cpm,  $n = 5$ ).

#### 4.1.4 Kultivierung der Myelomzelllinie NCI A2 in PMN-ÜS

Um die T-Zell Spezifität der beobachteten Hyperaktivierung durch PMN-ÜS in Anwesenheit eines Arginase 1 Inhibitors zu untersuchen, wurde die Myelomzelllinie NCI A2 für 48 h in PMN-ÜS mit unterschiedlichen PMN:NCI A2-Verhältnissen (1:1, 5:1, 10:1) inkubiert und anschließend wurde die Proliferation der NCI A2 Zellen mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst.



**Abbildung 14: Die Proliferation der Myelomzelllinie NCI A2 wird durch PMN-ÜS mit ARG 1 Inhibitor rekonstituiert, aber nicht verstärkt.** Humane PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert und für 72 h in verschiedenen PMN:NCI-Verhältnissen (PMN Anzahl berechnet anhand der später geplanten NCI A2-Zellzahl) in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 inkubiert. NCI A2 Zellen wurden im zellfreien PMN-ÜS für 48 h kultiviert und anschließend die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt ( $n = 2$ ). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test*.

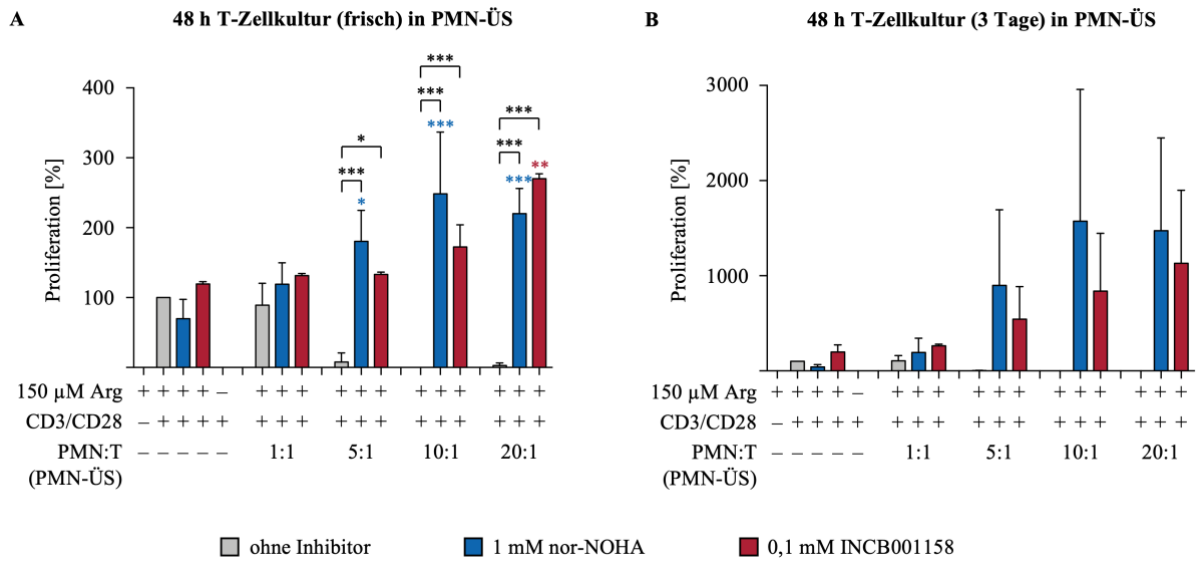
Die Proliferationswerte der Myelomzelllinie NCI A2 wurden auf die Kontrollbedingung (NCI A2 im normalen Vollmedium) normiert. Nach 48 h Kultur in Arginin-Mangelmedium waren die Proliferationswerte der NCI A2 stark erniedrigt ( $0,8 \pm 0,5$  %). Durch die PMN-ÜS konnte diese fast vollständige Suppression zwar nicht erreicht werden, aber auch in diesen Bedingungen wurde die Proliferation der NCI A2 deutlich inhibiert (1:1 =  $2,6 \pm 11,7$  %;

5:1 =  $7,1 \pm 7,6 \%$ ; 10:1 =  $12,5 \pm 14,4 \%$ ). Durch die Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren konnten jeweils Proliferationsaktivitäten der NCI A2 erreicht werden, die ungefähr jenen der Kontrollbedingung entsprachen. Eine Erhöhung der NCI A2 Proliferationswerte im Sinne einer Hyperaktivierung (analog zu den Ergebnissen mit T-Zellen) durch PMN-ÜS konnte hierbei nicht beobachtet werden.

## 4.2 Vergleich verschiedener T-Zell- und PMN-Kulturbedingungen

### 4.2.1 Frisch isolierte T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen nach 3-tägiger Kultur

Bisher konnte der aktivierende Effekt von PMN auf T-Zellen sehr stark nur in zellfreien PMN-Überständen bzw. deutlich schwächer in PMN-Sonikaten beobachtet werden. Um ein besseres Verständnis über mögliche Mechanismen dieser Hyperaktivierung zu erlangen, sollten in diesem Versuchsabschnitt die Co- und TransWell-Kultur von T-Zellen mit PMN mit der T-Zellkultur in PMN-ÜS verglichen werden. Da für die ersten beiden Kulturarten frisch isolierte und noch viable PMN verwendet werden, müssen auch die T-Zellen frisch nach Isolation aus dem Vollblut eingesetzt werden. Da in den bisherigen Versuchen T-Zellen erst nach 3-tägiger Kultur in Kultivierungsmedium verwendet wurden, musste zunächst untersucht werden, wie sich diese T-Zellen von frisch isolierten T-Zellen unterscheiden. Dazu wurden aus Spender A T-Zellen und PMN isoliert. Die T-Zellen wurden für 72 h in Medium kultiviert, währenddessen wurden die PMN in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen angesetzt und ebenfalls für 72 h inkubiert. Nach erfolgter Vorinkubation (72 h) wurden aus dem Vollblut eines zweiten Spenders B ebenfalls T-Zellen und PMN isoliert. Die frischen T-Zellen aus Spender B wurden mit den kultivierten T-Zellen aus Spender A verglichen. Hierbei wurden die Überstandskulturen mit den PMN-ÜS aus Spender A angesetzt, für die Co-Kulturen wurden die frisch isolierten PMN aus Spender B verwendet. Die Zellen wurden für 48 h kultiviert und anschließend wurde die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt. In Abbildung 15 sind die Mittelwerte der T-Zellproliferationen aus 3 unabhängigen Experimenten frisch isolierter T-Zellen (A) und T-Zellen nach 3-tägiger Kultivierung (B) abgebildet. Beim Vergleich der Proliferationswerte der frisch isolierten T-Zellen mit denen aus 3-tägiger Kultur fällt auf, dass die frisch isolierten T-Zellen in der Kontrollbedingung (Versuchsmedium + Aktivierung) mit  $24.083 \pm 3266$  cpm eine knapp 5-fach höhere Proliferation aufwiesen als die T-Zellen nach 3-tägiger Kultur ( $5.488 \pm 5.327$  cpm). Als Folge dieser hohen Proliferation bereits in den Kontrollbedingungen, fiel bei frisch isolierten T-Zellen die Hyperaktivierung durch PMN-ÜS mit Zugabe eines Arginase 1 Inhibitors deutlich geringer aus: Während T-Zellen nach 72 h *in vitro* Kultivierung nach weiteren 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Verhältnis von 10:1 und der Zugabe von 1 mM nor-NOHA etwa 16-fach höhere Proliferationswerte aufwiesen ( $1.574 \pm 1.386$  %) als in der Kontrollbedingung (auf 100 % normiert), zeigten die frisch isolierten T-Zellen nach 48 h Inkubation in derselben Bedingung einen nur 3-fachen Anstieg der Proliferationswerte ( $248 \pm 88$  %).

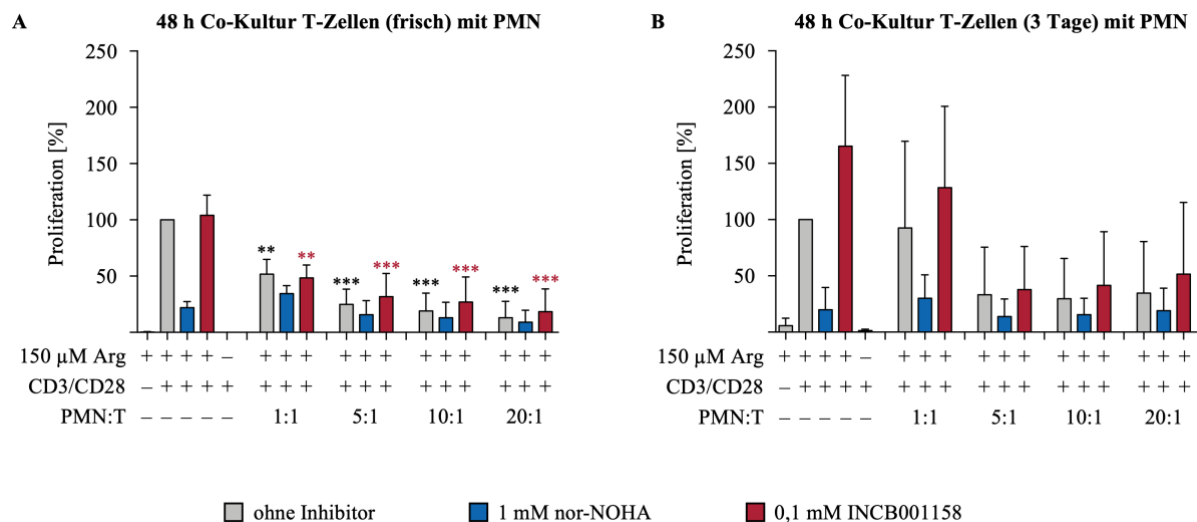


**Abbildung 15: Auch frisch isolierte T-Lymphozyten werden durch PMN-ÜS + Inhibitor hyperaktiviert.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender 1 (an Tag 0) und Spender 2 (an Tag 3) isoliert. PMN aus Spender 1 wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 angesetzt und 72 h inkubiert. **(A)** Frisch isolierte T-Zellen (aus Spender 2; n = 3) oder **(B)** T-Zellen nach 3-tägiger Kultur in Vollmedium (aus Spender 1; n = 3) wurden in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Dynabeads für 48 h stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt. Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Rot gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit INCB001158. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*) p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Trotz der Unterschiede in den gemessenen Rohwerten verhalten sich frisch isolierte T-Zellen ähnlich wie die T-Zellen nach 3-tägiger Kultur: die Inhibition der T-Zellproliferationen konnte in beiden Fällen ab einem PMN:T-Zellverhältnis von 5:1 beobachtet werden (frisch:  $7,7 \pm 13,1$  %; 3 Tage:  $3,2 \pm 3,7$  %, jeweils bezogen auf die normierten 100 % Proliferation der Kontroll-Aktivierungsbedingungen). Die Zugabe eines Arginase 1 Inhibitors führte in beiden Fällen zu einer Hyperaktivierung der T-Zellen, was mit zunehmender PMN Anzahl verstärkt wurde. Die Zugabe von nor-NOHA in der Kontrollbedingung führte in den 3 Tage alten T-Zellen zu einer Reduktion der Proliferation ( $41,1 \pm 25,1$  %). Nichtsdestotrotz konnte in den PMN-ÜS + nor-NOHA starke aktivierte T-Zellproliferation beobachtet werden

Der Vergleich von frisch isolierten T-Zellen und T-Zellen nach 3-tägiger Kultur im Hinblick auf eine Co-Kultur mit PMN ist Gegenstand des nächsten Versuches. Hierbei wurden die T-Zellen des Spenders A isoliert und 3 Tage im Kultivierungsmedium inkubiert. Nach dieser Dauer wurden T-Zellen und PMN eines weiteren Spenders B isoliert, wobei die viablen PMN des Spenders B für beide Co-Kulturen verwendet wurden. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte

der T-Zellproliferationen aus 3 unabhängigen Experimenten (A) der frisch isolierten T-Zellen und (B) der T-Zellen nach 3-tägiger Kultur zusammengefasst.



**Abbildung 16: Eine Co-Inkubation der T-Zellen mit PMN führt zu einer Proliferationshemmung, die durch ARG 1 Inhibition nicht beeinflusst wird.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender A (an Tag 0) und B (an Tag 3) isoliert. Co-Kulturen von PMN (aus Spender B) mit (A) frisch isolierten T-Zellen (aus Spender B, n = 3) oder (B) T-Zellen nach 3-tägiger Kultur (aus Spender A, n = 3) wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 angesetzt mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads für 48 h stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [ $^3$ H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt. Schwarz gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium ohne Arginase- Inhibitoren. Rot gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium ohne PMN-Co-Inkubation mit INCB001158. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Beim Vergleichen der Proliferationswerte von T-Zellen in den Kontrollbedingungen (Versuchsmedium ohne PMN  $\pm$  Arginase 1 Inhibitoren) war der negative Effekt von 1 mM nor-NOHA auf die Proliferation sehr prominent (frisch:  $22,0 \pm 5,5$  %; 3 Tage:  $19,9 \pm 19,8$  %). Diese Beobachtung wurde mit dem INCB001158 Inhibitor nicht gemacht. Aus Abbildung 5B wurde allerdings erkenntlich, dass dieser inhibitorische Effekt durch nor-NOHA nur in Bedingungen ohne PMN-ÜS auftrat und in den PMN-ÜS die gewohnte Hyperaktivierung beobachtet werden konnte. Auch in Abbildung 16 sind die Proliferationswerte der frisch isolierten T-Zellen im Versuchsmedium ohne Arginase 1 Inhibitor mit  $20.866 \pm 5.769$  cpm etwa 6,5-fach höher verglichen mit den T-Zellen nach 72 h Kultur ( $3.172 \pm 3.339$  cpm). Die Co-Kultur mit PMN ohne Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren führte in beiden T-Zellpopulationen zu einer Abnahme der Proliferationswerte, jedoch fiel diese Reduktion in den frisch isolierten T-Zellen stärker aus: Bereits ein PMN:T-Verhältnis von 1:1 führte zu einer Abnahme der Proliferation um etwa 50 %, die bei dem PMN:T-Verhältnis von 20:1 nur noch knapp 13 % betrug. In T-Zellen nach

72 h Kultur betrug die Abnahme der Proliferation bei einer Co-Kultur dieser T-Zellen mit PMN im Verhältnis von 1:1 dagegen nur 8 % verglichen zur Proliferation in der Kontrollbedingung. In den Bedingungen mit einer höheren Anzahl an PMN betrug die Proliferation jeweils etwa 30 %. Mit der Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren nor-NOHA bzw. INCB001158 konnte in beiden T-Zellkulturen kein Effekt erzielt werden. Hier blieb nicht nur die zuvor beobachtete Hyperaktivierung der T-Zellen aus (vgl. Abbildung 15), die Inhibition der Proliferation konnte zudem nicht rekonstituiert werden.

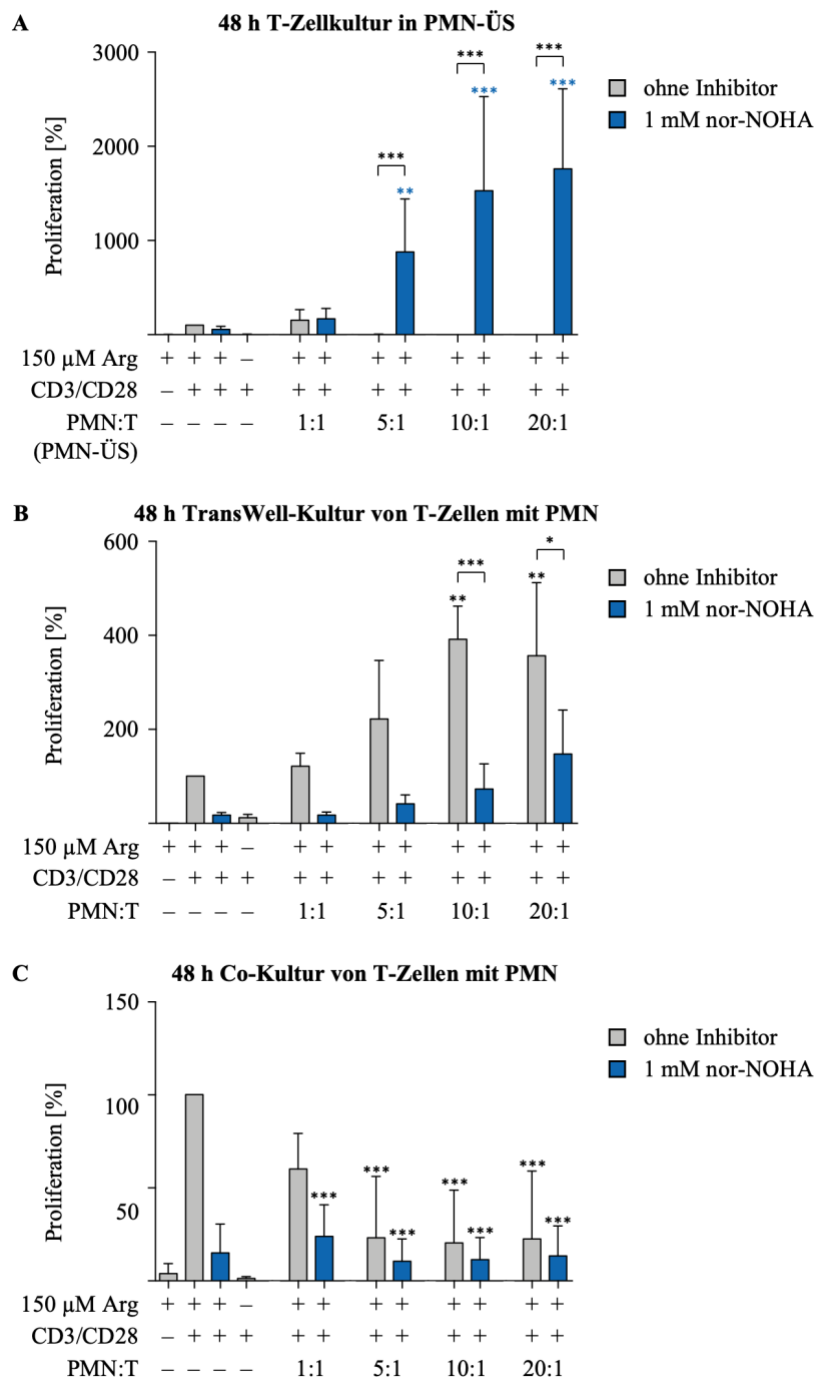
#### 4.2.2 Vergleich der T-Zellkultur in PMN-ÜS mit der Co-Kultur und Transwell-Kultur

In diesem Versuch wurden die 3 möglichen Kulturen von PMN und T-Zellen untereinander verglichen, um den Mechanismus der Hyperaktivierung durch PMN-ÜS besser verstehen zu können. Bislang konnte diese Hyperaktivierung lediglich in T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit hoher PMN-Dichte und Anwesenheit eines Arginase 1 Inhibitors gezeigt werden. Für alle Versuche wurden T-Zellen nach 3-tägiger Kultur verwendet. Hierzu wurden PMN und T-Zellen aus Spender A isoliert und die PMN-Vorinkubationen mit den unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen mit und ohne Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren angesetzt und 72 h inkubiert. Gleichzeitig wurden die T-Zellen in Kultivierungsmedium inkubiert. Zusätzlich wurde Versuchsmedium mit 1 mM nor-NOHA versetzt und 72 h im Kühlschrank gelagert. Nach erfolgter Vorinkubation wurde für die direkte Co-Kultur und indirekte TransWell-Kultur frische PMN aus Spender B isoliert und mit den T-Zellen des Spenders A kultiviert. Die restlichen T-Zellen wurden für 48 h in PMN-ÜS aus Spender A inkubiert. In Abbildung 17 ist die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Kulturen dargestellt. Abbildung 17A zeigt hierbei die 48 h T-Zellkultur in PMN-ÜS mit der bisher beschriebenen Hyperaktivierung der T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA (n = 11). Hier erreichten die Werte der hyperaktivierten T-Zellen nach 48 h Inkubation im 10:1 PMN-ÜS das 20-fache der Kontrollbedingung ( $2.335 \pm 3.249$  %). Abbildung 17C zeigt die Proliferation der T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit unterschiedlichen PMN-Zellzahlen (n = 5). Wie bereits aus Abbildung 16 hervorgeht, konnte in der direkten Co-Kultur keine Hyperaktivierung der T-Zellen mit und ohne Zugabe eines Arginase-Inhibitors beobachtet werden. Die durch die PMN hervorgerufene Reduktion der T-Zellproliferation konnte durch einen Arginase 1 Inhibitor nicht verhindert werden. Nor-NOHA übte auch diesmal in der Kontrollbedingung eine negative Auswirkung auf die Proliferation der T-Zellen aus. In Abbildung 16 geht jedoch bereits hervor, dass die Inhibition der Arginase 1 in der direkten Co-Kultur von T-Zellen mit PMN keine Rekonstitution der Proliferation bewirkt.

Abbildung 17B zeigt die Proliferation von T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN, die in TransWells vorgelegt wurden, um einen Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden ( $n = 3$ ). Die Inhibition der T-Zellproliferation in den PMN-Bedingungen ohne Inhibitor konnte hier nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich in diesen Bedingungen eine mit steigender PMN Anzahl erhöhte Proliferation, die in dem PMN:T-Verhältnis von 10:1 mit  $27.629 \pm 8.246$  cpm eine Vervierfachung der Werte der Kontrollbedingung ohne Inhibitor ( $6.935 \pm 961$  cpm) erreicht. Die Zugabe des Arginase 1 Inhibitors nor-NOHA, welcher in RPMI Versuchsmedium angesetzt und 3 Tage im Kühlschrank vorinkubiert wurde, führte in der Kontrollbedingung zu einer Reduktion der T-Zellproliferation von über 80 %. Diese durch nor-NOHA induzierte Reduktion war auch in den PMN-Bedingungen zu beobachten. Jedoch wurde mit zunehmender PMN-Anzahl dieser negative Effekt geringer, sodass in der Bedingung mit der höchsten PMN-Anzahl die ursprünglichen Proliferationswerte der konventionell aktivierten T-Zellen erreicht werden konnten ( $10.824 \pm 7.392$  cpm). In Abbildung 17A war die durch nor-NOHA bedingte Inhibition in den Kontrollbedingungen nur schwach ausgeprägt. Hier wurde das Versuchsmedium mit 1 mM nor-NOHA versetzt und anschließend zusammen mit der PMN-Vorinkubation für 72 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ , statt bei  $4^{\circ}\text{C}$ , inkubiert.

Insgesamt lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Hyperaktivierung der T-Zellen am stärksten in der PMN-ÜS Kultur, und hier nur bei Arginase-Inhibition, zu beobachten war. Bei physikalischer Separation von PMN und T-Zellen zeigte sich eine gewisse Hyperaktivierung der T-Zellproliferation durch PMN Co-Kultur, unabhängig von einer gleichzeitigen Arginase-Hemmung. In einer direkten Co-Kultur von T-Zellen und PMN wurde hingegen eine starke Suppression der T-Zellproliferation beobachtet, welche auch durch Arginase-Inhibition nicht verhindert werden konnte.





**Abbildung 17: In TransWell-Kulturen mit PMN wird eine Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten induziert.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. (A) PMN wurden in verschiedenen PMN:T-Zellverhältnissen im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen in diesen PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads für 48 h stimuliert (n = 11). (B, C) T-Zellen wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA (B) in TransWell-Kultur (n = 3) oder (C) in direkter Co-Kultur (n = 5) mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads für 48 h stimuliert. Anschließend wurde die T-Zellproliferation mittels  $^3\text{H}$ Thymidininkorporation über 16 h ermittelt. Schwarz gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium ohne Arginase Inhibitoren. Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

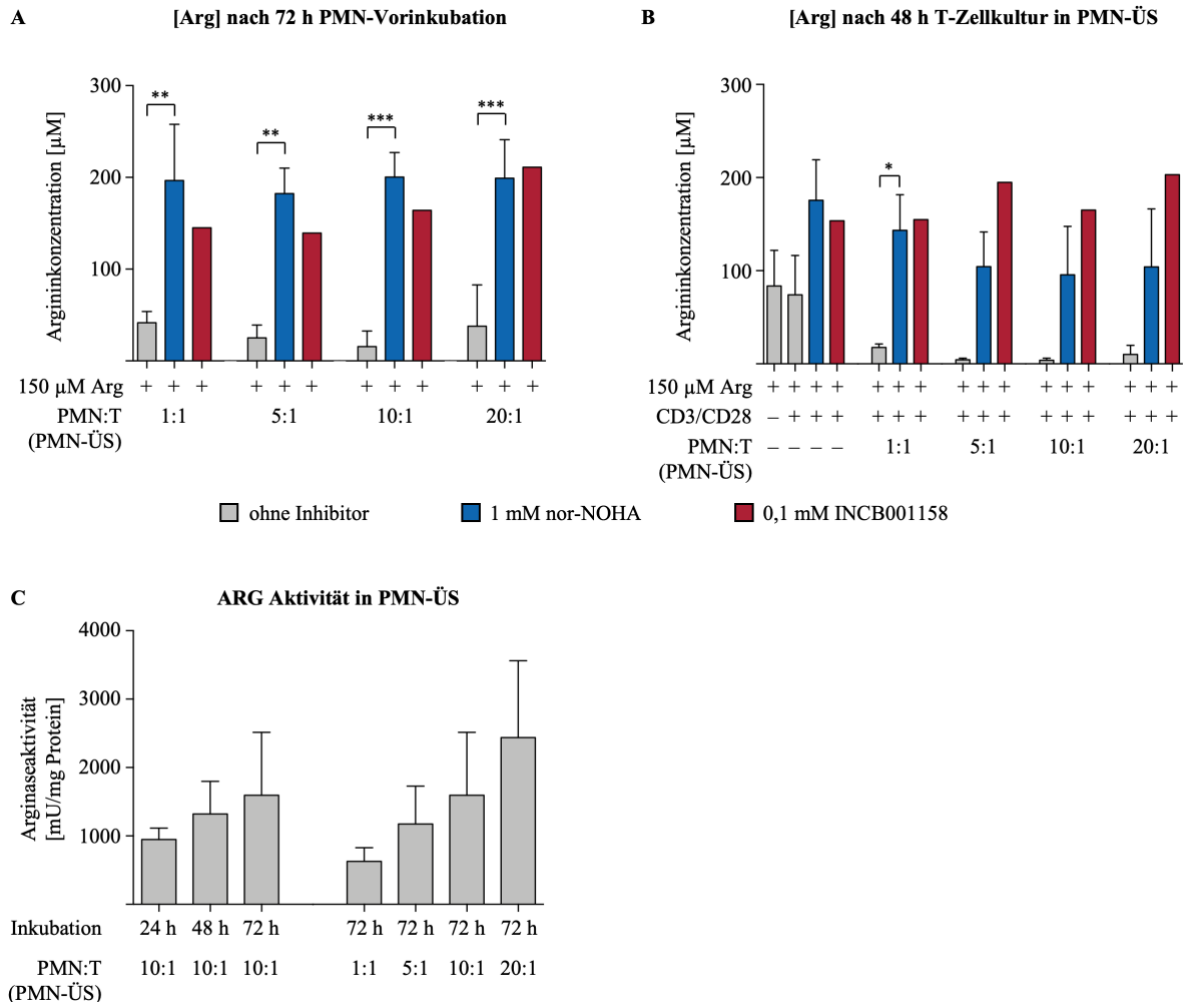
### 4.3 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN ist argininabhängig

Die Inhibition der T-Zellproliferation in PMN-ÜS lässt eine hohe Arginase 1 Aktivität in diesem Überstand vermuten. Diese Aktivität und die damit einhergehende mögliche Depletion der Aminosäure L-Arginin sollen in diesem Versuch näher untersucht werden. Hierzu wurde die Argininkonzentration in PMN-ÜS vor und nach 48 h T-Zellkultur, sowie nach 48 h direkter Co-Kultur mittels HPLC gemessen.

#### 4.3.1 Bestimmung der Argininkonzentration in PMN-ÜS vor und nach 48 h T-Zellkultur

In diesem Versuch wurde die Argininkonzentration mittels HPLC bestimmt. Hierzu wurde die PMN Vorinkubation mit und ohne Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen angesetzt und 72 h inkubiert. Anschließend wurde aus jeder Bedingung eine Probe für die HPLC Messung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und mit den restlichen PMN-ÜS die 48 h T-Zellkultur angesetzt, wobei auch die Kontrollbedingungen ohne PMN-ÜS mit und ohne den beiden Arginase 1 Inhibitoren angesetzt wurde. Nach erfolgter Inkubation wurde erneut aus jeder Bedingung eine Probe für die HPLC Messung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der HPLC Messungen zusammengefasst, wobei Abbildung 18A die Argininkonzentrationen in PMN-ÜS nach 72 h Vorinkubation und vor T-Zellinkubation und 18B die Argininkonzentrationen in Kontrollbedingungen und PMN-ÜS nach weiteren 48 h T Zellkultur darstellen. Bereits nach 72 h war in den PMN-ÜS ohne Arginase 1 Inhibitor eine deutliche Abnahme der Argininkonzentration zu beobachten: in der PMN:T 1:1 Bedingung ist die Argininkonzentration von ursprünglich  $150\ \mu\text{M}$  auf  $41,6 \pm 12,1\ \mu\text{M}$  gesunken. In den PMN-ÜS aus den Präinkubationen mit höheren PMN-Zahlen wurden niedrigere Argininkonzentrationen gemessen. So konnte in der PMN:T 5:1 Bedingung eine Argininkonzentration von  $25,0 \pm 14,2\ \mu\text{M}$ , in der PMN:T 10:1 Bedingung von  $15,6 \pm 16,9\ \mu\text{M}$  gemessen werden. In der Bedingung mit der höchsten PMN-Dichte war die Argininkonzentration mit  $37,9 \pm 44,8\ \mu\text{M}$  vergleichsweise hoch, jedoch zeigte die hohe Standardabweichung bereits, dass die einzelnen Werte stärkeren Schwankungen unterlagen. Durch die Zugabe von 1 mM nor-NOHA mit Beginn der Vorinkubation der PMN-ÜS konnte die Depletion von Arginin verhindert werden. So wurde im PMN-ÜS 1:1 (PMN:T) mit nor-NOHA eine Argininkonzentration von  $196,6 \pm 61,4\ \mu\text{M}$  gemessen, was in den restlichen PMN-ÜS weitestgehend konstant blieb (5:1 + N:  $182,1 \pm 27,7$ ; 10:1 + N:  $200,4 \pm 26,7\ \mu\text{M}$ ; 20:1 + N:  $199,1 \pm 42,0\ \mu\text{M}$ ). Nach 48 h Inkubation von unstimulierten T-Zellen im Versuchsmedium ohne Inhibitor wurde eine Argininkonzentration von  $83,7 \pm 38,2\ \mu\text{M}$

gemessen. Im Überstand aktivierter T-Zellen nach 48 h Kultur im Versuchsmedium betrug die Argininkonzentration in Abwesenheit von nor-NOHA  $73,8 \pm 42,4 \mu\text{M}$  und in Anwesenheit von nor-NOHA  $175,6 \pm 43,6 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 18: Ausgeprägte Arginindepletion in PMN-ÜS nach 72 h Vorinkubation.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden in verschiedenen PMN:T-Zellverhältnissen im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA (n = 3) oder 0,1 mM INCB001158 (n = 1) für 72 h vorinkubiert. (A) In den zellfreien PMN-ÜS erfolgte die Bestimmung der Argininkonzentrationen mittels HPLC. (B) In den zellfreien PMN-ÜS wurden die T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads für 48 h stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung der Argininkonzentrationen in den Überständen der T-Zellkulturen mittels HPLC. (C) PMN wurden in unterschiedlichen PMN-Dichten (ausgehend von einer T-Zellanzahl analog der  $^3\text{H}$ Thymidin-Proliferationsansätze) 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und anschließend wurde die Arginase Aktivität in den PMN-ÜS bestimmt (n = 3). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Die Argininkonzentrationen in den PMN-ÜS nach 48 h T-Zellinkubation betrug ab der 5:1 Bedingung  $\leq 10 \mu\text{M}$  (5:1  $4,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$ , 10:1  $4,0 \pm 2,3 \mu\text{M}$ , 20:1  $10,0 \pm 9,9 \mu\text{M}$ ). Mit der Zugabe von 1 mM nor-NOHA in diesen Überständen wurden die Argininkonzentrationen nach 48 h T-Zellinkubation geringfügig niedriger (5:1 + N:  $104,4 \pm 37,2 \mu\text{M}$ , 10:1 + N:  $95,6 \pm 52,1 \mu\text{M}$ ,

20:1 + N:  $104,2 \pm 62,3 \mu\text{M}$ ). Da für die Messungen mit dem INCB110058 Inhibitor nur ein Versuch vorliegt, konnten hier keine abschließenden Aussagen gemacht werden. In den PMN-Überständen wurde, vor der 48 h Inkubation der T-Zellen, die Arginase 1 Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18C zusammengefasst. Für die zeitkinetischen Untersuchungen der Arginase Aktivität wurde diese nach 24 h, 48 h und 72 h in PMN-ÜS mit dem PMN:T-Verhältnis von 10:1 untersucht. Weiterhin wurde die Arginase Aktivität nach 72 h für alle PMN:T-Verhältnisse bestimmt.

