

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

**Untersuchungen zur
Arginin-abhängigen Aktivierung
humaner T-Lymphozyten
durch neutrophile Granulozyten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Verena Maria Vonwirth
geboren in Grünstadt

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 03. November 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
1. Einleitung	9
2. Literaturdiskussion	13
2.1. Das humane Immunsystem	13
2.1.1. T-Lymphozyten	16
2.1.1.1. Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten	16
2.1.1.2. Aktivierungs- und Oberflächenproteine	18
2.1.1.3. Metabolismus der T-Lymphozyten	21
2.1.1.4. Zytokin-Stoffwechsel	22
2.1.2. Granulozyten	23
2.1.2.1. Einteilung der Granulozyten	23
2.1.2.2. Funktion von Granulozyten im Immunsystem	24
2.1.2.3. Zytokine der Granulozyten	29
2.2. Das Immunsystem unter Einfluss von Tumoren	30
2.2.1. Die Rolle der Granulozyten in Tumoren	31
2.2.1.1. Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN)	35
2.2.2. Myeloische Suppressor-Zellen (MDSC)	35
2.3. Arginin-Stoffwechsel	38
3. Material und Methoden	41
3.1. Material	41
3.1.1. Chemikalien	41
3.1.2. Kits	43
3.1.3. Medien	44
3.1.4. Lösungen und Puffer	45
3.1.5. Antikörper	47
3.1.6. Zelllinien	48
3.1.7. Verbrauchsmaterialien	48

4.1.6.	Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand bei Arginin-Supplementation	82
4.1.7.	Proliferation der T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der PMN	85
4.1.8.	Arginin-Konzentration im Medium nach PMN- und T-Lymphozyten-Inkubation	88
4.1.9.	Proliferation der T-Lymphozyten nach kurzen Inkubationen der PMN	90
4.1.10.	Proliferations-Induktion der T-Lymphozyten durch aktivierte Granulozyten	93
4.2.	Proliferation der T-Lymphozyten in Kokultur mit PMN	96
4.2.1.	[³ H]-Thymidin-Assay der direkten Kokultur von T-Lymphozyten und PMN	96
4.2.2.	Transwell-Kultur	97
4.3.	Aktivierung der T-Lymphozyten durch PMN	100
4.3.1.	Steigerung der Interferon- γ -Sekretion	100
4.3.2.	Expression von Aktivierungs- und Oberflächenproteinen	102
4.3.3.	Zytotoxizität	110
4.3.3.1.	Proliferation der transduzierten T-Lymphozyten	110
4.3.3.2.	Zytotoxizität der T-Lymphozyten	112
4.4.	Einfluss von PMN-Überstand auf die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien	118
4.5.	Mechanismus der Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN-Überstand	121
4.5.1.	Zytokin-Sekretion der PMN	121
4.5.2.	Proliferation der T-Lymphozyten bei Zugabe von PMN-sezernierten Zytokinen	125
5.	Diskussion	127
5.1.	Interaktion von PMN und T-Lymphozyten	127
5.2.	Suppression der T-Lymphozyten durch PMN	129
5.3.	Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN	133
5.3.1.	Proliferation	133
5.3.2.	Aktivierungs- und Erschöpfungs-Oberflächenmarker	138
5.3.3.	Zytokin-Sekretion	139
5.3.4.	Zytotoxizität	140
5.4.	Mechanismus der Hyperaktivierung	142
5.4.1.	Arginin-Stoffwechsel	146
5.4.2.	Granula der PMN	147
5.4.3.	Zytokine	148
5.5.	Therapeutische Möglichkeiten	151

6. Zusammenfassung	153
Literaturverzeichnis	155
A. Anhang	177
A.1. Reinheitskontrollen	177
A.2. CFSE-Assay	179
A.3. <i>Human cytokine array</i>	181
B. Danksagung	183

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthase
CAT-1	<i>cationic amino acid transporter 1</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>

Inhaltsverzeichnis

GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidyl-Inositol-verankertes Glykoprotein
HDN	<i>high-density neutrophils</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HVEM	<i>herpes virus entry mediator</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
iNOS	<i>inducible nitric oxide sythase</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ISPF	α -Isonitrosopropiophenon
KAS	Kationische Aminosäuren
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LAT-1	<i>l-type/large neutral amino acid transporter 1</i>
LDN	<i>low-density neutrophils</i>
Mac-1	<i>macrophage antigen 1</i>
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPO	Myeloperoxidase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nor-NOHA	N ω -Hydroxy-nor-L-Arginin
OKT-3	Muromonab-CD3
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>

PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PECy-7	Phycoerythrin und Cyanine-7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophil</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLC	<i>solute carrier</i>
SNAP	<i>synaptosomal-associated protein</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TAN	<i>tumor-associated neutrophils</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TIGIT	<i>t cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIM-3	<i>t cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VAMP-2	<i>vesicle-associated membrane Protein 2</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Tabellenverzeichnis

1.	Bestandteile der Granula der Granulozyten.	27
2.	Verwendete Chemikalien.	41
3.	Verwendete Kits.	43
4.	Verwendete Medien.	44
5.	Verwendete Lösungen und Puffer.	45
6.	Verwendete Antikörper.	47
7.	Eingesetzte Zelllinien.	48
8.	Verwendete Materialien.	48
9.	Verwendete Geräte.	49
10.	Zellpopulationen mit ihren zellspezifischen Antikörpern.	56
11.	Verwendete Lösungen und Puffer.	65

Abbildungsverzeichnis

1.	Das angeborene und adaptive Immunsystem.	14
2.	Aktivierung von T-Lymphozyten.	17
3.	Die Expression der Oberflächenproteine der T-Lymphozyten.	20
4.	Entstehung der verschiedenen Granula der PMN.	25
5.	Suppression der T-Lymphozyten durch die Arginase 1.	28
6.	Die pro-tumoralen Eigenschaften der PMN unter dem Einfluss der Tumor-Umgebung.	32
7.	Die immun-supprimierenden Eigenschaften der MDSC unter dem Einfluss der Tumor-Umgebung.	36
8.	Metabolisierung von Arginin aus Citrullin.	38
9.	Dichteauftrennung von heparinisiertem humanem Vollblut.	54
10.	Schematischer experimenteller Aufbau des [³ H]-Thymidin-Assays.	70
11.	Beispiel-Diagramm zur Ergebnisdarstellung.	71
12.	[³ H]-Thymidin-Assay: Proliferation von T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA.	72
13.	CFSE-Assay: Proliferation von T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA.	75
14.	Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne CB-1158.	77
15.	Proliferation der CD4 ⁺ - bzw. CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.	79
16.	Proliferation der T-Lymphozyten in definierter Arginase-Aktivität.	81
17.	Proliferation der T-Lymphozyten in Medien verschiedener Arginin-Konzentrationen.	84
18.	Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überständen verschiedener Inkubationszeiten.	86
19.	Arginin-Depletion im Verlauf der Inkubation der PMN und T-Lymphozyten.	89
20.	Schematischer experimenteller Aufbau des [³ H]-Thymidin-Assays nach kurzen Inkubationen der PMN.	91
21.	Proliferation der T-Lymphozyten nach kurzer Inkubation der PMN.	92
22.	Proliferation der T-Lymphozyten in aktiviertem PMN-Überstand.	94
23.	Proliferation der T-Lymphozyten in direkter Kokultur.	97

24.	Proliferation der T-Lymphozyten in Transwell-Kokultur.	98
25.	Vergleich der Interferon- γ -Sekretion und -Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand.	101
26.	Expression von Oberflächenproteinen der T-Lymphozyten nach Inkubation. . .	106
27.	Antigen-spezifische Proliferation der mit dem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten.	111
28.	Experimenteller Aufbau des Zytotoxizitäts-Assays.	113
29.	Antigen-spezifische Zytotoxizität der mit dem T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten: Kristallviolett-Färbung.	115
30.	Antigen-spezifische Zytotoxizität der mit dem T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten: quantitative Auswertung des Überlebens der SAOS-2-Zellen. .	116
31.	Proliferationen von Tumorzelllinien in PMN-Überstand.	119
32.	<i>Human cytokine array</i> : Testmembranen mit detektierten Zytokinen.	122
33.	<i>Human cytokine array</i> : Quantifizierung der von T-Lymphozyten sezernierten Zytokine.	123
34.	<i>Human cytokine array</i> : Quantifizierung der von den PMN sezernierten Zytokine.	124
35.	Proliferation der T-Lymphozyten unter Zugabe von rekombinanten Zytokinen. .	125
36.	Mechanismen der Suppression der T-Lymphozyten durch PMN.	130
37.	Mechanismen des Einflusses der PMN auf die T-Lymphozyten.	144
38.	Reinheitskontrolle: PMN.	177
39.	Reinheitskontrolle: T-Lymphozyten.	178
40.	CFSE-Assay: Kontrollbedingungen.	179
41.	CFSE: alle PMN:T-Verhältnisse zusammengefasst.	180
42.	Zuordnung der detektierten Doubletten.	182

1. Einleitung

„In Deutschland sind im Jahr 2019 rund 231.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung gestorben – 125.000 Männer und 106.000 Frauen. [...] Demnach war Krebs die Ursache für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland. Dieser Anteil habe sich innerhalb der vergangenen 20 Jahre kaum verändert, auch wenn die Zahl der Krebstoten seit 1999 um rund zehn Prozent gestiegen ist. Ein Fünftel aller an Krebs Verstorbenen war jünger als 65 Jahre.“¹

Diese erschreckend hohen Zahlen an Todesfällen aufgrund von Tumorerkrankungen legen die Bedeutsamkeit dar, welche die Tumorthherapie in der modernen Forschung einnimmt. Dennoch ist der Menschheit bis heute im Vergleich zu anderen Krankheits-Gruppen kein wirklicher Durchbruch in der Heilung und Therapie von Tumoren in der kompletten Breite der verschiedenen Tumor-Entitäten gelungen. Dies zeigt sich im prozentualen Anstieg der Todeszahlen an den gesamten Todesfällen.

Die moderne medikamentöse Tumorthherapie basiert auf drei Säulen:

- Chemotherapie
- zielgerichtete Therapie
- Immuntherapie oder -modulation

Durch die Innovationen und Entdeckungen der letzten Jahre in den Bereichen der Molekular-diagnostik konnten vor allem in der zielgerichteten Therapie und in der Immuntherapie große Fortschritte erzielt werden.

Auch die hämatologischen Erkrankungen sind dadurch heute deutlich besser und effizienter zu therapieren. Beim multiplen Myelom beispielsweise werden moderne Substanzklassen wie Proteasomen-Inhibitoren, Immunmodulatoren und monoklonale Antikörper (AK) mit klassischer Chemotherapie (individuell auch als Hochdosiskonzepte mit Transplantation) kombiniert [1, Seite 87]. So kann das durchschnittliche Überleben deutlich erhöht und die Zeit bis zum Rezidiv signifikant verlängert werden. Dennoch ist die Verbesserung und Erweiterung

¹Deutsches Ärzteblatt: News, Vermischtes, Krebs ist für ein Viertel aller Todesfälle verantwortlich. 08.11.2022

1. Einleitung

der Myelom-Therapie ein wichtiger Fokus der Forschung. Ein Augenmerk liegt dabei auf der Aktivierung der T-Lymphozyten und ihrer Schulung zur optimalen Erkennung der Tumorzellen.

T-Lymphozyten sind eine der Schlüsselzellen in der humanen Immunabwehr. Sie können Fremdes von Körpereigenem unterscheiden. Nach dem Erkennen des Pathogens oder der malignen Zelle können zytotoxische T-Lymphozyten selbst Pathogene und maligne Zellen eliminieren. Außerdem aktivieren sie andere Immunzellen, zum Beispiel B-Lymphozyten, die sich zu Plasmazellen differenzieren und mit der Antikörper-Sekretion beginnen können. Das gesunde humane Immunsystem überprüft kontinuierlich den Organismus und eliminiert Fremdes. Eine Lücke in dieser Immunabwehr ermöglicht potentiell die Manifestation von Tumorerkrankungen. Dabei versagen die T-Lymphozyten unter anderem im Erkennen von malignen Zellen als Fremd sowie in der Aktivierung des Immunsystems. Dies gilt nicht nur für hämatologische Erkrankungen, sondern für alle Tumorentitäten.

Die ineffektive Immunabwehr der T-Lymphozyten basiert entweder auf Defekten der Immunzellen oder auf Abwehrmechanismen der Tumorzellen. Durch die Tumorzellen wird das humane Immunsystem grundlegend beeinflusst. Die Immunzellen werden in ihrer Aktivität und Effektivität inhibiert. Dies geschieht unter anderem durch den Tumor selbst und das unmittelbare Tumor-Mikromilieu. Hier werden verschiedene Zytokine und Chemokine freigesetzt, die inhibitorische Wirkungen auf die Immunzellen ausüben. Des Weiteren induzieren Tumorzellen die Expansion von regulatorischen T-Lymphozyten und sogenannten myeloiden Suppressor-Zellen (*myeloid derived suppressor cells*: MDSC). Auch für physiologische neutrophile Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*: PMN) sind Tumor-induzierte inhibitorische Interaktionen mit Zellen des adaptiven Immunsystems beschrieben. Mit Hilfe dieser indirekten starken Inhibition durch den Tumor ist es den T-Lymphozyten nicht mehr möglich, die malignen Zellen zu erkennen und zu eliminieren [2].

Die inhibitorischen Interaktionen zwischen den MDSC beziehungsweise PMN und T-Lymphozyten in Tumorerkrankungen aber auch im Gesunden sind mittlerweile eines der zentralen Themen der tumorimmunologischen Forschung. Die Inhibition der T-Lymphozyten konnte unter anderem auf die Sekretion des Enzyms Arginase 1 zurück geführt werden [3]. Es wird von PMN und MDSC sezerniert oder im Rahmen von Zelltod freigesetzt und depletiert Arginin in der Umgebung. Durch die Arginin-Depletion wird die Proliferation und die Aktivität der T-Lymphozyten gehemmt. Die T-Lymphozyten arretieren im Zellzyklus zwischen der G₀- und G₁-Phase [4]. Durch die pharmakologische Inhibition der Arginase 1 der PMN durch Arginase-Inhibitoren wie N ω -Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA) oder CB-1158 konnte die ursprüngliche Aktivität und Proliferation der T-Lymphozyten wiederhergestellt werden.

Ein weiterer inhibitorischer Mechanismus der PMN ist die direkte inhibitorische Zell-Zell-Interaktion der PMN und der T-Lymphozyten. Außerdem sezernieren PMN sogenannte *reactive oxygen species* (ROS) und anti-inflammatorische Zytokine. Andererseits agieren PMN auch konträr immun-stimulierend und können T-Lymphozyten und andere Immunzellen aktivieren [5, 6, 7].

Die Wirkung der MDSC auf das Immunsystem scheint klar inhibitorisch zu sein, während die Rolle der PMN noch nicht eindeutig eingeordnet werden kann. In dieser Arbeit wird deshalb die Interaktion zwischen PMN und T-Lymphozyten untersucht. Um inhibitorische Mechanismen zu eliminieren, wurde PMN-Überstand mit und ohne Arginase-Inhibitor zur Inkubation mit den T-Lymphozyten verwendet. Der Fokus der Untersuchungen wird auf die Proliferation, Aktivität und Zytotoxizität der T-Lymphozyten gelegt. Es wird der Einfluss des reinen PMN-Überstandes mit dem PMN-Überstand unter Arginase-Inhibition verglichen. Ist es unter diesen Umständen möglich eine aktivierende Komponente der PMN aufzuzeigen?

2. Literaturdiskussion

2.1. Das humane Immunsystem

Durch unsere Umwelt steht der Mensch in ständigem Kontakt zu Bakterien, Viren und anderen pathogenen Strukturen. Das Eindringen in den Organismus sowie die Wirkung dieser pathogenen Substanzen wird durch das humane Immunsystem verhindert und bekämpft. Es besteht aus dem angeborenen unspezifischen und dem adaptiven spezifischen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist bei Geburt bereits vollständig ausgebildet und verändert sich im Verlauf des Lebens nicht mehr. Es besteht aus vielfältigen physikalischen, chemischen und biologischen Barrieren. Eine physikalische Barriere ist zum Beispiel das verhornte Plattenepithel der Epidermis, welches das Eindringen von Pathogenen verhindert. In den Atemwegen werden Pathogene mit Hilfe der Zilien sogar aktiv aus dem Körper heraus befördert [8, Teil I].

Die Schleimhäute liefern neben der physikalischen Barriere zudem einen chemischen Schutz. Im Schleim sind Enzyme wie zum Beispiel das Lysozym enthalten, das direkt bakterizid wirkt, aber auch Säuren, die ein Milieu erzeugen, in dem Bakterien und Pathogene nicht überlebensfähig sind. Diese chemische Barriere wird durch Sekretion von den Zellen des Epithels selbst wie zum Beispiel den Belegzellen im Magen und auch von den im Blut zirkulierenden Immunzellen gebildet [8, Teil I].

Die Immunzellen bilden die biologische Barriere der angeborenen Immunabwehr. Zu ihnen gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie Antigen-präsentierende Zellen (APZ: dendritische Zellen). Die Immunzellen exprimieren eine begrenzte vererbte Anzahl von Muster-Erkennungs-Rezeptoren wie die *Toll-like*-Rezeptoren und Phagozytose-Rezeptoren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren werden zell-spezifische Mechanismen ausgelöst, um Pathogene zu eliminieren. Makrophagen beispielsweise können Pathogene über ihre Phagozytose-Rezeptoren direkt in die Apoptose leiten. Mittels der *Toll-like*-Rezeptoren können Pathogene erkannt werden. Sie induzieren die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Durch diese Zytokine werden wiederum vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten aktiviert. Zudem wirken sie chemotaktisch auf die eben genannten Zellen und rekrutieren sie zur Eliminierung der Pathogene [8, Teil I].

2. Literaturdiskussion

Jede Zelle des humanen Körpers präsentiert kontinuierlich zelleigene Proteinfragmente auf den *major histocompatibility complex* Rezeptoren (MHC). Über diese Rezeptoren können natürliche Killerzellen körpereigene von fremden Zellen unterscheiden. Wenn die natürlichen Killerzellen eine Zelle über ihre präsentierten Fragmente als körpereigen erkennen, wird kein Signal übertragen. Werden sie jedoch nicht erkannt oder wird von der Zelle gar kein MHC-I-Rezeptor exprimiert, gilt sie als körperfremd und wird in die Apoptose geleitet [8, Teil I].

Neben der direkten zellulären Immunantwort gibt es weitere humorale Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems. Die Immunzellen sezernieren Zytokine, Chemokine und natürliche Antikörper, die im Blut zirkulieren. Neben den oben beschriebenen Chemokinen, die chemotaktisch wirken, können diese Zytokine auch direkt die Apoptose induzieren oder sie indirekt durch die Aktivierung zytotoxischer Zellen auslösen. Natürliche Antikörper markieren die Pathogene zur leichteren Erkennung und Eliminierung für die Immunzellen. Außerdem können Proteine wie die akute Phase Proteine (zum Beispiel das C-reaktive Protein) Pathogene markieren und die Zellen der Immunabwehr (beispielsweise Makrophagen) sowie das Komplementsystem aktivieren. Letzteres ist eine Kaskade sich gegenseitig aktivierender Proteine, die im Zusammenspiel miteinander unter anderem in den Zellmembranen von Bakterien Poren erzeugen und so zum Tod der Bakterien führen [8, Teil I].

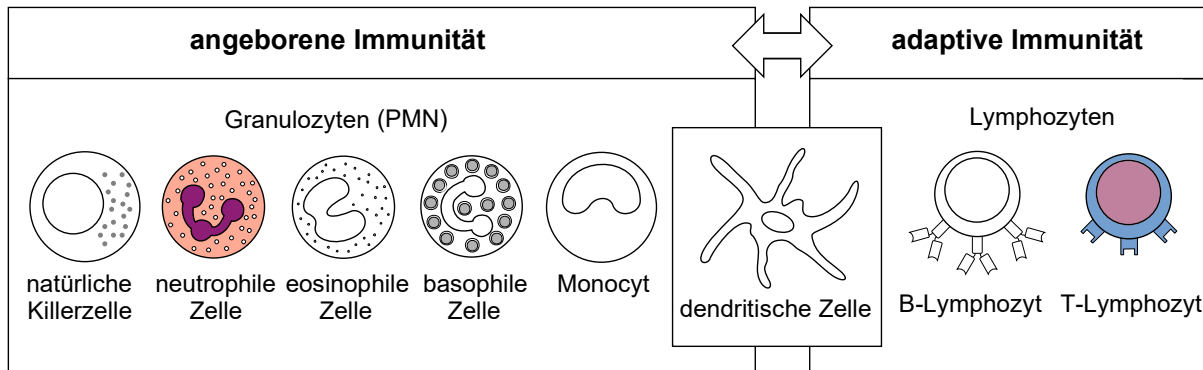


Abb. 1: Das angeborene und adaptive Immunsystem: Zu der angeborenen Immunabwehr gehören natürliche Killerzellen, Granulozyten und Monozyten. Granulozyten können nach ihren Granula-Inhalten weiter in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden. Zum adaptiven Immunsystem dagegen zählen die Lymphozyten. Sie werden in B- und T-Lymphozyten unterschieden. Die dendritischen Zellen stehen in vermittelnder Rolle für die Verbindung beider Systeme. Die farblich hervorgehobenen Zelltypen sollen in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehen [8, Abbildung verändert, Seite 24].

Die dendritischen Zellen bilden die Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (vergleiche Abbildung 1). Sie durchlaufen einen Reifungsprozess. In der Embryogenese präsentieren naive dendritische Zellen körpereigene Proteine für die Reifung des

angeborenen Immunsystems. Reife dendritische Zellen dagegen präsentieren die Antigene von körperfremden, potentiell schädlichen Proteinen. Zu diesen pathogenen Strukturen gehören die sogenannten *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). Wird ein PAMP durch einen *Toll-like*-Rezeptor erkannt, wird dieses Pathogen in die Zelle aufgenommen. Auf den MHC-Rezeptoren werden Pathogen-assoziierte Peptide für die T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems präsentiert. Durch diese Antigen-Präsentation sowie durch die Zytokine der humoralen Abwehr wird das adaptive Immunsystem aktiviert [8, Teil IV].