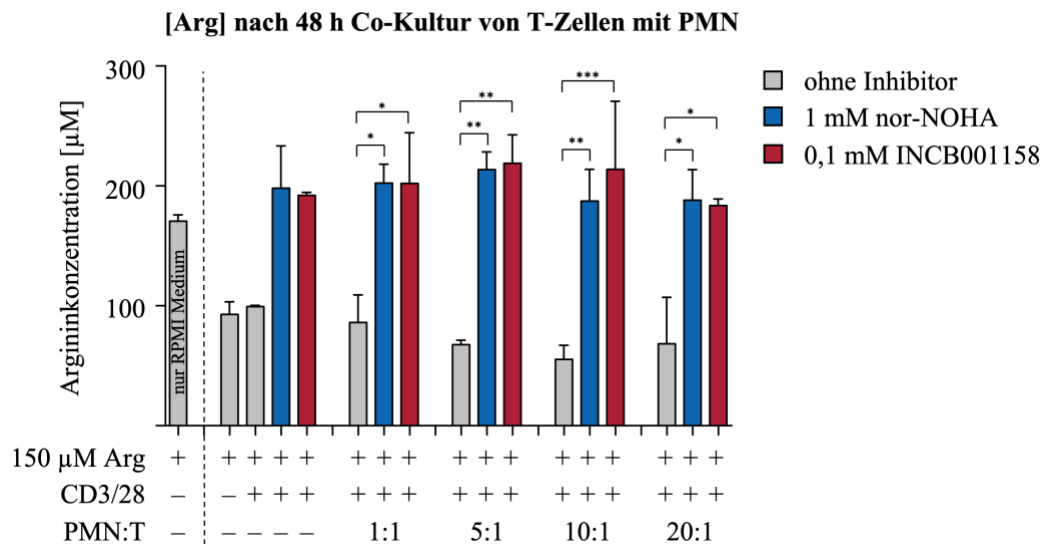
In der Zeitkinetik war, beginnend mit einer Aktivität von  $949 \pm 164 \text{ mU/mg Protein}$  nach 24 h, eine Steigerung der Arginase 1 Aktivität mit längerer Inkubationszeit zu beobachten, die nach 72 h eine Aktivität von  $1.595 \pm 919 \text{ mU/mg Protein}$  erreichte. In den PMN-ÜS mit unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen nach einer Inkubation von 72 h betrug die Aktivität in der 1:1 Bedingung  $627 \pm 201 \text{ mU/mg Protein}$  und stieg in der 20:1 Bedingung auf  $2.347 \pm 1.122 \text{ mU/mg Protein}$ .

#### 4.3.2 Bestimmung der Argininkonzentration nach 48 h Co-Kultur von T-Zellen mit PMN

Nach 48 h Co-Kultur von T-Zellen und PMN in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen, wurde aus jeder Bedingung eine Probe für die HPLC Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der HPLC Messungen dieser Proben zusammengefasst. Zusätzlich wurde als Kontrolle die Argininkonzentration im Versuchsmedium ohne T-Zellen bestimmt, in Abbildung 19 als erster grauer Balken dargestellt. In dieser Bedingung betrug die Argininkonzentration  $170,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$ . Nach 48 h Kultur war in der Kontrollbedingungen mit T-Zellen eine Argininkonzentration von  $99,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$  messbar. Auch in der Bedingung der unstimulierten T-Zellen nahm die Argininkonzentration ab: hier konnten  $92,9 \pm 10,3 \mu\text{M}$  Arginin gemessen werden. Interessanterweise wurde durch die Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren in den Kontrollbedingungen eine höhere Argininkonzentration von  $198,1 \pm 35,2 \mu\text{M}$  in der Bedingung mit 1 mM nor-NOHA und  $192,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$  in der Bedingung mit 0,1 mM INCB110058 gemessen. In der Co-Kultur mit PMN nahm die Argininkonzentration mit steigender PMN-Anzahl ab und erreichte Werte von  $86,1 \pm 23,0 \mu\text{M}$  in der PMN:T 1:1 Bedingung bis zu  $55,4 \pm 11,5 \mu\text{M}$  in der PMN:T 10:1 Bedingung. Durch die Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren konnte die Abnahme der Argininkonzentration in allen Bedingungen verhindert werden.

Die Argininkonzentrationen nach 48 h Co-Kultur von T-Zellen und PMN sind trotz der in den PMN vorhandenen Arginase 1 deutlich höher als nach 72 h Vorinkubation der PMN, obwohl im ersten Versuchsaufbau zusätzliche T-Zellen potentiell das Arginin metabolisieren können.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit der Zugabe von nor-NOHA bzw. INCB001158 eine erfolgreiche Inhibition der Arginase 1 und damit einhergehend höhere Argininkonzentrationen erzielt wurden.

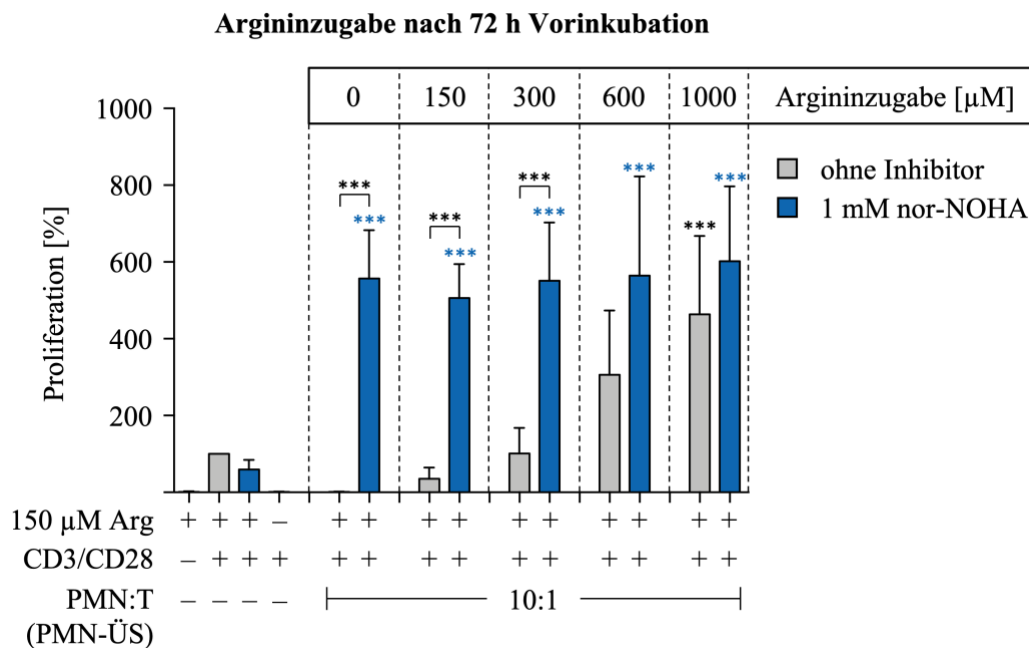


**Abbildung 19: Nur geringe Arginindepletion nach 48 h Co-Kultur.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert und die Co-Kultur in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Argininkonzentrationen in den unterschiedlichen zellfreien Überständen mittels HPLC ermittelt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*)  $p < 0,01$ ; \*)  $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3 Argininzugabe in die fertigen PMN-ÜS führt zur Rekonstitution der T-Zellproliferation, nicht aber zu einer noch stärkeren Hyperproliferation

Da in den vorangegangenen Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass der hyperaktivierende Effekt nicht auf das Enzym Arginase 1 und auch nicht auf den Inhibitor dieses Enzyms nor-NOHA bzw. INCB001158 zurückzuführen ist, erfolgten weitere Untersuchungen zu der Abhängigkeit des immunstimulierenden Effektes von der Aminosäure Arginin. Hierzu wurden die aus dem Vollblut isolierten PMN nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen angesetzt und 72 h inkubiert. Anschließend wurde der zellfreie PMN-Überstand generiert und mit 0 µM, 150 µM, 300 µM, 600 µM oder 1000 µM (jeweils finale Konzentration) Arginin versetzt. Die T-Zellen wurden in diesen Überständen für 48 h kultiviert und die Proliferation der T-Zellen mittels [<sup>3</sup>H]Thymininkorporation ermittelt. In Abbildung 20 sind die Mittelwerte der

T-Zellproliferationen aus 4 unabhängigen Experimenten gezeigt. Dabei wurden alle Werte auf die Werte der Kontrollbedingung (T-Zellen in Versuchsmedium ohne nor-NOHA) normiert.



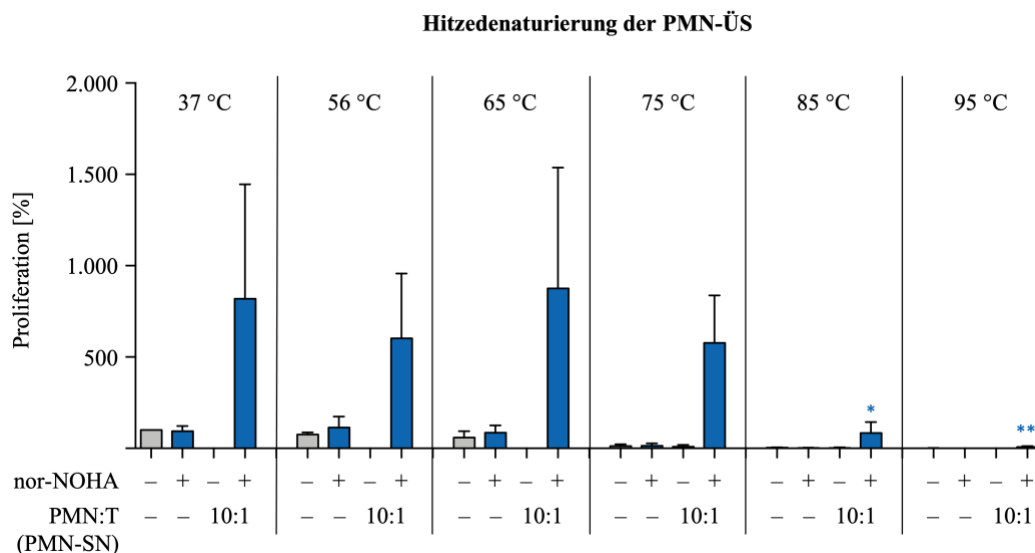
**Abbildung 20: Arginin wird für den immunstimulierenden Effekt der PMN gebraucht.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS wurden dann mit 0 µM, 150 µM, 300 µM, 600 µM oder 1000 µM L-Arginin versetzt, anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in diesen Überständen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt. Die Proliferationswerte von T-Zellen, die in Versuchsmedium ohne Inhibitor aktiviert worden waren, wurden auf 100% normiert (n = 4). Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*) p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Die Argininzugabe in die PMN-ÜS nach erfolgter Vorinkubation der PMN wirkte sich nur auf die Überstände ohne nor-NOHA aus. Hier konnte mit steigender Argininkonzentration eine Erhöhung der Proliferation beobachtet werden: bereits die physiologische Argininkonzentration von 150 µM reichte aus, um die Inhibition durch PMN abzuschwächen (PMN-ÜS + 150 µM L-Arg: 35,4 ± 29,2 % vs. PMN-ÜS + 0 µM L-Arg: 0,9 ± 0,6 %). Eine Argininzugabe von 300 µM hatte eine komplette Rekonstitution der T-Zellproliferation zur Folge (100,8 ± 67,2 %). Ab einer Zugabe von 600 µM Arginin konnte der immunstimulierende Effekt durch die PMN-ÜS wiederhergestellt werden, der durch Erhöhung der Argininzugabe auf 1000 µM bis auf das 4,5-fache der Kontrollproliferationswerte anstieg. Die Zugabe von Arginin in PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA hatte keinen Effekt auf die T-Zellproliferation. In diesen Bedingungen blieben die Proliferationswerte in etwa gleich.

## 4.4 Die immunstimulierende Aktivität der PMN ist sehr hitzestabil, hat ein Molekulargewicht < 3 kDa und ist stark hydrophil

### 4.4.1 Hitzestabilität der hyperaktivierenden PMN-ÜS

Zur initialen Eingrenzung der in Frage kommenden hyperaktivierenden Substanz(en) im PMN-Sekretom sollte deren Hitzestabilität untersucht werden. Hierzu wurden die aus dem Vollblut isolierten PMN in einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA in Versuchsmedium angesetzt und für 72 h inkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS und die RPMI Kontrollen wurden aliquotiert und jedes Aliquot wurde für 30 min bei 56 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C oder 95 °C inkubiert.



**Abbildung 21: T-Zell immunstimulierende Aktivität im PMN-ÜS ist sehr hitzestabil.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS und die RPMI Kontrollen wurden für 30 min bei 37 °C, 56 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C oder 95 °C inkubiert und auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in diesen Überständen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt und die erhaltenen Werte von T-Zellen, kultiviert in Versuchsmedium ohne Inhibitor, wurden auf 100 % normiert (n = 3). Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Bedingung hyperaktivierter T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA (37 °C). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Nachdem diese Überstände auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden die T-Zellen, aktiviert mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads, darin für 48 h inkubiert und anschließend wurde die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, wobei die mit 37 °C gekennzeichneten Bedingungen den bisherigen Standardbedingungen entsprechen. Die Proliferationswerte der T-Zellen, die in

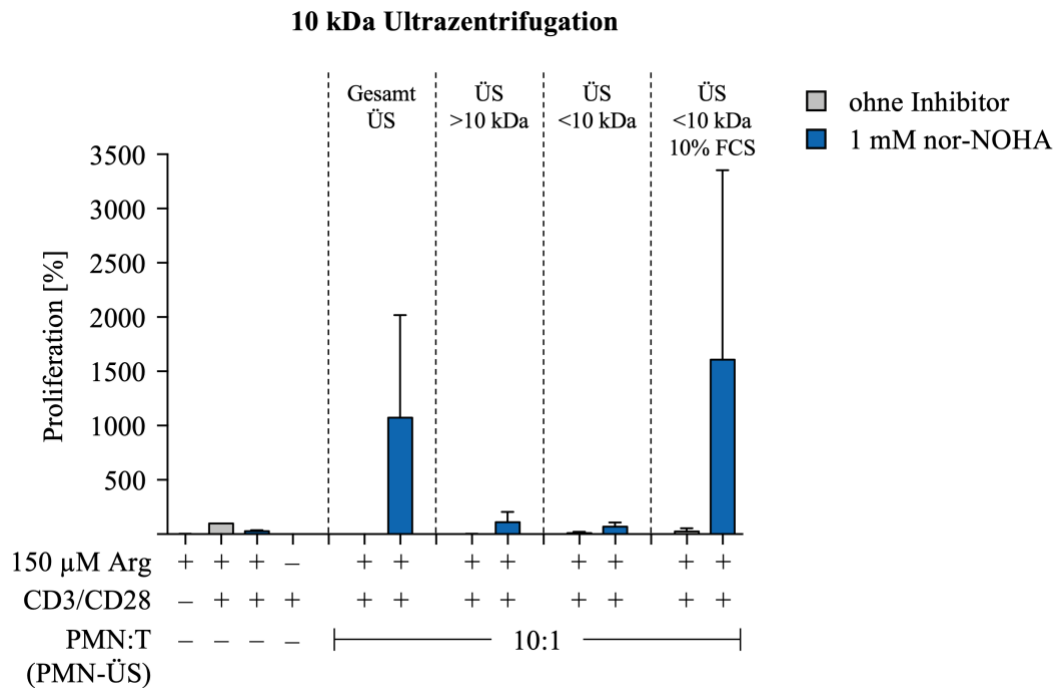
Versuchsmedium ohne Inhibitor inkubiert wurden, wurden als Referenzwert für alle anderen Bedingungen normiert verwendet. Die Proliferationswerte der T-Zellen, die in PMN-ÜS + nor-NOHA inkubiert wurden, zeigten mit  $819 \pm 626$  % eine deutlich erhöhte Proliferation verglichen mit den T-Zellen der Kontrollbedingung ohne Inhibitor. Eine 30 min Inkubation der Überstände bei  $56^{\circ}\text{C}$  wirkte sich kaum auf die Proliferation der T-Zellen aus. In der Kontrollbedingung ohne Arginase-Inhibitor wiesen die T-Zellen noch  $75,6 \pm 11,9$  % der ursprünglichen Proliferationswerte auf. Auch die Hyperaktivierung konnte hier noch deutlich beobachtet werden ( $602 \pm 354$  %). Diese Beobachtungen trafen auch auf die Überstände nach 30 min Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  zu (Versuchsmedium ohne Inhibitor:  $59,0 \pm 35,4$  %, PMN-Überstand + nor-NOHA:  $875 \pm 662$  %). Die 30 min Inkubation der Überstände bei  $75^{\circ}\text{C}$  führte mit nur noch  $12,7 \pm 9,9$  % verglichen zur Kontrollbedingung bei  $37^{\circ}\text{C}$  zu einer starken Reduktion der T-Zellproliferation in den Kontrollbedingungen, wohingegen in T-Zellen, die im PMN-ÜS + nor-NOHA kultiviert wurden, mit Proliferationswerten von  $576 \pm 259$  % weiterhin eine starke Hyperaktivierung zu beobachten war. Erst nach einer 30 min Inkubation der Überstände bei  $85^{\circ}\text{C}$  wird der stark immunstimulierende Effekt des PMN-ÜS + nor-NOHA deutlich abgeschwächt: hier zeigten die T-Zellen nach 48 h Inkubation im Versuchsmedium ohne Inhibitor mit  $3,6 \pm 2,9$  % sehr stark reduzierte Proliferationswerte, wohingegen die T-Zellen in PMN-ÜS + nor-NOHA mit nur  $84,0 \pm 60,9$  % relativ stabile Proliferationswerte aufwiesen. Die Inkubation der Überstände bei  $95^{\circ}\text{C}$  führte, wie zu erwarten, in allen Bedingungen zu stark inhibierten T-Zellproliferationen.

#### 4.4.2 Eingrenzung des Molekulargewichtes: 3 kDa und 10 kDa Ultrafiltrationen der PMN-ÜS

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welche unbekannt/n immunstimulierende/n Substanz/en im PMN-ÜS enthalten sind, die zu der zuvor beobachteten Hyperaktivierung der T-Zellen führen. Hierzu wurden die aus dem Vollblut isolierten PMN nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen in unterschiedlichen PMN:T-Verhältnissen angesetzt und 72 h inkubiert. Anschließend wurde der zellfreie PMN-ÜS mittels Amicon® Ultra einer Ultrafiltration mit einem Molekulargewichtsfiter von 10 kDa unterzogen, so dass der gesamte PMN-ÜS in zwei Überstände unterteilt wurde: PMN-ÜS mit Molekülen, die größer als 10 kDa sind und PMN-ÜS mit Molekülen, die kleiner als 10 kDa sind. Bei dieser Ultrafiltration werden viele im FCS enthaltene Moleküle wie z.B. Albumin oder zelluläre Wachstumsfaktoren nur in dem PMN-ÜS  $> 10$  kDa aufzufinden sein, daher wurde im PMN-ÜS  $< 10$  kDa zusätzlich 10 %



dialysiertes FCS hinzugefügt. In diesen Überständen wurden T-Zellen für 48 h kultiviert und die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt.



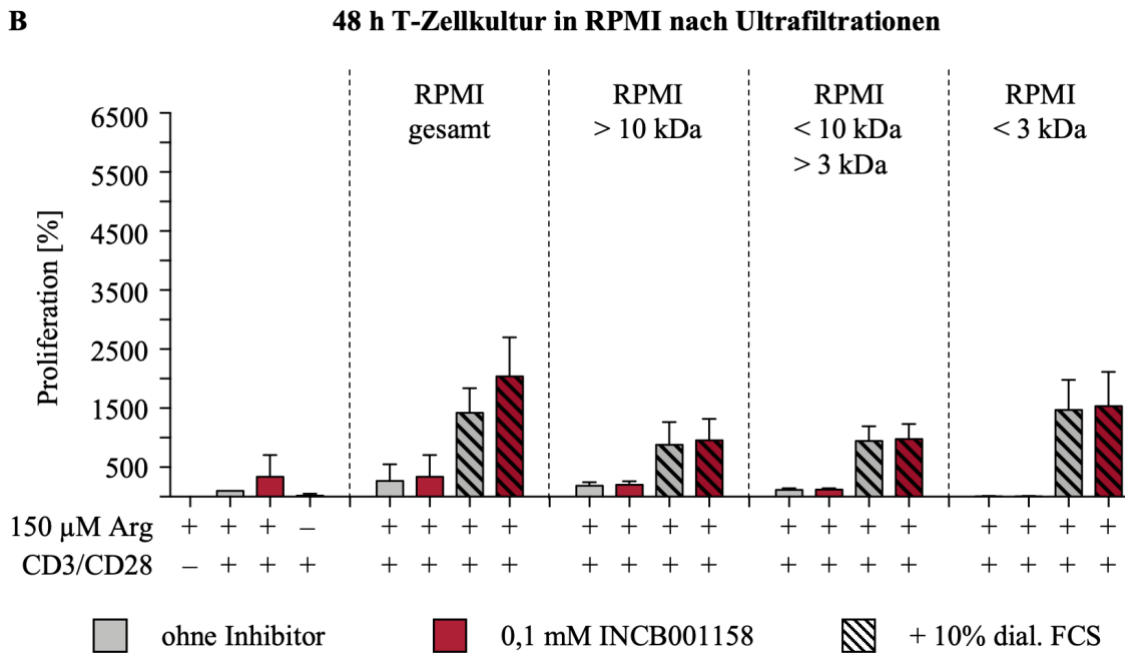
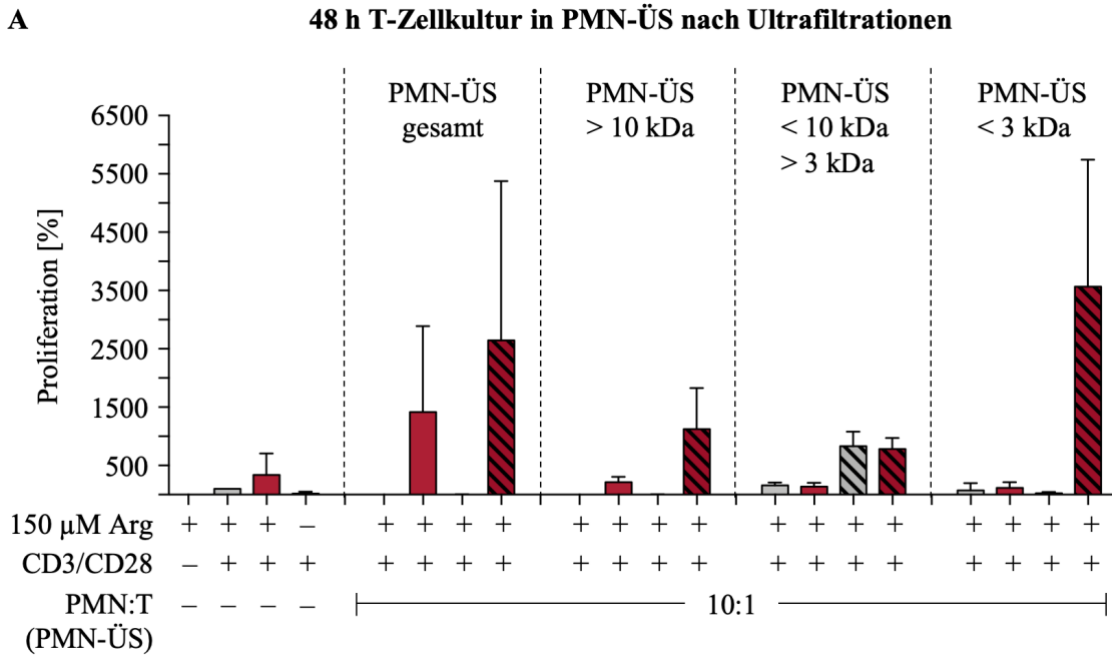
**Abbildung 22: Die Hyperaktivierung von T-Zellen benötigt Faktor(en) im PMN-ÜS mit einem Molekulargewicht < 10 kDa.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS wurden mittels 10 kDa cut-off Ultrafiltration erhalten. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in Gesamtüberstand, ÜS > 10 kDa, ÜS < 10 kDa mit und ohne Zugabe von 10 % dialysiertem FCS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt und die erhaltenen Werte von T-Zellen, kultiviert in Versuchsmedium ohne Arginase-Inhibitor, wurden auf 100 % normiert (n = 3). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test*.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des PMN:T-Verhältnisses von 10:1 mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA gezeigt. Im gesamten PMN-ÜS mit nor-NOHA konnte eine Hyperaktivierung der T-Zellen beobachtet werden: die Proliferationswerte in dieser Bedingung sind knapp 12× höher als in der Kontrollbedingung ( $1.155 \pm 1.119$  %). Diese Hyperaktivierung ist in T-Zellen, die in PMN-ÜS > 10 kDa mit nor-NOHA kultiviert wurden, nicht mehr zu beobachten. Hier kann durch die Zugabe von nor-NOHA lediglich eine Rekonstitution der T-Zellproliferation erreicht werden ( $107,3 \pm 96,3$  %). Dies trifft auch auf T-Zellen zu, die in PMN-ÜS < 10 kDa mit nor-NOHA kultiviert wurden: hier konnte keine volle Rekonstitution der T-Zellproliferation mit nor-NOHA Zugabe erreicht werden ( $68,3 \pm 39,5$  %). Wurde diesem Überstand jedoch 10 % dialysiertes FCS wieder zugesetzt, konnte die Hyperaktivierung in den T-Zellen wieder beobachtet werden ( $1.609 \pm 1.744$  %).

Zusammenfassend lässt sich aus diesem Versuch schlussfolgern, dass die gesuchte/n immunstimulierende/n Substanz/en ein Molekulargewicht von kleiner als 10 kDa aufweisen und dass für den hyperaktivierenden Effekt in den T-Zellen auch Inhaltsstoffe aus dem FCS benötigt werden.

Im folgenden Versuch soll dieses erste Ergebnis bestätigt werden. Um zu zeigen, dass der hyperaktivierende Effekt (Abbildung 22) nicht allein durch die Zugabe von 10 % dialysiertem FCS zustande kommt, wurde im nächsten Versuch auch die PMN-ÜS > 10 kDa mit 10 % dialysiertem FCS versetzt. Außerdem wurde eine zweite Ultrafiltration mit einer Molekulargewichtsgrenze von 3 kDa durchgeführt. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in diesen PMN-ÜS kultiviert und die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 23 dargestellt, wobei Abbildung 23A die Ergebnisse nach Ultrafiltration der PMN-ÜS und Abbildung 23B die Ergebnisse nach Ultrafiltration der RPMI Kontrollen zusammenfassen. Die Hyperaktivierung der T-Zellen nach 48 h Kultivierung im PMN-ÜS mit INCB001158 betrug mit  $16.199 \pm 13.270$  cpm das 14-fache der Proliferationswerte aus der Kontrolle ohne Inhibitor.

Die Zugabe von 10 % dialysiertem FCS in den PMN Gesamtüberstand erhöhte die Proliferationswerte dieser T-Zellen auf das 26-fache im Vergleich zu der Kontrolle ( $2.645 \pm 2.732$  %). Dieser proliferationsstimulierende Effekt von FCS ließ sich auch in allen anderen Überständen der PMN, sowie in den RPMI Kontrollen aus Abbildung 23B beobachten. Aus Abbildung 23A geht hervor, dass der hyperaktivierende Effekt nur dann erzielt werden konnte, wenn T-Zellen im gesamten PMN-ÜS oder im 3 kDa PMN-ÜS mit INCB001158 und FCS kultiviert wurden, so dass angenommen werden kann, dass sich in letzterem die immunstimulierende/n Substanz/en befindet/n. Trotz dieses positiven Effekts von FCS auf die T-Zellproliferation konnte in T-Zellen nach 48 h Inkubation im 3 kDa PMN-ÜS mit INCB001158 deutlich höhere Proliferationswerte erhalten werden als in T-Zellen nach 48 h Inkubation im 3 kDa RPMI mit INCB001158 ( $46.537 \pm 11.388$  cpm vs.  $21.728 \pm 4.853$  cpm).



**Abbildung 23: Die T-Zell immunstimulierende Aktivität im PMN-ÜS findet sich in der Fraktion mit einem Molekulargewicht < 3 kDa.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 0,1 mM INCB001158 für 72 h vorinkubiert. Als Kontrolle wurde Versuchsmedium mit und ohne 0,1 mM INCB001158 ebenfalls für 72 h vorinkubiert. Die (A) zellfreien PMN-ÜS und die (B) RPMI Kontrollen wurden mittels 10 kDa und anschließender 3 kDa cut-off Ultrafiltration in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in diesen PMN-ÜS unterschiedlichen Molekulargewichts mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ Thymininkorporation über 16 h ermittelt und die erhaltenen Werte von T-Zellen, kultiviert in Versuchsmedium ohne Inhibitor, wurden auf 100% normiert (n = 3). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (n.s).

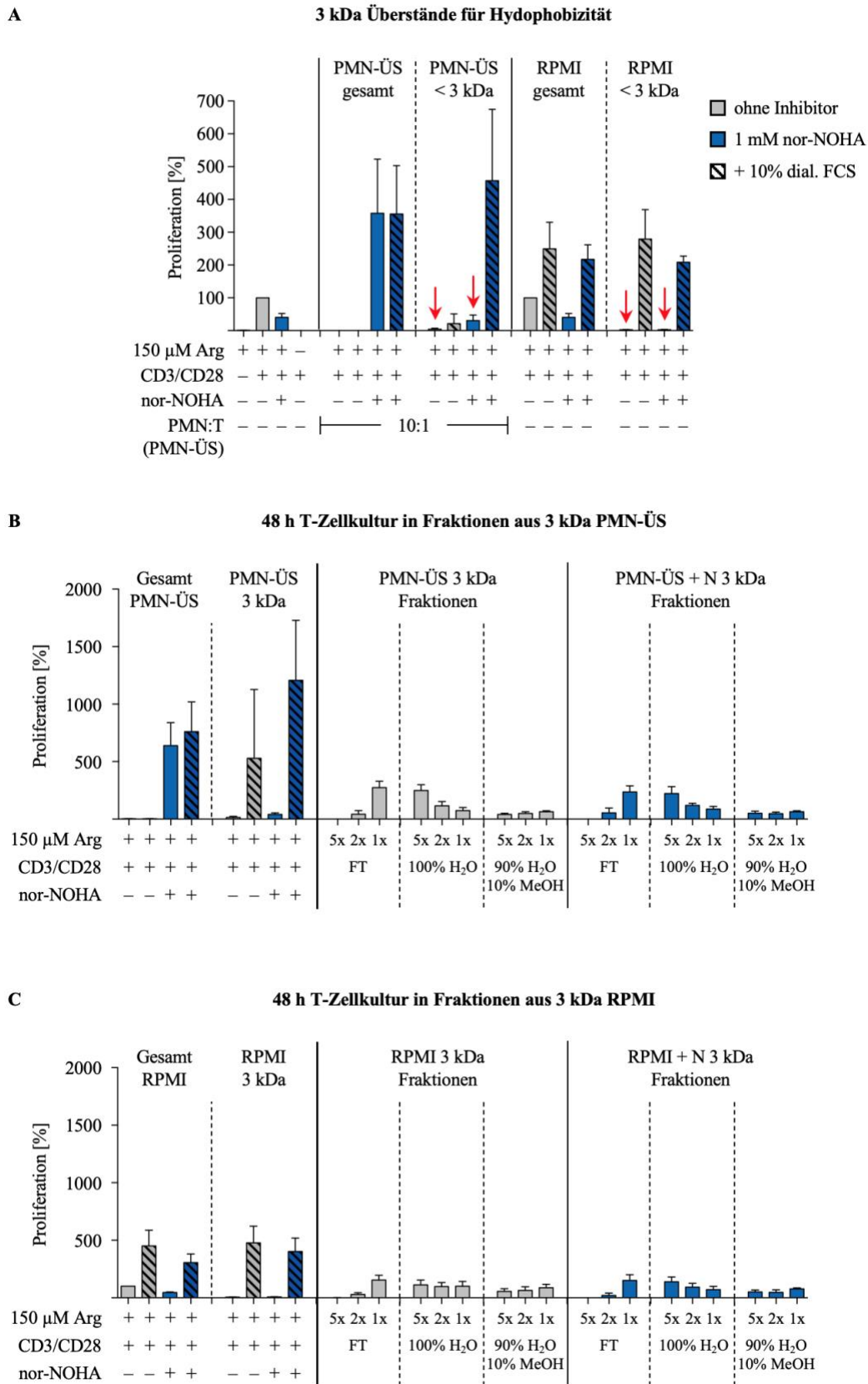
#### 4.4.3 *Reversed Phase* Chromatographie der 3 kDa Überstände

Nachdem das Molekulargewicht der gesuchten Substanz/en eingegrenzt werden konnte, sollte im Folgenden durch die *Reversed Phase* Chromatographie die Frage nach deren Hydrophobizität geklärt werden, um die spätere metabolomische Analyse zu erleichtern. Hierzu wurden die 3 kDa Überstände von PMN und RPMI mit und ohne nor-NOHA nach 3.5.2.1 Ultrafiltrationen der PMN-ÜS generiert und die Fähigkeit zur Hyperaktivierung der T-Zellen mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation ermittelt, was in Abbildung 24A zusammengefasst wurde. Die mit roten Pfeilen gekennzeichneten Bedingungen wurden für die Fraktionierung verwendet. Analog zu Abbildung 23, konnte auch in Abbildung 24 die Hyperaktivierung von T-Zellen sowohl nach 48 h Kultur im gesamten PMN-ÜS mit nor-NOHA ( $358 \pm 164$  %), als auch nach 48 h Kultur in < 3 kDa PMN-ÜS mit nor-NOHA ( $456 \pm 217$  %) beobachtet werden. Auch der aktivierende Effekt durch die Zugabe von 10 % dialysiertem FCS konnte erneut gezeigt werden (Abbildung 24). Auch die erreichten Proliferationswerte von  $208 \pm 18$  % in der Fraktion < 3 kDa RPMI + nor-NOHA sind in diesen Kontrollen relativ zu den PMN-ÜS Bedingungen vergleichbar denen in Abbildung 23.

Die *Reversed Phase* Chromatographie der Proben aus Abbildung 24A erfolgte mit tC18 Chromatographiesäulen und nach 3.5.2.2 Fraktionierung der < 3 kDa Proben. Hierbei wurden die Proben zunächst mit 100 % H<sub>2</sub>O eluiert und anschließend mit 90 % H<sub>2</sub>O + 10 % MeOH. Alle weiteren Eluationsschritte wurden für diesen Versuch nicht durchgeführt, da in einem ersten Pilotversuch bereits gezeigt werden konnte, dass die gesuchte/n Substanz/en äußerst hydrophile Eigenschaften aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand erneut in Versuchsmedium so gelöst, dass eine 5-fach und 2-fach konzentrierte Fraktion, sowie die ursprüngliche Konzentration erhalten wurde. Die T-Zellen wurden dann 48 h in diesen Überständen kultiviert. Zudem wurden die T-Zellen in zuvor eingefrorenen Kontrollbedingungen für 48 h kultiviert. Diese dienen dem Vergleich der Fraktionen mit der ursprünglich erreichten Hyperaktivierung in dem gesamten PMN-ÜS, sowie dem < 3 kDa PMN-ÜS (vgl. Abbildung 23).

Die Ergebnisse der Fraktionierung wurden in Abbildung 24B und 24C zusammengefasst. In diesem Versuch wurden alle Proliferationswerte auf die Gesamt-RPMI Bedingung ohne Zugabe von nor-NOHA und FCS normiert. Die Kontrollbedingungen der PMN-ÜS aus Abbildung 24B zeigten insgesamt höhere Proliferationswerte, verglichen mit Abbildung 24A: in der Fraktion < 3 kDa PMN-ÜS + nor-NOHA konnten Proliferationswerte von  $1.208 \pm 520$  % beobachtet werden. Im Gesamt-PMN-ÜS ohne Inhibitor hingegen, konnte die Inhibition der T-Zellproliferation beobachtet werden, auch mit Zugabe von 10 % dialysiertem FCS (2.

Bedingung von rechts). Die Proliferationswerte der RPMI-Kontrollen aus Abbildung 24C zeigten ähnliche Tendenzen wie in Abbildung 24A. In den einzelnen Fraktionen der PMN-ÜS konnten jeweils in der 100 % H<sub>2</sub>O Fraktionen etwas höhere Proliferationswerte beobachtet werden, verglichen zu den restlichen Fraktionen. Diese waren jedoch mit  $249 \pm 49$  % für die  $5 \times 100$  % H<sub>2</sub>O Fraktion des  $< 3$  kDa PMN-ÜS ohne Inhibitor, sowie mit  $221 \pm 59$  % für die  $5 \times 100$  % H<sub>2</sub>O Fraktion des  $< 3$  kDa PMN-ÜS mit nor-NOHA deutlich niedriger als die initial erhaltenen Proliferationswerte in den Kontrollen (Gesamt PMN-ÜS + nor-NOHA:  $638 \pm 201$  %). Dies könnte ein Hinweis auf die Stabilität der gesuchten Substanz/en sein. Durch diese deutliche Abnahme der hyperaktivierenden Wirkung in den PMN-ÜS Fraktionen ist der Vergleich zu den RPMI-Fraktionen nicht mehr so eindeutig wie in den Kontrollbedingungen. Dennoch konnten Unterschiede vor allem in der 100 % H<sub>2</sub>O Fraktion beobachtet werden: hier waren die Proliferationswerte mit  $112 \pm 42$  % für die  $5 \times 100$  % H<sub>2</sub>O Fraktion des  $< 3$  kDa RPMI ÜS ohne Inhibitor und  $139 \pm 41$  % für die  $5 \times 100$  % H<sub>2</sub>O Fraktion des  $< 3$  kDa RPMI ÜS mit nor-NOHA etwa halb so hoch wie die analogen PMN-ÜS Fraktionen. Da in Abbildung 23 ebenfalls nur ein Unterschied von Faktor 2 in diesen Bedingungen beobachtet werden konnte, konnte nach der Chromatographie zumindest das Verhältnis dieser Bedingungen erhalten werden.



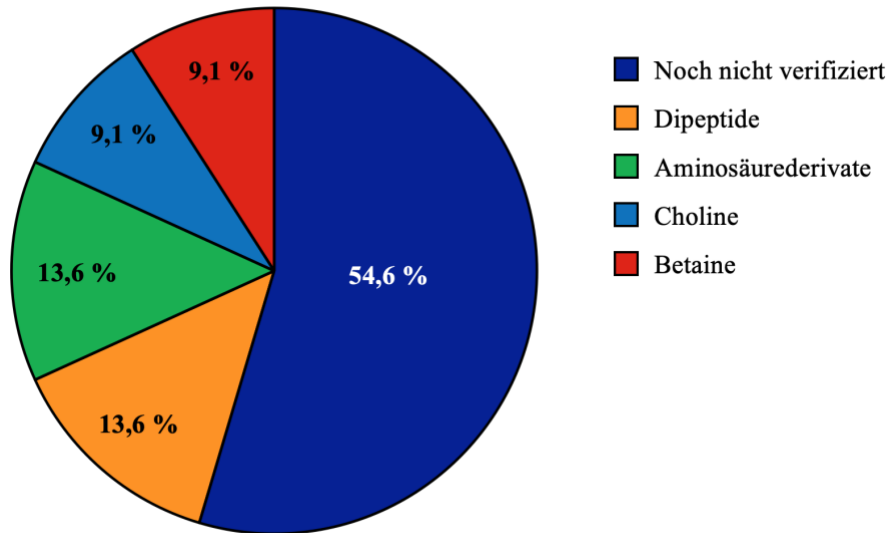
**Abbildung 24: T-Zell immunstimulierende Aktivität im 3 kDa PMN-ÜS findet sich in der hydrophilen Fraktion.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunder Spender isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS und die RPMI Kontrollen wurden mittels 10 kDa und anschließender 3 kDa cut-off Ultrafiltration erhalten. (A) Anschließend wurden die T-

Zellen für 48 h in diesen Überständen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt und die erhaltenen Werte von T-Zellen, kultiviert in Versuchsmedium ohne Inhibitor, wurden auf 100% normiert (n = 3). Die rot gekennzeichneten Bedingungen wurden mittels Reversed Phase Chromatographie nach ihrer Hydrophilie aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert, in unterschiedlichen Konzentrationen im Versuchsmedium gelöst und anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in (B) den PMN-Fraktionen oder (C) den RPMI-Kontrollen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation über 16 h ermittelt und die erhaltenen Werte von T-Zellen, kultiviert in Versuchsmedium ohne Inhibitor, wurden auf 100% normiert (n = 3). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (n.s.).

#### 4.4.4 Metabolomics der < 3 kDa Fraktionen

Die Analyse der Fraktionen aus Abbildung 24B + 24C erfolgte in Kooperation mit Dr. Michael Witting, *Metabolomics and Proteomics Core* des HelmholtzZentrum München. Hierbei wurden die Fraktionen erneut in Lösung gebracht und mit dem Ultra-Hochleistungsflüssigkeit-Chromatograph EcionLC™ AD, gekoppelt an einen hochauflösenden Massenspektrometer (Sciex X500R QToF) im positiven Ionisationsmodus, analysiert und mithilfe einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z-Säule aufgetrennt.

Es konnten insgesamt 15.009 Metaboliten in allen Proben detektiert werden, wobei nach erfolgter Qualitätskontrolle 3865 Metaboliten übrig blieben. Um die Suche nach den immunstimulierenden Metaboliten weiter eingrenzen zu können, wurden die Proliferationswerte aus Abbildung 24B + 24C mit der Peakintensität der einzelnen Proben korreliert. Hierbei wurden die Proliferationswerte der RPMI Bedingungen als Hintergrund betrachtet und von den PMN-ÜS Bedingungen abgezogen. Die Korrelationswerte der TOP 22 betragen zwischen 0,87 und 0,98. Die Substanzklassen dieser TOP22 Metaboliten wurden in Abbildung 25 als Kreisdiagramm dargestellt. Hierbei konnten 54,6 % der Metaboliten noch nicht verifiziert werden, d.h. hier liegen keine näheren Informationen zu den Substanzklassen vor. Darüber hinaus werden 13,6 % der TOP22 zur Klasse der Dipeptide und weitere 13,6 % zu den Aminosäurederivaten gezählt. Außerdem waren 9,1 % Choline und 9,1 % Betaine in den TOP22 enthalten.



**Abbildung 25: Graphische Darstellung der ersten Analyse der Metabolom Daten.** PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 (analog der T-Zellanzahl für den Proliferationsansatz) im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die zellfreien PMN-ÜS und die RPMI Kontrollen wurden mittels 10 kDa und anschließender 3 kDa cut-off Ultrafiltration erhalten und mittels Reversed Phase Chromatographie nach ihrer Hydrophilie aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und für die anschließende Ultrahochdruck-Flüssigkeitschromatographie (UHPLC) Time of Flight (ToF) Massenspektrometrie wieder in Lösung gebracht. Nach einer Qualitätskontrolle der Daten, wurden eine Korrelationsanalyse der erhaltenen Metabolomwerte mit den Proliferationswerten aus Abbildung 24B + 24C durchgeführt. Dargestellt ist die Verteilung der TOP22 Metaboliten dieser Korrelationsmethode auf die unterschiedlichen Metabolitgruppen.



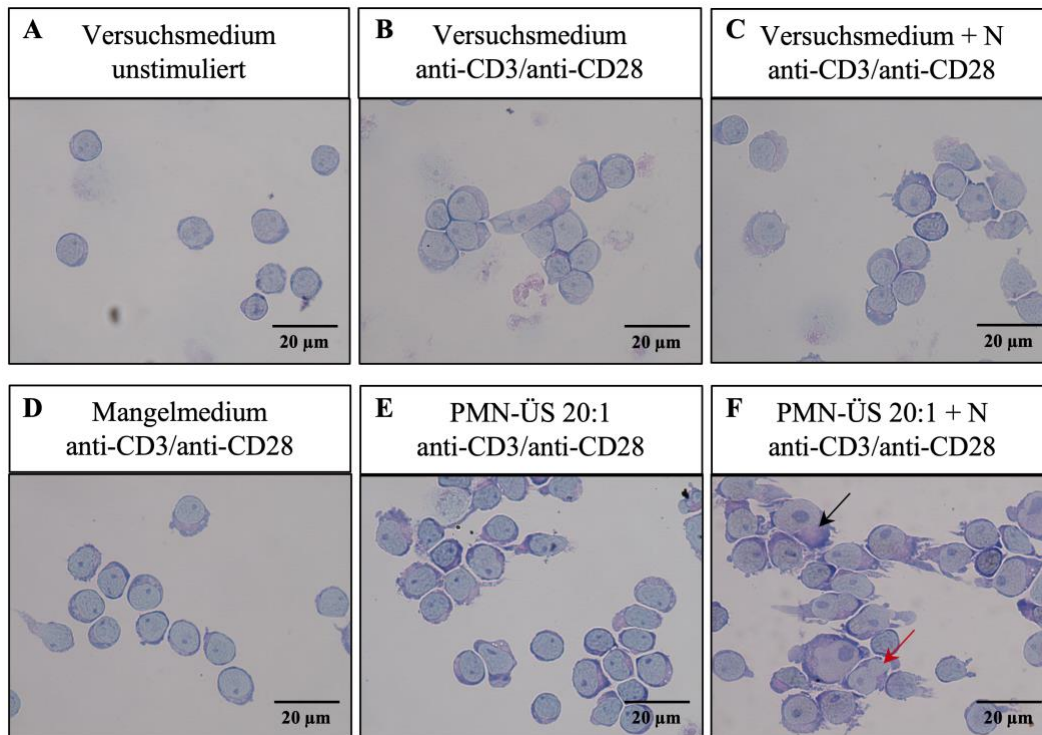
## 4.5 Auswirkungen der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zellen

Bisher lag der Schwerpunkt der Versuche auf Seiten der PMN und der immunstimulierenden Effekte der unbekannt Substanz/en. In den folgenden Versuchen wird der Fokus auf die T-Zellen gelegt. Neben der erhöhten Proliferation, sollten weitere Auswirkungen der hyperaktivierenden Aktivität im Sekretom der humanen PMN auf T-Zellen untersucht werden.

### 4.5.1 Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen

Im vorliegenden Versuch wurden die Auswirkungen der Hyperaktivierung durch PMN-ÜS + nor-NOHA auf die Morphologie der T-Zellen untersucht. Hierbei wurden die T-Zellen und PMN aus humanem Vollblut gesunder Spender isoliert und die PMN wurden in einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 mit und ohne Zugabe von nor-NOHA in Versuchsmedium angesetzt und 72 h inkubiert. Die T-Zellen wurden anschließend für 48 h im zellfreien PMN-ÜS kultiviert. Nachdem die T-Zellen geerntet wurden, wurden sie nach 3.4.4 Cytospin-Proben auf Objektträger mit Methanol fixiert, mit einer Eosin- und Methyleneblaulösung gefärbt und im Lichtmikroskop betrachtet. Die aufgenommenen Bilder sind in Abbildung 26 dargestellt. Methyleneblau färbt die Nukleinsäuren und macht so den Zellkern sichtbar und Eosin färbt basische Proteine und Substanzen im Zytosol, so dass diese Bereiche eine rötliche Farbe annehmen. Die vorliegenden Präparate aus Abbildung 26 zeigten statt rot und blau gefärbten Bereichen eher lilafarbene Bereiche, die im Zellkern hell und im Zytosol dunkler erschienen. In der Regel sollte der Zellkern wesentlich dunkler gefärbt sein als das Zytosol, so dass die Methode der Färbung noch verbessert werden kann [249]. Für eine intensivere Färbung scheint eine hohe Zelldichte vonnöten zu sein, so dass die Zellzahlen in den Bedingungen mit schwacher Färbung (vgl. Abbildung 26A-D) angepasst werden sollte. Trotz der nicht idealen Färbung, erkennt man deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen. Unstimulierte T-Zellen, wie auch T-Zellen, die in Argininmangelmedium aktiviert wurden, zeigten sich nach 48 h als kleine, runde Zellen, die in ihrer Morphologie normalen humanen Lymphozyten direkt nach Isolation aus dem peripheren Blut entsprachen. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen fast nur aus dem Nucleus, mitsamt kleinen Kernkörperchen, bestehen und das Zytoplasma als schmaler Saum zu sehen ist. Die konventionell aktivierten T-Zellen mit oder ohne Zugabe von nor-NOHA konnten hingegen als weniger runde Zellen mit mehr Zytoplasma dargestellt werden. Zudem machte sich die Aktivierung der T-Zellen über die anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads über das Ausbilden von kleinen Fortsätzen bemerkbar. T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne Inhibitor kultiviert wurden und in ihrer Proliferation inhibiert sind, zeigten

eine ähnliche Morphologie wie in Arginin-Mangelmedium aktivierte T-Zellen bzw. nicht-aktivierte T-Zellen. Die Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA zu der PMN-ÜS Bedingung führte zu einem sehr viel polymorpheren Bild mit teilweise sehr stark vergrößerten, lymphoblastisch imponierenden Zellen mit sehr prominenten und großen Nucleoli, einem aufgelockerten Kernchromatin und einem ausgeweiteten Zytoplasma. Diese ungewöhnlich stark alterierte Morphologie spiegelt die funktionellen Ergebnisse der Hyperproliferation dieser Zellen wider.

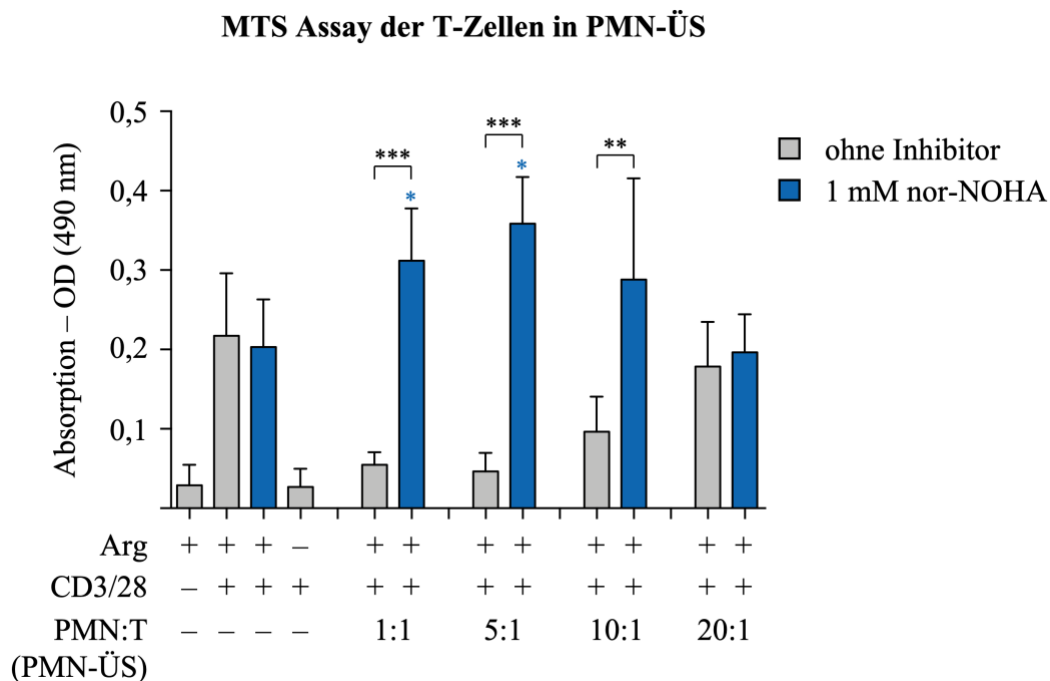


**Abbildung 26: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine ausgeprägt immunoblastische Morphologie auf.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Die T-Zellen wurden für 48 h in diesen Überständen mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen geerntet, die Dynabeads entfernt und als Cytospin auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellkerne wurden mit Methylenblau und das Zytoplasma mit Eosin gefärbt. Die Proben wurden mit dem EVOS Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung untersucht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4.5.2 Untersuchung des Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, inwiefern sich die Hyperaktivierung der T-Zellen durch das PMN-Sekretom auf ihren Zellmetabolismus auswirkt. Hierzu wurden die aus dem Vollblut gesunder Spender isolierten T-Zellen und PMN nach 3.2.6.2 PMN-Vorinkubationen angesetzt und nach erfolgter 48 h Inkubation der aktivierten T-Zellen in den zellfreien PMN-ÜS wurde der Metabolismus nach 3.4.2 Proliferationsassay mit MTS bzw. 3.4.3 T-Zellmetabolismus

mittels Agilent *Seahorse* bestimmt. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse des MTS-Assays dargestellt. Bereits in dem PMN-ÜS + nor-NOHA bei einem PMN:T-Zellverhältnis von 1:1 konnte in den T-Zellen eine höhere metabolische Aktivität beobachtet werden ( $158,5 \pm 57,4$  %). Diese blieb jedoch mit steigender PMN-Anzahl zunächst relativ konstant: so konnte in T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS + nor-NOHA bei einem 5:1 PMN:T-Zellverhältnis eine metabolische Aktivität von  $187,1 \pm 80,4$  % gemessen werden. Dieser leichte Anstieg fiel in T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS + nor-NOHA bei einem 10:1 PMN:T-Zellverhältnis wieder auf  $160,4 \pm 109,6$  % ab, wobei hier wegen der hohen Fehlerbalken keine signifikante Erhöhung verglichen zur Kontrollbedingung bestehend aus T-Zellen in Versuchsmedium + nor-NOHA beobachtet werden konnte. Die metabolische Aktivität der T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 und der Zugabe von nor-NOHA nahm weiterhin ab und erreichte mit  $99,3 \pm 38,7$  % ungefähr die metabolische Aktivität der T-Zellen in den Kontrollbedingungen.

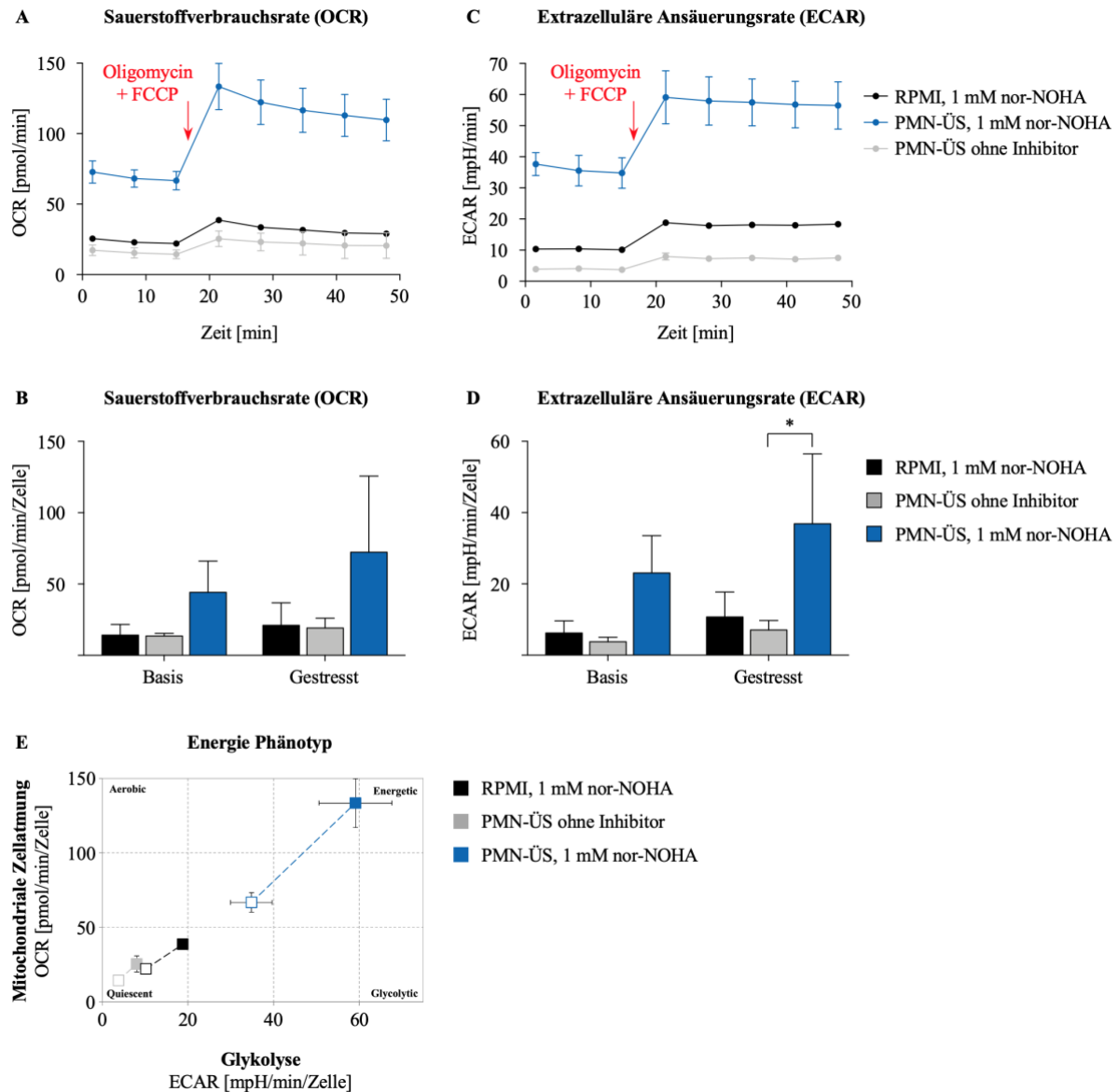


**Abbildung 27: Hyperaktivierte T-Zellen haben einen verstärkten Metabolismus.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die T-Zellen wurden für 4 h mit dem MTS Reagenz inkubiert, welches die Aktivität NADP(H) abhängiger Reduktasen und damit die metabolische Potenz der Zellen erfasst. Anschließend wurde mit Hilfe eines Plateraders die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen (n = 3). Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\* p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Die metabolische Aktivität von T-Zellen, die 48 h in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 1:1 aktiviert wurden, ist mit  $29,8 \pm 18,8$  % deutlich reduziert und dennoch höher als in unaktivierten T-Zellen ( $12,2 \pm 6,7$  %) und in T-Zellen nach 48 h Inkubation in Arginin-Mangelmedium ( $10,7 \pm 7,4$  %). Anders als in den Proliferationsversuchen (vgl. z.B. Abbildung 12), in denen die T-Zellproliferationen in allen PMN-ÜS inhibiert waren (mit Ausnahme der PMN:T 1:1 Bedingung), nimmt die metabolische Aktivität der T-Zellen in PMN-ÜS mit steigender PMN-Anzahl zu und erreicht im PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 annähernd die Werte der Kontrollbedingung ( $93,9 \pm 49,3$  %). Interessanterweise machte die Zugabe des Arginase 1 Inhibitors nor-NOHA im PMN-ÜS mit der höchsten PMN-Anzahl keinen Unterschied mehr in Bezug auf die metabolische Aktivität der T-Zellen aus. Um den T-Zellmetabolismus detaillierter studieren zu können, wurden im Folgenden Seahorse Experimente durchgeführt. Für den *Agilent Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test* wurde eine reine CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation verwendet, da jeder Zelltyp anders reagiert und dieser Assay sehr sensitiv gegenüber pH-Wertänderungen und O<sub>2</sub>-Verbrauch ist. Durchgeführt wurde dieser Versuch nach 3.4.3 T-Zellmetabolismus mittels *Agilent Seahorse*, wobei 3 unterschiedliche T-Zellbedingungen miteinander verglichen wurden: Aktivierte T-Zellen nach 48 h Inkubation in (i) Versuchsmedium mit der Zugabe von nor-NOHA (RPMI+N, konventionell aktivierte T-Zellen), (ii) PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 (PMN-ÜS ohne Inhibitor, nicht-aktivierte T-Zellen) und (iii) PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 mit der Zugabe von nor-NOHA (PMN-ÜS+N, hyperaktivierte T-Zellen). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

Die OCR ist in 28A und 28B abgebildet, wobei in 28A ein repräsentativer Versuch für den optischen Verlauf der Kurven und in 28B die ausgewerteten Messwerte aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt ist. Die ersten 3 Messwerte aus Abbildung 28A spiegeln den basalen Sauerstoffverbrauch der T-Zellen wider. Bereits hier war der erhöhte O<sub>2</sub>-Verbrauch der hyperaktivierten T-Zellen gegenüber den konventionell aktivierten T-Zellen und den nicht-aktivierten T-Zellen zu beobachten. Dies zeigte sich auch in den ausgewerteten Daten aus Abbildung 28B. Hier konnte in hyperaktivierten T-Zellen (blaue Säule) mit  $44,2 \pm 21,9$  pmol/min/Zelle ein 4-fach höherer O<sub>2</sub>-Verbrauch gemessen werden (konventionell:  $14,1 \pm 7,5$  pmol/min/Zelle; nicht-aktiviert:  $13,6 \pm 1,8$  pmol/min/Zelle). Nachdem der Stressor-Mix, bestehend aus Oligomycin und FCCP, injiziert wurde, konnte ein deutlicher Anstieg des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in den hyperaktivierten T-Zellen beobachtet werden ( $72,3 \pm 53,3$  pmol/min/Zelle), was anschließend über die Zeit kontinuierlich aber leicht wieder abnahm. Ein Anstieg der OCR wurde auch in den konventionell aktivierten T-Zellen ( $21,1 \pm 15,8$

pmol/min/Zelle) und den nicht-aktivierten T-Zellen ( $19,2 \pm 6,9$  pmol/min/Zelle) gemessen, allerdings weit weniger ausgeprägt. Die konventionell aktivierten T-Zellen konnten über den gesamten Versuch hinweg einen leicht höheren  $O_2$ -Verbrauch aufweisen als die nicht-aktivierten T-Zellen.



**Abbildung 28: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine stark erhöhte oxidative Zellatmung sowie Glykolyse auf.** Humane  $CD8^+$  T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im 10:1 PMN:T-Zellverhältnis im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Der Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test wurde zusammen mit dem XFp Analyzer nach Herstellerangaben durchgeführt. (A+B) Zellulärer Sauerstoffverbrauch durch die Messung der gelösten  $O_2$ -Konzentration im Medium (C+D) Protonenausscheidung durch die Messung der freien Protonen im Medium (pH-Wert), (E) Bestimmung des Energiephänotyps durch Auftragung von OCR gegen ECAR. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (A, C), sowie die Mittelwerte (B, D) aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (\*  $p < 0,05$ ).

Hinsichtlich der ECAR-Messungen (Abbildung 28C + 28D) konnten sehr ähnliche Beobachtungen gemacht werden: die hyperaktivierten T-Zellen wiesen, verglichen mit den anderen beiden Gruppen, bereits eine deutlich erhöhte basale Glykolyse auf (hyperaktiviert:  $23,1 \pm 10,5$  mpH/min/Zelle; konventionell:  $6,2 \pm 3,4$  mpH/min/Zelle; nicht-aktiviert:  $3,8 \pm 1,3$  mpH/min/Zelle), die nach Applikation der Stressoren stark ansteigt und dann konstant erhöht bleibt (hyperaktiviert:  $36,9 \pm 19,6$  mpH/min/Zelle; konventionell:  $10,7 \pm 7,0$  mpH/min/Zelle; nicht-aktiviert:  $7,1 \pm 2,6$  mpH/min/Zelle). Die konventionell aktivierten T-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ECAR-Messwerten deutlicher von den nicht-aktivierten T-Zellen als dies bei den OCR-Messungen zu sehen ist.