Genau wie im angeborenen Immunsystem lässt sich in der adaptiven Immunabwehr die zelluläre von der humoralen Abwehr unterscheiden. Auf zellulärer Ebene spielen hier vor allem die T- und B-Lymphozyten eine wichtige Rolle. T-Lymphozyten erkennen mit ihren T-Zell-Rezeptoren die, von den dendritischen Zellen präsentierten und von fremden Pathogenen stammenden, Peptide. T-Zell-Rezeptoren weisen variable Domänen auf und können in der Gesamtheit aller Zellen eine große Zahl an unterschiedlichen Pathogenen erkennen. Die Zusammensetzung der variablen Domänen unterscheidet sich zwischen den einzelnen T-Lymphozyten, sodass jede Zelle eine bestimmte Peptidsequenz optimal erkennen kann. Nach erfolgter Antigen-Erkennung kommt es zu einer starken Proliferation des passenden T-Lymphozyten. Anschließend rekrutieren die T-Lymphozyten weitere Immunzellen. Diese können Zellen des angeborenen Immunsystems sein, beispielsweise Granulozyten und Makrophagen, oder auch B-Lymphozyten. Werden letztere aktiviert, differenzieren sie zu Plasmazellen aus und beginnen mit der spezifischen Antikörperbildung. Die gebildeten Immunglobuline (Ig) bilden die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems. Sie markieren spezifisch die Pathogene und ermöglichen so die gezielte Elimination mittels Phagozytose durch die Zellen des angeborenen Immunsystems.

T- und B-Lymphozyten können nach erfolgreicher Immunabwehr zu sogenannten *memory*-Zellen ausdifferenzieren. Das bedeutet, dass sie nach dem Abschluss ihrer Aufgabe in der Immunabwehr in einen inaktiven, abwartenden Zustand übergehen. Sollte dasselbe Antigen im Körper erneut auftauchen, ermöglicht die Reaktivierung dieser Pathogen-spezifischen *memory*-Zellen eine sehr schnelle und effektive Immunabwehr [8, Teil IV].

Grundsätzlich lässt sich also festhalten, dass durch das angeborene Immunsystem eine rasche Immunantwort ermöglicht wird, die allerdings auf die Erkennung einer begrenzten Anzahl an vorbestimmten Pathogenen limitiert ist. Die Antwort des adaptiven Immunsystems dagegen tritt verzögert aber äußerst effektiv ein. Bei erneuter Infektion können *memory*-Zellen reaktiviert werden und die Immunreaktion erfolgt sofort. Das humane Immunsystem besteht aus einem komplexen Zusammenspiel von Zytokinen, Proteinen, Antikörpern und Zellen. Die angeborenen und adaptiven Anteile des Immunsystems sind dabei vielfach über Aktivierungs- und Hemmungs-Mechanismen untereinander verknüpft und arbeiten als Einheit zusammen.

2.1.1. T-Lymphozyten

2.1.1.1. Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten

Während der Embryogenese durchlaufen die T-Lymphozyten einen mehrstufigen Reifungsprozess. Durch negative Selektion werden zunächst solche T-Lymphozyten eliminiert, die mit ihren T-Zell-Rezeptoren körpereigene oder gar keine Proteine erkennen [9]. Die Proteine werden im Thymus durch APZ auf MHC-Rezeptoren präsentiert. Anschließend wird in der positiven Selektion überprüft, ob alle T-Lymphozyten mit ihren T-Zell-Rezeptoren regelrecht an die MHC-Rezeptoren der dendritischen Zellen binden. Die fehlerhaften T-Lymphozyten, die zu schwach oder zu stark binden, werden eliminiert [10]. Aus diesen zwei Selektionsprozessen resultieren die sogenannten naiven T-Lymphozyten. Für sie beginnt nach der Geburt die zweite Phase des Reifungsprozesses. Die APZ beginnen jetzt körperfremde Proteine zu präsentieren. Nach spezifischer Antigen-Erkennung differenzieren sich die T-Lymphozyten zu reifen Effektor-Zellen aus [8, Teil IV].

Die Effektor-Zellen der T-Lymphozyten werden hauptsächlich durch die Expression von zwei Oberflächenproteinen unterschieden: $CD4^+$ -T-Helferzellen (*cluster of differentiation*) und $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten. Dabei aktivieren die T-Helferzellen vor allem andere Immunzellen, während die zytotoxischen T-Lymphozyten Bakterien und Viren durch die Sekretion zytotoxischer Substanzen sowie verschiedener Zytokine eliminieren. Dazu gehören zum Beispiel Perforin, Granzym B, der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) [11]. Innerhalb dieser zwei Gruppen gibt es zudem sogenannte regulatorische T-Lymphozyten, die eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Immunantwort und der Selbst-Toleranz spielen. Dadurch können überschießende Immunantworten und Auto-Immunität verhindert werden [12, 13]. Definiert werden diese regulatorischen T-Lymphozyten durch die Expression von Oberflächenproteinen (zum Beispiel $CD4^+CD25^+$, $CD127^-$) und durch das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors *forkhead box protein 3* (Foxp3).

Die $CD4^+$ -T-Lymphozyten lassen sich darüber hinaus weiter unterteilen. Sie unterscheiden sich in ihrer Zytokin-Sekretion. Für die T_H1 -Zellen sind IL-2, Interferon- γ und der *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) typische Zytokine, wohingegen die T_H2 -Zellen die Interleukine 4, 5, 6, 10 und 13 sezernieren [9, 14, 15]. Einen kleineren Anteil bilden die T_H17 -Zellen, die hauptsächlich IL-17 und IL-22 sezernieren sowie die T_H9 -Zellen, die nach ihrem bevorzugt sezernierten Zytokin IL-9 benannt sind [16]. Neben der Zytokin-Sekretion führen T_H2 -Zellen mittels IL-5-Sekretion zu dem sogenannten Antikörper-*Shift* in Plasmazellen von IgM zu IgG und IgE [12, 17].

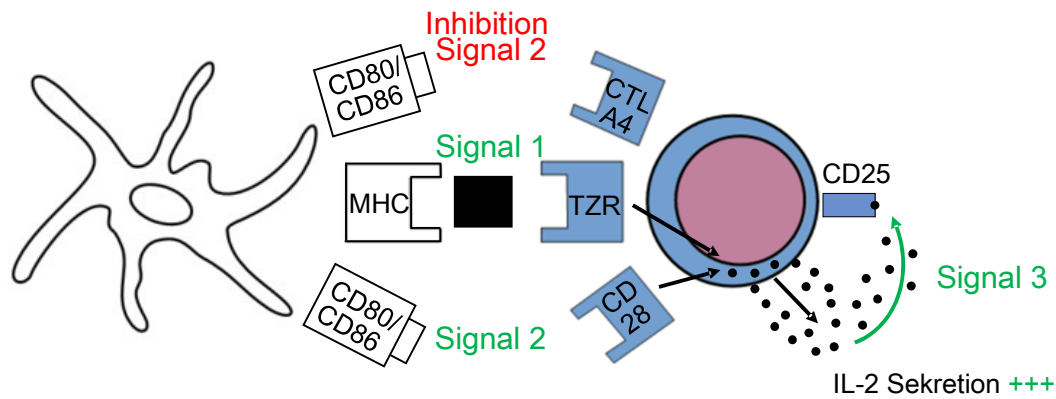


Abb. 2: Aktivierung von T-Lymphozyten: T-Lymphozyten werden in drei Schritten durch dendritische Zellen aktiviert. Zunächst bindet der T-Zell-Rezeptor an den MHC-Komplex der dendritischen Zelle. Dies ist das erste Signal. Dadurch wird die Bindung von CD80/CD86 der APZ an weitere Rezeptoren der T-Lymphozyten initiiert. Bindet CD80/CD86 an CD28, kommt es zur verstärkten Stimulation der IL-2-Sekretion der T-Lymphozyten. Das IL-2 bindet an seinen Rezeptor und aktiviert als drittes Signal die T-Lymphozyten. Bindet CTLA-4 an CD80/CD86, führt dies zu einem inhibitorischen Signal und es kommt zu keiner Aktivierung.

Vor der Ausdifferenzierung zu Effektor-Zellen müssen die T-Lymphozyten zunächst aktiviert werden. Diese Aktivierung läuft, wie in Abbildung 2 dargestellt, in drei Schritten ab. Dadurch gibt es mehrere Kontrollpunkte an denen fehlgeleitete T-Lymphozyten eliminiert werden können und die Gefahr von Autoimmunität wird minimiert.

- Das Erkennen des von den APZ auf den MHC-Rezeptoren präsentierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor der T-Lymphozyten führt zur Bindung beider Rezeptoren aneinander. CD4⁺-T-Lymphozyten binden dabei an den MHC-II-Rezeptor, während CD8⁺-T-Lymphozyten an den MHC-I-Rezeptor binden. Auf dem MHC-I-Rezeptor werden ursprünglich intrazellulär lokalisierte Proteinfragmente präsentiert. Im Gegensatz dazu präsentieren die APZ auf den MHC-II-Rezeptoren phagozytiertes Material [8, Teil I].
- Nach der Rezeptor-Antigen-Bindung vermitteln Korezeptoren der APZ (zum Beispiel CD80/CD86) die Bindung an einen kostimulierenden Rezeptor der T-Lymphozyten. Im Falle von CD80/CD86 handelt es sich um das Oberflächenprotein CD28. Die Bindung der kostimulierenden Rezeptoren wird als das zweite Signal bezeichnet.
- Dadurch kommt es zur Proliferation und zur Sekretion von IL-2 durch die T-Lymphozyten [9]. IL-2 dient dabei als autokriner Aktivator der T-Lymphozyten. Außerdem steigert IL-2 durch Bindung an den IL-2-Rezeptor (CD25) die Signalübertragung der T-Zell-Rezeptoren [11]. Dies führt in den T-Lymphozyten zu einer vermehrten Expression des Oberflächenproteins CD69 [18] als sehr frühes Zeichen ihrer Aktivierung.

2. Literaturdiskussion

Nach dieser primären Aktivierung wird die Differenzierung der T-Lymphozyten durch die Zytokine in ihrer unmittelbaren Umgebung bestimmt. Eine Differenzierung zu T_H1-Zellen wird durch IL-12, IL-23 und IL-27 induziert, während zum Beispiel IL-4 entscheidend ist für eine Differenzierung zu T_H2-Zellen [11, 19]. Der *transforming growth factor* β (TGF- β) und IL-23 induzieren die Entwicklung zu T_H17-Zellen [13]. Möglicherweise spielt TGF- β ebenfalls eine Rolle in der Differenzierung zu T_{reg}-Zellen, was allerdings noch nicht vollständig geklärt ist [12, 20]. Auch in der Entwicklung zu T_H9-Zellen sind TGF- β und IL-4 relevant [16].

2.1.1.2. Aktivierungs- und Oberflächenproteine

Die Aktivierung von T-Lymphozyten wird durch die vermehrte Expression verschiedener Oberflächenproteine angezeigt (vergleiche Abbildung 3). CD28, welches als kostimulierendes zweites Signal der T-Lymphozyten-Aktivierung fungiert, wird von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Überdies gibt es zwei weitere wichtige Oberflächenproteine, die eine Aktivierung anzeigen: CD25 und CD69.

Die Expression von CD69 wird als eine der ersten Veränderungen bei der Aktivierung der T-Zell-Rezeptoren angeregt. Dadurch wird die Proliferation und Zytotoxizität der T-Lymphozyten erhöht [21]. Außerdem wird die Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten gesteigert. Zum Beispiel sezernieren sie vermehrt IL-2, TNF- α und Interferon- γ [22].

Im Gegensatz dazu wird die Expression von CD25 erst später nach der Aktivierung der T-Lymphozyten stimuliert [17]. Das Oberflächenprotein bildet die α -Kette des IL-2-Rezeptors aus und ist deshalb eng mit der Aktivierung der T-Lymphozyten und deren Proliferation verknüpft [21]. Bei Aktivierung steigert IL-2 autokrin die Expression des IL-2-Rezeptors und seiner drei Ketten (α , β und γ) [23]. Außerdem spielt CD25 eine wichtige Rolle in der Selbst-Toleranz und verhindert Autoimmunreaktionen [24]. Im Gegensatz zu CD69 ist die Expression von CD25 klar abhängig von der Konzentration von Arginin im Medium der T-Lymphozyten. Durch Arginin-Mangel sinkt die aktivierungsabhängige Expression von CD25 [25].

Schon während der Aktivierung und der Bindung von CD28 an CD80 oder CD86 wird zur Gegenregulation die Expression von inhibitorischen Oberflächenproteinen induziert. Zu diesen inhibitorischen Oberflächenproteinen gehören neben dem *cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), das Oberflächenprotein TIGIT (*t cell immunoreceptor with Ig and ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) domains*), das *programmed cell death protein 1* (PD-1), das *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), das *t cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3* (TIM-3) und CD160.

CTLA-4 bindet an die gleichen APZ-Korezeptoren wie CD28 [26]. Im Gegensatz zur Aktivierung der T-Lymphozyten durch CD28 werden sie durch die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 jedoch inhibiert. Sowohl die Proliferation als auch die Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten sinkt [26]. Durch diesen Mechanismus wird eine Dauer- und Überstimulation verhindert [14].

Ähnlich wie CTLA-4 bindet auch das Oberflächenprotein TIGIT an Korezeptoren der dendritischen Zellen. TIGIT ähnelt dem stimulierenden Liganden CD226 strukturell, bindet jedoch mit höherer Affinität an dessen Rezeptor CD155 [26, 27]. Die APZ werden dadurch in ihrer Zytokin-Sekretion beeinflusst. Die Ausschüttung von IL-10 wird gesteigert, wohingegen IL-12 vermindert sezerniert wird. Dies führt zu einer indirekten Inhibition der Proliferation der T-Lymphozyten [28]. In den T-Lymphozyten selbst führt eine Dysbalance von TIGIT und CD226 zu einer schwächeren anti-tumoralen Immunabwehr [26]. Zudem wird die Signalübertragung der T-Zell-Rezeptoren vermindert, da durch TIGIT verschiedene Komponenten der T-Zell-Rezeptor-Kaskade limitiert werden. Zusätzlich zu diesen inhibitorischen Eigenschaften bewirkt TIGIT eine gesteigerte Expression der Rezeptoren von IL-2, IL-7 und IL-15. Sie bewirken, dass anti-apoptotische Proteine vermehrt produziert werden und sind somit wichtig für das Überleben der T-Lymphozyten. Durch TIGIT kommt es also zu weniger Überreaktionen des Immunsystems und gleichzeitig zum Schutz der funktionalen Zellen des Immunsystems vor dem Abbau und der Apoptose [29].

Ein Weiteres inhibitorisches Oberflächenprotein, das auch in die moderne immunologisch ausgerichtete Tumor-Therapie involviert ist, ist PD-1. Nach der Bindung von PD-1 an den Liganden PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) der APZ wird die Proliferation und die Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten inhibiert [30]. Dabei wird durch PD-1 nicht die initiale Aktivierung der T-Lymphozyten inhibiert, sondern die Funktionalität der Effektor-Zellen [26].

LAG-3 ähnelt dem CD4-Oberflächenprotein und bindet ebenfalls an den MHC-II-Rezeptor der APZ. Dabei bindet LAG-3 jedoch mit höherer Affinität an CD3 der T-Lymphozyten und inhibiert so den T-Zell-Rezeptor [27]. Dadurch wird die Proliferation und Aktivierung der T-Lymphozyten gehemmt [31]. Somit dient die Steigerung der Expression von LAG-3 in aktivierten T-Lymphozyten der Vorbeugung einer unkontrollierten Immunreaktion. Hierdurch erklärt sich die vermehrte Expression von LAG-3 auf regulatorischen T-Lymphozyten. Interessanterweise wird durch eine gesteigerte LAG-3-Expression der regulatorischen T_{reg}-Zellen auch die Expansion und Reaktivierung von *memory*-Zellen stimuliert [26].

TIM-3 wird vor allem von T_H1-Zellen exprimiert. Es interagiert mit einer Vielzahl verschiedener Liganden der T-Zell-Rezeptoren und reguliert so deren Signalübertragung und Expression

2. Literaturdiskussion

[27]. Vor allem in aktivierten und Interferon- γ -produzierenden T-Lymphozyten wird TIM-3 vermehrt exprimiert. Es bewirkt eine dysfunktionale Aktivierung [26]. Genau wie die Expression von LAG-3 und TIGIT wird durch die vermehrte Expression von TIM-3 also eine übermäßige Aktivierung der T-Lymphozyten auf T-Zell-Rezeptor-Ebene verhindert [29]. Außerdem wird die Toleranz der T-Lymphozyten erhöht, wodurch das Auftreten von Autoimmun-Reaktionen vermindert wird [32, 33]. Neben der direkten zellulären Supprimierung des Immunsystems induziert TIM-3 zudem die Bildung von MDSC im Tumor-Mikromilieu. Sie führen ihrerseits zusätzlich zu einer Inhibition der Immunabwehr [29, 32].

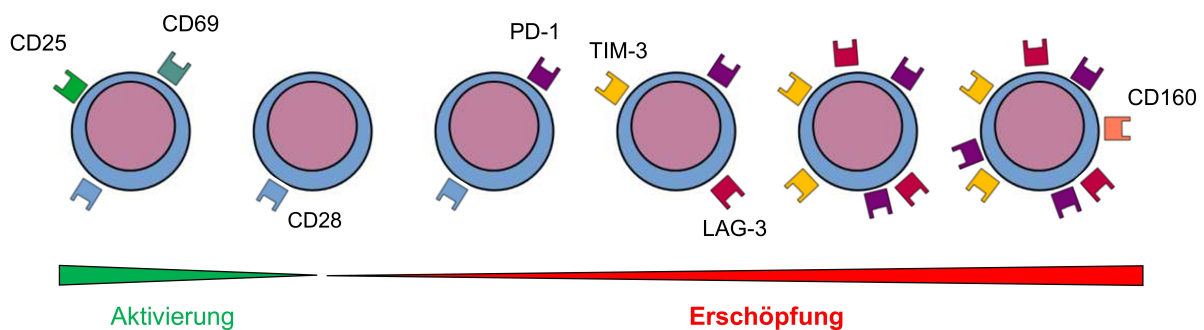


Abb. 3: Die Expression der Oberflächenproteine der T-Lymphozyten: T-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenprotein CD28 sowohl in Ruhe als auch in Aktivierung. Durch die Aktivierung der T-Lymphozyten werden vermehrt CD25 und CD69 exprimiert. Durch vermehrte Erschöpfung der T-Lymphozyten nimmt die Expression von CD28 ab. Dafür steigt die Expression der inhibitorischen Oberflächenproteine. Dabei tritt zuerst PD-1 in Erscheinung, gefolgt von TIM-3, LAG-3 und zuletzt CD160. Im Verlauf der Erschöpfung nimmt die Dichte an inhibitorischen Oberflächenproteinen immer weiter zu.

CD160 wird im Gegensatz zu TIM-3 vor allem von CD8⁺-T-Lymphozyten exprimiert. Das Oberflächenprotein wirkt dabei zusammen mit dem *herpes virus entry mediator* (HVEM) auf verschiedene Signalkaskaden der T-Lymphozyten und führt zu einer geringeren Proliferation und Interferon- γ -Sekretion [34]. Allerdings konnte durch CD160 auch eine stimulierende Wirkung auf CD8⁺-T-Lymphozyten über die Bindung an den MHC-I-Rezeptor beobachtet werden [35, 36].

In aktivierten T-Lymphozyten wird also zum Schutz vor Überaktivierung und Autoimmunität sowie zur Erhöhung der Selbst-Toleranz die Expression der inhibitorischen Oberflächenproteine CTLA-4, TIGIT, PD-1, TIM-3, LAG-3 und CD160 gesteigert. Kommt es jedoch bei einer chronischen Infektion oder einer Tumorerkrankung zur dauerhaften Stimulation des Immunsystems, zeigen die T-Lymphozyten trotz der inhibitorischen Bremse eine allmähliche Erschöpfung (*t cell exhaustion*). In diesem Fall sinkt die Expression von CD28, wohingegen die Expression der inhibitorischen Oberflächenproteine dauerhaft erhöht ist [26, 37]. Die PD-1-Expression

korreliert am sensibelsten mit der Erschöpfung der T-Lymphozyten und wird am frühesten aktiviert. Zusätzlich bewirkt die PD-1-Expression die zusätzliche Expression anderer inhibitorischer Oberflächenproteine wie CD160, TIM-3 und LAG-3. Diese werden im weiteren Verlauf und mit zunehmender Erschöpfung vermehrt exprimiert. Die Expression von CD160 wird erst im Kontext einer starken T-Lymphozyten-Erschöpfung stimuliert. Zudem kennzeichnet die Koexpression mehrerer dieser Oberflächenmarker eine starke Erschöpfung der Zelle [29, 38, 39].

Erschöpfte T-Lymphozyten proliferieren nicht und sezernieren weniger Zytokine. Dies betrifft vor allem die Sekretion von IL-2 und später auch von TNF- α . Eine schwere Erschöpfung zeichnet sich in der verminderten Interferon- γ -Produktion aus. Zusätzlich dazu nimmt die Zytotoxizität der T-Lymphozyten ab und sie sind nicht mehr zu einer effektiven Immunabwehr in der Lage [10, 40]. Viele Oberflächenproteine wie TIGIT, LAG-3 und TIM-3 führen zu einer verringerten Aktivität der T_H1-Zellen und im Gegenzug zu einer vermehrten Aktivität der T_H2-Zellen [26, 29, 31, 32].

Auch in T_{reg}-Zellen werden viele dieser Oberflächenproteine konstitutiv exprimiert. Sie führen zu einer verbesserten regulatorischen Funktion der Zellen. Identifiziert werden konnten inzwischen CTLA-4, TIGIT, PD-1, LAG-3 und TIM-3. CTLA-4 beispielsweise fungiert als Ziel des Transkriptionsfaktor Foxp3. Über CTLA-4 können T_{reg}-Zellen die Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 auf den dendritischen Zellen vermindern. Dies ist ein Beispiel für einen inhibitorischen Mechanismus dieser regulatorischen Zellen [26].

Im Gegensatz zu den oben genannten inhibitorischen Oberflächenproteinen ist die Expression von CD57 kein Hinweis auf die Erschöpfung, sondern auf die Seneszenz der T-Lymphozyten [39]. In der Seneszenz ist die Zytokin-Sekretion und die Proliferation unbeeinflusst. Mit einer hohen Sekretion von Perforin und Granzym zeigen die T-Lymphozyten in der Seneszenz sogar eine hohe Zytotoxizität. So lässt sich leicht erklären, warum eine hohe CD57-Expression vor allem in terminal differenzierten CD8⁺-T-Lymphozyten zu finden ist. Trotz der hohen Zytotoxizität weisen CD57⁺-T-Lymphozyten Einschränkungen in der anti-tumoralen Immunabwehr auf. Wie genau die Expression von CD57 dabei eine Rolle spielt, ist jedoch noch nicht näher bekannt [40].