Für die Bestimmung der Phänotypen wurden in Abbildung 28E die ECAR-Messwerte gegen die OCR-Bestimmungen aufgetragen, wobei die Basisphänotypen als weiße Quadrate mit farbiger Umrandung und die Stress-Phänotypen die farbigen Quadrate darstellen. Die hyperaktivierten T-Zellen reagierten am stärksten auf den metabolischen Stressor-Mix, was in einer stark erhöhten Glykolyse und parallel auch einer stark gesteigerten mitochondrialen Zellatmung resultierte. Demnach wiesen diese T-Zellen ein sehr hohes metabolisches Potential auf. Das geringste metabolische Potential wurde in den nicht-aktivierten T-Zellen gemessen. Sowohl der Basis-Phänotyp, als auch der Stress-Phänotyp dieser Zellen befanden sich in einem metabolischen Ruhezustand. Der Basis-Phänotyp der konventionell aktivierten T-Zellen liegt ungefähr auf derselben Höhe wie der Stress-Phänotyp der nicht-aktivierten T-Zellen. Jedoch reagierten die konventionell aktivierten T-Zellen deutlicher auf den Stressor-Mix, so dass ihr metabolisches Potential deutlich höher als das der nicht-aktivierten T-Zellen ist.

Aus diesem Versuch lässt sich abschließend zusammenfassen, dass die gesuchte/n immunstimulierende/n Substanz/en im Sekretom der PMN nicht nur zu einer Hyperproliferation der T-Zellen führt bzw. führen, sondern durch diese gleichermaßen die metabolische Aktivität sowie das metabolische Potential im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen deutlich erhöht wird.

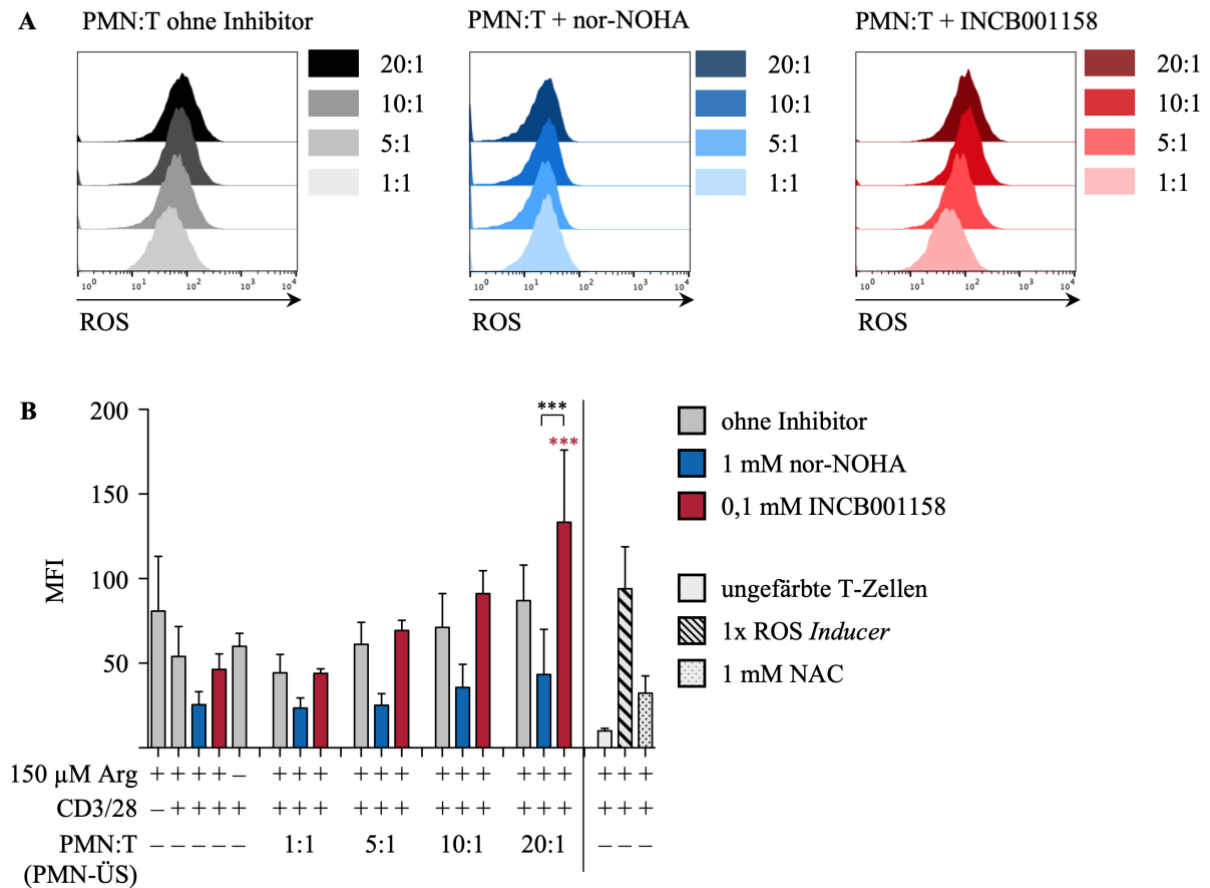
#### 4.5.3 Untersuchung der ROS Produktion in T-Zellen

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können auch von T-Zellen generiert werden und nehmen in diesem Zusammenhang eine Rolle in der T-Zellantwort ein [250]. Daher stellt sich die Frage, wie sich eine Hyperaktivierung auf die ROS-Produktion in diesen T-Zellen auswirkt. Im Mittelpunkt dieser Versuche stand die Untersuchung der ROS-Produktion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS oder nach 48 h Co-Kultur mit PMN. Hierzu wurden die T-Zellen und PMN aus Vollblut gesunder Spender isoliert und eine direkte Co-Kultur beider Zellen in

unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen mit und ohne Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren nor-NOHA oder INCB001158 für 48 h angesetzt. Des Weiteren wurde die PMN-Vorinkubation in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen mit und ohne Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren nor-NOHA oder INCB001158 in Versuchsmedium angesetzt und 72 h inkubiert. Anschließend folgte die 48 h Kultivierung der T-Zellen in diesen PMN-ÜS. Der ROS Nachweis in den T-Zellen erfolgte mittels *ROS Detection Assay Kit* von BioVision. Die Gating Strategie der gefärbten T-Zellen ist im Anhang, Abbildung A2 am Beispiel der ungefärbten Referenzprobe skizziert. Es werden nur viable T-Zellen, die ROS-positiv sind, betrachtet. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der ROS Produktion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS gezeigt. Hierbei wurden in Abbildung 29A die ROS Produktion in Form von Histogrammen der viablen T-Zellen und in Abbildung 29B die Zusammenstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aller Versuchsbedingungen incl. der technischen Assay-Kontrollen (letzte 3 Säulen) dargestellt.

Mit zunehmender PMN-Anzahl während der PMN-ÜS Herstellung konnte in allen nachfolgenden Aktivierungsbedingungen mit den T-Zellen eine Zunahme der ROS-Produktion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS beobachtet werden, was in Abbildung 29A als Rechtsverschiebung der Histogramme zu sehen ist. Betrachtet man die ROS-Produktion von T-Zellen in den Kontrollbedingungen ohne PMN-ÜS, so fällt auf, dass die MFI in der Bedingung mit nor-NOHA deutlich niedriger ist ( $25,5 \pm 7,7$ ) als in konventionell aktivierten T-Zellen ohne diesen Arginase-Inhibitor ( $54,0 \pm 17,7$ ). Dieser Trend konnte auch in den Bedingungen mit PMN-ÜS beobachtet werden: so betragen die MFI-Werte der ROS-Produktion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS mit einem 1:1 PMN:T-Zellverhältnis  $44,3 \pm 10,8$  bzw.  $44,0 \pm 2,7$  bei Zugabe des INCB001158 Inhibitors und stiegen kontinuierlich auf  $87,0 \pm 20,9$  (PMN-ÜS 20:1) bzw.  $133,3 \pm 42,7$  (PMN-ÜS 20:1 + INCB001158) an. In T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS mit nor-NOHA jedoch konnten deutlich niedrigere Werte für die MFI der ROS-Produktion beobachtet werden. Hier lag der MFI zunächst bei  $23,6 \pm 5,9$  in der Bedingung mit einem 1:1 PMN:T-Zellverhältnis und stieg in der Bedingung mit einem 20:1 PMN:T Verhältnis etwa auf das Doppelte an ( $43,3 \pm 26,7$ ), was ungefähr der ROS-Produktion der konventionell aktivierten T-Zellen in RPMI Versuchsmedium ohne Inhibitor entsprach.

## ROS Produktion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS



**Abbildung 29: Erhöhte ROS-Produktion in T-Zellen durch PMN-ÜS.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die ROS-Produktion in T-Zellen wurde mittels ROS Detection Assay Kit von BioVision durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dargestellt sind in (A) die Fluoreszenz-Histogramme eines repräsentativen Experiments und in (B) die mittlere Fluoreszenzintensität der erhaltenen Werte aller Experimente (n = 3). Rot gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit INCB001158. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*) p < 0,001).

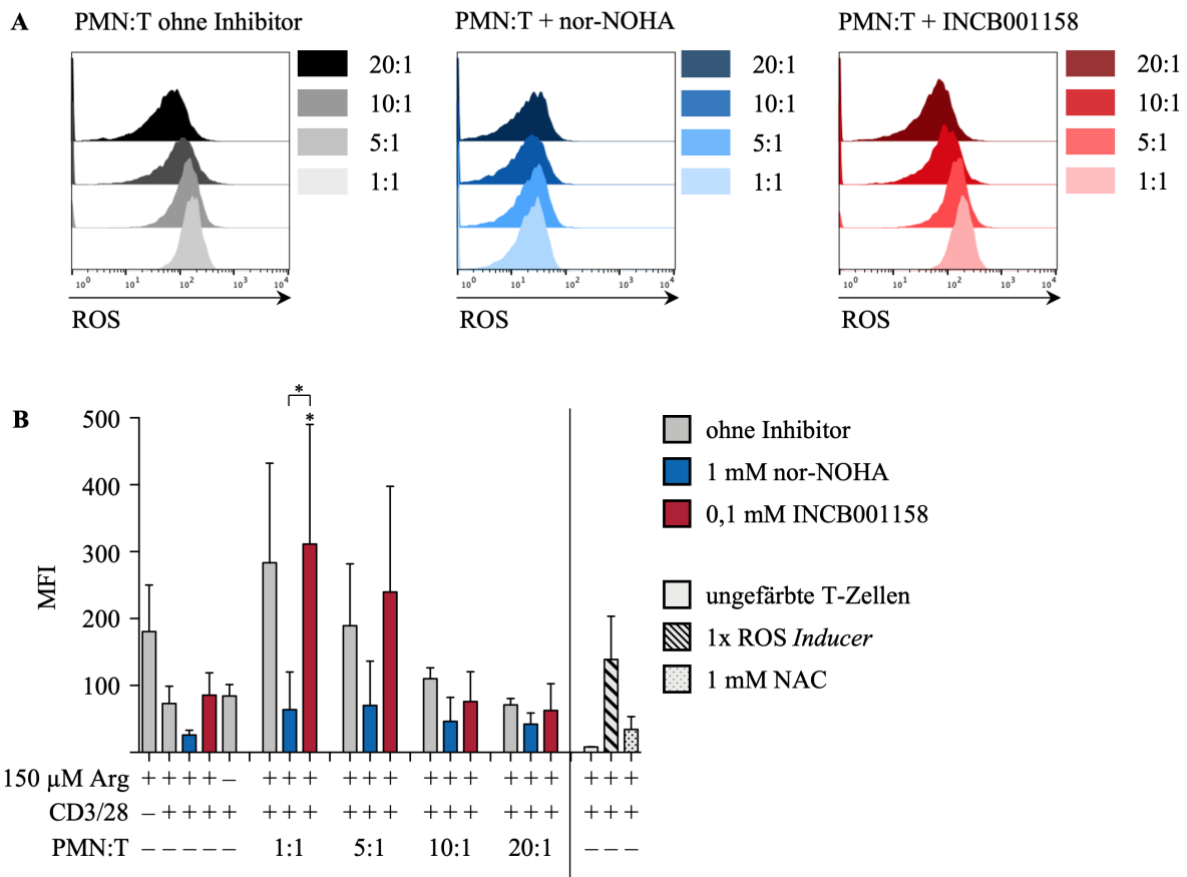
In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der ROS Produktion in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN dargestellt. Abbildung 30A zeigt die ROS Produktion in Form von Histogrammen der viablen T-Zellen aus einem repräsentativen Experiment und Abbildung 30B die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aller Daten incl. der technischen Assay-Kontrollen (letzte 3 Säulen). Die ROS-Produktion in T-Zellen der ersten 5 Kontrollbedingungen entsprechend in etwa der ROS-Produktion aus Abbildung 29. Anders als bei der Aktivierung der T-Zellen in PMN-ÜS (Abbildung 29) zuvor, nimmt die ROS-Produktion in T-Zellen jedoch mit zunehmender PMN-Anzahl ab. Die MFI der ROS-Werte in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur in einem Verhältnis von 1:1 betragen  $283,7 \pm 148,7$  und nahmen mit steigender PMN-Anzahl von



189,3 ± 92,4 bei einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 über 110,1 ± 16,4 bei einem 10:1 Verhältnis bis zu 70,9 ± 9,6 bei einem 20:1 Verhältnis ab. Die Zugabe des INCB001158 Inhibitors führte in den T-Zellen zu ähnlich hohen MFIs der ROS-Werte. Dabei erreichte die MFI der ROS-Werte in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN in einem Verhältnis von 1:1 und mit Zugabe des INCB001158 mit einem Wert von 311,3 ± 178,7 das Maximum, was mehr als das 3,5-fache der ROS-Produktion in konventionell aktivierten T-Zellen mit INCB001158 (85,57 ± 33,54) darstellt. Auch hier erfolgte eine Abnahme der MFI der ROS-Produktion in T-Zellen mit zunehmender PMN-Anzahl (5:1 + INCB001158: 239,7 ± 157,9; 10:1 + INCB001158: 76,2 ± 44,4; 20:1 + INCB001158: 62,5 ± 41,2). Die MFI der ROS-Werte in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN + nor-NOHA wiesen hingegen durchgehend niedrige Werte auf, die vergleichbar mit den MFI der konventionell aktivierten T-Zellen (73,1 ± 25,9) waren. So wurden z.B. in der 1:1 Co-Kultur mit nor-NOHA MFI Werte von 63,8 ± 56,3 gemessen und diese nahmen bei höheren PMN:T Verhältnissen nur geringfügig ab (z.B. 42,5 ± 16,6 in 20:1 + N).

Die ROS-Produktion in hyperaktivierten T-Zellen ist erhöht, wobei dies nur auf die T-Zellen zutrifft, die in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 mit dem Arginase 1 Inhibitor INCB001158 inkubiert wurden (vgl. Abbildung 29). Anders als bei der Proliferation, konnte in diesem Fall keine argininabhängige Induktion der ROS-Produktion beobachtet werden, da auch in T-Zellen nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 ohne Inhibitoren eine erhöhte ROS-Produktion beobachtet werden konnte. Bei einer Co-Kultur von T-Zellen in PMN-ÜS konnte ein Anstieg der ROS-Produktion in T-Zellen korrelierend mit zunehmender PMN-Anzahl beobachtet werden, während bei Aktivierung der T-Zellen in PMN-ÜS ein genau gegenteiliger Effekt feststellbar war. Beiden Kultivierungsarten war jedoch die dauerhaft niedrige ROS-Produktion in T-Zellen mit nor-NOHA versetzten Bedingungen gemein.

## ROS Produktion in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN



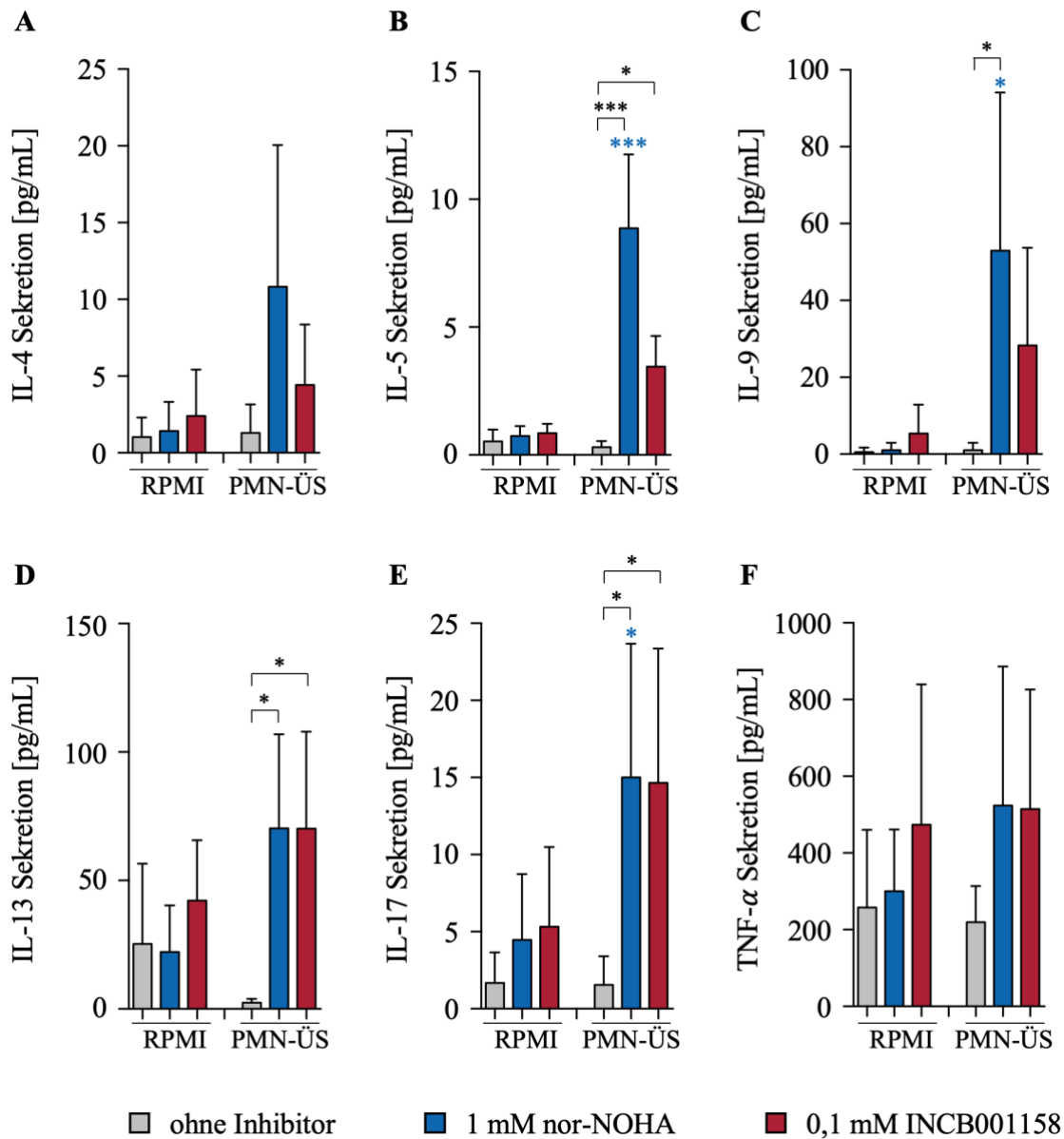
**Abbildung 30: Die ROS-Produktion in T-Zellen nimmt im Kontext einer Co-Kultur mit PMN mit steigender Anzahl an PMN ab.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. Die T-Zellen wurden in einer Co-Kultur mit PMN in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen mit und ohne 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 für 48 h mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die ROS-Produktion in T-Zellen wurde mittels *ROS Detection Assay Kit* von BioVision durchgeführt und im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die (A) Histogramme und (B) die mittleren Fluoreszenzintensitäten (+/- SD; n = 3). Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Signifikanzen auf die ROS-Produktion in T-Zellen in RPMI Versuchsmedium ohne Arginase-Inhibitor. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (\* p < 0,05).

### 4.5.4 Untersuchung des Zytokinprofils hyperaktivierter T-Zellen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Zytokinsekretion hyperaktivierter T-Zellen untersucht. Hierzu wurden die T-Zellen und PMN aus Vollblut gesunder Spender isoliert. Die 72 h Vorinkubation der PMN wurde in einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 mit und ohne der Zugabe von nor-NOHA oder INCB001158 im Versuchsmedium angesetzt und anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS kultiviert. Für die Untersuchung der Zytokine wurden zellfreie Kulturüberstände nach erfolgter 48 h T-Zellstimulation gesammelt und mittels *Human Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets* von BD Bioscience gemessen. Dieser Teil des Versuches wurde in Kooperation mit der Hautklinik und Poliklinik der

Universitätsmedizin Mainz unter Aufsicht von PD Dr. Matthias Bros durchgeführt. Die Ergebnisse der untersuchten Zytokinsekretionen wurden in Abbildung 31 zusammengefasst.

### Zytokinprofil hyperaktivierter T-Zellen



**Abbildung 31: Hyperaktivierte T-Zellen weisen eine verstärkte Sekretion von IL-5, IL-9 und IL-17 auf.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im 10:1 PMN:T-Zellverhältnis im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Aus dem Überstand nach 48 h T-Zellinkubation wurde zellfreier Kulturüberstand geerntet und die Zytokinquantifizierung mittels Human CBA Flex Sets von BD Bioscience nach Herstellerangaben durchgeführt (n = 4). Blau gekennzeichnete Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung aktivierter T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Vergleicht man die Sekretion der Zytokine aus hyperaktivierten T-Zellen mit der Sekretion der konventionell aktivierten T-Zellen, konnte für die Zytokine IL-5, IL-9 und IL-17 eine signifikant erhöhte Sekretion beobachtet werden. So war die IL-5 Sekretion in T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS mit nor-NOHA mit  $8,87 \pm 2,89$  pg/mL knapp 12× so hoch wie in konventionell aktivierten T-Zellen mit nor-NOHA ( $0,75 \pm 0,39$  pg/mL). Zudem konnte eine leichte Reduktion der IL-5 Sekretion in nicht-aktivierten T-Zellen beobachtet werden ( $0,31 \pm 0,24$  pg/mL). Hyperaktivierte T-Zellen zeigten auch eine signifikant erhöhte IL-9 Sekretion ( $52,94 \pm 41,91$  pg/mL) verglichen zu den konventionell aktivierten T-Zellen in Versuchsmedium mit nor-NOHA mit einer IL-9 Sekretion von  $0,97 \pm 1,93$  pg/mL. Hier konnte hingegen keine weitere Reduktion der IL-9 Sekretion in nicht-aktivierten T-Zellen in PMN-ÜS beobachtet werden ( $0,96 \pm 1,92$  pg/mL). Weiterhin war die Sekretion von IL-17 mit  $15,02 \pm 8,67$  pg/mL in hyperaktivierten T-Zellen signifikant höher als in konventionell aktivierten T-Zellen mit zusätzlichem nor-NOHA ( $4,47 \pm 4,27$  pg/mL). Auch hier kam es zu keiner Reduktion der IL-17 Sekretion in nicht-aktivierten T-Zellen ( $1,56 \pm 1,84$  pg/mL) im Vergleich zu T-Zellen nach 48 h Kultur in Vollmedium ( $1,68 \pm 1,97$  pg/mL).

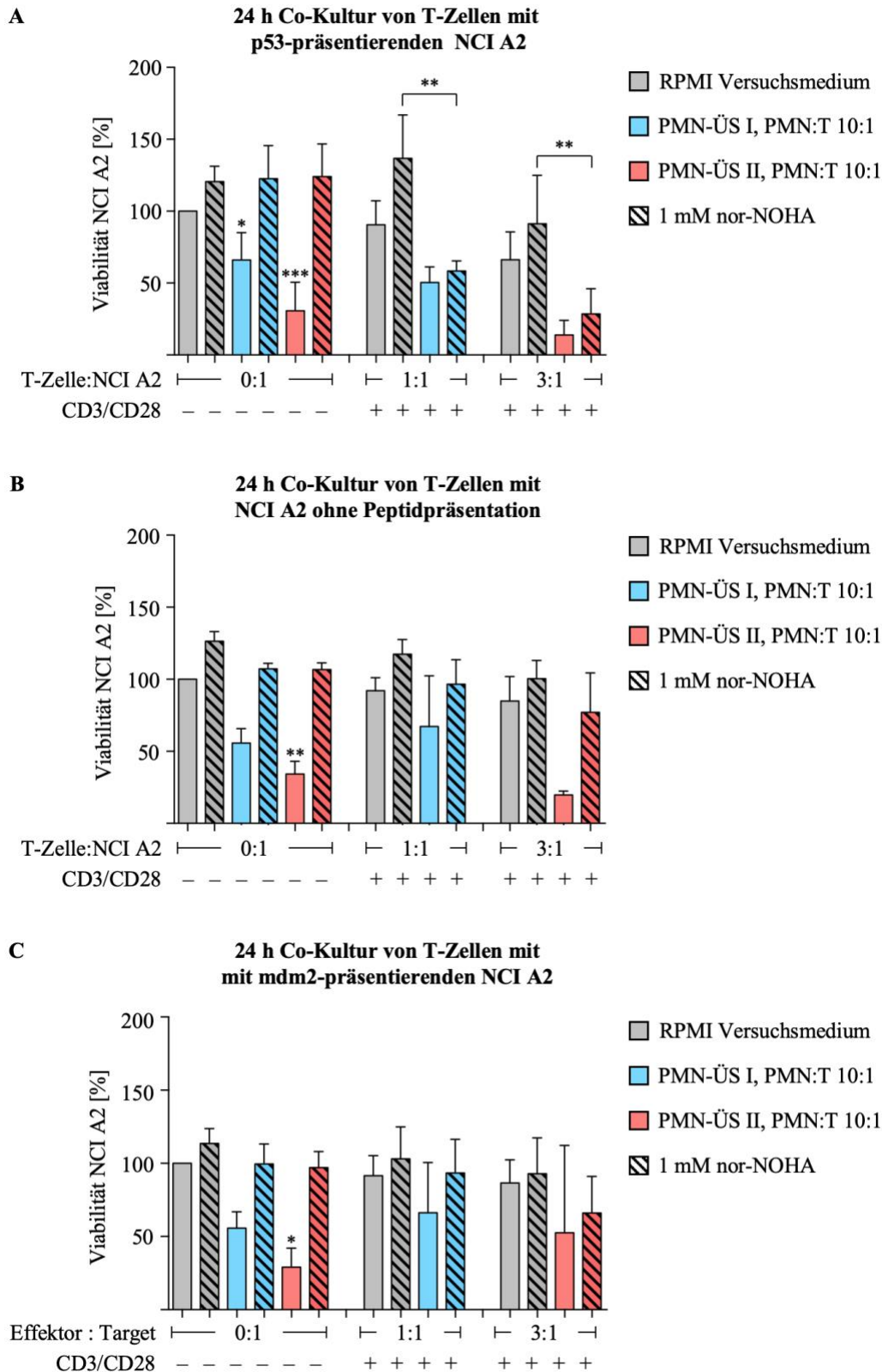
Auch wenn für die Zytokine IL-4 und IL-13 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sekretion hyperaktivierter T-Zellen und konventionell aktivierter T-Zellen beobachtet werden konnte, war dennoch eine deutliche Tendenz sichtbar: die IL-4 Sekretion hyperaktivierter T-Zellen war mit  $10,82 \pm 9,24$  pg/mL fast 7× höher als in konventionell aktivierten T-Zellen ohne Inhibitor ( $1,42 \pm 1,90$  pg/mL,  $p = 0,057$ ). Dies konnte auch für die IL-13 Sekretion beobachtet werden, jedoch war diese in den hyperaktivierten T-Zellen ( $70,32 \pm 36,68$  pg/mL) nur doppelt so hoch wie in den konventionell aktivierten T-Zellen ( $22,18 \pm 18,11$  pg/mL). Zudem konnte hier eine deutliche Reduktion der IL-13 Sekretion in nicht-aktivierten T-Zellen in PMN-ÜS beobachtet werden ( $2,50 \pm 1,39$  pg/mL). Für die Sekretion von TNF- $\alpha$  konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bedingungen festgestellt werden.

#### 4.5.5 Untersuchung der Zytotoxizität der hyperaktivierten T-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass hyperaktivierte T-Zellen nicht nur eine höhere Proliferation aufweisen, sondern auch metabolisch aktiver sind und eine höhere Zytokinsekretion aufweisen. Im Folgenden wurde die zytotoxische Wirkung von hyperaktivierten T-Zellen untersucht. Dazu wurden die T-Zellen mit einem p53(264-272)-spezifischen T-Zellrezeptor transduziert. Die NCI A2 Zelllinien wurden von C. Müller (III.

Med. Klinik, AG Theobald) transduziert und exprimieren das Enzym Luciferase, sowie ein rekombinantes HLA.A2-p53(264-272) bzw. HLA.A2-mdm2(81-88) Fusionsprotein (siehe 2.1.1 Zelllinien). Nach der 48 h Inkubation der p53 TCR-transduzierten T-Zellen in PMN-ÜS ± nor-NOHA oder Versuchsmedium ± nor-NOHA wurde der Zytotoxizitäts-Assay nach 3.4.5 Luciferase-Assay angesetzt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche T-Zellen:NCI A2-Verhältnisse angesetzt, woraus sich 2 verschiedene PMN-ÜS ergaben, da diese an die Anzahl der T-Zellen angepasst wurden. So wurde für das T-Zellen:NCI A2-Verhältnis von 1:1 der PMN-ÜS I (in Abbildung 32 als hellblau dargestellte Säulen) und für das T-Zellen:NCI A2-Verhältnis von 3:1 der PMN-ÜS II (in Abbildung 32 als orange dargestellte Säulen) angesetzt. Hierbei wurde beim Ansetzen der PMN-ÜS I und II ein PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 gewählt.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse des Luciferase-Assays dargestellt. Die Viabilität der NCI A2 Zellen wurde auf die Kontrollbedingung, bestehend aus NCI A2 in RPMI Versuchsmedium ohne Zugabe von Inhibitoren oder T-Zellen, genormt (erster grauer Balken). Abbildung 32A zeigt die Ergebnisse der 24 h Co-Kultur von T-Zellen mit NCI A2 Zellen, die das p53 Peptid präsentieren. Die Viabilität der NCI A2 Zellen in den beiden PMN-ÜS ohne Zugabe von nor-NOHA nimmt bereits ohne T-Zellen signifikant ab: nach 24 h Kultur der NCI A2 Zellen in PMN-ÜS I konnte eine Viabilität von  $66,0 \pm 18,9$  % ermittelt werden, die durch eine 24 h Kultur in PMN-ÜS II auf  $30,7 \pm 19,7$  % reduziert wurde. Durch die Zugabe des Arginase 1 Inhibitors nor-NOHA konnte dieser Verlust der Viabilität verhindert werden. In einer 24 h 1:1 Co-Kultur von konventionell aktivierten T-Zellen und NCI A2 Zellen war die Viabilität der NCI A2 Zellen mit  $90,6 \pm 16,6$  % sehr gut erhalten. Die 1:1 Co-Kultur mit hyperaktivierten T-Zellen zeigte hier jedoch eine starke Reduktion der Viabilität ( $50,4 \pm 10,7$  %). Betrachtete man die 1:1 Co-Kultur der nicht-aktivierten T-Zellen mit den NCI A2 Zellen, war auch eine klare Abnahme der NCI A2 Viabilität zu beobachten. Da dies jedoch bereits in den Kontrollbedingungen ohne T-Zellen zu beobachten war, konnte hier nicht eindeutig differenziert werden, ob die zytotoxische Wirkung durch den Argininmangel im PMN-ÜS I oder durch die T-Zellen hervorgerufen wurde.



**Abbildung 32: Hyperaktivierte T-Zellen zeigen eine verstärkte antigenspezifische Zytotoxizität.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. T-Zellen wurden retroviral mit einem HLA-A2-abhängigen p53(264-272)-spezifischen T-Zellrezeptor transduziert und wöchentlich durch Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads expandiert. PMN wurden im 10:1 PMN:T-Zellverhältnis im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Für den Luciferase-Assay wurden T-Zellen mit NCI A2 Zellen in verschiedenen

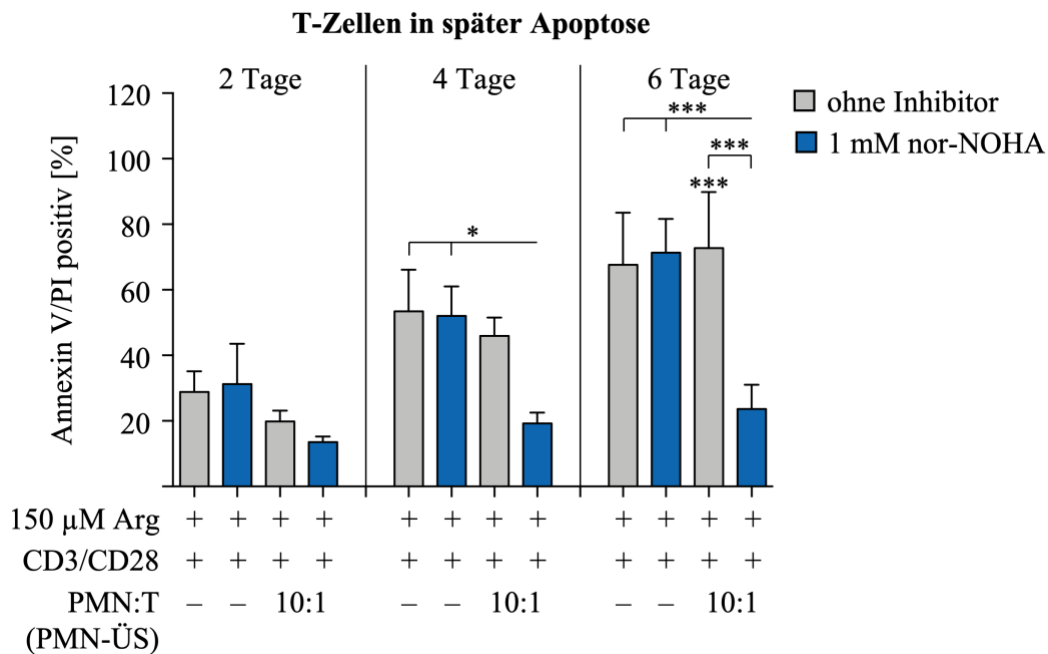
Bedingungen co-kultiviert, die Luciferase exprimieren und (A) p53(264-272) Peptid, (B) kein Peptid oder (C) mdm2(81-88) Peptid präsentieren. Nach 24 h Co-Kultur wurde die Luciferase-basierte Fluoreszenzintensität mittels Platerereader ermittelt. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Signifikanzen auf die Viabilität der NCI A2 Zellen in RPMI Versuchsmedium ohne Zusätze (n = 3). Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* und *Tukey's post hoc test* (\*\*\* p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05).

Nach einer 24 h Co-Kultur von T-Zellen und NCI A2 Zellen in einem Verhältnis von 3:1 wurden sehr ähnliche Beobachtungen gemacht, die jedoch durch die erhöhte Anzahl an T-Zellen noch deutlicher ausfielen. Werden hyperaktivierte T-Zellen mit NCI A2 Zellen in einem 3:1-Verhältnis kultiviert, wurde die Viabilität der NCI A2 Zellen auf  $13,9 \pm 10,0$  % reduziert. Dieser Wirkung konnte mit konventionell aktivierten T-Zellen nicht in diesem Maße erreicht werden: hier betrug die Viabilität der NCI A2 Zellen noch  $66,1 \pm 19,3$  %. In Abbildung 32B wird die 24 h Co-Kultur von T-Zellen mit NCI A2 Zellen, die kein Peptid präsentieren, und in Abbildung 32C die 24 h Co-Kultur von T-Zellen mit mdm2-präsentierenden NCI A2 Zellen gezeigt. In beiden Fällen konnte eine unspezifische Reduktion der NCI A2 Viabilität nach 24 h Kultur in PMN-ÜS I und II beobachtet werden, die mit der Zugabe von nor-NOHA verhindert werden konnte. Anders als in Abbildung 32A konnte hier jedoch keine Reduktion der NCI A2 Viabilität nach 24 h Co-Kultur mit T-Zellen beobachtet werden: so betrug die Viabilität in NCI A2 ohne Peptidpräsentation nach 24 h Co-Kultur mit T-Zellen in PMN-ÜS + N in beiden Verhältnissen über 75 % (E:T 1:1  $96,7 \pm 16,9$  %; E:T 3:1  $77,1 \pm 27,3$  %). Zusätzlich wurde eine 24 h Co-Kultur von T-Zellen mit NCI A2, die ein für den TCR der T-Zellen unspezifisches Peptid präsentieren (mdm2), durchgeführt, die in Abbildung 32C gezeigt ist. Wie bereits in den Abbildungen 32A und 32B sieht man auch in Abbildung 32C eine unspezifische Reduktion der NCI A2 Viabilität nach 24 h Kultur in den PMN-ÜS I ( $55,6 \pm 11,0$  %) und II ( $29,1 \pm 12,9$  %), die mit nor-NOHA-Zugabe nicht zu beobachten war. Nach 24 h Co-Kultur von mdm2-präsentierenden NCI A2 mit T-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 konnte keine Reduktion der NCI A2 Viabilität festgestellt werden ( $93,4 \pm 23,0$  %). Auch das Erhöhen der Zahl der T-Effektorzellen zu einem 3:1 Verhältnis führte zu keiner signifikanten Reduktion der NCI A2 Viabilität ( $66,1 \pm 25,0$  %).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass hyperaktivierte T-Zellen gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen eine peptid-antigenspezifische verbesserte Zytotoxizität aufwiesen.

#### 4.5.6 Untersuchung der Viabilität hyperaktivierter T-Zellen

Die Fragestellung, ob hyperaktivierte T-Zellen nicht nur verstärkt proliferieren, sondern auch länger viabel sind, ist Gegenstand der nächsten Untersuchung. Hierzu wurden PMN und T-Zellen aus Vollblut gesunder Spender isoliert und die PMN im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 mit und ohne Zugabe von nor-NOHA vorinkubiert. Die T-Zellen wurden in diesen PMN-ÜS für 2, 4 und 6 Tage kultiviert und die Anzahl spät-apoptotischer Zellen mittels Annexin V und Propidiumiodid-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurden in Abbildung 33 die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.



**Abbildung 33: Hyperaktivierte T-Zellen weisen ein verbesserte Viabilität auf.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 2 d, 4 d und 6 d in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die Viabilität der T-Zellen wurde mittels Annexin V und PI Färbung und anschließender Durchflusszytometrie ermittelt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way* ANOVA und *Tukey's post hoc test* (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Bereits nach 2 Tagen deutet sich eine bessere Viabilität der T-Zellen in PMN-ÜS + nor-NOHA (späte Apoptose:  $13,5 \pm 1,7$  %) im Vergleich zu den konventionell aktivierten T-Zellen in Versuchsmedium + nor-NOHA (späte Apoptose:  $31,2 \pm 12,3$  %) an. Dieser Unterschied wurde nach 4 Tagen erstmalig signifikant: hier lag der Anteil spät-apoptotischer T-Zellen in PMN-ÜS + nor-NOHA mit nur  $19,2 \pm 3,3$  % weiterhin deutlich unter den Kontrollbedingungen + nor-NOHA. In T-Zellen, die 4 Tage im Versuchsmedium  $\pm$  nor-NOHA kultiviert wurden,

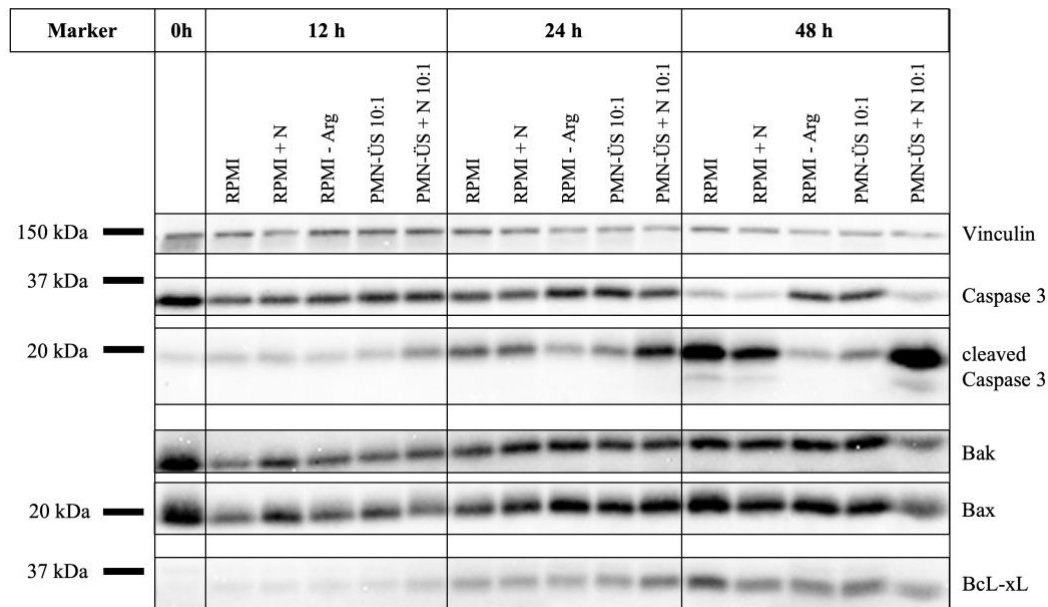


verdoppelte sich dagegen der Anteil spät-apoptotischer Zellen (ohne nor-NOHA:  $53,4 \pm 12,8$ , mit nor-NOHA:  $52,0 \pm 9,0$  %). Dieser Wert war vergleichbar mit dem Anteil spät-apoptotischer Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS ohne Inhibitor ( $45,9 \pm 5,6$ ). Dieser Trend konnte auch nach 6 Tagen beobachtet werden: während die T-Zellen, die in PMN-ÜS + nor-NOHA weiterhin einen geringen Anteil spät-apoptotischer Zellen beinhalten ( $23,6 \pm 7,3$  %), zeigte sich in den übrigen Bedingungen mit etwa 70 % ein hoher Anteil spät-apoptotischer T-Zellen.

Hyperaktivierte T-Zellen weisen im Vergleich zu konventionell aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen ein verbessertes Überleben auf. Dies soll im Folgenden hinsichtlich der zugrundeliegenden apoptotischen Mechanismen auf Proteinebene eruiert werden. In einem Western Blot wurde die Spaltung der pro-apoptotischen Caspase 3 (aktive Form: *cleaved* Caspase 3), sowie die Expression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL untersucht. Es sollte so ein erster Hinweis auf mögliche Faktoren der Apoptoseinhibition bzw. -induktion in hyperaktivierten T-Zellen erhalten werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich um einen Pilotversuch handelt, die Ergebnisse noch nicht reproduziert wurden, und daher in Folgearbeiten weiter analysiert werden sollten.

Die T-Zellen wurden nach 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1  $\pm$  nor-NOHA geerntet und Lysate nach 3.4.6 Herstellung der T-Zelllysate generiert. Anschließend wurde, wie zuvor beschrieben, eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 34 zusammengefasst.

Für die Expression von Caspase 3 in T-Zellen nach 12 h und 24 h Inkubation in PMN-ÜS oder RPMI konnten keine großen Unterschiede dargestellt werden. Erst nach 48 h wurde eine schwächere Caspase 3 Bande in den T-Zellen aus den RPMI, RPMI + N und PMN-ÜS + N 10:1 Bedingungen beobachtet werden, während die Expression in den übrigen Bedingungen unverändert war. Bei der Expression bzw. Aktivierung von *cleaved* Caspase 3 konnten antiparallele Expressionsmuster beobachtet werden: nach 12 h war die *cleaved* Caspase 3 Expression in allen T-Zellen ähnlich gering. Nach 24 h nahm die Expression von *cleaved* Caspase 3 in T-Zellen aus der PMN-ÜS Bedingung mit nor-NOHA zu und stieg nach 48 h weiterhin an. Auch die Expression in T-Zellen nach 48 h Kultur in Versuchsmedium mit und ohne nor-NOHA Zugabe stieg an, wohingegen die *cleaved* Caspase 3 Expression in T-Zellen nach 48 h in argininfreiem Medium oder PMN-ÜS ohne nor-NOHA gering war.



**Abbildung 34: Verstärkte Expression der *cleaved* Caspase 3 in hyperaktivierten T-Zellen, jedoch keine erhöhte Expression pro- oder anti-apoptotischer Proteine.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut eines gesunden Spenders isoliert. PMN wurden im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 im Versuchsmedium mit und ohne 1 mM nor-NOHA für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen für 12 h, 24 h und 48 h in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28-markierten Dynabeads stimuliert. Die aus den T-Zellen isolierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot detektiert (n = 1). Western Blot Analyse mit monoklonalem AK gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3, Bak, Bax, Bcl-xL und Vinculin (als Ladekontrolle).

Des Weiteren konnte nach 12 h eine erhöhte Expression von Bak und Bax in T-Zellen, die in Versuchsmedium mit nor-NOHA inkubiert waren, beobachtet werden. Die Bak und Bax Expression in den hyperaktivierten T-Zellen hatte nach 24 h einen Höchstwert erreicht und nahm dann wieder ab, wohingegen die Expression dieser Proteine in T-Zellen aus allen anderen Bedingungen mit der Zeit steigt.

Als letztes Protein wurde Bcl-xL untersucht. Hier konnten nach 12 h Inkubation der T-Zellen in allen Bedingungen ähnlich niedrige Bcl-xL Expressionen beobachtet werden. Nach 24 h konnte in den T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA inkubiert wurden, eine doppelt so hohe Bcl-xL Expression verglichen mit allen anderen Bedingungen nachgewiesen werden. Mit Dauer der Inkubationszeit steigt die Bcl-xL Expression in T-Zellen auch aus allen anderen Bedingungen.

Um eine endgültige Aussage über den Einfluss der immunstimulierenden Substanz/en auf die unterschiedlichen intrazellulären Wege der Apoptose treffen zu können, müssen zum einen mehr anti- und pro-apoptotische Proteine untersucht und zum anderen eine repräsentative Anzahl an Versuchen durchgeführt werden.

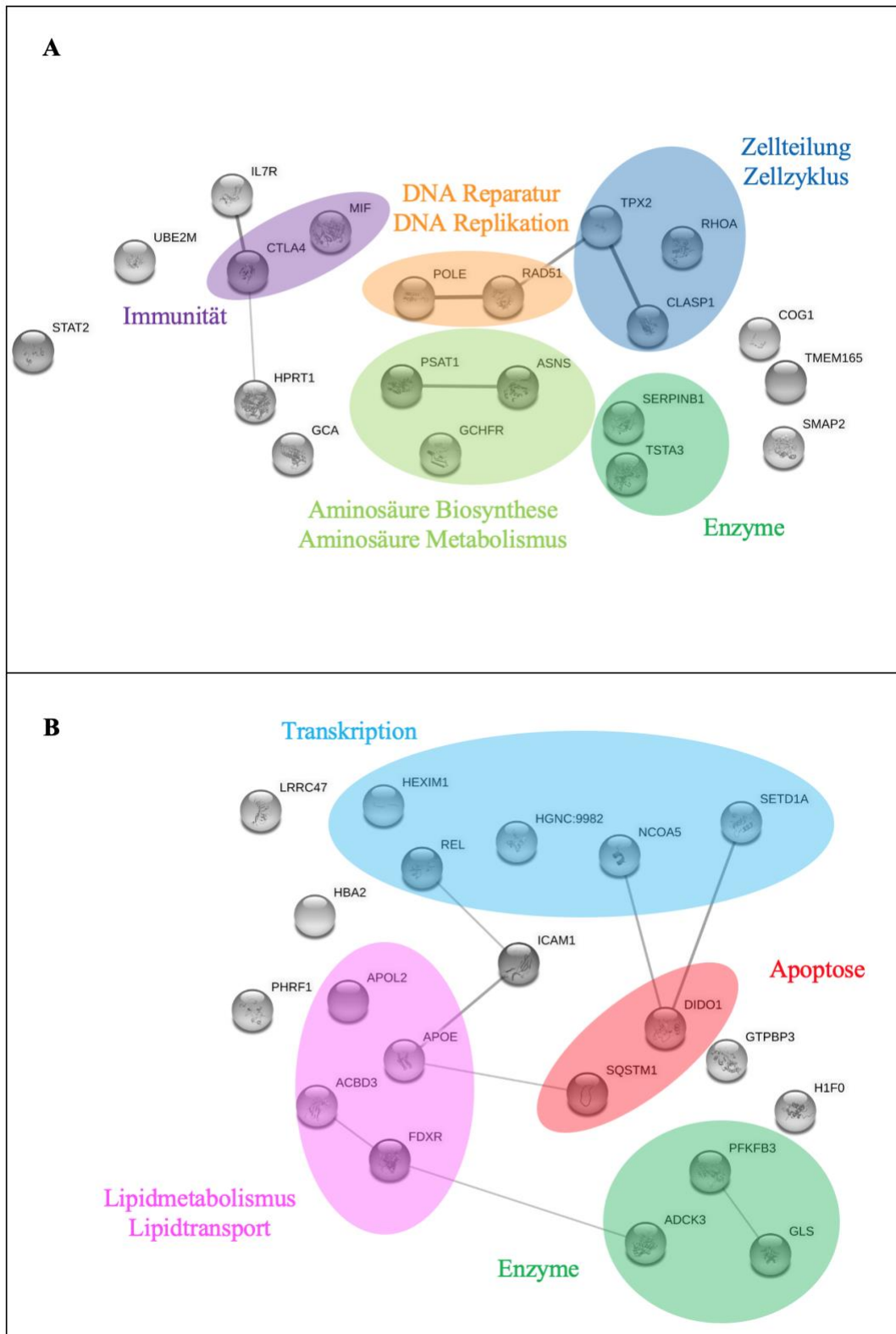
#### 4.5.7 Proteomanalyse hyperaktivierter T-Zellen

Auf der Suche nach weiteren Charakteristika hyperaktivierter T-Zellen wurden Proteomanalysen durchgeführt. Hierzu wurden PMN und T-Zellen aus Vollblut gesunder Spender isoliert und die PMN im PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 mit und ohne Zugabe von nor-NOHA vorinkubiert. Anschließend folgte die 48 h Kultivierung der mit anti-CD3/anti-CD28-aktivierten T-Zellen in diesen PMN-ÜS. Für die Proteomics-Proben wurden die reinen T-Zellpellets bei -20 °C eingefroren.

Die Probenaufbereitung und Massenspektrometrie der Proteomproben erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Tenzer, Leiter der Massenspektrometrie *Core Facility* der Universitätsmedizin Mainz. Die bioinformatische Datenanalyse der Rohdaten wurde von Dr. Ute Distler übernommen, wobei ein Benjamini-Hochberg korrigierter T-Test für die Untersuchung signifikant veränderter Proteinexpression herangezogen wurde ( $p < 0,01$ ;  $\log_2$ -Filter  $> 0,5$ ).

Durch die massenspektrometrische Analyse von konventionell-aktivierten vs. hyperaktivierten T-Zellen wurden insgesamt 4829 Proteine identifiziert, von denen in den hyperaktivierten T-Zellen 1085 hoch- und 600 herunterreguliert waren. Der Fokus der Proteomdaten liegt auf den TOP20 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteinen aus hyperaktivierten T-Zellen im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen.

In Abbildung 35 sind die Netzwerkdiagramme der signifikant veränderten Proteine dargestellt, wobei Abbildung 35A die hochregulierten und 35B die herunterregulierten Proteine zusammenfasst. Die Proteomanalyse ergab, dass hyperaktivierte T-Zellen eine hohe Expression von Proteinen aufweisen, die an Prozessen der Zellteilung/des Zellzyklus, der Biosynthese bzw. Metabolismus von Aminosäuren, sowie der DNA-Replikation und DNA-Reparatur beteiligt sind (Abbildung 35A), während konventionell aktivierte T-Zellen eine signifikant höhere Expression von Proteinen aufweisen, die für die Transkriptionsregulation, den Lipidmetabolismus und-transport, sowie die Apoptose benötigt werden. Die Ergebnisse dieses Netzwerkdiagramms wurden zusätzlich mittels Heatmap Diagramm, mit den TOP50 hoch- bzw. herunterregulierten Proteinen bestätigt und erweitert (Anhang Abbildung A3).



**Abbildung 35: Netzwerk Diagramm der Proteomdaten.** Die Proteomicsanalyse der hyperaktivierten T-Zellen im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen mit den (A) TOP20 hoch-regulierten und (B) TOP20 runter-regulierten Proteinen aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten.

## 5. Diskussion

### 5.1 Starke Stimulation der Proliferation von T-Zellen durch humane neutrophile Granulozyten-Überstände

Die vorliegende Arbeit demonstriert eine neue Form der Immunstimulation: erstmalig konnte eine sehr ausgeprägte T-Zell Hyperaktivierung durch humane neutrophile Granulozyten gezeigt werden, sofern deren Arginase-Aktivität gleichzeitig suffizient gehemmt wird. Diese robuste und reproduzierbare Beobachtung erforderte eine hohe PMN-Dichte und die Inhibition der Arginase 1 (vgl. Abbildung 2). Bei der Wahl der unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnisse wurden Zellzahlen gewählt, die sich auch in Tumorpatienten sowohl im peripheren Blut als auch im Tumorstroma gezeigt hatten [251, 252].

Dass PMN durch die konstitutive Expression bzw. Sekretion von Arginase 1 zur Depletion von extrazellulärem Arginin und in der Folge dann zur Inhibition von T-Zellproliferation führen können, wurde bereits durch Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe vor 15 Jahren erstmalig gezeigt [231]. Dies geschah unter Verwendung von PMN-Sonikaten mit einer Arginaseaktivität von 300 mU/mL. Die T-Zell Inhibition konnte durch Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA während der T-Zell Aktivierung in mit PMN Sonikaten versetztem Zellkulturmedium komplett verhindert werden. Auch in anderen Zellen ist die Arginase 1 als potentiell immunsupprimierender Mechanismus gezeigt worden, vor allem in Tumor-infiltrierenden Zellen, wie beispielsweise die myeloischen Suppressorzellen granulozytären Ursprungs (G-MDSC) [253]. In diesen Suppressorzellen konnte ebenfalls eine Rekonstitution der T-Zellproliferation, nicht jedoch eine darüber hinausgehende Aktivierung, erreicht werden, wobei die Arginase 1 Aktivität nicht direkt inhibiert wurde, sondern indirekt durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT3 erfolgte. Vasquez-Dunddel *et al.* zeigte in diesem Zusammenhang, dass STAT3 die Expression von Arginase 1 in G-MDSCs reguliert [254]. Weiterhin konnte in einem Ovarialkarzinom-Modell gezeigt werden, dass MDSCs durch die Expression von Arginase 1 sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren und dass diese Immunsuppression durch die Zugabe von nor-NOHA verhindert werden konnte [255]. Auch in diesem Beispiel konnte eine Rekonstitution, aber keine Hyperaktivierung der T-Zellen beobachtet werden. Im Ovarialkarzinom (OCa) ist die Arginase 1 Expression jedoch nicht nur auf die durch den Tumor induzierten MDSC beschränkt. So konnte gezeigt werden, dass auch in Ovarialkarzinomzellen Arginase 1 exprimiert wird und nicht nur in der Tumorumgebung angereichert ist, sondern durch extrazelluläre Vesikel (EV) auch peripher verteilt wird [256]. In der Folge wurde in zirkulierenden T-Zellen der OCa-Patientinnen eine herunterregulierte

ζ-Kette des T-Zellrezeptors, sowie eine verschlechterte Proliferationskapazität nachgewiesen, was durch die Verwendung des niedermolekularen Arginaseinhibitors OAT-1746 teilweise aufgehoben werden konnte [256]. In OCa-Patientinnen korrelierte eine hohe Arginaseaktivität im Plasma oder in Aszites mit einer reduzierten CD3ζ-Expression in den T-Zellen und einer schlechteren Prognose mit kürzerem Gesamtüberleben [256, 257]. Eine supprimierte Immunantwort durch die reduzierte CD3ζ-Expression von T-Zellen wurde auch in Patienten mit Kopf-Halstumoren oder Brustkrebs beobachtet und korrelierte ebenfalls mit einer schlechteren Prognose [258, 259]. Darüber hinaus kristallisiert sich das Verhältnis von Neutrophilen zu T-Zellen (engl. *neutrophil-to-T cell-ratio*, NTR) im peripheren Blut zunehmend als prognostischer Faktor heraus. So haben Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom bei erhöhter NTR ein schlechteres Gesamtüberleben mit einer erhöhten Rezidivrate [260]. Auch Brustkrebspatientinnen mit hoher NTR wiesen erhöhte Sterblichkeitsraten auf und hatten oftmals fortgeschrittene Krebsstadien erreicht [261]. Weiterhin waren hohe NTR vor Behandlungsbeginn auch in Darmkrebs- und Glioblastom-Patienten mit einem signifikant verschlechterten Gesamtüberleben assoziiert [262, 263]. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit, nämlich dass PMN in Kombination mit einer Arginase Inhibition zu einer verbesserten T-Zellfunktionalität führen, könnte diesen Patienten mit initial schlechter Prognose möglicherweise die (Ko-)Applikation eines Arginase-Inhibitors einen Vorteil für die Tumorthherapie bieten.

Die Interaktion von T-Zellen und PMN ist nicht nur in Tumorerkrankungen potentiell von Relevanz. So wurde in Patienten, die mit dem humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) infiziert sind und eine antiretrovirale Therapie (ART) erhalten, eine therapiebedingte chronisch erhöhte Immunaktivierung vor allem von T-Zellen beobachtet [264]. Die T-Zellen wiesen eine hohe Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR sowie von CD57 auf und zeigten einen seneszenten Phänotyp. Vermehrte und hyperaktivierte PMN mit kompromittierter Phagozytose tragen zu einem anhaltenden chronisch-entzündlichen Zustand in HIV1 Patienten bei [264]. Ob PMN aus ART-therapierten HIV-1 Patienten T-Zellen hyperaktivieren und deren seneszenten Phänotyp entgegenwirken können, wäre in diesem Zusammenhang eine interessante Fragestellung.

Eine sehr aktuelle Erkrankung, die in einem schweren Verlauf stark aktivierte T-Zellen aufweist, stellt COVID-19 (engl. *corona virus disease 2019*) dar. Diese T-Zellen zeigten erhöhte Perforin- und Granzym B-Expressionen. Die Viruslast des SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) nimmt unabhängig von der Virusmenge nach dem Höchstwert, der nach drei bis fünf Krankheitstagen erreicht ist, wieder ab, wohingegen die Hyperaktivierung der T-Zellen

erhalten bleibt und mit einem schweren Verlauf der Krankheit assoziiert ist [265]. Das Fehlen der Kontraktionsphase der T-Zellen, in der die Anzahl Antigen-aktivierter T-Zellen mittels Apoptose nach erfolgter Eliminierung der Krankheit reduziert wird und die übrigen T-Zellen zu Gedächtniszellen werden, könnte die Ursache für die hohe Aktivität sein [265]. Eine RNA-Analyse auf Einzelzellebene bestätigte die Hyperaktivierung von T-Zellen in Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf. Hierbei konnte eine ausbleibende Differenzierung regulatorischer T-Zellen durch die Unterdrückung der FOXP3 Expression beobachtet werden [266]. Eine weitere interessante Beobachtung konnte bei der Untersuchung der Neutrophilen in COVID-19 Patienten gemacht werden. Hierbei zeigten Patienten mit schwerem Verlauf eine Verdopplung der Anzahl an Neutrophilen im peripheren Blut, verglichen mit Patienten, die einen milden Krankheitsverlauf hatten [265].

Betrachtet man die Daten von Munder *et al.* [231] retrospektiv, ist bereits hier die Tendenz der starken Immunstimulation durch PMN in Anwesenheit eines Arginase 1 Inhibitors ersichtlich. So wurde durch die Zugabe von nor-NOHA zum PMN-Sonikat die Inhibition der T-Zellproliferation nicht nur rekonstituiert, sondern um knapp 50 % erhöht. Des Weiteren konnte in Arginase I defizienten PMN-Sonikaten gezeigt werden, dass die Proliferation unabhängig von der nor-NOHA Zugabe ebenfalls gleichermaßen erhöhte Werte aufwies.

In Abbildung 11 konnten diese Ergebnisse reproduziert werden, wobei die Tendenz des T-Zellstimulierenden Effekts in der PMN-S Bedingung mit 600 mU/mL Arginase-Aktivität + nor-NOHA noch deutlicher war. Erstmals signifikant wurden diese immunstimulierenden Effekte, wenn statt PMN-Sonikaten der vorinkubierte PMN-Überstand für die T-Zellinkubation verwendet wurde. Durch die Inhibition der Arginase 1 mit nor-NOHA oder INCB001158 in diesen PMN-ÜS konnte der immunstimulierende Effekt mit zwei unterschiedlichen Arginase-Inhibitoren gezeigt werden. Diese starke Aktivierung der T-Zellen betrifft sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wobei erstere deutlich stärker aktiviert werden [267]. Weiterhin konnten wir zeigen, dass nur aktivierte T-Zellen durch PMN-ÜS mit nor-NOHA eine starke Induktion ihrer Proliferation erfahren, wohingegen nicht-aktivierte T-Zellen unabhängig von den Bedingungen, in denen sie kultiviert wurden, keine Proliferation aufwiesen. In diesem Zusammenhang spielte die Art der T-Zellaktivierung keine Rolle, da sowohl eine polyklonale Aktivierung der T-Zellen über anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads, als auch eine HLA-Peptid Aktivierung der mit p53-spezifischem T-Zellrezeptor transduzierten T-Zellen zu dieser Proliferationsinduktion führte [267]. Die wohl wichtigste Erkenntnis jedoch war, dass anerge oder seneszente T-Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom bei polyklonaler Aktivierung durch die 48 h Inkubation in PMN-ÜS mit nor-NOHA oder INCB001158 ebenfalls stark

stimuliert werden konnten (vgl. Abbildung 13). Das Problem der generellen T-Zellanergie in Tumorpatienten [239, 268, 269] erschwert den Erfolg einer Immuntherapie, z.B. mit CAR-T-Zellen (engl. *chimeric antigen receptor*) [270], oftmals, so dass wir hoffen, mit unseren Entdeckungen einen möglichen Lösungsansatz für dieses Problem gefunden zu haben. Eine andere Art der Immuntherapie erfolgt mittels Checkpoint-Inhibitoren, wie z.B. anti-PD-1 Antikörper, da tumorinfiltrierende T-Zellen oftmals über immunsupprimierende Oberflächenmoleküle, wie PD-1, Tim-3 oder Lag-3, inhibiert werden. Interessanterweise wurde in der Arbeit von Yang *et al.* eine Tim-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation aus dem Tumormikromilieu (TME) isoliert, die eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien und verstärkte Glykolyse sowie Zytotoxizität im Vergleich zu den Tim-3<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufwies. Diese aktivierten T-Zellen erhöhten ihre anti-tumoralen Eigenschaften nach der Kombinationstherapie mit den anti-Tim-3 + anti-PD-1 + anti-Lag-3 Checkpoint-Inhibitoren [271]. In diesem Zusammenhang wurde die Ursache der Tim-3 und PD-1 Induktion in diesen T-Zellen noch nicht aufgedeckt. Kürzlich konnten wir jedoch zeigen, dass nach 48 h Inkubation von T-Zellen in PMN-ÜS + nor-NOHA eine signifikante Erhöhung der Tim-3 Expression in diesen T-Zellen beobachtet werden konnte [267]. Eine Induktion von Tim-3 durch im TME vorhandene Neutrophile könnte daher auch für die Arbeit von Yang *et al.* eine mögliche Erklärung bieten.