2.1.1.3. Metabolismus der T-Lymphozyten

Das komplexe Zusammenspiel von Aktivierung, Entwicklung, Funktion und Differenzierung der T-Lymphozyten wird durch ihren Metabolismus maßgeblich beeinflusst. Vor allem die Nährstoffaufnahme ist ein essentieller Faktor für die Proliferation und Funktion der Immunzellen. Ruhende T-Lymphozyten produzieren Adenosin-Triphosphat durch oxidative Phosphorylierung und bereiten sich so auf die Proliferation und ihre Funktion in der Immunabwehr vor [10].

2. Literaturdiskussion

Nach Aktivierung nutzen die T-Lymphozyten auch Glykolyse zur Energie-Gewinnung. Bei kataboler Stoffwechsellage nach der erfolgten Immunreaktion gehen die Effektor-Zellen in *memory*-Zellen über. Außerdem wird durch eine katabole Stoffwechsellage die Differenzierung zu regulatorischen T-Lymphozyten stimuliert [41].

Die Beeinflussung des Nährstoffangebotes in der unmittelbaren Umgebung ist einer der vielfältigen Mechanismen wie Tumore die Immunabwehr des Körpers umgehen können. Durch Verstoffwechslung und Depletion wichtiger Nährstoffe und gleichzeitiger Ausscheidung von Metaboliten und Proteinen können sie die Aktivität und Funktionalität von T-Lymphozyten hemmen. Zum Beispiel limitieren Tumorzellen das Glucose-Angebot und führen im Gegenzug zu einer Laktat-Akkumulation. Dadurch werden die Proliferation der T-Lymphozyten, ihre Aktivität und auch ihre Effektor-Funktionen wie beispielsweise die Interferon- γ -Sekretion inhibiert [42].

Ob T-Lymphozyten von einer ruhenden Phase in die Proliferation übergehen, wird neben dem Glucose-Angebot besonders durch die Verfügbarkeit von Aminosäuren bestimmt. Der Transport der Aminosäuren von extrazellulär nach intrazellulär geschieht durch verschiedene Aminosäure-Transport-Proteine mit jeweils definierter Spezifität wie zum Beispiel die Transporter *cationic amino acid transporter 1* (CAT-1) [43] oder dem *l-type/large neutral amino acid transporter 1* (LAT-1) [44]. Die Expression dieser Transporter wird nach Aktivierung der T-Lymphozyten stimuliert, sodass Aminosäuren vermehrt in die Zelle aufgenommen werden können [41, 45]. Bei der Bereitstellung der Aminosäuren spielen im Gesunden auch die APZ eine große Rolle. Sie nehmen verschiedene Aminosäuren zur Verstoffwechslung auf und sezernieren wiederum andere. Cystein, Leucin [46] und Serin [47] sind gut untersuchte Aminosäuren, welche die Proliferation und immunologische Aktivität der T-Lymphozyten steigern. Diese wichtigen Funktionen werden *in vivo* durch einen Mangel von beispielsweise Glutamin [41, 48], Tryptophan und Arginin [4, 42] limitiert. Eine erhöhte Konzentration von Glutamat wirkt der T-Lymphozyten-Aktivierung sogar entgegen [49]. Kynurenin, ein Abbauprodukt von Tryptophan, fördert dagegen die Bildung von T_{reg}-Zellen [42].

2.1.1.4. Zytokin-Stoffwechsel

Auch Zytokine spielen im Metabolismus der T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Zu einer Stimulation des aktiven Metabolismus kommt es durch die Bindung von IL-2, 4, 6, 7, 12 und 15 sowie Interferon- γ . Dies wiederum führt zu vermehrter Proliferation der T-Lymphozyten und ihre Funktionalität sowie ihre Aktivität werden gesteigert [11]. Dabei sind IL-2 und IL-15 vor allem in aktivierten T-Lymphozyten relevant. IL-7 und IL-15 fördern in naiven und ebenso in Effektor-T-Lymphozyten das Überleben der Zellen. Außerdem führen sie zu einer

verlangsamten Zellteilung in *memory*-Zellen, wodurch diese Zellform erst ermöglicht wird [10, 29]. IL-4 dagegen induziert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6. Gleichzeitig supprimiert IL-4 die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine beispielsweise des Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1ra) [50]. Andere Zytokine wirken spezifisch lediglich auf Subpopulationen der T-Lymphozyten. IL-21 zum Beispiel erhält die zytotoxische Funktion der CD8⁺-T-Lymphozyten und verhindert deren Erschöpfung [39].

Es gibt allerdings auch Zytokine, die sich negativ auf den Metabolismus der aktiven T-Lymphozyten auswirken. IL-10 und TGF- β führen zu einer prolongierten Aktivierung, die in der Erschöpfung der T-Lymphozyten resultiert [39, 51]. Der IL-7-Rezeptor fördert die Bildung von regulatorischen T-Lymphozyten und hemmt somit indirekt die Aktivierung der Effektor-T-Lymphozyten [42].

2.1.2. Granulozyten

2.1.2.1. Einteilung der Granulozyten

Granulozyten gehören zu den Phagozyten des angeborenen Immunsystem. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Hierbei sind vor allem zwei Wachstumsfaktoren wichtig: der *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und der *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Die Mehrzahl der Granulozyten verweilt im Knochenmark bis sie durch Zytokine wie IL-17, IL-23, G-CSF oder durch Chemokin-Liganden (beispielsweise CCL2 und CCL5) mittels Chemotaxis in die Blutbahn geleitet werden. Während sie im Blut zirkulieren, sind sie äußerst kurzlebig. Durch Tumore und Aktivierung im Inflammationsgeschehen kann diese kurze Lebensspanne jedoch deutlich verlängert werden [52, 53, 54].

Es werden drei Gruppen von Granulozyten nach ihrer Anfärbbarkeit in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterschieden: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die Neutrophilen bilden dabei den größten Anteil an der Gesamtpopulation der Granulozyten. Charakteristisch für sie ist ihr segmentierter Kern, weshalb sie auch *polymorphonuclear neutrophils* (PMN) oder segmentkernige Neutrophile genannt werden. Ihre phagozytische Aktivität ist eine der wichtigsten zellulären Komponenten der angeborenen Immunabwehr [8, Teil I]. Zudem sind die Neutrophilen die einzige Zellpopulation der Immunzellen, die physiologisch das Enzym Arginase 1 in hoher Aktivität konstitutiv exprimiert. Deshalb wird in dieser Arbeit der Fokus auf die PMN gelegt.

2.1.2.2. Funktion von Granulozyten im Immunsystem

Die Granulozyten bilden die vorderste Front der angeborenen Immunabwehr. In der Blutbahn zirkulierend exprimieren sie konstitutiv ihre konstanten Chemokin- und Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren. Zur Pathogen-Erkennung nutzen sie spezifische Komplement-Rezeptoren, mit denen sie durch Faktoren des Komplementsystems markierte Pathogene erkennen können. Außerdem können Granulozyten mit ihren Fc-Rezeptoren Pathogene erkennen, die mit IgG-Antikörpern markiert wurden. Sie werden phagozytiert und intrazellulär mit Hilfe von abbauenden Enzymen in den Phagosomen zerstört [8, 55, 56].

Granulozyten produzieren viele Zytokine und proteolytische Enzyme zur intrazellulären Speicherung in Granula. Da sie sehr kurzlebige Zellen sind, können die Granulozyten so im Falle einer Immunabwehr und Aktivierung schnell viele dieser Proteine sezernieren [55]. Die Zytokine werden dabei vorwiegend aktiv durch Transporter in den Extrazellularraum sezerniert. Proteolytische Enzyme dagegen werden durch Fusion der Granula mit der Zellmembran freigesetzt.

Man unterscheidet drei Arten von Granula: spezifische, azurophile und die Gelatinase (Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9))-haltigen Granula. Unterschieden werden sie außerdem nach dem Vorkommen von Myeloperoxidase (MPO) in den Granula. Die MPO grenzt die azurophilen Granula von den beiden anderen Arten ab. Zusätzlich zu diesen drei Granula-Typen stehen kleinere sekretorische Vesikel in den Granulozyten bereit, welche sehr einfach und schnell mobilisierbar sind.

Durch die Aktivierung von L-Selektin und dem Bindungspartner des endothelialen P-Selektin aus geschädigten Endothelien wird die Fusion der intrazellulären sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran induziert. Hierdurch wird die Expression von Integrin- β 2- und Chemotaxis-Rezeptoren in den Granulozyten erhöht. Auf diese Weise werden die Granulozyten chemotaktisch zum Ort der Gewebsschädigung geleitet. Sekretorische Vesikel enthalten die oben genannten Membranproteine sowie weitere Oberflächenproteine wie beispielsweise CD16 und das *macrophage antigen 1* (Mac-1, oder auch CD11b/CD18). Die sekretorischen Vesikel bestehen vor allem aus Membranproteinen und beinhalten wenig lösliche Proteine. Es konnten bisher zum Beispiel der Komplement-Faktor 1, das Glykosylphosphatidyl-Inositol-verankerte Glykoprotein 180 (GPI-180) und Plasmaproteine wie das α 1-Antitrypsin detektiert werden [55, 57].

Im Gegensatz dazu finden sich in den Granula vorwiegend proteolytische Enzyme. Dabei sind die Enzyme nicht ausschließlich auf die verschiedenen Granula aufgeteilt, jedoch mit hoher Spezifität und klar definierten Konzentrationen vorzufinden. Die Zusammensetzung lässt sich durch die sogenannte *targeting-by-timing*-Hypothese (Zielbestimmung durch den Zeitpunkt

der Synthese) erklären. In den unterschiedlichen Phasen und Differenzierungsstufen der Reifung von Granulozyten werden unterschiedliche Proteine synthetisiert. In diesem Prozess der Granulozytenreifung werden jeweils, wie in Abbildung 4 dargestellt, unterschiedliche Granula gebildet.

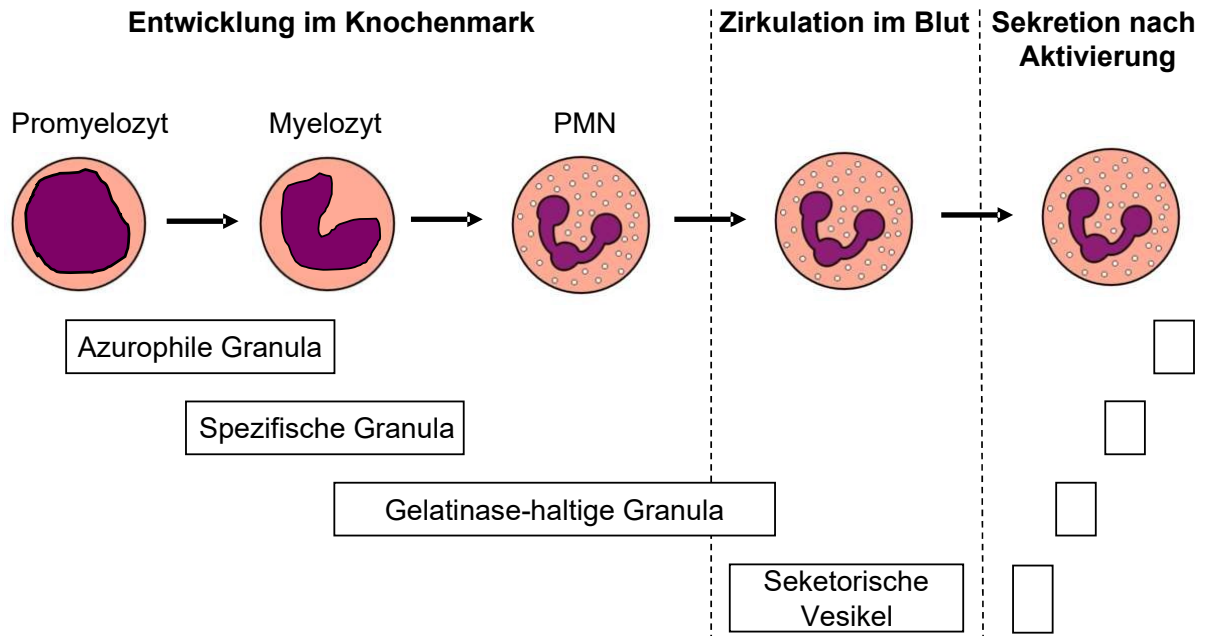


Abb. 4: Entstehung der verschiedenen Granula der PMN: Nach der sogenannten *targeting-by-timing*-Hypothese entstehen die verschiedenen Arten der Granula der PMN im Verlauf der Entwicklung. PMN entwickeln sich von den Promyelozyten zu den Myelozyten und schließlich zu den reifen Zellen im Knochenmark. Zuerst werden die azurophilen Granula gebildet, anschließend die spezifischen und zuletzt die Gelatinase-haltigen Granula. Die sekretorischen Vesikel entstehen durch Endozytose während des Zirkulierens der reifen PMN in der Blutbahn. Nach der Aktivierung der PMN durch Inflammation oder Tumore werden die Granula in umgekehrter Reihenfolge zu deren Entstehung sezerniert. Zuerst werden die sekretorischen Vesikel freigesetzt, danach die Gelatinase-haltigen, dann die spezifischen und zum Schluss die azurophilen Granula.

Die azurophilen Granula entstehen am frühesten im Promyelozyten. Sie werden deshalb auch als primäre Granula bezeichnet. In den nachfolgenden Myelozyten-Stadien werden anschließend die spezifischen, sekundären Granula gebildet. Als letzte und tertiäre Granula entwickeln sich im Metamyelozyten die Gelatinase-haltigen Granula. Auch die sekretorischen Vesikel entstehen erst spät in der Granulopoese. Sie werden durch Endozytose von Stoffen aus dem Extrazellularraum gebildet. Diese zuletzt gebildeten Granula werden im reifen Granulozyten am schnellsten exozytiert. Sie weisen die höchsten Konzentrationen an *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (ν -SNARE-Komponente) wie zum Beispiel das *synaptosomal-associated protein* (SNAP-23) oder das *vesicle-associated membrane protein 2* (VAMP-2) auf. Mit Hilfe dieser Proteine wird der SNARE-Komplex

2. Literaturdiskussion

gebildet und die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran zur Freisetzung der Inhalte initiiert [8, Teil V]. Aus diesem Grund werden die sekretorischen Vesikel am schnellsten freigesetzt, dann die Gelatinase-haltigen, gefolgt von den spezifischen und schließlich den azurophilen Granula [55, 56, 57, 58].

In den azurophilen Granula sind als Membranproteine unter anderem CD63 und CD68 gespeichert. Außerdem werden Arginase 1, MPO, Elastase, Proteinase 3, Cystin Proteasen, Defensine, das bakterizide Permeabilität-steigernde Protein und Lysozym in diesen Granula gespeichert. Die MPO reagiert mit Wasserstoff-Peroxid, welches durch die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase synthetisiert wird. Dadurch wird das toxische Potential des Wasserstoff-Peroxids erhöht. Außerdem wird durch die MPO die Bildung von chlorierten Proteinen, Tyrosin-Radikalen und anderen *reactive nitrogen species* (RNS) gefördert [56, 58].

Die beiden MPO-negativen Arten von Granula (die spezifischen und Gelatinase-haltigen Granula) speichern stattdessen vor allem antimikrobielle Peptide, wie Lactoferrin und Lysozym. Außerdem enthalten sie Metalloproteasen wie Kollagenase, Gelatinase und Leukolysin [56]. Zudem sind Mac-1 und die oben genannten SNARE-Komplex-Proteine in den Granula gespeichert. Zusätzlich bestehen die spezifischen Granula auch aus Cystatin C und F sowie Lactoferrin, Haptoglobin, Prodefensin, α 1-Antitrypsin und β 2-Mikroglobulinen. Die Gelatinase-haltigen Granula speichern zusätzlich zu den oben genannten Proteinen vor allem Arginase 1 und β 2-Mikroglobuline [55, 57, 58].

Bezüglich der Lokalisation der Arginase 1 gibt es in der Literatur aktuell unterschiedliche Beobachtungen. Das Enzym konnte durch die eigene Arbeitsgruppe in den azurophilen Granula [3], durch andere Forschungsgruppen aber auch in den Gelatinase-haltigen Granula [55, 59] nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise konnte die Arginase 1 in den spezifischen Granula nicht detektiert werden, was eine Lokalisation sowohl in azurophilen, als auch in Gelatinase-haltigen Granula aufgrund der *targeting by timing*-Hypothese eher unwahrscheinlich macht. Eine andere Arbeit beschreibt die Lokalisation der Arginase in den Gelatinase-haltigen Granula, beobachtet jedoch eine obligate Aktivierung des Enzyms durch Faktoren aus den azurophilen Granula [60]. Somit finden sich auch in dieser Beobachtung beide Typen von Granula der PMN wieder, die auch in den anderen Arbeiten als mögliche Lokalisationen benannt wurden. Die tatsächliche Lokalisation der Arginase 1 bleibt deshalb auf dem aktuellen Stand der Forschung im Detail noch ungeklärt.

Eine Übersicht der Bestandteile der unterschiedlichen Granula ist in Tabelle 1 dargestellt. In den Granula befinden sich neben antimikrobiellen Proteinen und Enzymen auch Rezeptoren

für die Endothel-Adhäsion sowie lösliche Immunmediatoren. Alle Bestandteile der Granula sind für die früh-inflammatorische Phase der Immunreaktion entscheidend. Durch sie können Pathogene im Extrazellularraum direkt eliminiert werden. Manche Granula, vor allem die azurophilen, fusionieren jedoch auch mit Phagosomen und stellen so die intrazelluläre enzymatische Abwehr dar [56]. Enzyme wie zum Beispiel die MPO reichern die Granula mit reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoff-Spezies an, wodurch Pathogene eliminiert werden können [61]. Des Weiteren depletiert die Arginase 1 Arginin lokal im Phagosom und zeigt so antimikrobielle Eigenschaften [3]. Zudem sorgen die Bestandteile der Granula für die Rekrutierung anderer Immunzellen wie beispielsweise T-Lymphozyten [57].

Tabelle 1: Bestandteile der Granula der Granulozyten.

sekretorische Vesikel	Gelatinase-haltige Granula	spezifische Granula	azurophile Granula
Mac-1, CD16,	Mac-1	Mac-1	
VAMP2	VAMP2	VAMP2	
SNAP-23	SNAP-23	SNAP-23	
Plasmaproteine, Komplementfaktor 1, GPI-180	Gelatinase, Arginase 1	Gelatinase, Kollagenase, Cystatin C & F	MPO, Arginase 1, Elastase, Proteinase 3
	Lysozym	Lysozym, Lactoferrin, Haptoglobin	Lysozym, Defensine

Eine weitere Abwehrfunktion der Granulozyten sind die extrazellulären Netze aus DNA, die Elastase und andere Enzyme gebunden haben. Mit ihrer Hilfe können Pathogene eingefangen und eliminiert werden. Dieser Vorgang wird NETose genannt und findet im Rahmen der Apoptose von Granulozyten statt. Durch die Elastase der PMN wird das Insulin Rezeptor Substrat 1 verstoffwechselt und der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert [52]. Zudem konnte eine Verknüpfung und gegenseitige Aktivierung des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade beobachtet werden [58, 62].

Zusätzlich zu ihren Funktionen im angeborenen Immunsystem aktivieren Granulozyten auch die adaptive Immunantwort, indem sie Antigene präsentieren. Die APZ sind die einzigen Zellen des Immunsystems, die kontinuierlich MHC-II exprimieren und daher kontinuierlich Antigene für die T-Lymphozyten präsentieren. PMN werden durch Interferon- γ und GM-CSF zu einer

2. Literaturdiskussion

vorübergehenden MHC-II-Expression und somit zur vorübergehenden Antigen-Präsentation angeregt [63]. Neben den T-Lymphozyten beeinflussen die PMN auch die B-Lymphozyten, indem sie den Antikörper-*shift* der B-Lymphozyten induzieren [64]. Über direkte Zell-Zell-Kontakte aktivieren sie APZ oder T-Lymphozyten. Hierbei spielen Zytokine, Proteasen und ROS eine entscheidende Rolle [65].

Neben der oben beschriebenen Aktivierung der T-Lymphozyten konnte jedoch vermehrt die Suppression der T-Lymphozyten durch die PMN beobachtet werden. Vor allem in der Kokultur zeigen die T-Lymphozyten eine deutlich verminderte Proliferation. Dies lässt auf eine Interaktion der beiden Zellpopulationen über direkte inhibitorische Zell-Zell-Kontakte schließen [7, 66, 67].

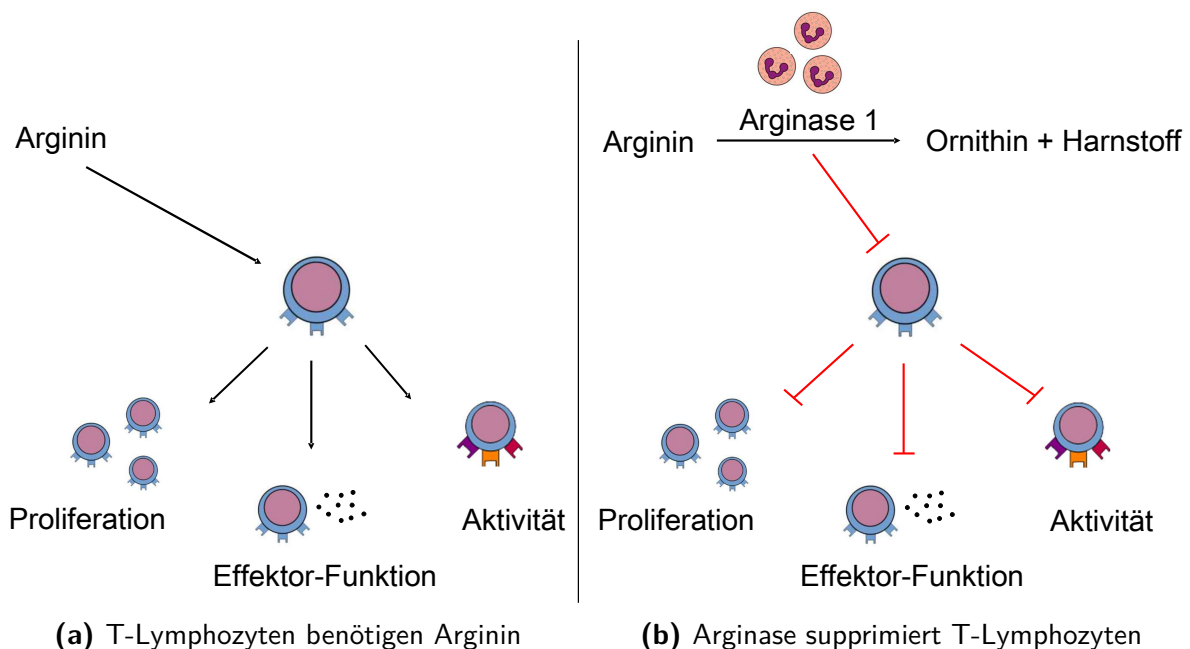


Abb. 5: Suppression der T-Lymphozyten durch die Arginase 1: T-Lymphozyten benötigen Arginin für ihren Metabolismus. Durch die Arginase 1 der Granulozyten wird Arginin zu Ornithin und Harnstoff abgebaut. Dadurch werden die Proliferation, die Effektor-Funktion und die Aktivität der T-Lymphozyten inhibiert.