Mittels moderner HTS-Technik (Hochdurchsatz-Screening, engl. *high throughput screening*) lassen sich kleinmolekulare Substanzen (engl. *small molecules*) für die Modulation der T-Zellaktivität finden [272]. Marro *et al.* konnten in diesem Zusammenhang Ingenol-Mebutat (IngMb), ein Proteinkinase C-induzierenden Diterpenester, identifizieren. Mit Hilfe dieses Moleküls konnte die durch PD-1 vermittelte supprimierende Signalkaskade in CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhindert und die Proliferation dieser T-Zellen induziert werden.

Diacylglycerin (DAG) ist eine weitere kleinmolekulare Substanz, die mit der Induktion von Proteinkinase C und einer Verstärkung der TCR-Signalübertragung assoziiert ist. Das Fehlen der Diacylglycerinkinase  $\zeta$  oder  $\alpha$  (DGK $\zeta$ , DGK $\alpha$ ), die beide die Umwandlung von DAG zu Phosphatidsäure katalysieren, führt zu einer Hyperaktivierung von T-Zellen, welche durch eine Verdopplung der T-Zellproliferation charakterisiert waren [273]. Riese *et al.* nutzen diesen Zusammenhang für eine verbesserte Effizienz der CAR-T-Zelltherapie, indem sie diese mit DGK $\zeta$  und/oder DGK $\alpha$  Knockout in einem murinen Modell kombinierten. Derartige CAR-T-Zellen zeigten eine deutlich erhöhte Expression von Zytokinen und eine verstärkte Zytotoxizität [274].



Die klinische Relevanz der neu entdeckten PMN-Immunistimulation wird durch die Tatsache, dass zwar T-Zellen, nicht aber Tumorzellen von dieser Hyperaktivierung betroffen sind, nochmals unterstrichen (vgl. Abbildung 14). Neben der Myelomzelllinie NCI A2, wurde dies zudem auch in den Myelomzelllinien FD50 und U266 bestätigt [267].

Die hier erstmals beschriebene Hyperaktivierung von T-Zellen beruht auf löslichen Faktoren oder Substanzen, die einerseits von vitalen PMN sezerniert werden (5 min PMN-Vorinkubation) und zusätzlich im Kontext von PMN-Zelltod in den Überstand freigegeben werden können (72 h PMN-Vorinkubation) [267].

## 5.2 Vergleich verschiedener T-Zellen und PMN Kulturen in Abhängigkeit der Arginase 1 Inhibition

Bei der Untersuchung der verschiedenen Kultivierungsmöglichkeiten von PMN und T-Zellen war interessant zu beobachten, dass die Hyperaktivierung von T-Zellen in der PMN-ÜS Kultur am stärksten zu vernehmen und in der TransWell-Kultur schwächer ausgeprägt war, wohingegen in einer direkten Co-Kultur von PMN und T-Zellen diese Hyperaktivierung komplett ausblieb. Während der TransWell-Kultur sind viable PMN und T-Zellen in einer indirekten Co-Kultur, d.h. der Zell-Zell-Kontakt ist verhindert, wobei der Austausch von löslichen Mediatoren, Zytokinen, usw. gewährleistet ist. Daher können T-Zellen mit immunstimulierenden Substanzen der PMN interagieren, was zu einer erhöhten T-Zellproliferation in den PMN Bedingungen ohne Inhibitor führt, wobei eine Arginase 1 vermittelte Inhibition der T-Zellproliferation vermutlich wegen noch ausreichender Argininkonzentrationen (150  $\mu\text{M}$  beim Start der Transwell-Kulturen) nicht beobachtet werden konnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste in den Überständen nach 48 h TransWell-Kultur eine Konzentrationsbestimmung des Arginins erfolgen. Eine weitere überraschende Beobachtung war der inhibierende Effekt von nor-NOHA auf die T-Zellproliferation während der TransWell-Kultur und der Co-Kultur. Mögliche Erklärungen hierfür wurden noch nicht bewiesen, jedoch steht die Frage offen, ob in T-Zellen nach Aufnahme des Argininanalogons nor-NOHA über Aminosäuretransporter dieses für die Proteinbiosynthese verwendet werden und zu fehlgefalteten Proteinen führen könnte oder ob nor-NOHA mitochondriale Arginase 2 in T-Zellen inhibieren könnte. Die Affinität von nor-NOHA für Arginase 2 ist 10-mal höher als für Arginase 1 ( $K_i$  für Arginase 2: 51 nM;  $K_i$  für Arginase 1: 500 nM) [275], so dass eine Inhibition der Arginase 2 denkbar wäre. Geiger *et al.*, zeigten in diesem Zusammenhang einen erhöhten Argininverbrauch in aktivierten T-Zellen und folgerten daraus eine regulatorische Funktion von Arginin auf metabolische Prozesse in aktivierten T-Zellen [276]. Der erhöhte Argininverbrauch konnte auf die Hydrolyse durch Arginase 2 zurückgeführt werden, da durch die Zugabe von nor-NOHA eine Reduktion der Metabolite von Arginin beobachtet werden konnte [276]. Ein weiterer kritischer Punkt des in der vorliegenden Arbeit beobachteten nor-NOHA Effektes ist die verwendete nor-NOHA Konzentration von 1 mM. Mit Hilfe von Titrationsversuchen wurden PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 und der Zugabe von unterschiedlichen nor-NOHA Konzentrationen generiert und anschließend die T-Zellen nach Protokoll in diesen Überständen inkubiert. Dabei konnte lediglich in der Bedingung mit 1 mM nor-NOHA eine Hyperaktivierung der T-Zellen beobachtet werden, wohingegen mit einer nor-NOHA Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  nicht einmal eine volle

Rekonstitution der ursprünglichen T-Zellproliferation erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auch in anderen Arbeitsgruppen wurde nor-NOHA in 1 mM Konzentration verwendet [255]. Hierbei wurden die aus dem Ovarialkarzinom isolierten Arginase 1 exprimierenden myeloischen Zellen für 1 h bei 37 °C mit 1 mM nor-NOHA inkubiert. Die Co-Kultur mit CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte jedoch in Abwesenheit von nor-NOHA, so dass diese T-Zellen keinen direkten Kontakt zum Arginase 1 Inhibitor hatten. Geiger *et al.* inkubierten T-Zellen in Medium mit einer nor-NOHA Konzentration von 500 µM für 4 Tage und konnten hierbei keine negativen Effekte auf die T-Zellen beobachten [276]. Deutlich niedrigere nor-NOHA Konzentrationen wurden durch Rodriguez *et al.* verwendet: hier wurde die Proliferation der T-Zellen nach 96 h Co-Kultur mit peritonealen Makrophagen und der Zugabe von 50 µM nor-NOHA bestimmt, wobei keine toxischen nor-NOHA Effekte zu verzeichnen waren [217]. Aufgrund der Titrationsversuche konnte in der vorliegenden Arbeit keine niedrigere nor-NOHA Konzentration verwendet werden. Da die inhibierenden Effekte von nor-NOHA nach 3-tägiger Pre-Inkubation in RPMI Medium jedoch nicht beobachtet wurde, sondern nur bei der direkten Verwendung von nor-NOHA im Medium auftrat, kann durch diesen Pre-Inkubationsschritt gewährleistet werden, dass nor-NOHA keine negativen Effekte auf die T-Zellen ausübt und dennoch die Arginase 1 der Neutrophilen suffizient inhibiert. Neben der Inhibition von Arginase 1 wurde bereits berichtet, dass nor-NOHA in K562-Zellen unter hypoxischen Bedingungen Apoptose induzieren kann [277].

In einer direkten Co-Kultur von PMN mit T-Zellen konnte bisher nur eine Inhibition der T-Zellproliferation beobachtet werden, die unabhängig von PMN Arginase 1 ist. Neben der Expression von Arginase 1 weisen PMN weitere mögliche inhibitorische Mechanismen auf. So kann die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer eingeschränkten T-Zellfunktion führen, indem Komponenten des TCRs durch erhöhten oxidativen Stress gehemmt werden [278]. Cemerski *et al.* generierten diese oxidative Umgebung in einer 1:1 Co-Kultur von T-Zellen und mit fMLP aktivierten PMN, wobei die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstandenen Beeinträchtigungen der T-Zellfunktion mit NAC oder Katalase verhindert werden konnten [278]. Weiterhin kann die Reaktion des Superoxidradikals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mit Stickstoffmonoxid (NO) zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) führen, einem sehr starken und reaktiven Oxidationsmittel. Peroxynitrit ist unter anderem durch die Nitrierung von Tyrosinresten wichtiger Signalproteine in der Lage Apoptose in T-Zellen zu induzieren. Hierbei wurde als Ursache die Beeinträchtigung der Tyrosinphosphorylierungskaskade und damit einhergehend die Beeinträchtigung des TCR/CD3 Komplexes gezeigt [279].

Neben der Bildung von ROS exprimieren PMN auch immunsupprimierende Oberflächenmoleküle, wie PD-L1 und können durch die Bindung an den PD-1 Rezeptor der T-Zellen inhibitorische Signale weiterleiten. Dieser spezielle Mechanismus konnte vor allen in chronischen Erkrankungen, wie Tumoren oder dem Systemischen Lupus erythematoses (SLE) [280] beobachtet werden. Auch in gesunden Spendern konnte eine Induktion der PD-L1 Expression gezeigt werden [178]. Hierbei wurde den Spendern vor der Blutentnahme intravenös Lipopolysaccharid (LPS) verabreicht. Die aus dem peripheren Blut isolierten Neutrophilen wurden *in vitro* zusätzlich mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Dabei konnte eine PD-L1 Induktion in Neutrophilen nur mit IFN- $\gamma$  Stimulation erreicht werden [178]. Eine weitere mögliche Erklärung der T-Zellinhibition durch PMN wurde durch Negorev *et al.* aufgeklärt, spiegelt jedoch nur *in vitro* Versuche wider. Negorev *et al.* befassten sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss die für die T-Zellaktivierung verwendeten anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Dynabeads auf humane Neutrophile haben. Dabei konnten sie zeigen, dass auch PMN in der Lage sind, an Dynabeads zu binden und so die T-Zellstimulation verhindern können [281]. Um dies in dem vorliegenden Versuchsaufbau der direkten T-Zell – PMN Interaktion ausschließen zu können, müssten T-Zellen entweder mit löslichen oder plattengebundenen Antikörpern stimuliert werden, oder man verwendet TCR-transduzierte T-Zellen mit peptidspezifischer Stimulation.

Auch wenn der inhibitorische Mechanismus in diesem experimentellen Aufbau abschließend nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, wird sehr deutlich, dass die inhibitorischen Mechanismen stärker sind als die immunstimulierenden Effekte, da diese sehr effektiv unterdrückt werden können. Die Aufklärung der inhibitorischen Mechanismen, die während der Co-Kultur von PMN mit T-Zellen beobachtet wurden, ist für eine *in vivo* Anwendung der PMN-induzierten Immunstimulation von großer Wichtigkeit.

### 5.3 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN ist argininabhängig

In allen Bedingungen war die Inhibition der PMN Arginase 1 erforderlich, um diese Hyperaktivierung der T-Zellen beobachten zu können. In einem Kinetikversuch mit unterschiedlichen Vorinkubationszeiten der PMN von 24 h, 48 h und 72 h konnte gezeigt werden, dass die durch Arginase 1 bedingte Inhibition der T-Zellproliferation ab einer Vorinkubationszeit der PMN von 48 h zu beobachten war und dass die komplette Inhibition erst nach 72 h Vorinkubationszeit der PMN in Zellkulturmedium erfolgte [267]. Die Hyperaktivierung hingegen konnte bereits nach 24 h in allen PMN-ÜS Bedingungen unabhängig von einer Arginase 1 Inhibition beobachtet werden. Innerhalb dieser kurzen Vorinkubationszeit konnte zwar bereits eine moderate Arginaseaktivität gemessen werden (vgl. Abbildung 18C), vermutlich war jedoch die kurze Inkubationsdauer nicht ausreichend für das Enzym, um vorhandenes Arginin komplett umzusetzen, so dass für die Entfaltung der starken immunstimulierenden Effekte genug Arginin in den PMN-ÜS vorhanden war. Umgekehrt kann daraus geschlossen werden, dass für die Inhibition der T-Zellproliferation nicht nur die Arginaseaktivität, sondern auch die Länge der Inkubation eine Rolle spielt: Wir konnten zeigen, dass die Arginaseaktivität in den PMN Überständen mit Länge der Inkubationsdauer steigt, was mit einem erhöhten PMN-Zelltod korreliert [231] und zu einer niedrigen Argininkonzentration im ÜS führt [267]. Um diese Aussage zu bekräftigen wurde die Argininkonzentration in PMN-ÜS mit unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen nach 72 h Vorinkubation und nach weiteren 48 h T-Zellkultur ermittelt (vgl. Abbildung 18A und 18B). Die Inhibition der T-Zellproliferation durch PMN-ÜS ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 kann eindeutig der Arginindepletion zugeordnet werden, da hier Werte von unter 40  $\mu\text{M}$  Arginin gemessen wurden und dieser Schwellenwert ausschlaggebend für den Arrest der T-Zellen in der G0-G1-Phase ist [209]. Durch die Zugabe der Arginase 1 Inhibitoren nor-NOHA oder INCB00158 konnte diese Arginindepletion erfolgreich verhindert werden, korrelierend mit einer Hyperaktivierung der T-Zellen.

Die Argininkonzentration wurde auch nach 48 h Co-Kultur von T-Zellen mit PMN in unterschiedlichen PMN:T-Zellverhältnissen ermittelt. Die Argininkonzentration in allen Co-Kulturen ohne Zugabe von Arginase 1 Inhibitoren nahm zwar auch mit steigender PMN-Anzahl ab, lag jedoch in allen Bedingungen deutlich über 40  $\mu\text{M}$  (vgl. Abbildung 19). Die in Abbildung 16A, 16B und 17C beobachteten Reduktionen der T-Zellproliferation müssen demnach auf andere inhibitorische PMN-Effektormechanismen zurückgeführt werden, wie bereits unter 5.2 Vergleich verschiedener T-Zellen und PMN Kulturen in Abhängigkeit der Arginase 1 Inhibition erörtert wurde.

Die Abhängigkeit der Hyperaktivierung von T-Zellen durch Faktor(en) im PMN-ÜS sowie der Verfügbarkeit von Arginin trat deutlich nach > 24 h PMN Vorinkubation auf. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden die PMN-ÜS in RPMI Medium mit supraphysiologischen Argininkonzentrationen angesetzt [267]. Dabei konnte nicht nur eine Aufhebung der durch Arginase 1 induzierten Inhibition der T-Zellproliferation, sondern auch die beginnende Hyperaktivierung in diesen Bedingungen erreicht werden, wobei die T-Zellen in den PMN-ÜS mit nor-NOHA noch höhere Proliferationswerte zeigten. Noch deutlichere Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn die PMN-ÜS nach erfolgter 72 h PMN-Vorinkubation mit Arginin supplementiert wurden (vgl. Abbildung 20). Hier konnte sehr klar die Abhängigkeit der T-Zell Hyperaktivierung von der verfügbaren Konzentration der Aminosäure Arginin bewiesen werden, wobei die im physiologischen Argininkonzentrationen berücksichtigt wurden [203]. Für translationale Anwendungen muss hierbei beachtet werden, dass erhöhte Argininkonzentrationen durchaus Nebenwirkungen, wie Magen-Darm-Beschwerden und Schlafstörungen auslösen können. Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte die Verwendung von L-Citrullin darstellen. In einer doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Studie wurde die orale Verabreichung von L-Arginin mit der von L-Citrullin verglichen. Hierbei konnte, ohne relevante Nebenwirkungen, durch L-Citrullin eine erhöhte Plasmakonzentration von L-Arginin erreicht werden [282]. Wegen des geringen First-Pass-Effekts der Leber wird L-Citrullin vorwiegend in der Niere durch ASS und ASL zu L-Arginin metabolisiert [283].

## 5.4 Die Hyperaktivierung von T-Zellen durch PMN beruht auf stark hydrophilen und hitzebeständigen Molekülen mit einem Molekulargewicht < 3 kDa

Die Identifizierung der Substanzen aus PMN, die eine Hyperaktivierung von T-Zellen unter suffizienten Argininkonzentrationen bewirken, ist von zentraler Bedeutung. Nach Ultrafiltrationen der PMN-ÜS konnten wir bereits zeigen, dass nur Substanzen in Frage kommen, die ein Molekulargewicht von < 3 kDa aufweisen [267]. Hierbei war besonders interessant, dass bereits nach der ersten Ultrafiltration sowohl aus dem PMN-ÜS < 10 kDa, als auch aus dem RPMI Medium Substanzen < 10 kDa abgetrennt wurden, welche für die T-Zellproliferation wichtig sind (vgl. Abbildung 21). Zu diesen Substanzen gehören auch alle Bestandteile des dialysierten FCS, da die vom Hersteller gewählte Molekulargewichtsgrenze der Dialyse 10 kDa beträgt. Tatsächlich wurde durch die Zugabe des 10 % dialysierten FCS in PMN-ÜS < 10 kDa ein Anstieg der T-Zellproliferationswerte erreicht (vgl. Abbildung 21). In diesem Zusammenhang wurde auch der Effekt von dialysiertem FCS auf die T-Zellproliferation in allen Bedingungen untersucht (vgl. Abbildung 22), wobei eine eindeutige Induktion der Proliferation durch zusätzliches FCS in allen RPMI Bedingungen (22B) beobachtet wurde. Auch in allen Bedingungen der PMN-ÜS konnte durch die FCS-Zugabe eine erhöhte T-Zellproliferation beobachtet werden, wobei die Hyperaktivierung nur in PMN-ÜS < 3 kDa + 10 % dial. FCS zu sehen war. Somit lässt sich eindeutig beweisen, dass die durch PMN hervorgerufene Hyperaktivierung der T-Zellen Moleküle mit < 3 kDa benötigt und die Zugabe des FCS in dieser Bedingung für das generelle Zellwachstum notwendig ist (22A). Die inhibitorische Wirkung von PMN-ÜS auf die T-Zellproliferation ist im gesamten PMN-ÜS, sowie im PMN-ÜS > 10 kDa sehr gut ersichtlich. Der PMN-ÜS im Bereich 3 – 10 kDa wurde durch die zweite Ultrafiltration stark konzentriert und anschließend in RPMI Versuchsmedium zum ursprünglichen Volumen verdünnt, womit dieser Bedingung erneut Arginin zugefügt wurde. Da Arginase 1 bereits in der ersten Ultrafiltration abgetrennt wurde, steht das Arginin in dieser Bedingung für die T-Zellen zur Verfügung. Auch in dieser Abbildung wird die Proliferations-induzierende Wirkung von FCS wieder sichtbar. Diese stimulierende Wirkung von dialysiertem FCS kann durch die darin enthaltenen Bestandteile, wie Rinderserumalbumin, Wachstumsfaktoren oder Hormone erklärt werden. Es ist aber sicher nicht dieselbe Substanz, die sich in PMN-ÜS < 3 kDa befindet, da Moleküle < 10 kDa in dialysiertem FCS nicht mehr enthalten sind. Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin, BSA) ist der Hauptbestandteil von FCS und die Zugabe von BSA anstelle von dialysiertem FCS in RPMI-Medium bzw. in PMN-ÜS könnte ein möglicher Versuchsansatz sein, um den FCS-Effekt in Abbildung 22 und Abbildung 23 näher zu untersuchen. Für die Untersuchung der Hydrophobizität wurden

FCS-freie Bedingungen (Abbildung 23, rote Pfeile) gewählt. Dabei konnten wir zeigen, dass die Hyperaktivierung von einer stark hydrophilen Substanz verursacht wird [267]. Jedoch scheint der Prozess der *reversed phase* Chromatographie und die anschließende Lyophilisierung der Proben einen erheblichen Verlust der gesuchten Substanz oder der Substanzen zu bewirken, da die Proliferationswerte dieser Fraktionen deutlich niedriger sind als in den unbehandelten PMN-ÜS (vgl. Abbildung 24A). Trotzdem kann man auch hier einen deutlichen Unterschied zwischen PMN-ÜS und RPMI in der *Flow through* Fraktion (FT) und in der 100 % H<sub>2</sub>O Fraktion erkennen. Dass in der *Flow through* Fraktion, erhöhte Proliferationswerte beobachtet werden konnten, bedeutet, dass die Chromatographiesäulen womöglich überladen waren und in der Folge Moleküle nicht gebunden werden konnten und durchgeflossen sind. Vermutlich war unter diesen Molekülen auch die gesuchte immunstimulierende Substanz, da die Proliferationswerte der FT Fraktion mit den Werten der H<sub>2</sub>O Fraktion vergleichbar sind. Jedoch gibt es hierbei einen nicht zu vernachlässigenden Unterschied: während in der FT Fraktion mit abnehmender Konzentration ( $5\times < 2\times < 1\times$ ) die T-Zellproliferation steigt, sinkt die T-Zellproliferation in der H<sub>2</sub>O Fraktion mit abnehmender Konzentration (vgl. Abbildung 24A). Das lässt vermuten, dass in der FT Fraktion auch Substanzen enthalten sind, die in hohen Konzentrationen sehr effektiv zur Inhibition der T-Zellproliferation führen können, diese inhibierenden Effekte gehen jedoch verloren, sobald die ursprüngliche Konzentration ( $1\times$ ) erreicht wird. Dieser negative Effekt konnte nicht nur in den PMN-Fractionen, sondern auch in den RPMI-FT Fraktionen beobachtet werden, so dass es sich um keine von PMN stammende Substanz handelt. Anders ist es mit der immunstimulierenden Substanz: hier sieht man vor allem in der 100 % H<sub>2</sub>O Fraktion deutliche Unterschiede zwischen PMN und RPMI. Diese Unterschiede werden in der 5-fach konzentrierten Bedingung am deutlichsten und sie können in der 90 % H<sub>2</sub>O/10 % MeOH Fraktion nicht mehr beobachtet werden. Da alle Lyophilisate wieder in RPMI Versuchsmedium gelöst wurden, sind keine Unterschiede zwischen PMN-ÜS ohne und PMN-ÜS mit nor-NOHA zu beobachten.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass es sich bei den gesuchten immunstimulierenden PMN-Substanzen um sehr hitzestabile Moleküle handelt (vgl. Abbildung 25) [267]. Sowohl PMN-ÜS als auch RPMI  $\pm$  nor-NOHA, die für 30 min bei 75 °C inkubiert wurden, zeigten deutlich reduzierte T-Zellproliferationswerte, was nicht für PMN-ÜS + nor-NOHA unter denselben Bedingungen zutraf. Die T-Zell Hyperaktivierung in dieser Bedingung blieb unverändert und wurde erst nach einer Hitzebehandlung bei 85 °C eingeschränkt, wobei die T-Zellen immer noch Proliferationswerte wie bei konventioneller Aktivierung (ohne PMN-ÜS



+ nor-NOHA) aufwiesen. Da es sich bei der hyperaktivierenden Substanz um kleinmolekulare Moleküle handelt, ist die starke Thermostabilität wenig überraschend. So degradieren Aminosäuren beispielsweise oberhalb Temperaturen von 120 °C, wobei hier auch die Dauer des Erhitzens entscheidend ist [284].

## 5.5 Auswirkungen der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zellen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse rund um die Effekte der Hyperaktivierung auf T-Zellen im Hinblick auf Morphologie, Metabolismus, Zytokinprofil, Zytotoxizität, ROS-Produktion und Viabilität diskutiert.

### 5.5.1 Morphologie hyperaktivierter T-Zellen

Für die morphologische Untersuchung wurden die T-Zellen auf dem Objektträger mit Methanol fixiert und mit einer Eosin- und Methyleneblaulösung gefärbt (vgl. Abbildung 26). Unstimulierte T-Zellen und T-Zellen unter Arginindepletion zeigten die bereits bekannte runde Form ruhender T-Zellen [285]. Eine Aktivierung der T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads führte zur Konformationsänderung: die Zellen nehmen länglichere Form an und ordnen ihr Aktinzytoskelett neu an, hin zum Ort des Aktivierungssignals [286]. Diese T-Zellpolarisation dient der Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und Antigenpräsentierender Zelle (APC) [287]. Neben der Formänderung durch anti-CD3/anti-CD28 Aktivierung konnte in den hyperaktivierten T-Zellen (Abbildung 26F) auch eine deutliche Vergrößerung der T-Zellen und vor allem der Zellkerne mit aufgelockertem Chromatin und ebenfalls vergrößerten Nukleoli beobachtet werden. Zusammen mit dem starken Ausbau des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates zeigen diese morphologischen Veränderungen der T-Zellen eine erhöhte Aktivität der Proteinbiosynthese und unterstreichen damit die bereits beobachtete erhöhte Proliferation dieser Zellen. Für eine bessere Untersuchung der T-Zellorganellen wurden bereits elektronenmikroskopische Bilder dieser Zellen aufgenommen (Bülbül *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Des Weiteren wären intrazelluläre Färbungen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für Aufnahmen mit einem konfokalen Lasermikroskop eine interessante Ergänzung. Außerdem wäre eine Untersuchung der morphologischen Veränderung separierter CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein weiterer interessanter Aspekt.

### 5.5.2 Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen

Für die metabolische Untersuchung hyperaktivierter T-Zellen wurden sowohl ein MTS Assay, als auch die Messung des extrazellulären O<sub>2</sub>-Gehalts und pH-Wertes mittels *Flux Analyzer* herangezogen.

Als Kontrolle für den MTS Assay wurden PMN-ÜS ohne T-Zellen mit MTS versetzt und 4 h inkubiert (Daten nicht gezeigt), um ausschließen zu können, dass im PMN-ÜS Verbindungen enthalten sind, die zu einer nicht-enzymatischen Reduktion des MTS führen. Hierbei wurden in PMN-ÜS ohne T-Zellen keine erhöhten Absorptionswerte erhalten, so dass angenommen werden kann, dass es sich bei den erhöhten Werten aus Abbildung 27 um die metabolische Aktivität der T-Zellen handelt. Bei dem MTS Assay zeigten T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS bereits ab einem 1:1 Verhältnis von PMN und T-Zellen einen signifikant höheren Metabolismus. Jedoch stieg dieser nicht noch weiter an, sondern nahm mit zunehmender PMN-Dichte ab. Da Lymphozyten generell eher wenig Formazan produzieren [288], wurde hier mit 250.000 T-Zellen/well eine hohe Anfangszellzahl gewählt. Während der 48 h Inkubation der T-Zellen in den unterschiedlichen Bedingungen konnten diese Zellen vor allem in den hyperaktivierenden Bedingungen stark proliferieren und überschritten möglicherweise die für den Assay benötigte maximale Zellzahl. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum die gemessene Absorption der T-Zellen in PMN-ÜS + N nicht mit höherer PMN Dichte steigt. Eine gegenseitige Kontakthemmung der T-Zellen könnte die Stoffwechselaktivität in diesen Zellen beeinflusst haben. Um dieser Hypothese nachgehen zu können, müsste man den MTS Assay mit weniger T-Zellen starten, wobei eine Zellzahl zwischen 150.000 und 200.000 T-Zellen laut der T-Zelltitration (Daten nicht gezeigt) geeignet wäre. Der Unterschied zwischen konventionell aktivierten und hyperaktivierten T-Zellen könnte durch die Anpassung der T-Zellzahl deutlicher ausfallen. Interessanterweise, wurde der Metabolismus von T-Zellen in PMN-ÜS ohne Inhibitor mit steigender PMN-Dichte deutlich verbessert, so dass in der 20:1 PMN:T-Zellbedingung kein Unterschied zwischen hyperaktivierten und nicht-aktivierten Zellen zu beobachten war. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den [<sup>3</sup>H]-Proliferationsdaten der T-Zellen, bei denen der Unterschied zwischen Hyperaktivierung und Inhibition mit steigender PMN Dichte deutlicher wurde. Daher wäre es sehr interessant zu wissen, ob sich diese Beobachtung aus ungünstig gewählten Zellzahlen ergibt oder ob der inhibierende Effekt auf die T-Zellproliferation nicht gleichermaßen inhibierend auf die metabolische Aktivität der T-Zellen ist.

Mit der Agilent Seahorse Technologie konnte die Frage nach dem Metabolismus in hyperaktivierten T-Zellen eindeutig geklärt werden (vgl. Abbildung 28). Hier konnte gezeigt

werden, dass hyperaktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl eine deutlich höhere Glykolyse, als auch eine höhere mitochondriale Zellatmung im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen aufweisen und auch ein extrem hohes metabolisches Potential haben, was bedeutet, dass die hyperaktivierten T-Zellen auf Stressbedingungen schneller reagieren können als konventionell aktivierte T-Zellen. Die hyperaktivierten T-Zellen scheinen einen erhöhten Energiebedarf zu haben, wodurch auch die Nährstoffaufnahme und der Stoffwechsel angepasst werden müssen. Diese Anpassung erfolgt einerseits über die Erhöhung der Glykolyse in hyperaktivierten T-Zellen, wodurch vermehrt Pyruvat gebildet wird. Aus Pyruvat werden Stoffwechsel-Zwischenprodukte gebildet, die für andere metabolische Wege weiterverwendet werden, welche wiederum für Proliferation und Effektorfunktionen der T-Zellen benötigt werden [290]. Andererseits ist die erhöhte oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien für die T-Zellproliferation erforderlich [291]. Nicht-aktivierte T-Zellen (graue Linie in Abbildung 28) weisen mit konventionell aktivierten T-Zellen vergleichbare Basis-OCR und Basis-ECAR Werte auf. Hierbei handelt es sich um die zu erwartenden Bereiche für OCR und ECAR konventionell aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen, für die OCR Basiswerte von < 50 pmol/min und ECAR Basiswerte von < 20 mpH/min publiziert sind [292].

Im Vergleich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sich wesentliche Unterschiede im Hinblick auf ihren Metabolismus nach erfolgter Aktivierung. So wurden in aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen höhere Raten der mitochondrialen Atmung beobachtet, wohingegen aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehr Glykolyse aufwiesen als CD4<sup>+</sup> T-Zellen [293]. Um diese Ergebnisse in hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu überprüfen, wurde der *Agilent Seahorse Cell Energy Phenotype Test* zusätzlich mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Außerdem wurden sowohl mit CD4<sup>+</sup>, als auch mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen der *Agilent Seahorse Cell Mito Stress Test* durchgeführt (Bülbul *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

### 5.5.3 ROS-Produktion in hyperaktivierten T-Zellen

Eine erhöhte OXPHOS, wie es in hyperaktivierten T-Zellen der Fall ist, kann jedoch auch die Produktion unerwünschter Nebenprodukte, wie ROS, zur Folge haben. Daher wurde die ROS Produktion in hyperaktivierten T-Zellen nach 48 h Kultur in PMN-ÜS, sowie nach 48 h Co-Kultur mit PMN untersucht (vgl. Abbildungen 29 + 30).

Die ROS-Produktion in unaktivierten T-Zellen und T-Zellen unter Argininmangel war vergleichbar mit der ROS-Produktion in konventionell aktivierten T-Zellen. Ruhende und naive T-Zellen decken ihren ATP Bedarf hauptsächlich über OXPHOS, wobei ROS Nebenprodukte gebildet werden können [294, 295]. Der Energiebedarf nach T-Zellaktivierung wird durch den

Wechsel vom katabolen Ruhezustand zum anabolen Zustand gedeckt, wodurch sowohl Glykolyse als auch mitochondriale Zellatmung hochreguliert werden [295], so dass aktivierte T-Zellen in der Folge auch höhere ROS-Werte erreichen sollten. Erhöhte ROS-Werte gehen jedoch mit oxidativem Stress und Apoptoseinduktion einher. T-Zellen können sich durch die Synthese von zellulären Antioxidantien, wie z.B. Glutathion, vor übermäßig hohen ROS-Werten schützen, was eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise niedrigen ROS-Werte sein könnte. In diesem Zusammenhang fanden Sukumar *et al.* heraus, dass T-Zellen mit niedrigem mitochondrialen Membranpotential trotz ihrer erhöhten mitochondrialen Atmung einen verringerten oxidativen Stress durch reduzierte ROS-Level aufweisen [296]. Hierbei konnte in diesen T-Zellen ein großes Repertoire an oxidiertem Glutathion, sowie eine erhöhte mRNA Expression von antioxidativen Enzymen, wie Katalasen oder Superoxiddismutasen, festgestellt werden. Die Untersuchung zellulärer Antioxidantien und die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in konventionell- und hyperaktivierten T-Zellen könnten die vergleichsweise niedrigen ROS-Werte erklären.

T-Zellen, die in PMN-ÜS kultiviert wurden, zeigten eine leichte Tendenz zur Erhöhung der ROS Produktion bei gleichzeitiger Erhöhung der PMN-Dichte. Die Zugabe von INCB00158 beeinflusste hier die ROS-Produktion kaum, wohingegen die Zugabe von nor-NOHA zu einer deutlichen Reduktion der ROS-Produktion führte. Für die T-Zellen in PMN-ÜS mit einem PMN:T-Zellverhältnis von 10:1 wurde bereits gezeigt, dass die T-Zellen in Gegenwart von nor-NOHA sehr stark erhöhte Glykolyseraten und OXPHOS aufweisen. Daher wäre zu erwarten, dass vor allem in der PMN-ÜS + N Bedingung T-Zellen hohe Mengen an ROS produzieren. Hinsichtlich der ROS-Suppression durch nor-NOHA muss noch geklärt werden, ob nor-NOHA als Radikalfänger fungiert oder ein anderer Mechanismus involviert ist. In H9c2-Zellen konnte eine Glukose-abhängige Induktion der Arginaseaktivität mit Folge einer NOS-Entkopplung und erhöhter ROS Produktion beobachtet werden. Hier konnte mit Hilfe von nor-NOHA ebenfalls eine Reduktion der ROS gezeigt werden [297]. Auch *in vivo* konnte der nor-NOHA Effekt auf ROS beobachtet werden: in einem Tumormodell wurde die ROS Produktion unreifer myeloischer Zellen (engl. *immature myeloid cells*, ImC) und ihre inhibitorische Wirkung auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Hierbei konnte durch nor-NOHA Zugabe eine 10-fache Reduktion der ROS in ImC gezeigt werden [298]. Die Hypothese von Kusmartsev *et al.*, dass Metaboliten von Arginin bei der ROS Entstehung eine Rolle spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht genauer untersucht. Weiterhin stellt sich bei dieser Hypothese die Frage, warum mit dem INCB001158 Inhibitor nicht die gleichen Ergebnisse erzielt werden können.

Die ROS Produktion in T-Zellen nach 48 h Co-Kultur mit PMN zeigt eine sehr gute Korrelation zu den Proliferationsdaten dieser T-Zellen: Mit zunehmender PMN-Anzahl nehmen sowohl T-Zellproliferation, als auch ROS Produktion ab, wobei in beiden Fällen durch die Arginaseinhibition kein Effekt erzielt werden konnte, mit Ausnahme des nor-NOHA Effekts auf ROS.

Die ROS Produktion scheint keine Bedeutung auf die Hyperaktivierung von T-Zellen in PMN-ÜS zu haben. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde die Auswirkung einer ROS Inhibition durch N-Acetylcystein (NAC) in hyperaktivierten T-Zellen auf die Proliferation dieser Zellen untersucht, wobei durch NAC keine Hyperaktivierung in T-Zellen induziert werden konnte und die Kombination von nor-NOHA und NAC ebenfalls keine synergistischen Effekte zeigte (Bülbül *et al.*, Manuskript in Bearbeitung). Weiterhin wurden ROS während der Co-Kultur von T-Zellen und PMN inhibiert und anschließend die Proliferation der T-Zellen untersucht, wobei durch die Inhibition von ROS keine Rekonstitution der T-Zellproliferation erreicht werden konnte (Bülbül *et al.*, Manuskript in Bearbeitung). Damit lässt sich auch bestätigen, dass von Neutrophilen produzierte ROS nicht für die Inhibition der T-Zellproliferation verantwortlich sind.

#### 5.5.4 Zytokinprofil hyperaktivierter T-Zellen

Bei der Untersuchung des Zytokinprofils hyperaktivierter T-Zellen wurde die CD3<sup>+</sup> Population als Ganzes einbezogen. Dennoch kann über die Untersuchung des Zytokinprofils eine Aussage darüber getroffen werden, welche T-Zellen am meisten von der Hyperaktivierung betroffen sind. Hierbei muss beachtet werden, dass die Induktion der Zytokinsekretion möglicherweise nicht nur auf die Immunstimulierung durch die noch unbekannt Substanz aus PMN zurückgeführt werden kann. PMN produzieren eine Reihe von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, die sich potenziell im PMN-ÜS befinden können und zur Differenzierung bestimmter T-Zell Subtypen führen können [299, 300]. In Abbildung 31 ist die erhöhte Sekretion vor allem von Th2 Zytokinen zu beobachten: IL-4, IL-5 und IL-13. Die Differenzierung von Th2 Zellen erfolgt über IL-4 und den STAT6 Signalweg [299]. Des Weiteren kann IL-4 zusammen mit TGF- $\beta$  zur Th9 Differenzierung führen, wobei Th9 differenzierte T-Zellen wiederum vermehrt IL-9 sezernieren [299]. Außerdem kann TGF- $\beta$  in Kombination mit IL-6 und IL-23 die Differenzierung von Th17 Zellen bewirken. Th17 Zellen produzieren vor allem das Zytokin IL-17 [299]. Da neutrophile Granulozyten in der Lage sind, die oben genannten Zytokine für Th2-, Th9- und Th17-Differenzierung (konstitutiv oder nach

Aktivierung) zu produzieren, lässt sich mit den vorhandenen Daten lediglich schlussfolgern, dass vor allem die Sekretion von auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen einwirkenden Zytokinen induziert wird. Hier besteht ein Zusammenhang mit der Hyperaktivierung dieser Zellen, da bereits gezeigt wurde, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen etwas stärker als CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Hyperaktivierung durch PMN-ÜS reagieren [267]. Um differenzieren zu können, welche Zytokine in welcher Menge von PMN produziert wurden, müsste dieser *Cytokin Bead Array* mit PMN-ÜS ohne T-Zellen wiederholt werden. Mit einem membran-basierten Zytokinassay konnten wir bereits die Zytokine im PMN-ÜS untersuchen. Hierbei wurden vor allem IL-1RA, IL-8, IL-16 und MIF detektiert (Vonwirth, V., unveröffentlichte Daten). Dabei muss beachtet werden, dass die unterschiedlichen Methoden (membran-basiert vs. durchflusszytometrisch) auch verschiedene Detektionsgrenzen aufweisen. Weiterhin wurde bei dem *Cytokin Bead Array* speziell nach T-Zell Zytokinen gesucht, sodass in den nächsten CBA Versuchen zusätzlich die PMN-ÜS ohne T-Zellen integriert werden sollten.

#### 5.5.5 Zytotoxizität hyperaktivierter T-Zellen

Eine der wichtigsten Fragestellungen bezüglich Hyperaktivierung der T-Zellen lautet: Können diese hyperaktivierten T-Zellen verbesserte zytotoxische Eigenschaften aufweisen? Dieser Aspekt wurde mit einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay untersucht, wobei eine signifikant verbesserte Zytotoxizität von hyperaktivierten T-Zellen gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen nach 24 h Co-Kultur mit den NCI A2 Zielzellen gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 32A). Hierbei handelt es sich um eine antigenspezifische Zytotoxizität, da nur p53(264-272) Peptid präsentierende NCI A2 Zellen abgetötet wurden, wohingegen mdm2(81-88)Peptid präsentierende NCI A2 Zellen und Myelomzellen ohne Peptidpräsentation nicht durch T-Zellen abgetötet wurden (Abbildung 32B + C). Dieses verbesserte Killing der hyperaktivierten T-Zellen konnten wir bereits mithilfe eines Kristallviolett-basierten Zytotoxizitäts-Assays zeigen [267]: nach nur 3 h Co-Kultur hyperaktivierter T-Zellen mit SAOS-2 Zellen konnte eine sehr effiziente und spezifische Zytotoxizität beobachtet werden. Dabei war nicht nur die sehr kurze Inkubationsdauer von 3 h sehr beeindruckend, sondern auch die Tatsache, dass T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA inkubiert wurden und in der Folge in ihrer Proliferation inhibiert sind, dennoch eine signifikant verbesserte Zytotoxizität zeigten, als konventionell aktivierte T-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen die durch Munder *et al.* publizierte Daten über die arginin-unabhängige Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [301]. In dieser früheren Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Chemotaxis, die Sekretion von Perforin und die Calcium-Signalwege, sowie der PI3K-Akt

Signalweg in T-Zellen unabhängig von Arginin funktionieren [301]. Dieses arginin-unabhängige Killing konnte in der vorliegenden Arbeit aus methodischen Gründen nicht bestätigt werden, weil die verwendeten Tumorzellen Arginin-auxotroph sind und nach 24 h Kultur in PMN-ÜS ohne Inhibitor bereits durch den Argininmangel eine deutlich schlechtere Viabilität zeigten. Während der unterschiedlich langen Inkubationszeiten der beiden Killing Assays (3 h vs. 24 h) könnten weiterhin unterschiedliche zytotoxische Mechanismen zugrunde liegen. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können einerseits nach Antigenerkennung durch den TCR die Inhalte ihrer Granula in Richtung der Zielzelle ausschütten. Dieser Vorgang tritt bereits nach wenigen Minuten nach Antigenerkennung ein und wird durch die Polymerisierung von Perforin charakterisiert, wobei eine Pore an der Zellmembran der Zielzelle gebildet wird [2, 302]. Durch diese Poren können die Granzyme (Serinproteasen) in die Zellen eindringen und die Apoptose einleiten [2]. Andererseits können CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Expression von Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor der Zielzelle binden, wodurch in dieser über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose induziert wird. Dieser Mechanismus dauert deutlich länger als der Perforin/Granzym Todesweg [303]. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können beide Mechanismen für die Abtötung der Zielzellen einsetzen, wobei hier die Expressionsraten von Perforin bzw. Fas-Ligand eine große Rolle spielen. So kommt es in einigen Tumorerkrankungen vor, dass infiltrierende T-Zellen im Tumormilieu eine reduzierte Perforinexpression aufweisen und der Killing-Mechanismus in Richtung langsam-wirkender Fas-Ligand verschoben wird [304]. Unter Berücksichtigung der Arbeit von Vonwirth *et al.* und der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Arginin-auxotrophe Tumorzellen verwendet wurden, konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass PMN-ÜS die Zytotoxizität von T-Zellen unabhängig von der Argininverfügbarkeit signifikant verbessert und zugleich in den Tumorzellen durch die Arginindepletion eine zusätzliche Reduzierung ihrer Viabilität verursacht.

### 5.5.6 Viabilität hyperaktivierter T-Zellen

Nachdem neben der Proliferation bereits viele weitere positive Effekte der PMN-induzierten Hyperaktivierung von T-Zellen, wie Metabolismus, Zytotoxizität und Zytokinprofil, erörtert werden konnten, befasst sich der nächste Abschnitt mit der Frage der Viabilität hyperaktivierter T-Zellen. Hierbei kristallisierte sich eine verbesserte Viabilität hyperaktivierter T-Zellen heraus. Diese Ergebnisse ziehen weitere interessante Fragestellungen nach sich: Wie lange können hyperaktivierte T-Zellen insgesamt kultiviert werden, wenn sie wöchentlich restimuliert werden? Gibt es hierbei einen signifikanten Unterschied zu konventionell



aktivierten T-Zellen? Welcher Mechanismus ist für die verbesserte Viabilität hyperaktivierter T-Zellen verantwortlich bzw. gibt es einen Einfluss auf die Apoptose?

Den letzten Punkt betreffend wurden Western Blot Versuche mit T-Zellen nach 12 h, 24 h und 48 h Inkubation in PMN-ÜS ± nor-NOHA durchgeführt. Hierbei wurden frühere Zeitpunkte als bei der durchflusszytometrischen Apoptoseuntersuchung gewählt, da für die Untersuchungen der Proteinexpressionen viable T-Zellen benötigt werden und nach 4 Tagen Inkubation bereits über 50 % der T-Zellen tot waren. Somit können die Western Blot Ergebnisse nur teilweise mit diesen Ergebnissen verglichen werden.

Während die beiden pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax, sowie das anti-apoptotische Protein Bcl-xL keinen eindeutigen Hinweis auf Apoptoseinduktion oder -inhibition zeigten, war in hyperaktivierten T-Zellen eine stark ausgeprägte *cleaved* Caspase 3 detektierbar (vgl. Abbildung 34). Die Spaltung der Caspase 3 ist ein klassischer Marker für Apoptose, da die Caspase 3 sowohl während der intrinsischen, als auch extrinsischen Apoptose aktiviert wird. Darüber hinaus hat Caspase 3 in T-Zellen eine weitere Funktion: Die Spaltung der Caspase 3 erfolgt nach TCR-Stimulation in Abwesenheit von Apoptose und hat in diesem Zusammenhang eine physiologische Rolle während der Aktivierung von T-Zellen, welche durch eine Caspase 3 Inhibition verhindert wurde [305]. Demnach steht die bereits nach 12 h beginnende Spaltung der Caspase 3 in den hyperaktivierten T-Zellen (PMN-ÜS + N) für den Mechanismus der T-Zellaktivierung, der mit der Zeit zunimmt und stellt so eine weitere Bestätigung für die Hyperaktivierung der T-Zellen dar. Die immunsuppressive Wirkung von Caspase Inhibitoren wurde durch Lawrence *et al.* bestätigt [306]. Hier konnte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Caspase Inhibitoren aus der Klasse der Peptidyl-Fluoromethylketone die Inhibition der T-Zellproliferation, sowie eine Blockierung des NF-κB Signalwegs gezeigt werden.

Interessanterweise wurde die Spaltung von Caspase 3 und Caspase 8 durch die von Lawrence *et al.* verwendeten Caspase Inhibitoren nicht gehemmt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Spaltung von Caspase 3 und Caspase 8 nach T-Zellaktivierung unabhängig von anderen Caspasen ist. Dies deutet darauf hin, dass die Caspase 3 und Caspase 8 Prozessierung nach T-Zellaktivierung durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden verglichen mit der Caspase 3 und Caspase 8 Prozessierung nach Fas-induzierter Apoptose [306, 307]. In diesem Zusammenhang wäre für die vorliegende Arbeit interessant die 48 h Inkubation der T-Zellen in PMN-ÜS mit Zugabe von Caspase Inhibitoren zu untersuchen, um den Mechanismus der Hyperaktivierung eingehender zu studieren. Ein weiterer spannender Aspekt ist die Untersuchung des Caspase 3 Signalwegs, um zu analysieren, aus welchem Grund eine Induktion der Apoptose nach Prozessierung der Caspase 3 ausbleibt.

### 5.5.7 Proteomanalyse hyperaktivierter T-Zellen

Um ein noch besseres Verständnis der T-Zellhyperaktivierung erlangen zu können, wurden die Proteine hyperaktivierter und konventionell aktivierter T-Zellen isoliert und mittels Proteomanalyse untersucht. Für den Vergleich wurden die TOP20 signifikant hoch- bzw. herunter regulierten Proteine analysiert.

Betrachtet man die in hyperaktivierten T-Zellen hochregulierten Proteine, stellt man viele Übereinstimmungen mit den bisherigen Ergebnissen fest. Die erhöhte Proliferation gegenüber konventionell aktivierter T-Zellen spiegelt sich in der erhöhten Expression von Proteinen, die bei der Anordnung und Regulierung der Mikrotubuli während der M-Phase des Zellzyklus eine Rolle spielen, wider. Damit in Zusammenhang steht die gleichermaßen erhöhte Expression von DNA-Reparatur- und DNA-Replikationsproteinen, sowie der hohe Energiedarf, der sich in der Expression von Enzymen, die für die Synthese der Aminosäuren L-Asparagin, L-Glutamin, L-Phenylalanin und L-Serin benötigt werden, bemerkbar macht. Die hochregulierte Serin-Biosynthese kann hierbei auf erhöhte Argininkonzentrationen zurückgeführt werden [276]. Eine weitere Beobachtung, die Geiger *et al.* hohen Mengen L-Arginin zuschreiben konnten, war das verbesserte Überleben der T-Zellen. Durch Wechselwirkungen von L-Arginin mit den Proteinen BAZ1B, PSIP1 und TSN und der damit verbundenen Konformationsänderungen dieser Proteine, konnten positive Wirkungen auf das Überleben von T-Zellen erzielt werden [276]. Durch eine erweiterte Analyse der Proteomdaten der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser speziellen Proteine in hyperaktivierten T-Zellen vs. konventionell aktivierten T-Zellen beobachtet werden, so dass der Grund für den Überlebensvorteil hyperaktivierter T-Zellen weiterhin eruiert werden muss.

Auch unter den signifikant herunter regulierten Proteinen finden sich viele Übereinstimmungen mit bisher beobachteten Ergebnissen. Das Histon H1.0 (H1FO) Protein ist für die Kondensation der Nukleosomketten verantwortlich und vor allem in Zellen, die sich im Endstadium der Differenzierung befinden und geringe Zellteilungsraten aufweisen, vorzufinden [308]. Zusätzlich sind viele Transkriptionsfaktoren herunter reguliert, die als negativer Regulator in Zusammenhang mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg (REL, HEXIM1), dem positiven Transkriptionselongationsfaktor p-TEFb (HEXIM1) oder dem MYC Transkriptionsfaktor (NCOA5) stehen [309].

In Folge einer T-Zellaktivierung steigt auch der Lipidbedarf an, was sich in der vermehrten Fettsäuresynthese (engl. *fatty acid synthesis*, FAS) und gleichzeitig der reduzierten Fettsäureoxidation (engl. *fatty acid oxidation*, FAO) bemerkbar macht. Die Fettsäuremetabolite werden für die Synthese der Plasmamembran benötigt [310]. Daher erscheint eine reduzierte

Expression von Proteinen, die mit dem Lipidtransport oder -metabolismus assoziiert sind, in hyperaktivierten T-Zellen gegensätzlich. Die beiden Apolipoproteine E und L2 (APOE, APOL2) sind für den Transport von Lipiden verantwortlich [311]. APOE kann zudem eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen haben, so dass eine reduzierte Expression in hyperaktivierten T-Zellen eine verminderte Inhibition durch APOE bedeutet [312].

Unter den signifikant herunter regulierten Enzymen ist die Fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) ein Indiz dafür, dass die Glykolyse oder Gluconeogenese reduziert ist und vorwiegend OXPHOS zur Energiegewinnung dient. Mittels extrazellulären Flux-Assays konnte jedoch gezeigt werden, dass neben der mitochondrialen Zellatmung auch die Glykolyse in hyperaktivierten T-Zellen erhöht ist (vgl. Abbildung 28). Ein weiteres herunter reguliertes Enzym aus der Energiegewinnung ist die atypische Kinase COQ8A (ADCK3), welches in der Biosynthese von Coenzym Q involviert ist [313]. Dieses auch Ubiquinon Q genannte Protein gehört zur Atmungskette der Mitochondrienmembran und ist an der OXPHOS beteiligt. Die reduzierte Expression von PFKFB3 und ADCK3 könnten auf regulatorische Prozesse in den hyperaktivierten T-Zellen hindeuten. Für eine genauere Untersuchung dieser aufkommenden Fragestellung könnte die Analyse des T-Zell-Transkriptoms weiterhelfen.

## 6. Ausblick

Eine zusammenfassende Abbildung der Ergebnisse ist in Abbildung 36 dargestellt. Auch wenn in dieser Arbeit bereits vieles über die neuartige immunstimulierende Wirkung von PMN-ÜS auf T-Zellen aufgezeigt werden konnte, gibt es noch viele weitere Fragen, die sich aus diesen Ergebnissen ergeben.

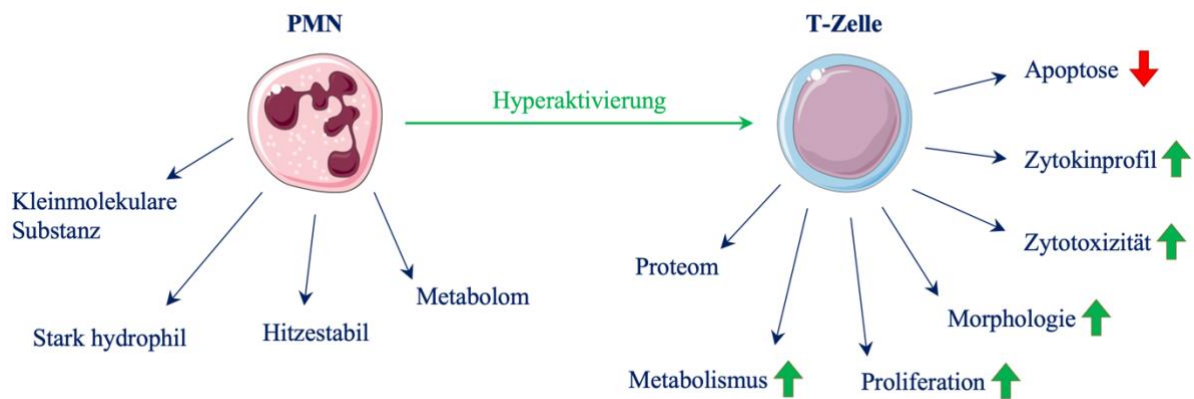


Abbildung 36: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.

Nachdem durch die Metabolomanalyse einige mögliche kleinstmolekulare Substanzen, die für den immunstimulierenden Effekt verantwortlich sein könnten, aufgedeckt wurden, müssen diese in Folgeversuchen getestet werden. Da noch nicht bekannt ist, ob nur eine Substanz oder mehrere für die Hyperaktivierung verantwortlich sind, sollten die Hits hierbei sowohl einzeln, als auch in unterschiedlichen Kombinationen getestet werden.

Die Tatsache, dass hyperaktivierte T-Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen zeigen, wirft ebenfalls weitere Fragen auf. In diesem Zusammenhang wäre eine umfassende Untersuchung pro- und anti-apoptotischer Proteine, die in dieser Arbeit lediglich angeschnitten wurden, ein weiterer interessanter Aspekt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob hyperaktivierte T-Zellen auch deutlich länger in Kultur gehalten werden können als konventionell aktivierte T-Zellen und wie sich diese Hyperaktivierung auf die T-Zellphänotypen auswirkt. Um den Mechanismus der Hyperaktivierung durch PMN-ÜS besser verstehen zu können, sollten T-Zellsignalwege näher untersucht werden. Hierbei deuten erste Versuche darauf hin, dass der distale Akt-Signalweg (p-4EBP1, p-S6, p-eIF4E) stärker aktiviert ist (Liebhäuser, S., unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse können im Rahmen einer Transkriptomanalyse von T-Zellen ebenfalls untersucht werden. Eine RNA Sequenzierung hyperaktivierter T-Zellen, sowie nicht-aktivierter und konventionell aktivierter T-Zellen wurde bereits durchgeführt und die bioinformatischen Analysen liegen vor. Die

biochemische Analyse dieser Ergebnisse ist der nächste wichtige Schritt um das Bild der Hyperaktivierung zu vervollständigen und mögliche Mechanismen aufzudecken.

Die Aufdeckung der inhibitorischen Mechanismen von PMN auf die T-Zellproliferation während einer direkten Co-Kultur stellt ebenfalls eine wichtige Aufgabe dar.

Der im Rahmen dieser Versuche etablierte PMN-ÜS Versuch ist mit allen *in vitro* Daten sehr robust und reproduzierbar. Da man jedoch in einem isolierten System arbeitet, sollte der hyperaktivierende Effekt ebenfalls *in vivo* untersucht werden. Vorzugsweise verwendet man hierbei ein Xenograft-Modell, da eine Hyperaktivierung von murinen T-Zellen durch humane PMN bisher nicht gelungen ist (unveröffentlichte Daten, AG Theobald). In diesem Zusammenhang ist die Frage, ob murine PMN auch hyperaktivierende Effekte auf murine T-Zellen ausüben auch noch unbeantwortet.

Eine weitere offene Frage ist, ob die PMN-gesteuerte Hyperaktivierung neben den T-Zellen auch weitere Immunzellen, wie B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, beeinflussen kann und in welchem Maße dies geschieht.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit eine sehr interessante und neue Beobachtung der Hyperaktivierung von T-Zellen durch kleinmolekulare Substanzen aus Neutrophilen und könnte einen wichtigen ergänzenden Ansatz für Immuntherapien aller Art darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Horn, F., *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6th ed. 2015: Georg Thieme Verlag.
2. Murphy, K., Weaver, C., *Janeway's Immunology*. 9th ed. 2017: Garland Science, Taylor & Francis Group.
3. Ruter, A. and U. Gunzer, *Differentiation of granulocytes in Pappenheim stained blood cell smears using standardized cytophotometric analysis*. *Blut*, 1984. **48**(5): p. 307-20.
4. Kühnel, W., *Taschenatlas Histologie*. 13th ed. 2014: Georg Thieme Verlag.
5. Siracusa, M.C., E.D. Wojno, and D. Artis, *Functional heterogeneity in the basophil cell lineage*. *Adv Immunol*, 2012. **115**: p. 141-59.
6. Ramirez, G.A., et al., *Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 9095275.
7. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 625-7.
8. Coffelt, S.B., M.D. Wellenstein, and K.E. de Visser, *Neutrophils in cancer: neutral no more*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(7): p. 431-46.
9. Selders, G.S., et al., *An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration*. *Regen Biomater*, 2017. **4**(1): p. 55-68.
10. Dincey, J.T., et al., *Neutrophil kinetics in man*. *J Clin Invest*, 1976. **58**(3): p. 705-15.
11. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(2): p. 105-17.
12. Manz, M.G. and S. Boettcher, *Emergency granulopoiesis*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(5): p. 302-14.
13. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
14. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. *J Intern Med*, 2010. **268**(1): p. 25-34.
15. Panopoulos, A.D., et al., *STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils*. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3682-90.
16. Richards, M.K., et al., *Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3562-8.
17. Minns, D., K.J. Smith, and E.G. Findlay, *Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents*. *Mediators Inflamm*, 2019. **2019**: p. 8968943.
18. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. *J Immunol*, 1995. **154**(8): p. 4157-65.

19. Borregaard, N., et al., *Human neutrophil granules and secretory vesicles*. Eur J Haematol, 1993. **51**(4): p. 187-98.
20. Bainton, D.F., J.L. Ulliyot, and M.G. Farquhar, *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow*. J Exp Med, 1971. **134**(4): p. 907-34.
21. Bainton, D.F., *Neutrophil granules*. Br J Haematol, 1975. **29**(1): p. 17-22.
22. Rorvig, S., et al., *Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(4): p. 711-21.
23. Feuk-Lagerstedt, E., et al., *Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule*. Proteomics, 2007. **7**(2): p. 194-205.
24. Pereira, H.A., et al., *CAP37, a human neutrophil-derived chemotactic factor with monocyte specific activity*. J Clin Invest, 1990. **85**(5): p. 1468-76.
25. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
26. Perera, N.C., et al., *NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2700-7.
27. Munder, M., et al., *Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2549-56.
28. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils*. Blood, 1994. **83**(6): p. 1640-9.
29. Jacobsen, L.C., et al., *Arginase I is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils*. Blood, 2007. **109**(7): p. 3084-7.
30. Cane, S. and V. Bronte, *Detection and functional evaluation of arginase-1 isolated from human PMNs and murine MDSC*. Methods Enzymol, 2020. **632**: p. 193-213.
31. Borregaard, N., L.J. Miller, and T.A. Springer, *Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1204-6.
32. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
33. Muller, W.A., *Getting leukocytes to the site of inflammation*. Vet Pathol, 2013. **50**(1): p. 7-22.
34. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 49-58.
35. Sundd, P., et al., *'Slings' enable neutrophil rolling at high shear*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 399-403.
36. McEver, R.P. and C. Zhu, *Rolling cell adhesion*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 363-96.

37. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 181-218.
38. Li, X., et al., *The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote Candida albicans clearance*. *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(6): p. 603-15.
39. Kennedy, A.D., et al., *Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(2): p. 467-78.
40. Trinchieri, G. and A. Sher, *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(3): p. 179-90.
41. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 549-59.
42. Muller, I., et al., *Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms?* *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 522-30.
43. Boudaly, S., *Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**: p. 1589-95.
44. Charmoy, M., et al., *Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(2): p. e1000755.
45. Yang, D., et al., *Alarmins link neutrophils and dendritic cells*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 531-7.
46. Sporri, R., et al., *A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7121-30.
47. Soehnlein, O., C. Weber, and L. Lindbom, *Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 538-46.
48. Scapini, P., F. Bazzoni, and M.A. Cassatella, *Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils*. *Immunol Lett*, 2008. **116**(1): p. 1-6.
49. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(3): p. e1004651.
50. Grecian, R., M.K.B. Whyte, and S.R. Walmsley, *The role of neutrophils in cancer*. *Br Med Bull*, 2018. **128**(1): p. 5-14.
51. Wu, L., S. Saxena, and R.K. Singh, *Neutrophils in the Tumor Microenvironment*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1224**: p. 1-20.
52. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(3): p. 183-94.
53. Wu, P., et al., *gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer*. *Immunity*, 2014. **40**(5): p. 785-800.
54. Sato, T., et al., *Neutrophil elastase and cancer*. *Surg Oncol*, 2006. **15**(4): p. 217-22.
55. Houghton, A.M., et al., *Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth*. *Nat Med*, 2010. **16**(2): p. 219-23.



56. Gong, L., et al., *Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase*. Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 154.
57. Nawa, M., et al., *Growth effect of neutrophil elastase on breast cancer: favorable action of sivelestat and application to anti-HER2 therapy*. Anticancer Res, 2012. **32**(1): p. 13-9.
58. Wada, Y., et al., *Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF-alpha, PDGF and VEGF in esophageal cell lines*. Oncol Rep, 2007. **17**(1): p. 161-7.
59. Wada, Y., et al., *Sivelestat, a specific neutrophil elastase inhibitor, suppresses the growth of gastric carcinoma cells by preventing the release of transforming growth factor-alpha*. Cancer Sci, 2006. **97**(10): p. 1037-43.
60. Gaida, M.M., et al., *Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors*. Eur J Immunol, 2012. **42**(12): p. 3369-80.
61. Galdiero, M.R., et al., *Roles of neutrophils in cancer growth and progression*. J Leukoc Biol, 2018. **103**(3): p. 457-464.
62. Wilson, T.J., et al., *Cathepsin G-mediated enhanced TGF-beta signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1*. Cancer Lett, 2010. **288**(2): p. 162-9.
63. Yui, S., et al., *Neutrophil cathepsin G, but not elastase, induces aggregation of MCF-7 mammary carcinoma cells by a protease activity-dependent cell-oriented mechanism*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 971409.
64. Morimoto-Kamata, R., et al., *Cathepsin G induces cell aggregation of human breast cancer MCF-7 cells via a 2-step mechanism: catalytic site-independent binding to the cell surface and enzymatic activity-dependent induction of the cell aggregation*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 456462.
65. Shabani, F., J. McNeil, and L. Tippet, *The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs*. Free Radic Res, 1998. **28**(2): p. 115-23.
66. De Larco, J.E., B.R. Wuertz, and L.T. Furcht, *The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 4895-900.
67. Deryugina, E.I., et al., *Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment*. Neoplasia, 2014. **16**(10): p. 771-88.
68. Coussens, L.M., et al., *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 481-90.
69. Acuff, H.B., et al., *Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 259-66.