Eine weitere bereits gut charakterisierte inhibitorische Funktion der Granulozyten ist die Arginin-Depletion durch die Aktivität der Arginase 1. Nach der Apoptose der Zellen wird das Enzym freigesetzt und depletiert das Arginin im Plasma. T-Lymphozyten sind auf eine Grundkonzentration von Arginin im Plasma angewiesen. Wird diese Minimalkonzentration unterschritten, so werden ihre Proliferation, Aktivität und Effektor-Funktionen supprimiert [25, 60, 68, 69, 70, 71, 72]. In Abbildung 5 ist dieser starke und effiziente immun-suppressive Mechanismus der Granulozyten noch einmal dargestellt.

2.1.2.3. Zytokine der Granulozyten

Granulozyten sezernieren verschiedene Zytokine und zahlreiche Chemokine. Diese können sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Wirkungen haben. Zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören IL-1ra und TGF- β . Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zählen IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-16, IL-18 und der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Es überwiegen die pro-inflammatorischen Zytokine, die autokrin oder parakrin andere Immunzellen aktivieren können und so die Immunantwort stimulieren. Zusätzlich werden die immun-regulatorischen Zytokine IL-22 und IL-23 freigesetzt. Des Weiteren sezernieren Granulozyten G-CSF, Endothelin sowie Angio- und Fibrogenese-Faktoren (zum Beispiel den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Angiopoetine) [58].

Die Zytokine werden entweder wie IL-1ra aktiv über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat sezerniert [73] oder sie gelangen passiv im Rahmen der sekundären Nekrose des Granulozyten in den Extrazellularraum. Dazu gehören IL-16 und MIF [74, 75]. Diese beiden Zytokine werden konstitutiv von den Granulozyten synthetisiert und gespeichert. IL-16 wird dabei vor allem von ruhenden Granulozyten produziert, während die Sekretion von IL-1, IL-6 und IL-23 nach Aktivierung der Granulozyten über die *Toll-like*-Rezeptoren stimuliert wird. Durch Aktivierung und Stimulation werden sie de novo synthetisiert. Sie können nicht im Zytosol gespeichert werden [58].

Durch die Sekretion von immun-aktiven Zytokinen greifen die Granulozyten direkt in die Immunabwehr ein. Sie können die angeborene und adaptive Immunantwort durch Aktivierung oder Supprimierung der zugehörigen Zellen beeinflussen. Die Sekretion von IL-12 zum Beispiel bewirkt die bevorzugte Differenzierung von T-Lymphozyten zu T_H1-Zellen, anstatt zu T_H2-Zellen. Eine gegenteilige Wirkung ist von IL-4 bekannt [63]. Durch die Sekretion von IL-10 können die Granulozyten die Proliferation und die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten senken [54, 76]. Auch TGF- β wirkt inhibitorisch auf die Proliferation der T-Lymphozyten. TNF- α hingegen sorgt als Coaktivator für eine Aktivierung der T-Lymphozyten. Viele Chemokine (CXC-Chemokin-Ligand 1 (CXCL1), CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 sowie IL-8) wirken chemotaktisch auf die T-Lymphozyten [63].

Die Funktion der proteolytischen Enzyme und anderer Proteine aus den Granula wird durch die Wirkung der sezernierten Zytokine gesteigert. Somit wirken beide Mechanismen synergistisch in der Aktivierung der Immunabwehr [58].

2.2. Das Immunsystem unter Einfluss von Tumoren

Der menschliche Körper eliminiert kontinuierlich einzelne mutierte Tumorzellen bevor sie sich zu einem manifesten Tumor weiterentwickeln können. Dennoch finden sich Tumorerkrankungen mit steigender Inzidenz in der Bevölkerung. Dies liegt einerseits am demographischen Wandel und der dadurch erhöhten Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung in der Lebenszeit aber auch an ungesunden Lebensstilen und den damit steigenden Risikofaktoren. Andererseits schützt die Tumorzellen ihre Fähigkeit sich effektiv zu verbergen vor einer Eliminierung durch das Immunsystem. Dieses Maskieren dient der vermehrten Progression, Invasion und Metastasierung des Tumors. Eine der wichtigsten Mechanismen mit denen die Tumorzellen der Immunabwehr entgehen, ist die Ausbildung des immun-suppressiven *tumor microenvironment* (also die unmittelbare Umgebung des Tumors).

Tumorzellen benötigen durch ihr exzessives Wachstum und ihre hohe Aktivität große Mengen an Glucose, die sie aus ihrer unmittelbaren Umgebung beziehen. Dadurch sinkt der Glucose-Gehalt auch für die immigrierenden Immunzellen, die den Tumor eliminieren sollen [41]. Neben der Glucose-Depletion spielt auch die Depletion von Aminosäuren, und hier vor allem von Arginin, eine entscheidende Rolle für das Entkommen des Tumors vor der Immunabwehr. Durch die Depletion von Arginin werden beispielsweise die zytotoxischen T-Lymphozyten supprimiert [4, 25, 77]. Außerdem werden regulatorische T-Lymphozyten im *tumor microenvironment* aktiviert [41].

Im multiplen Myelom konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass T-Lymphozyten in der unmittelbaren Tumor-Umgebung deutlich geringer proliferieren und eine schlechtere Immunfunktion aufweisen. Sie exprimieren die charakteristischen Oberflächenproteine PD-1, CTLA-4 und CD160, die den Erschöpfungs-Zustand der T-Lymphozyten anzeigen sowie CD57, was die Seneszenz der T-Lymphozyten erkennen lässt. Das Aktivierungs-Oberflächenprotein CD28 hingegen wird weniger stark exprimiert. Zudem weisen T-Lymphozyten in der unmittelbaren Nähe der Tumorzellen nach erfolgter Aktivierung eine verringerte Interferon- γ -Sekretion auf. Also zeigt sich im *tumor microenvironment* eine Dysfunktion der T-Lymphozyten. Nicht nur die Arginin-Depletion, sondern das Zusammenspiel aller inhibitorischen Mechanismen im Tumor-Mikromilieu supprimiert die Aktivierung, Differenzierung und Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten [78, 79, 80].

Da das Tumor-Mikromilieu von den Immunzellen als eine Art chronische Entzündung identifiziert wird, infiltrieren viele Granulozyten den Tumor und seine unmittelbare Umgebung. In der Rekrutierung der Granulozyten spielen das von den Tumorzellen sezernierte IL-8 und der Wachstumsfaktor G-CSF eine wesentliche Rolle [81]. Durch die Induktion

pro-tumoraler und anti-inflammatorischer Funktionen wird das Immunsystem supprimiert und das Tumorwachstum stimuliert. Die Zytokine fördern die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung des Tumors sowie den Umbau der Extrazellulärmatrix. Außerdem konnte beobachtet werden, dass diese Immunzellen auch vom Primarius weit entferntes Gewebe für eine spätere Kolonisierung vorbereiten. Dadurch ermöglichen sie die spätere Metastasierung [82]. Dies geschieht vermutlich durch die sogenannte reverse Migration der Granulozyten, die bei Tumorerkrankungen aber auch bei chronischen Infektionen beobachtet werden konnte [81]. Reverse Migration steht für die Emigration der Immunzelle vom Ort der Entzündung oder des Tumors zurück in die Blutbahn.

Neben der Depletion der funktionellen Immunzellen können die Tumorzellen Immunzellen und deren Vorstufen rekrutieren und induzieren in ihnen immun-supprimierende Funktionen. Diese Immunzellen entstammen der hämatopoetischen Stammzelle und entwickeln sich im Knochenmark. Entstehen sie aus unreifen myeloischen Vorläuferzellen werden sie *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) genannt [64]. Ausdifferenzierte Suppressor-Zellen werden als „Tumor-assoziiert“ bezeichnet, wie beispielsweise die *tumor-associated neutrophils* (TAN). In der unmittelbaren Nähe des Tumors werden diese Suppressor-Zellen vor Apoptose geschützt [64] und können so effektiv die infiltrierenden anti-tumoralen Immunzellen inhibieren. Im multiplen Myelom konnten vermehrt unreife immun-suppressive Granulozyten identifiziert werden, die eine Depletion der T-Lymphozyten bewirkten [83].

2.2.1. Die Rolle der Granulozyten in Tumoren

Granulozyten sind in der Lage schnell und effektiv durch Chemotaxis an den Ort der Entzündung zu gelangen. Dort initiieren sie durch Degranulation, Phagozytose und NETose die Immunabwehr der Körpers. Tumorerkrankungen haben große Ähnlichkeiten mit Entzündungsgeschehen und so werden große Mengen an Granulozyten in und um den Tumor akkumuliert. Die genaue Rolle von Granulozyten in bestimmten Tumoren ist bislang umstritten. Es werden sowohl anti- also auch pro-tumorale Eigenschaften der PMN beschrieben. Die pro-tumoralen Eigenschaften sowie die Interaktion zwischen dem Tumor, den PMN und den T-Lymphozyten sind in Abbildung 6 dargestellt.

Es gibt Beobachtungen, dass die Anzahl an PMN im Tumorstroma und/oder in der Blutbahn einen schlechten prognostischen Faktor für Tumorpatienten darstellt und mit einer erhöhten Mortalität korreliert [84, 85, 86, 87, 88]. Bei hohen Zahlen von im Blut zirkulierenden PMN konnte insbesondere bei einem hohen PMN-zu-T-Lymphozyten-Verhältnis eine verstärkte Tumor-Progression festgestellt werden. Dabei spielen die von ihnen sezernierten Bestandteile der Granula in verschiedenen Schritten der Tumor-Entwicklung eine entscheidende Rolle:

2. Literaturdiskussion

- Die PMN sezernieren VEGF A, Prokineticin-2 und die MMP9, wodurch der Extrazellularraum verändert und die Angiogenese in Tumorzellen stimuliert wird [54, 63]. Die MMP9 ist zudem ein Faktor des initialen Tumor-Wachstums, durch den die Sekretion von VEGF gefördert wird [89, 85]. Durch Zytokine der IL-6 Familie, TNF- α und über die Stimulation mit Lipopolysaccharide kann die Sekretion von VEGF darüber hinaus gesteigert werden [58, 81, 90].
- Durch die Elastase der PMN wird das Insulin Rezeptor Substrat 1 verstoffwechselt und der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert [52, 54]. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zur Hemmung der Apoptose der Tumorzellen sowie zur Aktivierung der Translation und der vermehrten Proliferation [58, 68, 85, 91].
- Der Tumor-Progress wird durch ROS, RNS und Proteasen gefördert [89, 64, 81].

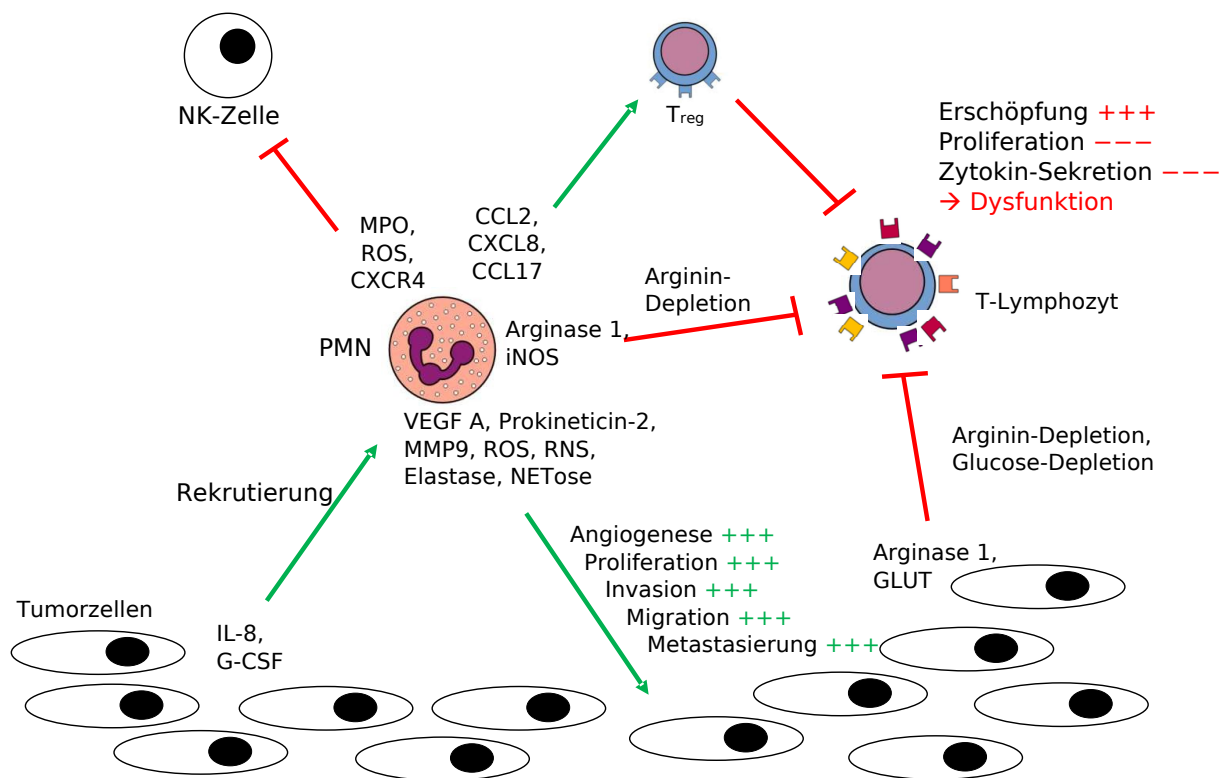


Abb. 6: Die pro-tumoralen Eigenschaften der PMN unter dem Einfluss der Tumor-Umgebung: Durch den Tumor werden vermehrt PMN rekrutiert. Sie fördern vielfach die Angiogenese, Proliferation, Invasion, Migration und Metastasierung des Tumors. Gleichzeitig inhibieren sie weitere Immunzellen wie die NK-Zellen und T-Lymphozyten. Die Suppression der T-Lymphozyten findet indirekt über die Aktivierung von T_{reg}-Zellen, aber auch direkt durch die Arginin-Depletion mittels der Arginase 1 statt. Auch die Tumorzellen depletieren Arginin durch ihre Arginase 1. Außerdem metabolisieren sie die Glucose und senken so deren Konzentration in der Tumor-Umgebung. Dies führt zu einer Inhibition der Proliferation und der Zytokin-Sekretion. Die Dysfunktion der T-Lymphozyten ist zudem an der vermehrten Expression der inhibitorischen Oberflächenproteine (vergleiche Abbildung 2) erkennbar.

- Die NETose der PMN erleichtert die Invasion und Migration des Tumors [81]. Auch die Metastasierung des Tumors wird durch die PMN verbessert, indem sie die Extravasation des Tumors durch Sekretion von IL-1 β und MMP vereinfachen. Außerdem ermöglichen sie zelluläre Interaktionen über das *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und die NETose [64, 81, 92]. Darüber hinaus können sie die Tumorzellen durch die reverse Migration zum späteren Ort einer Metastase eskortieren [89, 68]. Dort sind die PMN präsent und bereiten das Gewebe für die Invasion durch den Tumor vor [93].

Des Weiteren stimulieren die PMN durch Zytokin-Sekretion die Tumor-Progression. Dabei spielen pro-inflammatorische Zytokine wie das *monocyte chemoattractant protein 1*, IL-8 und das *macrophage inflammatory protein 1 α* (MIP-1 α) eine wichtige Rolle [53]. Durch IL-8 werden weitere Granulozyten rekrutiert und im Tumor immobilisiert. Dort ändern sie durch Induktion der Tumorzellen ihren Phänotyp zu den *tumor-associated neutrophils* [53]. Außerdem wird durch IL-8 die Sekretion von Arginase 1 in den TAN stimuliert und die Angiogenese des Tumors gesteigert [81, 85].

Auch anti-inflammatorische Zytokine der Granulozyten fungieren als Stimulatoren des Tumors. Es konnte beobachtet werden, dass IL-1ra die Seneszenz von Tumorzellen beendet und sie in aktivierte Tumorzellen konvertiert [94]. Diese Reaktivierung der Tumorzellen kann ebenso durch verschiedene Enzyme und Proteine der Granula der Granulozyten induziert werden [53].

Ein weiterer Faktor, der die Tumor-Entwicklung begünstigt, ist die Suppression der Zellen des Immunsystems:

- Die T-Lymphozyten werden durch Arginin-Depletion durch die Arginase 1 [3, 63, 81] und die *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) der PMN supprimiert [52]. Durch den Arginin-Mangel verbleiben die T-Lymphozyten im G₀-Stadium des Zellzyklus [4]. Zudem wird die T-Lymphozyten-Proliferation sowie die Interferon- γ -Sekretion der aktivierten T-Lymphozyten durch ROS und die Membran-assoziierte Protease 3 inhibiert [89]. Mit Hilfe von TNF- α und RNS werden CD8⁺-T-Lymphozyten in Apoptose geleitet [58].
- Mit Hilfe des CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), CXCL8 und CCL17 rekrutieren Granulozyten T_{reg}-Zellen, die inhibitorisch auf T-Lymphozyten einwirken [58].
- Durch die MPO, ROS und den CXC-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) wird die Funktion der natürlichen Killerzellen inhibiert, wodurch Tumorzellen intravasal länger überleben können. Dies ermöglicht die hämatogene Metastasierung [68, 81, 92].

Andererseits konnten in verschiedenen Arbeiten anti-tumorale Funktionen der PMN detektiert werden. Ganz im Gegensatz zu der oben beschriebenen Vereinfachung der Extravasation des

2. Literaturdiskussion

Tumors konnte in nicht metastasierten Lungen-Karzinomen eine Inhibition der Metastasierung durch die Sekretion von Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) und anderen ROS beobachtet werden [54, 64, 81, 82]. Auch die Sekretion der Arginase 1 und der damit einhergehenden Arginin-Depletion hat den ursprünglichen Sinn, die Proliferation des Tumors zu reduzieren, da auch Tumorzellen Arginin für ihren Stoffwechsel benötigen [95]. Zudem zeigten die PMN nach Kontakt zu den Tumorzellen eine Tumorzell-spezifische Zytotoxizität. Sie sezernieren ROS und Wasserstoff-Peroxid und leiten die Tumorzellen dadurch in die Apoptose. Der Tumor selbst stimuliert seinerseits durch die Sekretion von CCL2 und CCL5 die Sekretion und Akkumulation von Wasserstoffperoxid [82]. Durch TNF- α kann die Sekretion von ROS autokrin aktiviert werden. Es konnte zudem eine Aktivierung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) nachgewiesen werden [68, 81, 93, 89].

Auch auf die zelluläre Komponente der Immunabwehr können PMN stimulierend einwirken. Durch NETose wird die Aktivierungs-Schwelle der T-Lymphozyten gesenkt. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt aktivieren die Granulozyten in den $CD8^+$ -T-Lymphozyten vor allem die Proliferation und die Interferon- γ -Sekretion [82]. Die Granulozyten exprimieren ko-stimulatorische Oberflächenproteine wie CD80 und CD86 und können dadurch T-Lymphozyten aktivieren [96].

Außerdem haben Granulozyten einen Einfluss auf das Verhältnis von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten. Mit steigender Zahl der PMN wird das Verhältnis der T-Lymphozyten sowohl systemisch im Blut als auch lokal im *tumor microenvironment* zugunsten der zytotoxischen $CD8^+$ -T-Lymphozyten verschoben [84]. Innerhalb der $CD4^+$ -T-Lymphozyten dominieren die T_H1 -Zellen gegenüber den T_H2 -Zellen [53]. Des Weiteren wird die Differenzierung zu T_{reg} -Zellen und T_H17 -Zellen supprimiert [75, 84]. Das von den T_H17 -Zellen sezernierte IL-17 fördert die Metastasierung und das Wachstum des Tumors. Zudem konnte beobachtet werden, dass IL-17 die Differenzierung von Granulozyten zu immun-suppressiven Phänotypen stimuliert. Diese beiden Mechanismen werden somit indirekt unterbunden. Darüber hinaus werden durch die Sekretion von IL-18 durch Granulozyten natürliche Killerzellen rekrutiert und aktiviert [81] sowie die Bildung von MDSC inhibiert [84].

Es gibt Hinweise darauf, dass Granulozyten im Verlauf der Interaktion mit Tumoren auch ihre Eigenschaften von anti- zu pro-tumoral ändern können. Es konnte in der Kokultur von Granulozyten und Tumorzellen eine Zytotoxizität der Granulozyten gegenüber dem Tumor in den ersten 24 Stunden der Kultur beobachtet werden. Anschließend zeigten die verbliebenen Tumorzellen durch den Einfluss der Granulozyten jedoch eine stärkere Proliferation [97].

2.2.1.1. Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN)

Tumorzellen induzieren im Tumor-Mikromilieu die Bildung von sogenannten TAN. Gebildet werden sie entweder durch Umwandlung des Phänotyps von ausdifferenzierten Granulozyten im Knochenmark oder durch die Ausdifferenzierung von MDSC in der Blutzirkulation [64, 68]. Dies wird durch die Fähigkeit der Granulozyten ermöglicht, ihren Phänotyp an das unmittelbare Milieu anzupassen. Durch Wachstumsfaktoren des Tumors wie G-CSF wird die Neubildung der Granulozyten im Knochenmark stimuliert [53, 82, 90]. Die Tumorzellen sezernieren außerdem IL-8, wodurch Granulozyten chemotaktisch zum Tumor rekrutiert werden [85, 98] (vergleiche Abbildung 6). Außerdem werden die Granulozyten und MDSC durch die auf den Tumorzellen exprimierten Chemokin-Rezeptoren 1 und 2 zur transendothelialen Immigration in den Tumor angeregt. Dort werden sie zu Suppressor-Zellen umgewandelt und aktiviert [81]. Im Vergleich zu Granulozyten zeigen TAN ein reduziertes Ansprechen auf Chemotaxis der Tumore, eine schwächere phagozytische Aktivität und keine spezifische Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen [64].

Ähnlich wie bei den Granulozyten ist auch die Rolle der TAN in Tumoren aktuell umstritten. Man unterscheidet zwei verschiedene Gruppen von TAN durch ihre Eigenschaften. Die durch Interferon- γ induzierten TAN bilden die anti-tumorale Abwehr und werden im murinen Modell als N1-Neutrophile bezeichnet. Sie sezernieren vor allem TNF- α , CCL4, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid und ROS. All diese Stoffe wirken zytotoxisch auf die Tumorzellen und hemmen dadurch das Tumorwachstum. Zudem konnte eine gesteigerte Proliferation und Interferon- γ -Sekretion der T-Lymphozyten beobachtet werden [89, 54]. Diese anti-tumoralen TAN wurden vermehrt in frühen Stadien von Tumoren entdeckt, während pro-tumorale TAN eher in späteren Tumorstadien identifiziert werden konnten. Diese pro-tumoralen TAN werden durch TGF- β induziert und als N2-Neutrophile bezeichnet. Sie supprimieren die zelluläre adaptive Immunantwort, indem sie die Proliferation der zytotoxischen T-Lymphozyten senken [54]. Darüber hinaus sezernieren sie pro-tumorale Faktoren und fördern beispielsweise die Angiogenese des Tumors [89, 51, 68, 84, 88, 98].

2.2.2. Myeloische Suppressor-Zellen (MDSC)

Prinzipiell werden zwei unterschiedliche Zelltypen von MDSC unterschieden. Zum einen gibt es die polymorphkernigen granulozytären MDSC (PMN-MDSC), die den PMN ähnlich sind und zum anderen die monozytären MDSC (M-MDSC), die den Monozyten ähneln [52]. Zur Entstehung dieser Zelltypen gibt es unterschiedliche Beobachtungen. MDSC können aus Vorstufen der ausdifferenzierten Granulozyten oder Monozyten entstehen. Beide Zelltypen entwickeln sich aus gemeinsamen myeloischen Stammzellen. Durch den Einfluss

2. Literaturdiskussion

des Tumors wird die Ausdifferenzierung unterbrochen. Stattdessen verlassen die unreifen inhibitorischen MDSC das Knochenmark und gelangen in die Blutbahn. Andere MDSC entstehen durch Umdifferenzierung aus reifen myeloischen Zellen. Hierbei wird die sogenannte Trans-Differenzierung aus anderen Zelltypen von der Umaktivierung durch den Tumor unterschieden [2]. In der Blutbahn werden sie durch Chemokine des Tumors (zum Beispiel CCL2, CCL5 und CXCL8) rekrutiert und akkumulieren in der unmittelbaren Umgebung des Tumors. Im hypoxischen Tumor-Milieu steigert sich ihre inhibitorische immun-supprimierende Funktion [99, 100]. MDSC sind ebenso wie PMN assoziiert mit einer schlechten Prognose der Tumor-Patienten.

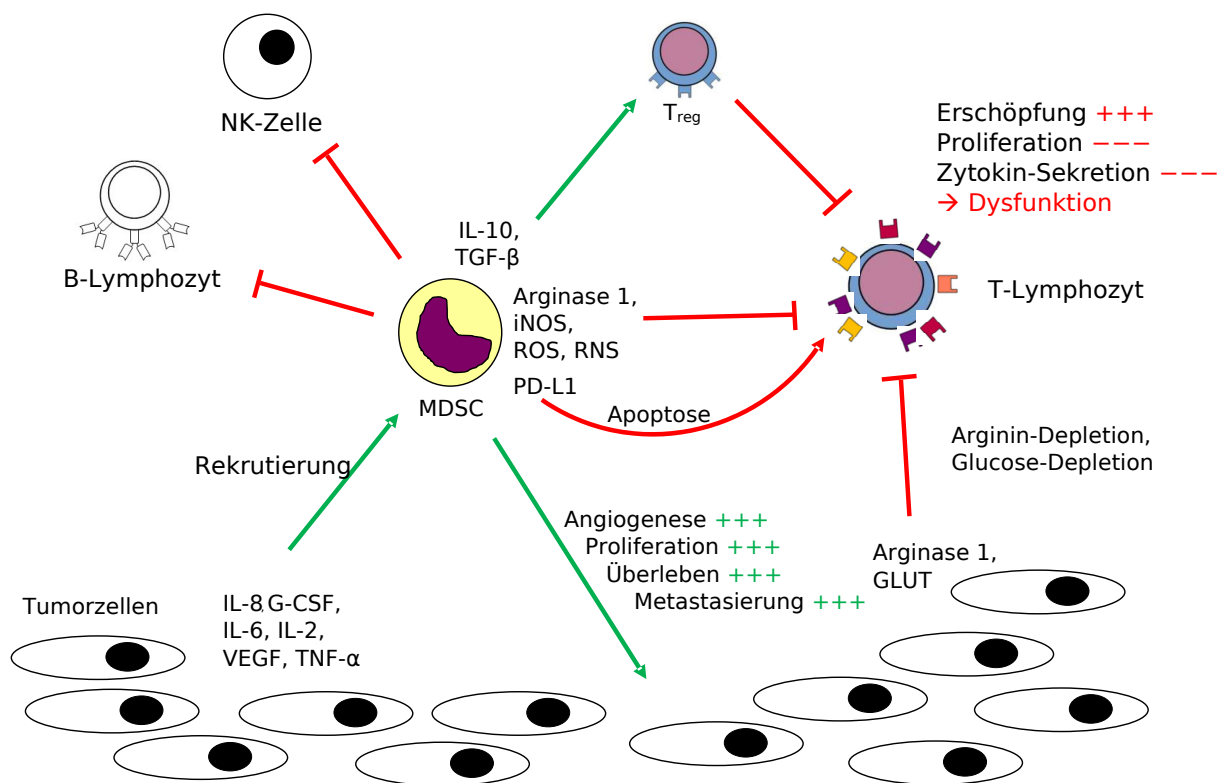


Abb. 7: Die immun-supprimierenden Eigenschaften der MDSC unter dem Einfluss der Tumor-Umgebung: Die MDSC zeigen ähnliche inhibitorische Eigenschaften wie die PMN (vergleiche Abbildung 6). Sie werden durch den Tumor vermehrt rekrutiert. Sie fördern die Angiogenese, Proliferation, das Überleben und die Metastasierung des Tumors. Die MDSC inhibieren zusätzlich zu den NK-Zellen und T-Lymphozyten auch B-Lymphozyten. Außerdem aktivieren sie T_{reg}-Zellen. Sie depletieren Arginin durch Sekretion von Arginase 1 und setzen ROS und RNS frei. Mit PD-L1 können sie an PD-1 der T-Lymphozyten binden und dort die Apoptose induzieren.

In ihren Oberflächenproteinen und ihrem Phänotyp unterscheiden sich PMN-MDSC nicht von ausdifferenzierten Granulozyten [2]. Sie sind jedoch durch eine vermehrte Expression von Granulozyten-spezifischen Oberflächenmarkern wie CD11 und CD66b schneller aktivierbar als

Granulozyten [64]. Granulozyten werden in die sogenannten *low-density neutrophils* (LDN) und *high-density neutrophils* (HDN) unterteilt. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich durch ihre Dichte *in vitro*. Aktuell herrscht noch keine letztendliche Klarheit über die unterschiedlichen Funktionen der beiden Gruppen. LDN sind *in vitro* nach der Dichteauftrennung zusammen mit den MDSC in der Gruppe der *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) aufzufinden (vergleiche Kapitel 5.1). Sie ähneln von ihren immuno-suppressiven Eigenschaften den MDSC [101]. PMN und HDN ko-lokalisieren mit den Erythrozyten bei deutlich höherer Dichte. Dadurch können PMN und HDN *in vitro* zuverlässig von MDSC und PBMC getrennt werden.

Die Bildung von MDSC kann schon in frühen Tumor-Stadien beobachtet werden. Aktiviert werden sie wie PMN durch IL-8 und G-CSF sowie zusätzlich durch IL-6, IL-2, TNF- α und VEGF. All diese Faktoren werden gezielt durch die Tumorzellen sezerniert [72, 100, 102, 103] (vergleiche Abbildung 7).

MDSC unterstützen direkt die Tumor-Entwicklung, indem sie das Überleben der Tumorzellen verbessern und die Angiogenese sowie die Metastasierung fördern. Außerdem rekrutieren sie weitere MDSC in die Umgebung des Tumors [99, 104]. Neben den direkten Wirkungen auf die Tumor-Progression ermöglichen sie das Tumor-Wachstum durch die Suppression der anti-tumoralen Immunabwehr. Es konnte die vermehrte Sekretion der Enzyme Arginase 1, iNOS, Indoleamin-2,3-dioxygenase und MPO beobachtet werden. Durch die Sekretion von ROS und Wasserstoffperoxid inhibieren sie die Aktivität und Proliferation von Immunzellen, beispielsweise von T-Lymphozyten. Die Sekretion von Arginase 1 und die damit bedingte Arginin-Depletion ist ein bestimmender Faktor der Suppression der T-Lymphozyten [70]. Auch die Depletion der Aminosäuren Cystein und Tryptophan ist ein wichtiger Mechanismus der T-Lymphozyten-Suppression. Dadurch wird die Proliferation und die Aktivität von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten supprimiert. Dies äußert sich durch eine verminderte Interferon- γ -Sekretion. Zudem supprimieren die MDSC andere Immunzellen direkt durch Bindung von PD-L1 an PD-1 von beispielsweise T-Lymphozyten. Die Expression von PD-L1 wird durch IL-6 und die Hypoxie, wie sie in der Tumor-Umgebung häufig ist, weiter stimuliert [2, 54, 64, 99, 100, 102, 103, 105].

MDSC fördern durch IL-10 und TGF- β die Differenzierung von T-Lymphozyten in regulatorische T-Lymphozyten [64, 75, 106, 107]. Außerdem wird die Funktion der natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten supprimiert [2, 99]. Eine Übersicht aller inhibitorischen Eigenschaften der MDSC und ihrer Effekte auf die Immunzellen ist in Abbildung 7 dargestellt.

2.3. Arginin-Stoffwechsel

Arginin ist eine der 20 proteinogenen Aminosäuren. Für T-Lymphozyten ist Arginin eine semi-essentielle, für die Zellproliferation sehr wichtige Aminosäure [108]. Arginin kann entweder durch Membran-Transporter aus dem Extrazellularraum ins Zytosol transportiert werden oder durch Autophagie beziehungsweise Mikropinozytose von Proteinen gewonnen werden. Für Arginin sind acht etablierte Transportproteine aus der Familie der *solute carrier* (SLC) beschrieben, die alle neben Arginin auch andere kationische Aminosäuren (KAS), wie Lysin oder Ornithin transportieren: die KAS-Transporter CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3 (*cationic amino acid transporter* (CAT) 1-3 entsprechen den SLC7A1-3), die Glykoprotein-assoziierten Transporter γ^+ LAT1 (SLC7A7), γ^+ LAT2 (SLC7A6) und $b^{0,+}$ AT (SLC7A9) sowie der Natrium- und Chlorid-abhängige Transporter $ATB^{0,+}$ (SLC6A14) [109]. Die Schlüsselrolle der Arginin-Aufnahme der T-Lymphozyten übernimmt der CAT-1 Transporter [45].

Des Weiteren sind T-Lymphozyten in der Lage aus Citrullin mit Hilfe der Enzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) Arginin zu metabolisieren. Niedrige Arginin-Konzentrationen führen bei Aktivierung der T-Lymphozyten zu einer Induktion der ASS, während die ASL konstitutiv exprimiert wird. Dadurch kann vermehrt Citrullin in Arginin metabolisiert werden und die T-Lymphozyten können dadurch niedrigere Arginin-Konzentrationen tolerieren [71]. Diese Reaktion ist in Abbildung 8 dargestellt. De novo können T-Lymphozyten Arginin aus Prolin, Glutamin oder Glutamat synthetisieren [110]. Die Auswirkungen eines kompletten Arginin-Mangels können durch die Metabolisierung von Citrullin zu Arginin und die de novo Synthese jedoch nicht aufgehoben werden [71]. Arginin-Mangel führt zu supprimierter Zellproliferation, Aktivität und Interferon- γ -Sekretion. Durch das Fehlen von Arginin wird die CD3 ζ -Kette der T-Zell-Rezeptoren vermindert exprimiert, sodass deren Signalübertragung inhibiert wird [25, 61, 77, 72, 111].

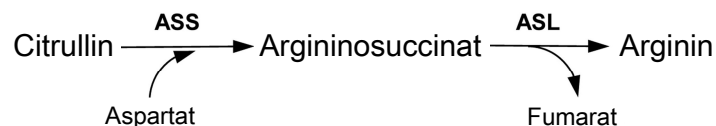


Abb. 8: Metabolisierung von Arginin aus Citrullin: Citrullin wird zusammen mit Aspartat durch die Argininosuccinat-Synthase in Argininosuccinat umgewandelt. Anschließend spaltet die Argininosuccinat-Lyase aus Argininosuccinat Fumarat und Arginin. (Abbildung verändert aus [71])

In den myeloischen Zellen wird Arginin zum einen durch die intrazelluläre iNOS und zum anderen durch die Arginase verstoffwechselt. Von der iNOS wird Arginin zu dem zytotoxi-

schen, anti-tumoralen und anti-mikrobiellen Mediator Stickstoffmonoxid metabolisiert. Die Arginase hydrolysiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Es gibt zwei Isoformen der Arginase, die als Arginase 1 und Arginase 2 bezeichnet werden. Arginase 2 ist ein mitochondriales Enzym, das in vielen verschiedenen Gewebearten so auch in T-Lymphozyten exprimiert wird. Arginase 1 dagegen ist ein zytosolisches Enzym, das vor allem in der Leber als Bestandteil des Harnstoffzyklus vorzufinden ist [3, 110].

Auch die Zellen des Immunsystems exprimieren Arginase 1. In murinen Zellen, zum Beispiel in Makrophagen und APZ kann die Arginase 1-Expression durch die T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-10 induziert werden [112]. T_H1 -Zytokine dagegen supprimieren die Synthese von Arginase 1 und induzieren im Gegenzug die iNOS [113, 114]. In humanen Granulozyten wird die Arginase 1 konstitutiv exprimiert. Sie wird in den Granulozyten jedoch nicht im Zytosol gelagert, sondern ist wahrscheinlich in den Gelatinase-haltigen oder in den azurophilen Granula gespeichert. In intaktem Gewebe kommt es zu keiner kontinuierlichen Arginin-Depletion im Plasma, da die Arginase in den azurophilen Granula keinen Kontakt zum Extrazellulärraum hat. Nach dem Zelltod der Granulozyten wird die Arginase 1 freigesetzt und kann Arginin in der unmittelbaren Umgebung depletieren [25]. Außerdem wird die Arginase 1 nach der Aktivierung der Granulozyten aus den Granula freigesetzt. In septischen Krankheitsbildern findet sich eine vermehrte Konzentration von Arginase 1 in den PMN [115]. Zudem kommt es in chronischen Entzündungen zu schnellem Zelluntergang der Granulozyten als physiologische Reaktion des Immunsystems und dadurch zur vermehrten Ausschüttung des Enzyms. Das Tumor-Mikromilieu weist viele Gemeinsamkeiten mit chronischen Entzündungen auf, weshalb auch dort die Arginase 1 der PMN vermehrt sezerniert wird [116]. Arginase 2 jedoch ist in PMN nicht exprimiert [3]. Im Gegensatz zu den PMN exprimieren humane eosinophile Granulozyten keine Arginase 1 [117].

MDSC exprimieren im Vergleich zu Granulozyten vermehrt Arginase 1 in ihrem Zytosol. Die Expression und Aktivität der Arginase 1 in den MDSC wird durch IL-13 und Interferon- γ von $CD8^+$ -T-Lymphozyten weiter stimuliert [110]. Im Gegensatz zu Granulozyten depletieren vitale MDSC die Arginin-Konzentration in ihrer Umgebung kontinuierlich [72]. Hierdurch wird in T-Lymphozyten die Aktivierung über T-Zell-Rezeptoren, die Proliferation und Zytokin-Sekretion (beispielsweise von Interferon- γ) inhibiert [118]. Die Sekretion anderer Zytokine wie IL-2 bleibt dagegen unbeeinflusst von der Arginin-Konzentration [72, 71, 119]. Im Arginin-Mangel sistieren die T-Lymphozyten in der G_0 -Phase des Zellzyklus und die Proliferation stagniert [4, 89]. Auch die Induktion von Apoptose konnte beobachtet werden [106]. Zusätzlich konnte durch eine erhöhte Arginase 1-Konzentration eine gesteigerte Differenzierung der T-Lymphozyten zu pro-inflammatorischen T_H17 -Zellen und deren typischer Zytokin-Sekretion beobachtet werden [105]. Außerdem wird durch Arginin-Mangel die

2. Literaturdiskussion

Akkumulation von CD2 und CD3 in der immunologischen Synapse gehemmt, wodurch die Bindung von T-Lymphozyten an andere Zellen, zum Beispiel an APZ, gestört [119]. Neben der Suppression der T-Lymphozyten kann die Arginase 1 durch Arginin-Depletion in den T-Lymphozyten auch die intrazelluläre Signalübertragung regulieren. Dabei sind vor allem die beiden Kinasen *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und *general control nonderepressible 2* (GCN2) beteiligt [105].

Diese Regulierung und Limitierung der T-Lymphozyten-Aktivität und Proliferation durch das Angebot an Arginin ist ein wichtiger Mechanismus des Immunsystems zur Verhinderung von Autoimmunität. Zudem wird die Arginin-Depletion im Mikromilieu des Tumors durch die Tumorzellen selbst oder durch die induzierten MDSC zur Suppression des Immunsystems genutzt [108]. Daher gilt die Idee der Arginase-Inhibition als medikamentöse Tumorthherapie zur Restimulation des Immunsystems aktuell als eine wichtige neue Strategie der Tumorthherapie und wird bereits in klinischen Studien getestet [110, 120]. Im Maus-Modell war die Arginase-Inhibition als Tumor-Therapie bereits vielversprechend [121].

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
α -Isonitrosopropiophenon (ISPF)	13502	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	BE17-737E	Lonza
AB-Serum		Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz
Ammoniumchlorid	K298.1	Carl Roth
Arginase 1, human, rekombinant	HM2162	Hycultec GmbH
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	C1157	Invitrogen
CB-1158		Incyte
Chlorwasserstoff 12 M (Salzsäure)	K025.1	Carl Roth
Dextransulfat-Natriumsalz	A4970,0100	AppliChem GmbH
Dimethylsulfoxid	4433	Pall corporation
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	11960-044	Gibco
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	D8537	Sigma-Aldrich
<i>dynabeadsTM human t-activator</i> CD3/CD28	00670474	Gibco
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	K928.3	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	8043	Carl Roth

3. Material und Methoden

Essigsäure	3738.1	Carl Roth
foetal calf serum (FCS), hitzeinaktiviert	F7524	Sigma-Aldrich
FCS, hitzeinaktiviert, dialysiert	F0392	Sigma-Aldrich
FuGENE 6	E2692	Promega
Genitacin	11811-031	Gibco
Harnstoff (600 µg/ml)	17-1319-01	plusone
Histopaque®-1077	10771-500ML	Sigma-Aldrich
Interferon-γ, human	51-26136E	BD Biosciences
Ionomycin		nicht bekannt
Interleukin-1 Rezeptor Antagonist	10123-HNAE	Sino Biologicals
Interleukin-2		Novartis
Interleukin-8	10098-H08Y	Sino Biologicals
Interleukin-16	10944-H07E	Sino Biologicals
Kaliumhydrogencarbonat	P748.1	Carl Roth
Kristallviolett	0B487250	Merck
L-Arginin, 100 mM	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Glutaminlösung, 200 mM	G7513	Sigma-Aldrich
L-Leucin, 100 mM	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin, 100 mM	L8662	Sigma-Aldrich
Lymphoprep™	07851/07861	Stemcell
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	A788334	Merck
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	A2087,0100	AppliChem
MIF	10246-H08H	Sino Biologicals
Natriumcarbonat	A407992	Merck
Natriumhydroxid (Natronlauge)	K021.1	Carl Roth
N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)	F3506	Sigma-Aldrich
nor-NOHA	F3685	Bachem
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma Aldrich
Penicillin-Streptomycin, 10 mg/ml	P4333	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA)		nicht bekannt
Phosphorsäure 1 M	6366.1	Carl Roth

Polybrene		Sigma-Aldrich
Protein Assay Standard II	500-0007	Bio-Rad
Propidiumiodid	556463	BD Biosciences
<i>Roswell Park Memorial Institute</i>		
(RPMI)-1640 Medium (Vollmedium)	R0883	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium ohne L-Arginin (Mangelmedium)	R1780	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure 1 M	4623.1	Carl Roth
<i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	0183.3	Carl Roth
Thymidin [methyl- ³ H]	T1895	Sigma
TWEEN®20	9127.2	Carl Roth
Trypanblau	T-0776	Biochrom-AG
Trypsin-EDTA Lösung	T3924	Sigma-Aldrich

3.1.2. Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits.

Kit/Bestandteile	Artikelnummer	Hersteller
<i>EasySep™ human t cell enrichment Kit</i>	19051	Stemcell
<i>EasySep™ human t cell enrichment cocktail</i>	19051C.2	
<i>EasySep™ D magnetic particles</i>	19250	
<i>EasySep™ human CD4⁺ t cell isolation Kit</i>	17912	Stemcell
<i>EasySep™ human CD4⁺ t cell isolation cocktail</i>	17952C	
<i>EasySep™ dextran rapidspheres™</i>	50103	
<i>EasySep™ human CD8⁺ t cell isolation Kit</i>	17913	Stemcell
<i>EasySep™ human CD8⁺ t cell isolation cocktail</i>	17953C	
<i>EasySep™ dextran rapidspheres™</i>	50103	
<i>DC™ protein assay reagents package</i>	5000116	Bio-Rad
<i>DC™ protein assay reagent A</i>	500-0113	
<i>DC™ protein assay reagent B</i>	500-0114	
<i>DC™ protein assay reagent S</i>	500-0115	

3. Material und Methoden

human proteome profilerTM array	ARY005B	R&D Systems
<i>human cytokine array</i>	898260	
<i>array buffer 4</i>	895022	
<i>array buffer 5</i>	895876	
Waschpuffer-Konzentrat	895003	
<i>detection antibody cocktail</i>	898261	
Streptavidin <i>horseradish</i> Peroxidase	893019	
Chemi-Reagenz 1	894287	
Chemi-Reagenz 2	894288	
4-Well Multifunktions-Platte	607544	
human IFN-γ ELISA set	555142	BD Biosciences
<i>capture antibody</i> (Anti-human IFN- γ)	51-26131E	
<i>detection antibody</i> (biotinyliertes, anti-humanes IFN- γ)	51-26132E	
Enzym-Reagenz (Streptavidin <i>horseradish</i> , Peroxidase Konjugat)	51-9002208	
Standard (rekombinantes humanes IFN- γ)	51-26136E	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Substrat-Reagenz Set (Substrat A und B)	555214	BD Biosciences

3.1.3. Medien

Tabelle 4: Verwendete Medien.