70. Tecchio, C., et al., *On the cytokines produced by human neutrophils in tumors*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(3): p. 159-70.
71. Imai, Y., et al., *Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(2): p. 287-93.
72. Chawla, A., et al., *Neutrophil elastase enhances antigen presentation by upregulating human leukocyte antigen class I expression on tumor cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(6): p. 741-51.
73. Ai, S., et al., *Angiogenic activity of bFGF and VEGF suppressed by proteolytic cleavage by neutrophil elastase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **364**(2): p. 395-401.
74. Scapini, P., et al., *CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 5034-40.
75. Amarante-Mendes, G.P. and T.S. Griffith, *Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond*. *Pharmacol Ther*, 2015. **155**: p. 117-31.
76. Brincks, E.L., M.C. Risk, and T.S. Griffith, *PMN and anti-tumor immunity-the case of bladder cancer immunotherapy*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(3): p. 183-9.
77. van Egmond, M. and J.E. Bakema, *Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(3): p. 190-9.
78. Tanaka, H., et al., *Treatment with IFNalpha in vivo up-regulates serum-soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (sTRAIL) levels and TRAIL mRNA expressions in neutrophils in chronic myelogenous leukemia patients*. *Eur J Haematol*, 2007. **78**(5): p. 389-98.
79. Tecchio, C., et al., *IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3837-44.
80. Eruslanov, E.B., et al., *Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(12): p. 5466-80.
81. Dallegri, F., et al., *Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1*. *Inflammation*, 1991. **15**(1): p. 15-30.
82. Zivkovic, M., et al., *Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils*. *Biofactors*, 2005. **24**(1-4): p. 305-12.
83. Ottonello, L., et al., *Chimaeric Lym-1 monoclonal antibody-mediated cytotoxicity by neutrophils from G-CSF-treated patients: stimulation by GM-CSF and role of Fc gamma -receptors*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(3): p. 463-9.
84. Schneider-Merck, T., et al., *Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular*

- cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 512-20.
85. Valerius, T., et al., *Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. Blood*, 1993. **82**(3): p. 931-9.
  86. Bakema, J.E., et al., *Targeting FcalphaRI on polymorphonuclear cells induces tumor cell killing through autophagy. J Immunol*, 2011. **187**(2): p. 726-32.
  87. Otten, M.A., et al., *FcR gamma-chain dependent signaling in immature neutrophils is mediated by FcalphaRI, but not by FcgammaRI. J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 2918-24.
  88. Jablonska, J., et al., *Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. J Clin Invest*, 2010. **120**(4): p. 1151-64.
  89. Granot, Z. and J. Jablonska, *Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 701067.
  90. Eruslanov, E.B., S. Singhal, and S.M. Albelda, *Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap. Trends Cancer*, 2017. **3**(2): p. 149-160.
  91. Templeton, A.J., et al., *Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(6): p. dju124.
  92. Dumitru, C.A., et al., *Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(8): p. 1155-67.
  93. Berry, R.S., et al., *High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0188799.
  94. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature*, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
  95. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 925135.
  96. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 549-57.
  97. Lazarevic, V., et al., *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. Nat Immunol*, 2011. **12**(1): p. 96-104.
  98. Hwang, E.S., et al., *T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. Science*, 2005. **307**(5708): p. 430-3.
  99. Thierfelder, W.E., et al., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. Nature*, 1996. **382**(6587): p. 171-4.

100. Djuretic, I.M., et al., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
101. Kohu, K., et al., *The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7817-24.
102. Mullen, A.C., et al., *Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 652-8.
103. Chiang, E.Y., et al., *Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease*. Nat Med, 2009. **15**(7): p. 766-73.
104. Williams, M.A., A.J. Tyznik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 890-3.
105. Wuest, T.Y., et al., *The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(4): p. 973-80.
106. Zhu, J., et al., *Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7276-81.
107. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
108. Zhu, J., et al., *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell Res, 2006. **16**(1): p. 3-10.
109. Zhu, J., et al., *Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 739-48.
110. Stritesky, G.L., et al., *The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development*. Immunity, 2011. **34**(1): p. 39-49.
111. Zhu, J., et al., *Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18214-9.
112. Kim, J.I., et al., *The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 745-51.
113. Rengarajan, J., et al., *Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression*. J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1003-12.
114. Steinke, J.W. and L. Borish, *Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res, 2001. **2**(2): p. 66-70.
115. Doucet, C., et al., *IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1421-33.

116. Martinez-Moczygamba, M. and D.P. Huston, *Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(4): p. 653-65; quiz 666.
117. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 425-56.
118. Little, F.F., W.W. Cruikshank, and D.M. Center, *Il-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(3): p. 347-52.
119. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
120. Fort, M.M., et al., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 985-95.
121. Kleinschek, M.A., et al., *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 161-70.
122. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
123. Staudt, V., et al., *Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 192-202.
124. Chen, T., et al., *Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1026.
125. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
126. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
127. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
128. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-487.
129. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
130. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
131. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
132. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
133. Leonard, W.J. and R. Spolski, *Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 688-98.

134. Vogelzang, A., et al., *A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells*. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 127-37.
135. Akiba, H., et al., *The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2340-8.
136. Bossaller, L., et al., *ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(7): p. 4927-32.
137. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. *J Exp Med*, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
138. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(11): p. 853-65.
139. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 324-35.
140. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
141. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation*. *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 579-91.
142. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(11): p. 1643-56.
143. Yoshimura, A. and G. Muto, *TGF-beta function in immune suppression*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011. **350**: p. 127-47.
144. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(1): p. 280-90.
145. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. *Immunity*, 2007. **26**(3): p. 371-81.
146. Takimoto, T., et al., *Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development*. *J Immunol*, 2010. **185**(2): p. 842-55.
147. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
148. Awasthi, A., et al., *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1380-9.
149. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. *Blood*, 2010. **116**(6): p. 935-44.

150. Apetoh, L., et al., *The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 854-61.
151. Pot, C., et al., *Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 797-801.
152. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
153. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
154. Jutel, M. and C. Akdis, *T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy*. Chem Immunol Allergy, 2008. **94**: p. 158-177.
155. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
156. Raphael, I., R.R. Joern, and T.G. Forsthuber, *Memory CD4(+) T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases*. Cells, 2020. **9**(3).
157. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
158. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
159. Sheridan, B.S. and L. Lefrancois, *Regional and mucosal memory T cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 485-91.
160. Schenkel, J.M. and D. Masopust, *Tissue-resident memory T cells*. Immunity, 2014. **41**(6): p. 886-97.
161. Jiang, X., et al., *Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 227-31.
162. Martin, M.D. and V.P. Badovinac, *Defining Memory CD8 T Cell*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2692.
163. Hamann, D., et al., *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1407-18.
164. Rodriguez, P.C., et al., *Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21123-9.
165. Burkhardt, J.K., E. Carrizosa, and M.H. Shaffer, *The actin cytoskeleton in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 233-59.
166. Feldmeyer, N., et al., *Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes*. Int Immunol, 2012. **24**(5): p. 303-13.

167. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
168. Pillay, J., et al., *Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(20): p. 3813-27.
169. Klemke, M., et al., *Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 404-13.
170. Malmberg, K.J., et al., *Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2595-601.
171. Schmielau, J. and O.J. Finn, *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4756-60.
172. Pillay, J., et al., *A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 327-36.
173. Mougiakakos, D., C.C. Johansson, and R. Kiessling, *Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3542-5.
174. Bank, U., et al., *Selective proteolytical cleavage of the ligand-binding chains of the IL-2-receptor and IL-6-receptor by neutrophil-derived proteases*. Adv Exp Med Biol, 1997. **421**: p. 231-42.
175. Bank, U., et al., *Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(11): p. 1277-87.
176. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
177. Nijnik, A., et al., *Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5788-98.
178. de Kleijn, S., et al., *IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72249.
179. Abi Abdallah, D.S., et al., *Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation*. Int Immunol, 2011. **23**(5): p. 317-26.
180. Radsak, M., et al., *Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation*. Immunology, 2000. **101**(4): p. 521-30.
181. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
182. Beauvillain, C., et al., *CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1196-204.



183. Beauvillain, C., et al., *Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 2965-73.
184. Duffy, D., et al., *Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells*. *Immunity*, 2012. **37**(5): p. 917-29.
185. Maletto, B.A., et al., *Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3094-102.
186. Bennouna, S. and E.Y. Denkers, *Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4845-51.
187. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
188. Tillack, K., et al., *T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses*. *J Immunol*, 2012. **188**(7): p. 3150-9.
189. Chertov, O., et al., *Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(6): p. 2935-40.
190. Grigat, J., et al., *Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 3958-65.
191. Yang, D., et al., *Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells*. *J Leukoc Biol*, 2000. **68**(1): p. 9-14.
192. Rodriguez-Garcia, M., et al., *Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects*. *Clin Immunol*, 2009. **131**(3): p. 374-84.
193. Blanco, P., et al., *Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus*. *Science*, 2001. **294**(5546): p. 1540-3.
194. Bi, B.Y., et al., *Effect of lactoferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T cell line*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 1997. **45**(4): p. 315-20.
195. Zimecki, M., et al., *Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes*. *Immunol Lett*, 1991. **30**(1): p. 119-23.
196. van der Does, A.M., et al., *The antimicrobial peptide hLF1-11 drives monocyte-dendritic cell differentiation toward dendritic cells that promote antifungal responses and enhance Th17 polarization*. *J Innate Immun*, 2012. **4**(3): p. 284-92.
197. Murray, P.J., *Amino acid auxotrophy as a system of immunological control nodes*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(2): p. 132-9.

198. Rath, M., et al., *Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 532.
199. Thomas, A.C. and J.T. Mattila, "*Of mice and men*": arginine metabolism in macrophages. Front Immunol, 2014. **5**: p. 479.
200. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem J, 1998. **336 ( Pt 1)**: p. 1-17.
201. Husson, A., et al., *Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle*. Eur J Biochem, 2003. **270(9)**: p. 1887-99.
202. Brosnan, M.E. and J.T. Brosnan, *Renal arginine metabolism*. J Nutr, 2004. **134(10 Suppl)**: p. 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
203. Castillo, L., et al., *Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90(16)**: p. 7749-53.
204. Boger, R.H., *The pharmacodynamics of L-arginine*. Altern Ther Health Med, 2014. **20(3)**: p. 48-54.
205. Baydoun, A.R., et al., *Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173(3)**: p. 940-8.
206. Closs, E.I., et al., *Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)*. J Membr Biol, 2006. **213(2)**: p. 67-77.
207. Werner, A., et al., *Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation*. Eur J Immunol, 2016. **46(1)**: p. 92-103.
208. Munder, M., *Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system*. Br J Pharmacol, 2009. **158(3)**: p. 638-51.
209. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, and A.C. Ochoa, *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. Blood, 2007. **109(4)**: p. 1568-73.
210. Werner, A., et al., *Reconstitution of T Cell Proliferation under Arginine Limitation: Activated Human T Cells Take Up Citrulline via L-Type Amino Acid Transporter 1 and Use It to Regenerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 864.
211. Ash, D.E., J.D. Cox, and D.W. Christianson, *Arginase: a binuclear manganese metalloenzyme*. Met Ions Biol Syst, 2000. **37**: p. 407-28.
212. Dizikes, G.J., et al., *Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141(1)**: p. 53-9.
213. Cama, E., et al., *Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal*. Biochemistry, 2003. **42(28)**: p. 8445-51.
214. Morris, S.M., Jr., *Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 87-105.

215. Jenkinson, C.P., W.W. Grody, and S.D. Cederbaum, *Comparative properties of arginases*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1996. **114**(1): p. 107-32.
216. Grzywa, T.M., et al., *Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 938.
217. Rodriguez, P.C., et al., *L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes*. *J Immunol*, 2003. **171**(3): p. 1232-9.
218. Munder, M., et al., *Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(7): p. 3771-7.
219. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): p. 253-68.
220. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. *J Immunol*, 2009. **182**(8): p. 4499-506.
221. Suer Gokmen, S., et al., *Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma*. *Cancer Biochem Biophys*, 1999. **17**(1-2): p. 125-31.
222. Singh, R., et al., *Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(12): p. 3305-12.
223. Steggerda, S.M., et al., *Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment*. *J Immunother Cancer*, 2017. **5**(1): p. 101.
224. Strohl, W.R. and M. Naso, *Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells*. *Antibodies (Basel)*, 2019. **8**(3).
225. Sin, Y.Y., et al., *Arginase-1 deficiency*. *J Mol Med (Berl)*, 2015. **93**(12): p. 1287-96.
226. Abdelkawy, K.S., K. Lack, and F. Elbarbry, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Promising Arginase Inhibitors*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2017. **42**(3): p. 355-370.
227. Di Costanzo, L., et al., *Inhibition of human arginase I by substrate and product analogues*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **496**(2): p. 101-8.
228. Havlinova, Z., et al., *Comparative pharmacokinetics of N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine, an arginase inhibitor, after single-dose intravenous, intraperitoneal and intratracheal administration to brown Norway rats*. *Xenobiotica*, 2013. **43**(10): p. 886-94.
229. Havlinova, Z., et al., *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of arginase inhibitor Nomega-hydroxy-nor-L-arginine, and its effect on plasma amino acids concentrations in Wistar rats*. *Gen Physiol Biophys*, 2014. **33**(2): p. 189-98.

230. Bronte, V., et al., *Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1257-68.
231. Munder, M., et al., *Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1627-34.
232. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
233. Secondini, C., et al., *Arginase inhibition suppresses lung metastasis in the 4T1 breast cancer model independently of the immunomodulatory and anti-metastatic effects of VEGFR-2 blockade*. Oncoimmunology, 2017. **6**(6): p. e1316437.
234. Renz-Polster, H. and S. Krautzig, *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4 ed. 2008, München.
235. Lopes, R., et al., *The Immune Microenvironment in Multiple Myeloma: Friend or Foe?* Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
236. Wörmann, B., Driessen, C., Einsele, H., Goldschmidt, H., Gunsilius, E., Kortüm, M., Kröger, N., Ludwig, H., Mügge, L.O., Naumann, R., Pritzkeleit, R., Röllig, C., Scheid, C., Taverna, C., Weisel, K., Weißinger, F. *Multipl. Myelom - Leitlinie*. 2018.
237. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. Lancet Oncol, 2014. **15**(12): p. e538-48.
238. Munshi, N.C., et al., *Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2021. **384**(8): p. 705-716.
239. Zelle-Rieser, C., et al., *T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site*. J Hematol Oncol, 2016. **9**(1): p. 116.
240. Soneoka, Y., et al., *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(4): p. 628-33.
241. Weijtens, M.E., et al., *A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes*. Gene Ther, 1998. **5**(9): p. 1195-203.
242. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1597-601.
243. Technologies, A. *Seeding Adherent Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates*. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/Seeding%20Adherent%20Cells%20in%20XFp%20Cell%20Culture%20Miniplates.pdf>.
244. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(680-5).

245. Distler, U., et al., *Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics*. Nat Protoc, 2016. **11**(4): p. 795-812.
246. Bocker, S., et al., *SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification*. Bioinformatics, 2009. **25**(2): p. 218-24.
247. Duhrkop, K., et al., *Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. 12580-5.
248. Ludwig, M., L.F. Nothias, and K. Duhrkop, *Database-independent molecular formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC*. Nature Research, 2020.
249. Baurmann, H., et al., *Lymphocyte morphology in the peripheral blood film: proposal of a revised nomenclature and systematics*. Journal of Laboratory Medicine, 2011.
250. Griffiths, H.R., *ROS as signalling molecules in T cells--evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis*. Redox Rep, 2005. **10**(6): p. 273-80.
251. Si, Y., et al., *Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector function by MDSC in human cancer tissue*. Sci Immunol, 2019. **4**(40).
252. Cho, H., et al., *Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 15-23.
253. Raber, P., A.C. Ochoa, and P.C. Rodriguez, *Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives*. Immunol Invest, 2012. **41**(6-7): p. 614-34.
254. Vasquez-Dunddel, D., et al., *STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients*. J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1580-9.
255. Bak, S.P., et al., *Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-I activity for T cell suppression*. Mol Immunol, 2008. **46**(2): p. 258-68.
256. Czystowska-Kuzmicz, M., et al., *Small extracellular vesicles containing arginase-I suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3000.
257. Singel, K.L., et al., *Mature neutrophils suppress T cell immunity in ovarian cancer microenvironment*. JCI Insight, 2019. **4**(5).
258. Upreti, D., et al., *Change in CD3zeta-chain expression is an independent predictor of disease status in head and neck cancer patients*. Int J Cancer, 2016. **139**(1): p. 122-9.
259. Gruber, I.V., et al., *Down-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients*. Anticancer Res, 2008. **28**(2A): p. 779-84.

260. Ilie, M., et al., *Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer*. *Cancer*, 2012. **118**(6): p. 1726-37.
261. Azab, B., et al., *Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(1): p. 217-24.
262. Han, S., et al., *Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with neutrophil and T-cell infiltration and predicts clinical outcome in patients with glioblastoma*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 617.
263. Walsh, S.R., et al., *Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer*. *J Surg Oncol*, 2005. **91**(3): p. 181-4.
264. Campillo-Gimenez, L., et al., *Neutrophils in antiretroviral therapy-controlled HIV demonstrate hyperactivation associated with a specific IL-17/IL-22 environment*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **134**(5): p. 1142-52 e5.
265. Kang, C.K., et al., *Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity*. *Int J Infect Dis*, 2020. **97**: p. 313-321.
266. Kalfaoglu, B., et al., *T-Cell Hyperactivation and Paralysis in Severe COVID-19 Infection Revealed by Single-Cell Analysis*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 589380.
267. Vonwirth, V., et al., *Inhibition of Arginase 1 Liberates Potent T Cell Immunostimulatory Activity of Human Neutrophil Granulocytes*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 617699.
268. Appleman, L.J., et al., *Helper T cell anergy: from biochemistry to cancer pathophysiology and therapeutics*. *J Mol Med (Berl)*, 2001. **78**(12): p. 673-83.
269. Schirmacher, V., et al., *T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 201-8.
270. Kasakovski, D., L. Xu, and Y. Li, *T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 91.
271. Yang, M., et al., *Checkpoint molecules coordinately restrain hyperactivated effector T cells in the tumor microenvironment*. *Oncoimmunology*, 2020. **9**(1): p. 1708064.
272. Marro, B.S., et al., *Discovery of Small Molecules for the Reversal of T Cell Exhaustion*. *Cell Rep*, 2019. **29**(10): p. 3293-3302 e3.
273. Zhong, X.P., et al., *Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(9): p. 882-90.
274. Riese, M.J., et al., *Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases*. *Cancer Res*, 2013. **73**(12): p. 3566-77.
275. Colleluori, D.M. and D.E. Ash, *Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase*. *Biochemistry*, 2001. **40**(31): p. 9356-62.

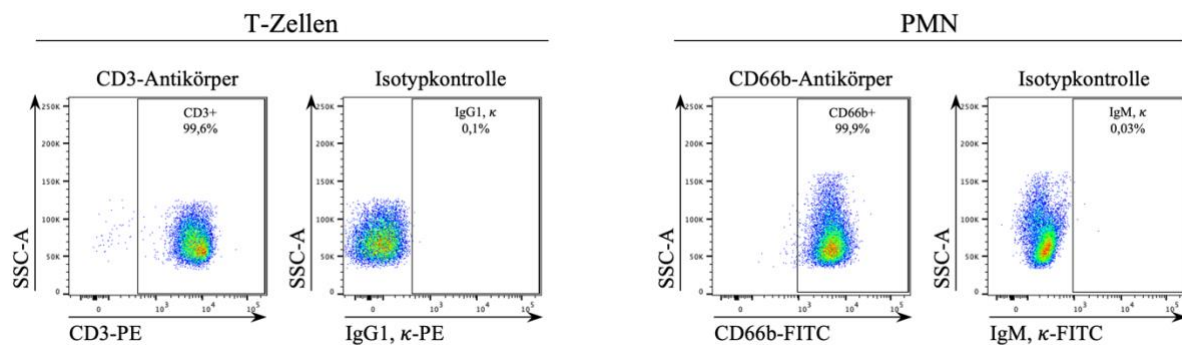
276. Geiger, R., et al., *L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity*. Cell, 2016. **167**(3): p. 829-842 e13.
277. Ng, K.P., et al., *The arginase inhibitor Nomega-hydroxy-nor-arginine (nor-NOHA) induces apoptosis in leukemic cells specifically under hypoxic conditions but CRISPR/Cas9 excludes arginase 2 (ARG2) as the functional target*. PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0205254.
278. Cemerski, S., et al., *Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19585-93.
279. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
280. Luo, Q., et al., *PD-L1-expressing neutrophils as a novel indicator to assess disease activity and severity of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**: p. 47.
281. Negorev, D., et al., *Human neutrophils can mimic myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC) and suppress microbead or lectin-induced T cell proliferation through artefactual mechanisms*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3135.
282. Schwedhelm, E., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **65**(1): p. 51-9.
283. Romero, M.J., et al., *Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease*. Cardiovasc Drug Rev, 2006. **24**(3-4): p. 275-90.
284. Ito, M., et al., *Thermal stability of amino acids in seafloor sediment in aqueous solution at high temperature*. Organic Geochemistry, 2006. **37**: p. 177-188.
285. Quintana, A., et al., *Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals*. Cell Calcium, 2009. **45**(2): p. 109-22.
286. Barda-Saad, M., et al., *Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 80-9.
287. Yokosuka, T. and T. Saito, *The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **340**: p. 81-107.
288. Chen, C.H., P.A. Campbell, and L.S. Newman, *MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **93**(2-3): p. 249-55.
289. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**(1): p. 1-222.
290. Fox, C.J., P.S. Hammerman, and C.B. Thompson, *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 844-52.

291. Chang, C.H., et al., *Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1239-51.
292. Mastelic-Gavillet, B., et al., *Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8(+) T cells*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 257.
293. Cao, Y., J.C. Rathmell, and A.N. Macintyre, *Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104104.
294. Brand, K.A. and U. Hermfisse, *Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 388-95.
295. Franchina, D.G., C. Dostert, and D. Brenner, *Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism*. Trends Immunol, 2018. **39**(6): p. 489-502.
296. Sukumar, M., et al., *Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 63-76.
297. Zhou, L., et al., *Upregulation of arginase activity contributes to intracellular ROS production induced by high glucose in H9c2 cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(3): p. 2728-36.
298. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 989-99.
299. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
300. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
301. Munder, M., et al., *Cytotoxicity of tumor antigen specific human T cells is unimpaired by arginine depletion*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63521.
302. Barber, D.L., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 27-31.
303. Hassin, D., et al., *Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable*. Immunology, 2011. **133**(2): p. 190-6.
304. Radoja, S., et al., *CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5042-51.
305. Alam, A., et al., *Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1879-90.
306. Lawrence, C.P. and S.C. Chow, *Suppression of human T cell proliferation by the caspase inhibitors, z-VAD-FMK and z-IETD-FMK is independent of*

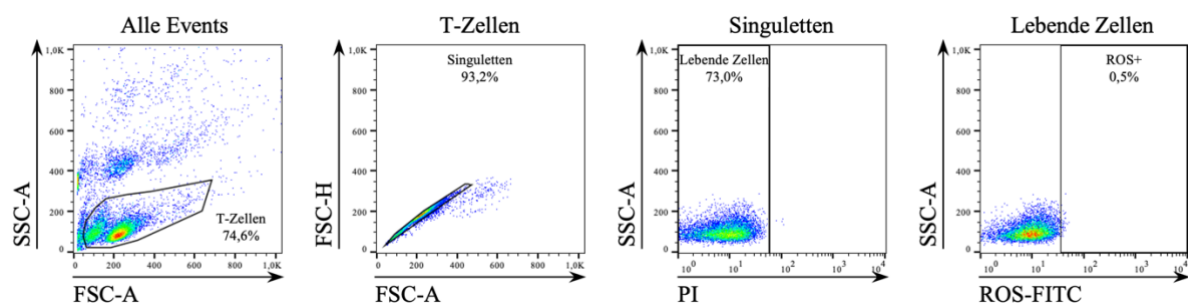


- their caspase inhibition properties.* Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **265**(1): p. 103-12.
307. Lawrence, C.P., et al., *The cathepsin B inhibitor, z-FA-FMK, inhibits human T cell proliferation in vitro and modulates host response to pneumococcal infection in vivo.* J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3827-36.
308. Di Liegro, C.M., G. Schiera, and I. Di Liegro, *H1.0 Linker Histone as an Epigenetic Regulator of Cell Proliferation and Differentiation.* Genes (Basel), 2018. **9**(6).
309. Michels, A.A. and O. Bensaude, *Hexim1, an RNA-controlled protein hub.* Transcription, 2018. **9**(4): p. 262-271.
310. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation.* Immunity, 2011. **35**(6): p. 871-82.
311. Marcel, Y.L., C. Vezina, and R.W. Milne, *Cholesteryl ester and apolipoprotein E transfer between human high density lipoproteins and chylomicrons.* Biochim Biophys Acta, 1983. **750**(2): p. 411-7.
312. Curtiss, L.K., T.M. Forte, and P.A. Davis, *Cord blood plasma lipoproteins inhibit mitogen-stimulated lymphocyte proliferation.* J Immunol, 1984. **133**(3): p. 1379-84.
313. Stefely, J.A., et al., *Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis.* Mol Cell, 2015. **57**(1): p. 83-94.

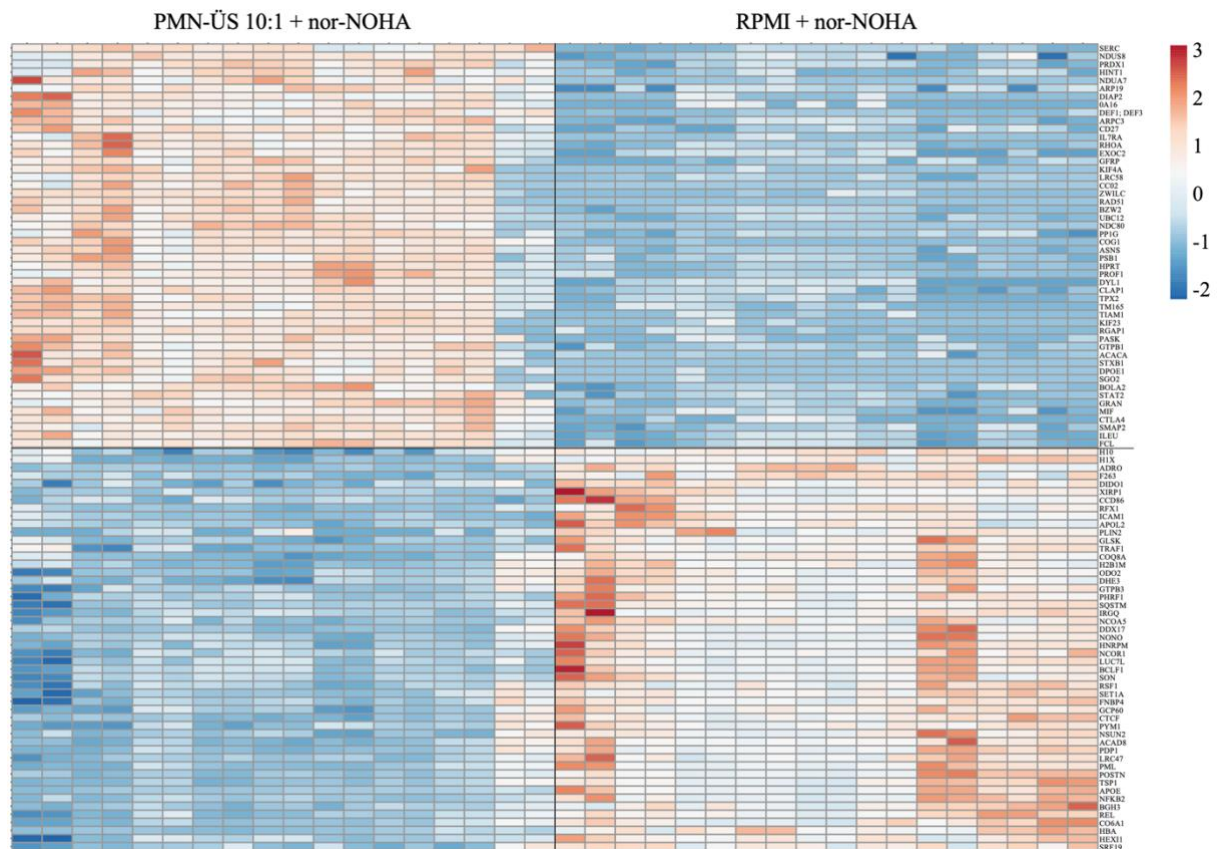
## 8. Anhang



**Abbildung A1: Hohe Reinheit der isolierten Zellen.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. T-Zellen wurden mit anti-CD3-PE und der zugehörigen Isotypkontrolle-PE gefärbt, PMN wurden mit anti-CD66b-FITC und der zugehörigen Isotypkontrolle-FITC gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS Diva II durchflusszytometrisch gemessen. Durchschnittliche Reinheit der T-Zellen:  $98,3 \pm 1,3$  %. Durchschnittliche Reinheit der PMN:  $98,9 \pm 1,0$  %.



**Abbildung A2: Gating Strategie der ROS-Messungen am Beispiel der ungefärbten Referenzprobe.** Humane T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut gesunder Spender isoliert. PMN wurden in verschiedenen PMN:T-Verhältnissen in Versuchsmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA oder 0,1 mM INCB001158 angesetzt und 72 h inkubiert. T-Zellen wurden in den zellfreien PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h stimuliert und anschließend wurde die ROS-Produktion in T-Zellen mittels *ROS Detection Assay Kit* von BioVision durchgeführt und im Durchflusszytometer gemessen. Die viable Population wurde nach einer Duplettendiskriminierung auf Propidium-negativ (= lebende Zellen) gated.



**Abbildung A3: Heatmap der TOP50 signifikant hoch bzw. runter regulierten Proteine.** Die Proteomicsanalyse der hyperaktivierten T-Zellen im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen mit den TOP50 hoch und TOP50 runter regulierten Proteinen. Gezeigt sind die Daten von n = 3 unabhängigen Experimenten, welche als Triplikate angesetzt wurden. Die Massenspektrometrie der Triplikate erfolgte in Duplikaten, so dass jeder Spender 6 Säulen aufweist.

## Danksagung

Zunächst möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, meinen tiefen Dank aussprechen. Durch eine für mich perfekte Mischung aus regelmäßigen Besprechungen mit viel motivierendem Input und der Freiheit meine wissenschaftlichen Ideen einzubringen, konnte ich nicht nur dieses Projekt, sondern auch meine Fähigkeiten gezielt ausbauen und erweitern. Vielen Dank für Deine immerwährende Unterstützung und Dein Vertrauen!

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. G. G. für seine Bereitschaft, mich als Zweitgutachter und Prüfer zu unterstützen, bedanken.

Mein herzlicher Dank geht außerdem an Prof. Dr. S. T. und Dr. M. W.: bei komplexen Fragestellungen rund um Proteom- und Metabolomanalysen und bei der Auswertung der Daten konnte ich mich immer auf euch verlassen. Vielen Dank auch, dass ihr mit meinen Projekten immer mitgefiebert habt und euch über jeden Fortschritt gefreut habt.

Besonders bei Dr. A. W. möchte ich mich für die erstklassige Betreuung vor allem während meiner Anfangszeit bedanken. Sie war immer sehr hilfsbereit und sorgte für eine freundschaftlich-angenehme Arbeitsatmosphäre. Auch den beiden Medizinstudentinnen, V. V. und S. L., danke ich für ihre fleißige Arbeit im Labor und beim Verfassen der beiden Manuskripte. Vor allem Dir, S., danke ich sehr, dass du mir in der Endphase meiner Doktorarbeit den Rücken freigehalten und die Forschung der AG mit Deinem Ehrgeiz und Fleiß vorangetrieben hast. Auch E. A. soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Durch ihre langjährige Erfahrung trat sie bei Problemen ein ums andere Mal in gewohnter Hilfsbereitschaft in Erscheinung. Ihre gut gelaunte und belebende Art übertrug sich dabei nicht selten auf alle anderen Kollegen.

Meine tief empfundene Dankbarkeit gilt meiner Familie. Sie haben mich während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit unterstützt und an mich geglaubt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Verlobten, Dr. Dr. T.-O. B., von ganzem Herzen bedanken. Durch seine liebevolle Art ist er eine sehr große Unterstützung und seine eiserne Disziplin ist mir stets ein Vorbild.

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name Yagmur Bülbül

### BERUFLICHER WERDEGANG

---

04/2018 – 08/2021 Doktorand an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
*Charakterisierung einer neuartigen T-Zell Stimulation durch humane neutrophile Granulozyten – III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz*

### SCHULE UND STUDIUM

---

04/2016 – 03/2018 Masterstudium Biomedizinische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz – Master of Science (1,8)  
*Die Rolle des ER Stress und der Autophagie unter Arginindepletion und Canavaninsupplementierung in humanen Myelomzellen – III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz*

08/2015 – 03/2016 Masterstudium mit Schwerpunkt Polymerchemie am Polymer Science & Engineering Department der University of Massachusetts, Amherst /USA

04/2012 – 07/2015 Bachelorstudium Biomedizinische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz – Bachelor of Science (1,9)  
*Synthese neuer Polyphosphoramidate – Max-Planck-Institut für Polymerforschung*