Medium	Medienzusätze
DMEM	10 % FCS 2 mM L-Glutamin Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (0,1 mg/ml) 25 mM HEPES
humanes RPMI-1640 (Vollmedium)	10 % AB-Serum 2 mM L-Glutamin Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (0,1 mg/ml) 25 mM HEPES

RPMI-1640 (Vollmedium)	10 % FCS 2 mM L-Glutamin Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (0,1 mg/ml)
RPMI-1640 (Vollmedium) + FCS	5 % FCS
L-Arginin RPMI-1640 (Mangelmedium)	10 % FCS, dialysiert 2 mM L-Glutamin 400 μ M L-Leucin 220 μ M L-Lysin 20 μ M Mangan(II)-chlorid Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (0,1 mg/ml)
+Arg-Medium	150 μ M L-Arginin
500 μ M Arg-Medium	500 μ M L-Arginin
1 mM Arg-Medium	1000 μ M L-Arginin
–Arg-Medium	0 μ M L-Arginin

3.1.4. Lösungen und Puffer

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 1 M Natronlauge oder 1 M Salzsäure eingestellt.

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
α -Isonitrosopropiophenon-Lösung (6 %)	3,0 g α -Isonitrosopropiophenone 50 mL 100 % Ethanol
Dextransulfat (steril filtriert)	500 ml DPBS 15 g Dextransulfat-Natriumsalz
Erythrozyten-Lyse-Puffer (steril filtriert) pH=7,3	4,65 g Ammoniumchlorid 0,5 g Kaliumcarbonat 0,1 ml von 0,5 M EDTA 500 ml destilliertes Wasser

3. Material und Methoden

Formaldehyd-Lösung 1 % (steril filtriert)	498 ml DPBS 5 g Paraformaldehyd 2 ml von 0,5 M EDTA
Formaldehyd-Lösung 4 % (steril filtriert) pH=6,9	1000 ml DPBS 40 g Paraformaldehyd
Harnstofflösung (60 µg/ml)	60 mg Harnstoff 100 ml destilliertes Wasser
Kristallviolett-Lösung 0,5 %	250 µl Kristallviolett 49,75 ml destilliertes Wasser
<i>magnetic cell sorting</i> (MACS)-Puffer	489 ml DPBS 10 ml FCS, hitzeinaktiviert 1 ml von 0,5 M EDTA
Mangan(II)-chlorid 10 mM (steril filtriert)	0,19 g Mangan(II)-chlorid 100 mL destilliertes Wasser
DPBS/EDTA	498 ml DPBS 2 ml von 0,5 M EDTA
Säuregemisch	135 mL 85 %-ige Phosphorsäure 45 mL 97 %-ige Schwefelsäure 320 mL destilliertes Wasser
SDS-Lösung 5 % (steril filtriert) pH=7,2	25 g SDS 225 ml destilliertes Wasser 250 ml DPBS
Trypanblau-Lösung 0,1 % (steril filtriert)	40 mg Trypanblau 50 ml DPBS

3.1.5. Antikörper

Die verwendeten Antikörper dienen der Markierung von Zellen. Zur Detektion mit dem FACS Canto wurden die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt. Als Farbstoffe wurden Alexa Fluor 488, Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin und Cyanine-7 (PECy-7) und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) verwendet. Sämtliche Antikörper wurden bereits fluoreszenzmarkiert gekauft.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Ursprung	Typ	Artikelnummer	Hersteller
Arginase 1 (FITC)	Maus	IgG	561927	BD Biosciences
CD3 (FITC)	Maus	IgG	555333	BD Biosciences
CD3 (APC)	Maus	IgG	555335	BD Biosciences
CD16 (PE)	Maus	IgG	555407	BD Biosciences
CD4 (FITC)	Maus	IgG	555346	BD Biosciences
CD8 (APC)	Maus	IgG	555369	BD Biosciences
CD25 (PE)	Maus	IgG	30795X	BD Biosciences
CD28 (FITC)	Maus	IgG	555728	BD Biosciences
CD57 (PECy-7)	Maus	IgG	25-0577-42	Affymetrix Inc.
CD66b (FITC)	Maus	IgM	561927	BD Pharmingen
CD69 (PE)	Maus	IgG	555531	BD Biosciences
CD152 (=CTLA-4) (APC)	Maus	IgG	349907	Biolegend
CD279 (=PD-1) (FITC)	Maus	IgG	557860	BD Biosciences
Isotyp Alexa Fluor 488	Ratte	IgG	400625	Biolegend
Isotyp APC	Maus	IgG	555751	BD Biosciences
Isotyp FITC	Maus	IgG	555748	BD Biosciences
Isotyp FITC	Maus	IgM	551448	BD Biosciences
Isotyp PE	Maus	IgG	555749	BD Biosciences
Isotyp PE	Hamster	IgG	550085	BD Biosciences
Isotyp PECy7	Maus	IgG	565573	BD Biosciences
Isotyp PerCP	Ziege	IgG	IC108C	R&D Systems
LAG-3 (PerCP)	Ziege	IgG	FAB 2319C	R&D
Muromonab (OKT-3)	Maus			Janssen-Cilag GmbH

3. Material und Methoden

TIGIT (PE)	Maus	IgG	MBSAU3	BD Biosciences
TIM3 (Alexa Fluor 488)	Ratte	IgG	FAB2365G	R&D Systems
V β -3 (PE)	Hamster	IgG	553209	BD Biosciences

3.1.6. Zelllinien

Tabelle 7: Eingesetzte Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
FD50	multiples Myelom	Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Markus Munder 3. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz
K562-A2 CD80 ⁺	chronisch myeloische Leukämie	Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Wölfel 3. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz
NCI H929 A2 ⁻	multiples Myelom	Prof. Dr. med. Michael Hundemer Innere Medizin 5, Universitätsklinikum Heidelberg
Phoenix-Ampho	Nierenepithel	ATCC [®]
SAOS-2	Osteosarkom	ATCC [®]
U266	multiples Myelom	Prof. Dr. Martin Gramatzki, ehemals: Abteilung für Hämatologie/Onkologie 3. Med. Klinik, Universität Erlangen

3.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Materialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>combitips advanced</i> [®] : 0,5 ml, 2,5 ml, 10 ml	Eppendorf
Deckgläser	Carl Roth
ELISA Platten	Greiner Bio-One
<i>fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)-Röhrchen	Corning
Falcon Röhrchen, steril: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Filtermembran, bedruckt A (für 1450 MicroBeta [™])	Perkin Elmer

Folie, klebend, transparent	R&D Systems
Pasteurpipetten (Plastik)	Brand
Pasteurpipetten (Glas)	alpha Laboratories
Petrischale, steril: 10 cm	CitoOne
Pipettenspitze, steril: 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 2 ml	Sarstedt
Pipette, steril: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Probenhülle (für 1450 MicroBeta™)	Perkin Elmer
Reaktionsgefäß, steril: 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, steril: 14 ml	Stemcell
Spritze, steril: 2 ml, 20 ml, 50 ml	BD Discardit®
Spritzenfilter Filttropur	Sarstedt
Stericup-GV	Merck
Steritop™ Filtereinheiten	Merck
Transwell-Einsätze (Porengröße 0,4 µm)	Corning
Zählkammer	Neubauer
Zellkulturflasche, steril, T25, T75, T125	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte, steril: 6 Well, 24 Well, 96 Well (Flachboden, Rundboden)	Greiner Bio-One

3.1.8. Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAHD	Köttermann
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences
Harvester 96	MACH 3	TOMTEC
Heizblock	Thermostat Plus 1,5 mL	Eppendorf
<i>iBright</i>	CL1000	Invitrogen
Inkubator	Function Line	Heraeus
1450 LSC & Luminescence Counter	MicroBeta	TriLux
Mikroskop	AE2000	Motic

3. Material und Methoden

pH-Meter	766	Knick
Platereader	MRXC	DYNEX Technologies
Scanner	Perfection 2400 Photo	Epson
Sterilbank	Hera Safe HS18	Heraeus
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
	Vortex Genius 3	IKA Labortechnik
	G-560 E	Scientific Industries
Wasserbad	1003	GFL
Zellbestrahlung	Gamma Cell 2000	Molsgard
Zentrifuge groß	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge klein	5417 R	Eppendorf

3.1.9. Statistik und verwendete Programme

Die FACS-Daten wurden mit dem Programm *FlowJo* ausgewertet. Der Platereader nutzte das Programm *Revelation G 3.2*. Die radioaktiven *counts* wurden mit der *MicroBeta workstation* gemessen. Der *cytokine array* wurde mit der Software des *iBright: iBright analysis* ausgelesen. Ausgewertet und normiert wurden die Daten mit *Microsoft Excel*. Dabei wurde die Kontrollbedingung „aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium ohne Inhibitor“ auf 100 % normiert und die anderen Werte in prozentualen Bezug dazu gesetzt. Alle Messwerte wurden mittels eines *one-way ANOVA-test* (Post-Test: *turkey*) statistisch ausgewertet. Die Werte wurden \pm der Standardabweichung angegeben. Alle p-Werte $< 0,05$ % wurden dabei als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern gekennzeichnet. p-Werte $< 0,01$ % erhielten zwei Sterne und p-Werte $< 0,001$ % erhielten drei Sterne. Die Graphen wurden mit *GraphPad Prism 3.02* erstellt.

3.2. Methoden

Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt. Ausgenommen sind hierbei die Arbeiten in den Radioaktivlaboren und die Methoden der Proteinanalytik. Die Inkubatoren wiesen eine Temperatur von 37°C und einen konstanten Kohlenstoffdioxidgehalt der Luft von 5 % auf.

3.2.1. Methoden der Zellkultivierung

3.2.1.1. Zellzählung

Zum Zählen der Zellen wurden in einer 96-Well-Platte 50 µl der Zellsuspension zu 50 µl der 0,1 %-igen Trypanblau-Lösung aus Tabelle 5 pipettiert und etwa 8 µl der Mischung zwischen den Objektträger und das Deckgläschen pipettiert. In der Zählkammer wurden zwei sich nicht berührende Quadranten ausgezählt.

3.2.1.2. Kultivierung von Suspensionszellen: FD50, K562 -A2 CD80⁺, NCI, U266

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Inkubator inkubiert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen nach sieben Tagen (die K562-A2 CD80⁺ nach drei bis vier Tagen) 1:5 bis 1:20 gesplittet. Hierfür wurde die Zellsuspension in eine frische Zellkulturflasche überführt und mit auf 37°C erwärmtem RPMI-1640 Vollmedium aus Tabelle 4 verdünnt. Für die K562 -A2 CD80⁺ Zellen wurde zusätzlich 1 mg/ml Genitacin in das Medium dazu gegeben (2 mM im Medium). Ein Tag vor dem Ansetzen des jeweiligen Versuches wurde das Medium der Zellen ausgewechselt. Dazu wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1500 *rounds per minute* (rpm), wenn nicht anders gekennzeichnet in der Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge von Thermo Fisher Scientific, 5 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wurde das alte Medium dekantiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

3.2.1.3. Kultivierung von adhärennten Zellen: SAOS-2

Die SAOS-2-Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Inkubator inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen je nach Zelldichte 1:3 bis 1:10 gesplittet. Die adhärennten SAOS-2-Zellen wurden dazu zunächst von der Zellkulturflasche gelöst. Dafür wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Das DPBS wurde dafür an der gegenüberliegenden Wand der Zellkulturflasche ablaufen gelassen. Nach kurzem Schwenken wurde das DPBS abgenommen und 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung so in die Zellkulturflasche pipettiert, dass alle Zellen bedeckt wurden. Danach wurde die Zellkulturflasche für zwei bis drei Minuten im Inkubator inkubiert. Durch Klopfen auf die Zellkulturflasche und anschließendem Abspülen der Wand mit auf 37°C erwärmtem Medium wurden die Zellen von der Wand abgelöst. Abschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, gesplittet.

Kultivierung von T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) wurden direkt nach der Isolierung in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen im Inkubator inkubiert. Als Medium wurde humanes RPMI-1640 Vollmedium aus Tabelle 4 genutzt.

3.2.1.4. Retrovirale Transduktion der T-Lymphozyten

Transfektion der Phoenix Amphi

Die Phoenix Amphi-Zellen wurden in DMEM-Medium aus Tabelle 4 kultiviert. Dazu wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in 15 ml Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche für drei Tage im Inkubator inkubiert. In diesen drei Tagen wuchsen die Zellen adhären an der Zellkulturflasche an. Zum Lösen wurden die Zellen gemäß Kapitel 3.2.1.3 mit DPBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Statt mit RPMI-1640 Vollmedium wurden die Phoenix Amphi mit DMEM-Medium von der Wand der Zellkulturflasche abgespült. Danach wurden je $1,2 \cdot 10^6$ der Phoenix Amphi-Zellen in 8 ml DMEM-Medium aufgenommen, in einer sterilen Petrischale ausgesät und im Inkubator inkubiert. Einen Tag später wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 6 ml frisches Medium ersetzt, das am Rand der Flasche auf die Zellen laufen gelassen wurde. Nach vier Stunden Inkubation im Inkubator wurden $35 \mu\text{l}$ *FuGENE 6* in $800 \mu\text{l}$ DMEM-Medium pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden $10 \mu\text{g}$ der T-Zell-Rezeptor-DNA (pBup53sc-neo²) und $5 \mu\text{g}$ der Helferplasmide (pHit60² und pColt-Galv²) hinzugefügt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde diese Mischung vorsichtig auf die Phoenix Amphi pipettiert und die Petrischale weiter im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag um 16 Uhr wurde das Medium abgenommen und durch 8 ml humanes RPMI-1640 Vollmedium ersetzt. Die Platte wurde erneut für 24 Stunden im Inkubator inkubiert. Einen Tag später wurden die Phoenix Amphi gesammelt und die Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert, um den zellfreien Virusüberstand zu erhalten.

Transduktion der humanen PBMC

Nach der Aufreinigung aus Vollblut (siehe Kapitel 3.2.2) wurden die PBMC in humanem RPMI-1640 Vollmedium in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Zusätzlich wurden 30 ng/ml Muromonab (OKT-3) und 600 U/ml IL-2 in das Medium pipettiert. Auf einer 24-Well-Platte wurden die PBMC in je 2 ml pro Well ausgesät und im Inkubator inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die PBMC geerntet und zusammengeführt. Das Medium wurde abzentrifugiert und das Zellpellet in dem Virusüberstand (siehe Kapitel 3.2.1.4) in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Danach wurden $5 \mu\text{g/ml}$ Polybrene in das

²bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Theobald, 3. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz

Medium hinzugefügt und je 1 ml der Zellsuspension in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die 24-Well-Platte wurde anschließend ohne Bremse mit 2200 rpm bei 32°C für 90 Minuten zentrifugiert und anschließend im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PBMC geerntet, das Medium abzentrifugiert und die Zellen in humanem RPMI-1640 in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Zusätzlich wurde in das Medium pro $1 \cdot 10^6$ Zellen 5 μ l *dynabeadsTM human t-activator* CD3/CD28 (anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte Beads), 600 U/ml IL-2 sowie 800 μ g/ml Genitacin pipettiert. Danach wurden je 2 ml der Zellsuspension in einer 24-Well-Platte ausgesät.

Bereits nach einer Woche bestand die Zellpopulation zu $> 90\%$ aus CD3⁺ und v β -3⁺ T-Lymphozyten (vergleiche Abbildung 39 auf Seite 178 im Anhang). Somit hatte sich durch die spezifische Restimulation eine T-Lymphozyten-Population angereichert, die den transduzierten T-Zell-Rezeptor exprimiert. Die transduzierten T-Lymphozyten wurden einmal pro Woche mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads und IL-2 in der selben Konzentration restimuliert und neu ausgesät.

Nach drei bis vier Wochen wurde die Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads durch die Restimulation mit beladenen und bestrahlten (siehe Kapitel 3.2.1.5) K562-Zellen im Verhältnis 1 T-Lymphozyt auf 0,3 K562-A2 CD80⁺-Zellen ersetzt.

3.2.1.5. Beladung und Bestrahlung der K562-A2 CD80⁺-Zellen

Die K562-A2 CD80⁺-Zellen wurden gemäß Kapitel 3.2.1.1 gezählt und die benötigte Zellzahl (die Hälfte der Anzahl der T-Lymphozyten, die mit den K562-Zellen stimuliert werden sollen) durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und zum Zellpellet sowie in die, nach dem Dekantieren verbliebene Restflüssigkeit, 1 μ l p53-Peptid₂₆₄₋₂₇₂ (entspricht 10 μ g) pipettiert. Anschließend wurde diese Suspension für zwei Stunden im Inkubator inkubiert. Danach wurden 10 ml des RPMI-1640 Vollmediums auf die Suspension pipettiert und die Zellen in der Zellbestrahlungsanlage mit 100 Gray bestrahlt. Nach dem Bestrahlen wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert und in frischem Medium aufgenommen.

3.2.2. Isolierung von PMN und T-Lymphozyten

Aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern wurden PMN und T-Lymphozyten isoliert.

Dichteauftrennung von heparinisiertem Vollblut

Mittels einer Dichteauftrennung konnten die PMN von den T-Lymphozyten getrennt werden. Dafür wurde das Blut zunächst in einer Zellkulturflasche 2:1 mit DPBS/EDTA verdünnt. In einem 50 ml-Reaktionsgefäß wurden 15 ml Histopaque[®]-1077 oder LymphoprepTM vorgelegt

3. Material und Methoden

und vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut überschichtet. Durch Zentrifugation (2200 rpm für 10 Minuten, ohne Bremse) wurde das Vollblut nach der Dichte der Zellen aufgetrennt. Da die PMN eine höhere Dichte aufweisen als die T-Lymphozyten, befanden sich diese zusammen mit den Erythrozyten in der untersten Phase. Die T-Lymphozyten weisen eine geringere Dichte auf, weshalb sie nach der Zentrifugation in der weiter oben gelegenen, dünnen weißen Zellphase verbleiben. Zusammen mit den mononukleären Zellen bilden sie die sogenannte PBMC-Phase.

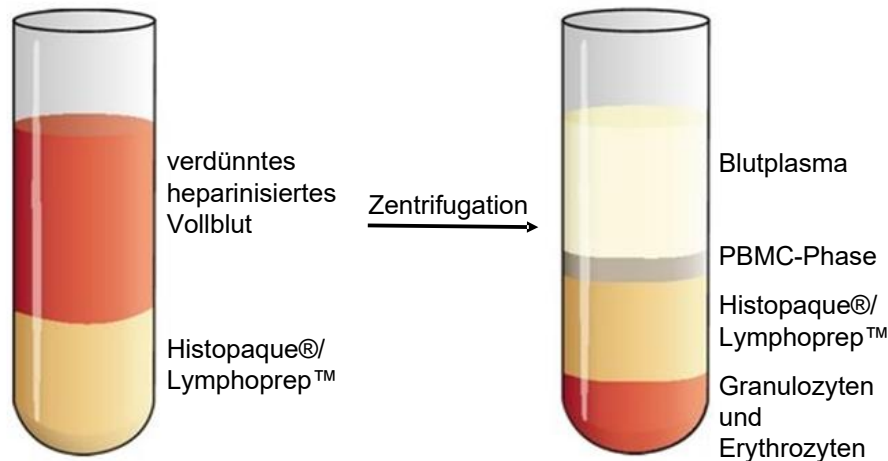


Abb. 9: Dichteauftrennung: Das humane Vollblut wurde mit Histopaque®-1077 oder Lymphoprep™ überschichtet und durch Zentrifugation ohne Bremse aufgetrennt. Es bildeten sich zwei zellreiche Phasen aus: die PBMC-Phase und die untere Phase mit den Erythrozyten und Granulozyten.

Isolierung der T-Lymphozyten

Um die T-Lymphozyten von den anderen PBMC zu isolieren, wurde zunächst die gesamte PBMC-Phase abgenommen. Durch Zentrifugation (1500 rpm für 5 Minuten) wurden die Zellen pelletiert. Wenn das Pellet eine sichtbare Rotfärbung durch Erythrozyten aufwies, wurden diese durch den Erythrozyten-Lyse-Puffer aus Tabelle 5 lysiert. Dazu wurde das Zellpellet in 20 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (1500 rpm für 5 Minuten) wurden die PBMC erneut pelletiert und der Erythrozyten-Lyse-Puffer von den PBMC dekantiert. Anschließend wurden die PBMC drei Mal in 15 ml MACS-Puffer aus Tabelle 5 gewaschen, indem sie zuerst in dem MACS-Puffer resuspendiert und danach durch Zentrifugation (1500 rpm für 5 Minuten) pelletiert wurden. Der Waschpuffer wurde nach jedem Waschschrift dekantiert und verworfen. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, gezählt. Wenn keine Erythrozyten-Lyse notwendig war, wurden 50 µl der Zellsuspension vor dem Zählen 1:1 mit 4%-iger Essigsäure verdünnt. Die Essigsäure lysierte die im Zellpellet befindlichen Erythrozyten, aber nicht die PBMC. Dadurch wurde gewährleistet, dass beim Zählen ausschließlich die PBMC gezählt wurden und nicht eventuell verbliebene Erythrozyten. Anschließend wurden die Zellen in einer

Konzentration von $50 \cdot 10^6$ Zellen/ml in MACS-Puffer aufgenommen.

Die aufgereinigten PBMC wurden durch negative Selektion je nach Versuchsaufbau mit dem *EasySepTM human t cell enrichment Kit*, dem *EasySepTM human CD4⁺ t cell isolation Kit* oder dem *EasySepTM human CD8⁺ t cell isolation Kit* aus Tabelle 3 isoliert. Dafür wurden die T-Lymphozyten in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

Für das *enrichment Kit* wurden 100 µl des *EasySepTM human t cell enrichment cocktail* pro 1 ml Zellsuspension pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dieselbe Menge an *EasySepTM magnetic particles* hinzugefügt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Volumen in dem Reaktionsgefäß auf 5 ml aufgefüllt und das Reaktionsgefäß für 5 Minuten in einem Magneten platziert. Nach den fünf Minuten befanden sich in der Zellsuspension ausschließlich T-Lymphozyten. Die restlichen Zellen wurden via Antikörper-Bindung und nachfolgender Interaktion mit Dextran-gekoppelten magnetischen Partikeln durch den Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes festgehalten. Durch Kippen des im Magneten platzierten Reaktionsgefäßes wurde die Zellsuspension in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Für die *isolation Kits* wurden 100 µl des *EasySepTM human CD4⁺ t cell isolation cocktail* pro 1 ml der Zellsuspension pipettiert und für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde die selbe Menge an *EasySepTM dextran rapidspheresTM* hinzugefügt, direkt auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt und das Reaktionsgefäß für drei Minuten in einem Magneten platziert. Abschließend wurde die Zellsuspension ebenfalls durch Kippen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Entsprechend wurde auch für die Isolation von CD8⁺ T-Lymphozyten verfahren. Im Anschluss wurden die isolierten Zellen nach Kapitel 3.2.1.3 für drei Tage inkubiert.

Isolierung von PMN

Die PMN befanden sich nach der Dichteauftrennung zusammen mit den Erythrozyten in der untersten roten Phase. Die überständige Flüssigkeit wurde abgenommen und die Zellphase 1:1 mit DPBS/EDTA resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde wiederum 1:1 mit 3%-iger Dextransulfat-Lösung gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Dextransulfat-Lösung wurde die Zellsuspension erneut nach der Dichte ihrer Bestandteile aufgetrennt. Es bildeten sich zwei Phasen, eine dichte, rote Phase im unteren Teil des Reaktionsgefäßes, in der sich die Erythrozyten sammelten und eine flüssige, hellere Phase, die der unteren Phase auflag. In dieser oberen, granulozytären Phase befanden sich die PMN sowie auch noch einige Erythrozyten. Der granulozytäre Überstand wurde abgenommen und durch Zentrifugation (1800 rpm für 3 Minuten) pelletiert. In dem PMN-reichen Zellpellet wurden die restlichen Erythrozyten durch den Erythrozyten-Lyse-Puffer lysiert. Dazu wurde das Zellpellet

3. Material und Methoden

in 25 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis sowie anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die PMN, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, drei Mal mit je 40 ml DPBS/EDTA gewaschen.

3.2.2.1. Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie

Für die Reinheitskontrolle wurden 150.000 bis 250.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit DPBS auf 1 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen pelletiert und anschließend der Überstand dekantiert. Auf das Zellpellet wurde 1 µl des gewünschten Antikörpers pipettiert und durch Vortexen gut gemischt. Die Zellen wurden mit diesen Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 10: Zellpopulationen mit ihren zellspezifischen Antikörpern.

Zellpopulation	zellspezifischer Antikörper
PMN	CD66b
CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	CD4
CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	CD8
CD4 ⁺ und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	CD3
transduzierte T-Lymphozyten	vβ3 und CD3

Danach wurden die überschüssigen Antikörper abgewaschen, indem in jedes Röhrchen 1 ml DPBS pipettiert wurde. Durch die anschließende Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen erneut pelletiert. Der flüssige Überstand wurde dekantiert und die fertig gefärbte Probe je nach Zellzahl in 175 bis 250 µl 1 %-iger PFA-Lösung resuspendiert. Die 1 %-ige PFA-Lösung diente der Zellfixierung.

Für jede Messung im FACS Canto wurden drei Proben vorbereitet und gemessen: eine ungefärbte Probe, eine mit dem gewünschten Antikörper gefärbte Probe und eine Probe, die mit der Isotyp-Kontrolle gefärbt wurde. Mit der ungefärbten Probe wurden die Parameter *forward scatter* (FSC) und *sideward scatter* (SSC) auf die Zellpopulation sowie der Farbkanal des Antikörpers passend eingestellt. Die Isotyp-Kontrolle diente zum Ausschluss unspezifischer Bindung der Antikörper an die jeweiligen Zellen mit daraus resultierender falsch-positiver Fluoreszenz-Emission. Jede Zellpopulation wurde mit dem für sie spezifischen Antikörper gefärbt (vergleiche Tabelle 10). Ausgewertet wurden die FACS-Messungen mit dem Programm *FlowJo* (vergleiche Anhang Abbildungen 38 und 39 auf Seiten 177 und 178).

3.2.3. Proliferations-Assays

3.2.3.1. Ansetzen der Versuchsbedingungen

Nach der Isolation wurden die PMN in +Arg-Medium aus Tabelle 4 aufgenommen und in den entsprechenden Konzentrationen je nach benötigtem Volumen in einer 6- oder 24-Well-Platte ausgesät. Die Konzentrationen ergaben sich aus der T-Lymphozyten-End-Konzentration des jeweiligen Versuches. Sie wurde so gewählt, dass die Versuchsbedingungen ein Verhältnis von PMN zu T-Lymphozyten von 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 und 50:1 aufwiesen. Jede dieser Bedingungen wurde ein Mal ohne weitere Zusätze und je ein Mal mit den benötigten Zusätzen angesetzt. Mögliche Zusätze sind:

- CB-1158 (100 μ M): Arginase 1- und 2-Inhibitor
- nor-NOHA (1 mM): kompetitiver Arginase 1- und 2-Inhibitor
- fMLP (1 μ M): Leukozyten-Aktivator durch Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren
- Ionomycin (1 μ M): Leukozyten-Aktivator durch Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration
- PMA (0,24 μ M): Leukozyten-Aktivator durch Aktivierung der Proteinkinase C

Neben den Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Zusätzen wurden auch Kontrollbedingungen ohne PMN nur mit +Arg-Medium und den verwendeten Zusätzen angesetzt und in eine 24-Well-Platte pipettiert. Alle Bedingungen wurden je nach Versuchsansatz für ein, zwei oder drei Tage im Inkubator inkubiert.

Aktivierung der PMN

Um die PMN zu aktivieren, wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer 24-Well-Platte ausgesät. Pro Bedingung wurde in 2 Wells je 1 ml der Zellsuspension und des Aktivators pipettiert. Die Platte wurde 30 Minuten im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (1500 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf, 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml +Arg-Medium aufgenommen. In je einen der beiden Ansätze wurde der Inhibitor nor-NOHA (1 mM) hinzugefügt und alles für drei Tage im Inkubator inkubiert. Zusätzlich zu den Bedingungen mit den Aktivatoren wurden vier Doubletten der PMN ohne Aktivatoren ausgesät. Davon wurde je eine dieser Doubletten nach 5, 10, 15 oder 30 Minuten geerntet. Danach wurden sie genauso behandelt, wie die Bedingungen mit Aktivatoren.

3.2.3.2. [³H]-Thymidin-Assay

Der [³H]-Thymidin-Assay wurde in 96-Well-Platten angesetzt. Pro Well wurden 50.000 T-Lymphozyten (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, transduzierte T-Lymphozyten) ausgesät. Dazu wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, gezählt und die benötigte Zellzahl in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf, 5 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert. Das überständige Medium wurde verworfen und die Zellen in 1 ml –Arg-Medium aus Tabelle 4 resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in –Arg-Medium aufgenommen. Für die Kontrollbedingung „T-Lymphozyten in +Arg-Medium“ wurde in drei Wells je 10 µl der Suspension ausgesät. Danach wurde zu der Zellsuspension pro $1 \cdot 10^6$ Zellen 5 µl der anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads pipettiert, gut gemischt und dann pro Well 10 µl ausgesät. Für jede Bedingung wurden T-Lymphozyten in drei Wells ausgesät, sodass sich Tripletts ergaben.

Die transduzierten Zellen wurden statt mit den anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads mit Peptid-beladenen und bestrahlten K562-A2 CD80⁺-Zellen aus Kapitel 3.2.1.5 aktiviert. Dazu wurden die T-Lymphozyten direkt in alle Wells ausgesät, wie oben beschrieben. Die K562-A2 CD80⁺ wurden nach dem Bestrahlen wie die T-Lymphozyten drei Mal mit –Arg-Medium gewaschen und in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Anschließend wurde in alle T-Lymphozyten-Wells 10 µl der K562-A2 CD80⁺-Zellsuspension dazu pipettiert (T:K562-Verhältnis: 2:1), ausgenommen die Kontrollbedingung in +Arg-Medium.

Die Bedingungen mit PMN wurden aus der 24-Well-Platte geerntet und durch Zentrifugation (2500 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf, 10 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert. Anschließend wurden je 200 µl des reinen, zelllosen Überstandes in die Wells pipettiert, in denen sich schon die T-Lymphozyten und Aktivatoren befanden. Die Kontrollmedien wurden ebenso in 200 µl zu den drei Wells des Tripletts pipettiert. Danach wurde die 96-Well-Platte für eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert, um einen guten Zell-Zell-Kontakt am Boden des Wells zu ermöglichen und für 48 Stunden im Inkubator inkubiert.

Nach den 48 Stunden wurde aus jedem Well 50 µl Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei –80°C für folgende Experimente eingefroren. Danach wurde in jedes Well 20 µl des 1,85 MBq [³H]-Thymidins (37 MBq wurde mit –Arg-Medium 1:20 verdünnt) pipettiert und die Platte erneut für 16 Stunden im Inkubator inkubiert. Während dieser 16 Stunden wurde das radioaktive [³H]-Thymidin von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut. Durch anschließendes Einfrieren der Platten wurde die Zellmembran zerstört, wodurch die radioaktiv markierte DNA in das Medium freigesetzt wurde. Indem die Platten erneut aufgetaut wurden,

konnten die einzelnen Wells mit dem Harvester⁹⁶ auf ein Filterpapier geerntet werden. Anschließend wurde in dem 1450 LSC & Luminescence Counter die Intensität der radioaktiven Strahlung als *counts per minute* (cpm) gemessen.

3.2.3.3. Direkt-Kokultur

Für die Direkt-Kokultur wurden die T-Lymphozyten nach der Isolation aus Kapitel 3.2.2, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, gezählt und in einer 96-Well-Platte ausgesät. Auch die PMN wurden direkt nach dem Isolieren ohne Vorinkubation in je 10 μl +Arg-Medium zu den T-Lymphozyten in die 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden die PMN in verschiedenen Konzentrationen aufgenommen, sodass sich ein Verhältnis von PMN zu T-Lymphozyten von 1:1, 5:1, 10:1 und 20:1 ergab. Von diesen Bedingungen wurden doppelte Triplets angesetzt. Zusätzlich zu den PMN-Bedingungen wurden als Kontrollbedingungen T-Lymphozyten ohne PMN in die 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurde in die Hälfte der PMN-Bedingungen 200 μl des +Arg-Mediums pipettiert und in die andere Hälfte das +Arg-Medium mit dem Zusatz von 1 mM nor-NOHA. Auch in die Kontrollbedingungen wurden 200 μl des jeweiligen Mediums pipettiert.

Die 96-Well-Platte wurde zentrifugiert (1000 rpm, für 1 Minute bei Raumtemperatur) und für 48 Stunden im Inkubator inkubiert. Die anschließende Behandlung mit [³H]-Thymidin und die Messung der *counts per minute* wurde gemäß Kapitel 3.2.3.2 durchgeführt.

3.2.3.4. Transwell-Kokultur

Nach der Isolation in Kapitel 3.2.2 wurden die T-Lymphozyten zunächst, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, gezählt und in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in –Arg-Medium aufgenommen. Pro $1 \cdot 10^6$ T-Lymphozyten wurden 5 μl der anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads dazu pipettiert. Danach wurden in jedes Well einer 24-Well-Platte 50 μl dieser Zellsuspension pipettiert. Als Kontrollbedingungen wurden zu den 50 μl Zellsuspension 950 μl des Mediums (+Arg-Medium, +Arg-Medium mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA oder –Arg-Medium) pipettiert. Für die Bedingungen mit den PMN wurde in ein Well 750 μl +Arg-Medium und in ein Well 750 μl +Arg-Medium mit dem Zusatz nor-NOHA zu den T-Lymphozyten gegeben. Die nor-NOHA Konzentration in dem Medium wurde so gewählt, dass sich in allen Versuchsansätzen mit nor-NOHA eine Endkonzentration von 1 mM ergab. Die PMN wurden in verschiedenen Konzentrationen in 200 μl +Arg-Medium aufgenommen, sodass sich ein finales Verhältnis von PMN zu T-Lymphozyten von 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 ergab.

Die Transwell-Einsätze wurden in die Wells mit den T-Lymphozyten eingesetzt und die 200 μl der PMN-Zellsuspension in die Einsätze pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 48 Stun-

3. Material und Methoden

den im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Transwell-Einsätze entfernt und die T-Lymphozyten im Medium resuspendiert. Aus jedem Well der 24-Well-Platte wurden 200 µl der Zellsuspension in drei Wells einer 96-Well-Platte überführt, wodurch sich pro Bedingung ein Triplet ergab. In diese Platte wurde [³H]-Thymidin dazu gegeben und die Platte inkubiert (vergleiche Kapitel 3.2.3.2). Im Anschluss wurde die Radioaktivität mit dem 1450 LSC & Luminescence Counter gemessen.

3.2.3.5. CFSE-Assay

Carboxyfluoresceinsuccinimidylester ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der kovalent an intrazelluläre Moleküle bindet. Durch die Zellteilung wird die Konzentration des intrazellulären CFSE von der Mutterzelle auf die beiden Tochterzellen halbiert. So lässt sich mit Hilfe der Abnahme der CFSE-Konzentration die Anzahl der Zellteilungen einer Zell-Population darstellen. Für den CFSE-Assay wurden die T-Lymphozyten wie in Kapitel 3.2.1.1 gezählt. $3 \cdot 10^6$ T-Lymphozyten wurden in 450 µl RPMI-1640 Vollmedium + FCS aus Tabelle 4 aufgenommen. Für die Färbung wurde das CFSE mit DPBS verdünnt, sodass sich eine Konzentration von 50 µM ergab. Von dieser Vorverdünnung wurden 50 µl zu der Zellsuspension pipettiert und gut gemischt. Die Endkonzentration des CFSE betrug somit 5 µM. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 5 ml des RPMI-1640 Vollmediums + FCS dazu pipettiert und die Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet erneut in 5 ml des RPMI-Mediums + FCS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Abschließend wurde das Zellpellet in ein Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml –Arg-Medium aufgenommen. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension gemäß Kapitel 3.2.3.2 mit den anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads in die 96-Well-Platte ausgesät. Zusätzlich wurden 150.000 T-Lymphozyten in ein FACS-Röhrchen überführt und in DPBS gewaschen (vergleiche Kapitel 3.2.2.1).

Die Kontrollen und die Bedingungen mit den PMN wurden, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, geerntet, zentrifugiert und zu den T-Lymphozyten in die 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 1000 rpm für eine Minute zentrifugiert und für vier Tage im Inkubator inkubiert.

Zusammen mit ungefärbten T-Lymphozyten wurden die gefärbten Zellen an Tag 0 der Inkubation mit dem PMN-Überstand mittels des FACS Canto im FITC-Kanal gemessen. Nach vier Tagen Inkubation der gefärbten T-Lymphozyten mit den PMN-Überständen wurden jeweils die Triplets einer Bedingung in einem FACS-Röhrchen zusammengeführt. Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml DPBS pipettiert. Durch fünfminütiges Platzieren dieser in

einem Magneten wurden die anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads an der Röhren-Wand gesammelt. So konnte die Zellsuspension frei von den anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads in ein frisches Röhrchen überführt werden. Die Zellen wurden anschließend gemäß Kapitel 3.2.2.1 gewaschen, in 200 µl DPBS aufgenommen und mit dem FACS Canto im FITC-Kanal mit den identischen Einstellungen der ungefärbte Kontrolle an Tag 0 gemessen.

Für die Auswertung mit dem Programm *FlowJo* wurde die ungefärbte Probe zur Festlegung des unteren Grenzwertes der FITC-Emission genutzt. Die Histogramme der zusammen gehörenden Proben wurden zur Veranschaulichung übereinandergelegt.

3.2.4. Zytotoxizitäts-Assay

Der Zytotoxizitäts-Assay wurde in 24-Well-Platten angesetzt. Die transduzierten T-Lymphozyten wurden nach Kapitel 3.2.3.1 gezählt und gewaschen. In jedes Well wurden 600.000 transduzierte T-Lymphozyten in 50 µl –Arg-Medium ausgesät. Wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, wurden die PMN angesetzt und nach drei Tagen Vorinkubation aus der 6-Well-Platte geerntet. Im Anschluss wurden sie für 10 Minuten bei 2500 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf zentrifugiert. Danach wurden 2 ml des zellfreien Überstandes auf die transduzierten T-Lymphozyten in der 24-Well-Platte pipettiert. Die Bedingung PMN und T-Lymphozyten im Verhältnis 20:1 in +Arg-Medium mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA wurde als zusätzliche Kontrollbedingung doppelt angesetzt. Außerdem wurden in der Platte folgende Kontrollbedingungen angesetzt:

- je ein Well mit transduzierten T-Lymphozyten in: +Arg-Medium, +Arg-Medium mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA und –Arg-Medium
- je ein Well mit 1 ml des reinen zelllosen Überstands der PMN

Die 24-Well-Platte wurde für 48 Stunden im Inkubator inkubiert. 24 Stunden nach Beginn der Inkubation wurden die SAOS-2 Zellen trypsiniert und gezählt (vergleiche Kapitel 3.2.1.3). Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $0,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI-1640 (Vollmedium) aufgenommen und 20 ng/ml humanes Interferon- γ hinzugefügt. Je 500 µl dieser Zellsuspension wurde pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Für jede Bedingung wurden 2 Wells ausgesät und zusätzlich zwei Wells für eine Kontroll-Bedingung mit RPMI-1640 (Vollmedium) angesetzt. Alle Platten wurden im Inkubator für 21 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde in alle Proben (mit Ausnahme von zwei Wells, die als Kontrollen dienten) 0,1 ng des p53-Peptid₂₆₄₋₂₇₂ pipettiert und die Platten für weitere drei Stunden im Inkubator inkubiert. Währenddessen wurden für die verschiedenen T-Lymphozyten-Bedingungen die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, gezählt. Durch Zentrifugation (1500 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf, für fünf Minuten bei Raumtemperatur) und anschließende

3. Material und Methoden

Resuspension im korrekten Volumen wurden die Zellen auf eine Konzentration von $0,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml gebracht. In der 24-Well-Platte mit den SAOS-2-Zellen wurde nach der Inkubation von drei Stunden das Medium aspiriert und die Zellen mit DPBS gewaschen. Dazu wurde in jedes Well 1 ml DPBS pipettiert, die Platte kurz geschwenkt und das DPBS danach wieder abgesaugt. Anschließend wurden je 500 μ l der T-Lymphozyten-Bedingungen und der Kontrollbedingungen in zwei Wells mit SAOS-2-Zellen (mit p53-Peptid₂₆₄₋₂₇₂ beladen) pipettiert. In die zwei Wells mit unbeladenen SAOS-2-Zellen wurde die doppelt angesetzte Kontrollbedingung (PMN von T-Lymphozyten im Verhältnis 20:1 in +Arg-Medium mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA) pipettiert. Alle Flüssigkeiten wurden nicht direkt auf die Zellen pipettiert, sondern am Rand des Wells ablaufen gelassen. Die 24-Well-Platten wurden erneut in den Inkubator gestellt.

Nach einer Stunde Inkubation wurde die 24-Well-Platte unter dem Mikroskop betrachtet und die Zytotoxizität der T-Lymphozyten in den verschiedenen Bedingungen beurteilt. Wenn mit dem Auge kein vollständiges Absterben der SAOA-2-Zellen zu sehen war, wurde die Platte für eine weitere Stunde in den Inkubator gestellt. Bei vollständiger Zytotoxizität wurde die Flüssigkeit in allen Wells aspiriert und die Platte ein Mal mit DPBS, wie oben beschrieben, gewaschen. Danach wurde in jedes Well 1 ml der 4 %-igen Formaldehyd-Lösung aus Tabelle 5 pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die so fixierten SAOS-2-Zellen wurden erneut mit DPBS gewaschen. In jedes Well wurden 400 μ l der 0,05 %-igen Kristallviolett-Lösung aus Tabelle 5 pipettiert und die Platten für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit DPBS gewaschen und die Flüssigkeit vollständig abgesaugt. Für den optischen Eindruck der Zytotoxizität wurden die Platten eingescannt. Im Anschluss wurden die fixierten, gefärbten Zellen in 500 μ l der 5 %-igen SDS-Lösung aus Tabelle 5 gelöst. Aus jedem Well der 24-Well-Platte wurden je 200 μ l der Lösung in zwei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Mit dem Platerreader wurde die 96-Well-Platte bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Für die Auswertung wurde die Bedingung der SAOS-2-Zellen in RPMI-1640 (Vollmedium) ohne transduzierte T-Lymphozyten als 100 % Überleben normiert und alle anderen Bedingungen in Bezug dazu gesetzt.

3.2.5. Aktivierungs- und *Exhaustion*-Marker

Um die T-Lymphozyten in den verschiedenen Bedingungen aus Kapitel 3.2.3.1 zu evaluieren, wurden verschiedene Oberflächenmarker der T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen: CD25, CD28, CD57, CD69, CD152 (=CTLA-4), CD160, CD279 (=PD-1), TIGIT, LAG-3 und TIM-3.

Dafür wurden die T-Lymphozyten an Tag 0, also vor der Inkubation mit den Antikörpern, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, gefärbt und im FACS Canto gemessen. Außerdem wurden

die T-Lymphozyten in einer Konzentration von $15 \cdot 10^6$ T-Lymphozyten/ml in –Arg-Medium mit den anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und in 96-Well-Platten ausgesät (vergleiche Kapitel 3.2.3.1).

Es wurden drei verschiedene Vorinkubationszeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden) und vier verschiedene Bedingungen untersucht:

- +Arg-Medium
- +Arg-Medium mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA
- PMN-Überstand im Verhältnis PMN zu T-Lymphozyten 10:1
- PMN-Überstand 10:1 mit dem Zusatz 1 mM nor-NOHA

Dafür wurden die Zellreste der PMN, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, abzentrifugiert und von dem Überstand sowie von den Medien je 200 μ l in ein Well mit T-Lymphozyten und Aktivator pipettiert. Es wurde für jeden Antikörper, für jede Bedingung und jeden Vorinkubationszeitpunkt ein Well angesetzt. Anschließend wurden die 96-Well-Platten bei 1000 rpm für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Für die Messung wurde nach der entsprechenden Vorinkubationszeit ein Well in ein FACS-Röhrchen überführt und nach Kapitel 3.2.2.1 gewaschen, gefärbt und gemessen. Als *gate* wurde für jede Bedingung zu jeder Vorinkubationszeit eine ungefärbte Probe mitgemessen. Der untere Grenzwert wurde so gesetzt, dass die jeweilige Isotyp-Kontrolle < 1% positive Zellen aufwies.

3.2.6. Methoden der Proteinanalytik

3.2.6.1. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die PMN nach der Isolation in einer Konzentration von $50 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml +Arg-Medium resuspendiert und anschließend bei -20°C eingefroren. So konnten sie für einige Wochen aufbewahrt werden.

Um das in den Granula gespeicherte Enzym Arginase-1 freizusetzen, wurden die PMN im Ultraschall-Sonikator in 6 Zyklen je für 90 Sekunden bestrahlt mit je 5 Sekunden Pause dazwischen. Im Anschluss daran wurden durch zehminütige Zentrifugation (13000 rpm in der 5417 R Zentrifuge von Eppendorf bei einer Temperatur von 4°C) die Zellreste pelletiert. Der Überstand mit der Arginase-1 wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Währenddessen wurden folgende Konzentrationen des Proteinstandard als Standardreihe angesetzt: 4000 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ und 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

3. Material und Methoden

Die DC^{TM} protein reagents A und S wurden im Verhältnis 50:1 angesetzt. In einer 96-Well-Platte wurde von dieser Mischung pro Well je 25 μ l vorgelegt. Danach wurden 5 μ l der Proben beziehungsweise des Standards in die Wells pipettiert. Die Proben wurden als Triplets und die Standardreihe als Doubletten angesetzt. Für die messbare Farbreaktion wurde in jedes Well 200 μ l des DC^{TM} protein reagent B pipettiert und die Platte für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Mit dem Platerader wurde die spezifische Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 690 nm gemessen und die Proteinkonzentration mittels einer *fit*-Funktion (Kurventyp: 4 Parameter) bestimmt.

3.2.6.2. Arginase 1 Aktivitäts-Assay

Von den in Kapitel 3.2.6.1 gemessenen Proben wurden in zwei Reaktionsgefäße je 3,3 μ g Protein in 100 μ l DPBS gelöst. Das eine Reaktionsgefäß wurde mit +Arg beschriftet und das andere mit –Arg (als Negativkontrolle). In alle Reaktionsgefäße wurde 20 μ l Mangan(II)-Chlorid aus Tabelle 5 pipettiert. Nach dem Mischen wurden sie auf dem Heizblock bei einer Temperatur von 56°C für acht Minuten inkubiert. Anschließend wurde in alle +Arg Reaktionsgefäße 100 μ l der 0,5 M L-Arginin-Lösung pipettiert. Alle Probenansätze wurden gemischt und für zwei Stunden auf dem Heizblock bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

In dieser Zeit wurde die Standardreihe angesetzt, indem 900 μ l des Säuregemisches aus Tabelle 5 mit 100 μ l Harnstoff-Lösung gemischt wurde. Der Harnstoff wurde so mit destilliertem Wasser verdünnt, dass sich folgende Konzentrationen ergaben: 60 ng/ml, 45 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml und 7,5 ng/ml. Zusätzlich wurde eine Probe mit reinem destilliertem Wasser (also 0 ng/ml Harnstoff) für die Standardreihe angesetzt.

Nach den zwei Inkubationsstunden wurde die Reaktion mit dem Säuregemisch abgestoppt, indem alle Reaktionsgefäße mit diesem auf 1 ml aufgefüllt und anschließend gemischt wurden. Zu allen Probenansätzen und Standards wurden 40 μ l der ISPF-Lösung aus Tabelle 5 pipettiert und gemischt. Die Ansätze wurden im Dunkeln erst auf dem Heizblock für 30 Minuten bei einer Temperatur von 95°C und im Anschluss für weitere 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Für die Messung im Platerader wurde für jede Probe und jeden Standard eine Doublette mit je 200 μ l der Probe oder des Standards in einer 96-Well-Platte angesetzt. Mit dem Platerader wurde die spezifische Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen und die Harnstoffkonzentration mittels einer *fit*-Funktion (Kurventyp: lineare Regression) ausgerechnet. Zur Berechnung der Arginase-1 Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Aktivität [mU/mg Protein]} = \frac{\mu\text{g Harnstoff} \times 1000 \times 303 \frac{1}{\text{mg}}}{60 \text{ g/mol} \times 120 \text{ Minuten}} \quad (3.1)$$

3.2.6.3. Interferon- γ ELISA

Tabelle 11: Verwendete Lösungen und Puffer.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
<i>assay diluent</i>	DPBS 10 % FCS, hitzeinaktiviert
<i>coating buffer</i>	7,13 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ 1 l destilliertes H ₂ O pH = 9,5 mit 1 N Natronlauge einstellen
Waschpuffer	DPBS 0,05 % TWEEN®20

Für den Interferon- γ -ELISA wurde das in Tabelle 3 beschriebene Human IFN- γ ELISA Set genutzt. Der *capture antibody* wurde mit dem *coating buffer* aus Tabelle 11 1:250 verdünnt. In eine 96-Well-ELISA-Platte wurde pro Well 50 μ l der Mischung vorgelegt. Die 96-Well-Platte wurde über Nacht mit Folie abgedeckt und bei einer Temperatur von 4°C inkubiert.

Mit dem Waschpuffer aus Tabelle 11 wurde die 96-Well-Platte drei Mal gewaschen, indem die Wells mit dem Puffer ausgespült wurden. Die Flüssigkeit wurde anschließend ausgeschüttet und die Reste auf einem Papier ausgeklopft. In jedes Well wurden 200 μ l *assay diluent* pipettiert, die Platte erneut mit der Folie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Proben mit dem *assay diluent* 1:5 verdünnt. Als Standardreihe wurde das humane Interferon- γ mit dem *assay diluent* verdünnt, sodass sich folgende Konzentrationen ergaben: 3000 pg/ml, 1000 pg/ml, 333 pg/ml, 111 pg/ml, 37 pg/ml, 12,3 pg/ml und 4,1 pg/ml.

Nach der Inkubation wurde die Platte erneut, wie oben beschrieben, drei Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde pro Well 50 μ l der Probe beziehungsweise des Standards pipettiert. Dabei wurden Triplets für die Proben und Doubletten für die Standardreihe angesetzt. Danach wurde die Platte mit der Folie abgedeckt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde der sogenannte Arbeits-Detektor angesetzt. Dafür wurde der *detection antibody* und das Enzym-Reagenz Streptavidin *horseradish* Peroxidase jeweils 1:250 mit *assay diluent* verdünnt.

3. Material und Methoden

Nach den zwei Stunden Inkubation wurde die Platte fünf Mal gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 50 µl des *detection antibody* pipettiert, die Platte mit der Folie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Platte sieben Mal gewaschen. Anschließend wurde Substrat A und B aus Tabelle 3 1:1 gemischt und hiervon 100 µl in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde für weitere 30 Minuten mit der Folie abgedeckt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurde zum Abstoppen der Reaktion in jedes Well 50 µl der 2 N Schwefelsäure pipettiert. Im Platerader wurde die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Hintergrund von 570 nm gemessen. Die Interferon- γ -Konzentration konnte mittels einer *fit*-Funktion (lineare Regression mit logarithmischen Achsen) bestimmt werden. In die endgültigen Konzentrationswerte wurde der Verdünnungsfaktor mit einberechnet.

3.2.6.4. *Human cytokine array*

Für den *human cytokine array* wurde das in Tabelle 3 beschriebene Kit *human proteome profilerTM array* genutzt. Alle Proben und Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden mit 0,5 ml *array buffer 4* gemischt und mit *array buffer 5* auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt. Der *detection antibody cocktail* wurde in 100 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Zu jeder Probe wurden 15 µl des Cocktails pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In jedes Well der 4-Well-Multifunktions-Platte wurden 2 ml des *array buffer 4* pipettiert. Die Membranen wurden mit einer Pinzette aus der Schutzfolie in je eine Kammer der 4-Well-Multifunktions-Platte gelegt und für eine Stunde auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden dabei vollständig von der Flüssigkeit bedeckt. Danach wurde der *array buffer 4* vollständig aus den Kammern der 4-Well-Multifunktions-Platte aspiriert und stattdessen pro Kammer eine der verdünnten Proben pipettiert. Die 4-Well-Multifunktions-Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei einer Temperatur von 4°C auf der Schüttelplatte inkubiert.

Das Waschpufferkonzentrat wurde 1:25 mit destilliertem Wasser verdünnt und dann je 20 ml des Waschpuffers in eine Plastikbox vorgelegt. Danach wurde jede Membran aus der 4-Well Multifunktions-Platte in eine individuelle Plastikbox mit dem Waschpuffer überführt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Danach wurden die 20 ml Waschpuffer aspiriert und dieser Waschschrift weitere zwei Male wiederholt. Währenddessen wurde die 4-Well-Multifunktions-Platte mit destilliertem Wasser gereinigt und abgetrocknet. Nach dem Waschen wurden die Membranen in die gereinigte 4-Well-Multifunktions-Platte zurück überführt. Dabei wurde überschüssiger Waschpuffer entfernt, indem die Membranen mit der Ecke vorsichtig auf ein Papiertuch getupft wurden. Die Streptavidin *horseradish* Peroxida-

se wurde 1:2000 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Mischung wurden 2 ml neben jede Membran pipettiert, sodass sie vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Bei Raumtemperatur wurde die 4-Well-Multifunktions-Platte für drei Minuten auf der Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurden die Membranen drei Mal mit 20 ml des Waschpuffers gewaschen. Nach dem letzten Aspirieren des Waschpuffers wurden die Membranen mit der Identifikationsnummer nach oben auf eine Plastikfolie gelegt. Das Chemi-Reagenz 1 wurde 1:1 mit dem Chemi-Reagenz 2 gemischt. Auf jede Membran wurde 1 ml dieser Mischung getropft, sodass sie vollständig bedeckt waren. Die Membranen wurden mit Plastikfolie abgedeckt im Dunkeln für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Chemi-Reagenzien wurden mit Papiertüchern vorsichtig abgetupft und die Membranen mit dem *iBright* bei verschiedenen Belichtungszeiten ausgelesen.

4. Ergebnisse

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Im folgenden Kapitel wird die Proliferation der T-Lymphozyten unter dem Einfluss des PMN-Überstandes mit und ohne Arginase 1-Inhibitor in verschiedenen Versuchsbedingungen beschrieben. Dabei wurden die beiden Zellpopulationen nicht in direkter Kokultur inkubiert, sondern die T-Lymphozyten lediglich in PMN-Überstand. In der direkten Kokultur ist bekannt, dass PMN die Proliferation von T-Lymphozyten supprimieren [102]. Wie verändert sich die Proliferation in PMN-Überstand?

4.1.1. Allgemeine Anmerkungen zu den Proliferations-Assays

Für die folgenden Versuche wurden die T-Lymphozyten und die PMN aus humanem Vollblut gesunder Blutspender isoliert, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die verwendeten Zellpopulationen wurden zur Kontrolle der Reinheit auf die Expression charakteristischer Oberflächenproteine (CD66b für PMN und CD3 für T-Lymphozyten) untersucht. Die Reinheit der PMN lag in allen 29 voneinander unabhängigen Versuchen bei $\geq 94\%$ und die der T-Lymphozyten stets bei $\geq 95\%$. Ein repräsentatives Ergebnis ist im Anhang in den Abbildungen 38 und 39 auf den Seiten 177 und 178 dargestellt.

Die PMN wurden in den Konzentrationen $0,05 \cdot 10^6$, $0,25 \cdot 10^6$, $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ und $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit und ohne Arginase-Inhibitor für 72 Stunden in +Arg-Medium inkubiert. Die T-Lymphozyten wurden währenddessen für 3 Tage im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden sie mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und zu $0,05 \cdot 10^6$ Zellen/Well vorgelegt. Die verschiedenen PMN-Bedingungen wurden abzentrifugiert und der zellfreie Überstand auf die T-Lymphozyten pipettiert. Somit ergab sich in den Versuchs-Wells ein PMN:T-Verhältnis von 1:1 bis 50:1. Die T-Lymphozyten wurden im PMN-Überstand weitere 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der unterschiedlichen Proliferation der T-Lymphozyten mittels [^3H]-Thymidin-Assays. Der schematische experimentelle Aufbau ist in Abbildung 10 dargestellt. Zusätzlich zu den PMN-Überständen wurden folgende vier Medium-Bedingungen als Referenz angesetzt:

4. Ergebnisse

1. nicht aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
2. aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
3. aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium mit Arginase 1-Inhibitor
4. aktivierte T-Lymphozyten in –Arg-Medium

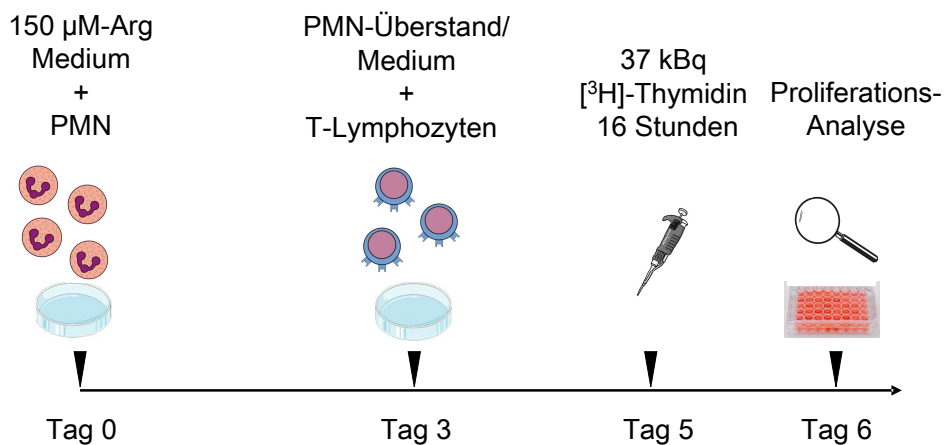


Abb. 10: Schematischer experimenteller Aufbau des [3H]-Thymidin-Assays: Nach der Isolierung wurden die PMN für 72 Stunden mit und ohne Arginase-Inhibitor inkubiert und davon Überstand generiert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten 48 Stunden in den PMN-Überständen oder in den Medium-Bedingungen inkubiert. Danach wurde das radioaktive [3H]-Thymidin hinzugefügt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Zum Schluss wurde die Proliferation in den verschiedenen Bedingungen analysiert.

In den folgenden Kapiteln 4.1.2 bis 4.5.2 sind in den Abbildungen die Ergebnisse verschiedener [3H]-Thymidin-Assays dargestellt. Die Proliferation der T-Lymphozyten wird dabei immer in einem Balkendiagramm aufgetragen. Ein Beispiel-Diagramm, in dem der schematische Aufbau zu erkennen ist, wird in Abbildung 11 gezeigt.

Auf der X-Achse ist zu sehen, in welchen Bedingungen die T-Lymphozyten des jeweiligen Balkens inkubiert wurden. Ein „+“ in der Spalte steht für einen „in den Bedingungen enthaltenen Stoff“, wohingegen ein leeres Feld das Fehlen des Stoffes kennzeichnet. Zur leichteren Übersicht sind Gruppen von Balken, wie zum Beispiel die Medium-Bedingungen oder gleiche PMN:T-Verhältnisse mit Hilfe von gestrichelten senkrechten Linien voneinander getrennt. Die PMN- und Medium-Bedingungen ohne Arginase 1-Inhibitor sind stets als einfarbige Balken dargestellt, wohingegen die Bedingungen mit Arginase 1-Inhibitor als gemusterte Balken (diagonal gestreifte Balken für nor-NOHA und senkrecht gestreifte Balken für CB-1158) erscheinen. Spezielle Balken werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Auf der Y-Achse ist die Proliferation der T-Lymphozyten in Prozent abzulesen. Dabei wurde in jedem Experiment die Proliferation nach Aktivierung ohne Zugabe von Arginase-Inhibitor als 100 % normiert und die übrigen Aktivierungen zu dieser in Relation gesetzt. Da es sich bei jedem Experiment um individuelle Blutspender handelt, zeigen die T-Lymphozyten große quantitative Unterschiede in der Aktivität und Proliferation. Durch die Normierung werden diese absoluten Unterschiede für die Vergleichbarkeit der diversen Bedingungen eliminiert. In den Abbildungen sind somit ausschließlich die Effekte der verschiedenen PMN-Überstände auf die Proliferation der T-Lymphozyten dargestellt. Es ist das Mittel der normierten Werte aller Experimente zu sehen mit der jeweiligen Standardabweichung. Signifikante Unterschiede der Proliferation zwischen den Bedingungen sind durch horizontale Linien gekennzeichnet.

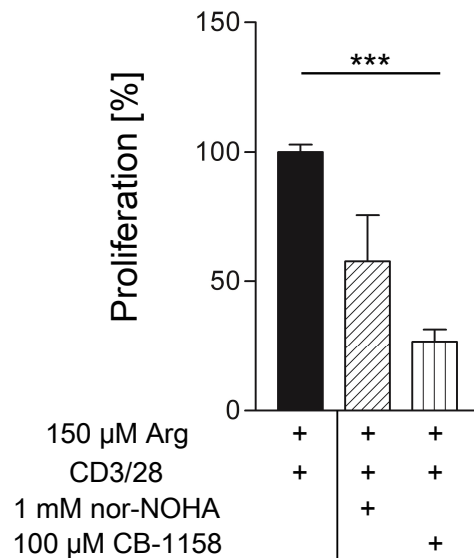


Abb. 11: Beispiel-Diagramm: Zu sehen ist ein beispielhaftes Schema der [³H]-Thymidin-Assays. Der erste Balken zeigt den auf 100 % normierten Mittelwert nach Aktivierung in +Arg-Medium. Zu dieser Bedingung wurden alle anderen in Relation gesetzt. Die anderen beiden Balken zeigen die relativen Proliferationswerte der Bedingung nach Aktivierung und Zugabe von nor-NOHA oder CB-1158. Die jeweilige Standardabweichung ist als „T“-Balken dargestellt. Senkrechte Linien trennen Gruppen von Bedingungen und horizontale Linien markieren Signifikanzen.

4.1.2. Proliferation der T-Lymphozyten unter Inhibition der PMN-Arginase durch nor-NOHA

In den folgenden zwei Experimenten wurde der kompetitive Arginase 1- und 2-Inhibitor nor-NOHA zur Inhibition der Arginase 1 der PMN verwendet. Mit zwei unterschiedlichen Methoden wurde der Einfluss des PMN-Überstandes auf die Proliferation der T-Lymphozyten mit und ohne Inhibitor evaluiert. Die Inhibition der PMN-Arginase fand also während der Inkubation der PMN und somit vor Inkubation der T-Lymphozyten statt. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse des [³H]-Thymidin-Assays zu sehen und in Abbildung 13 die des CFSE-Assays.

4. Ergebnisse

[³H]-Thymidin-Assay

Für den [³H]-Thymidin-Assay wurden die T-Lymphozyten in den verschiedenen PMN- und Medium-Bedingungen für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 37 kBq radioaktives [³H]-Thymidin hinzugefügt und die Zellen für weitere 16 Stunden in den Inkubator gestellt. Im β -Counter wurde im Anschluss die zellgebundene, das heißt die in die DNA inkorporierte, Radioaktivität der T-Lymphozyten gemessen. Das radioaktive [³H]-Thymidin wird in der Synthese-Phase der Mitose proliferierender Zellen zur DNA-Replikation eingebaut. Die zellgebundene Radioaktivität ist also ein Maß für die DNA-Synthese im Rahmen der Mitose der Zellen und somit auch ein Maß der Proliferation während der 16-stündigen Inkubation.

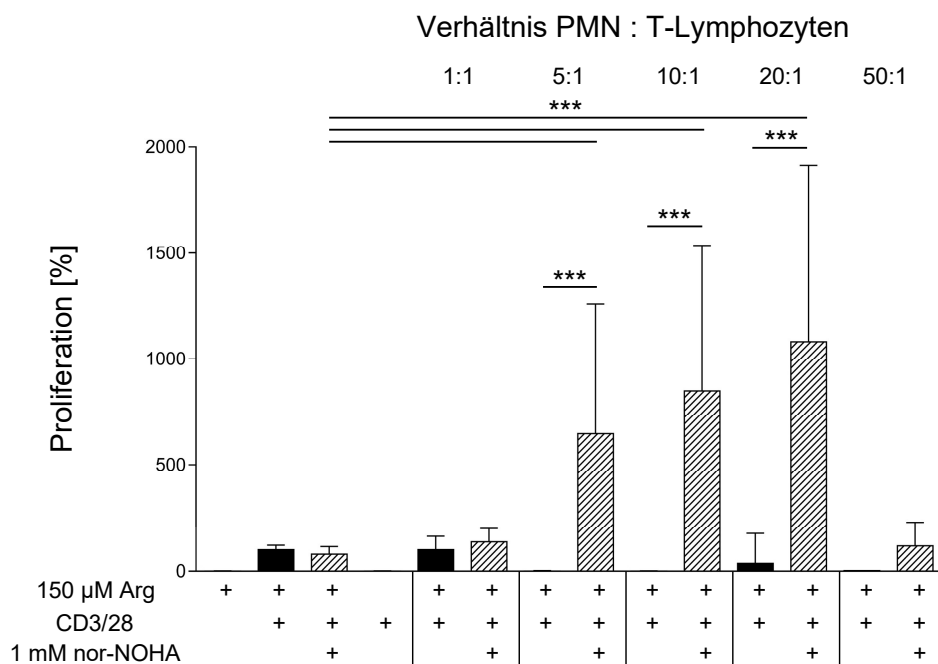


Abb. 12: [³H]-Thymidin-Assay: Proliferation von T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden für 48 Stunden in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Die Proliferation wurde mittels des [³H]-Thymidin-Assays ermittelt. Zu sehen ist die Auswertung von 29 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 12 lassen sich die unterschiedlich starken Proliferationen der T-Lymphozyten in den PMN- und Medium-Bedingungen deutlich erkennen. Ohne Aktivierung beziehungsweise nach Aktivierung in –Arg-Medium zeigten die T-Lymphozyten keine Aufnahme von [³H]-Thymidin. Das heißt in diesen Bedingungen proliferierten die T-Lymphozyten nicht. Die Proliferation nach Aktivierung mit und ohne Zugabe von nor-NOHA unterschied sich nicht signifikant voneinander. Die absoluten *counts per minute* lagen bei Aktivierung ohne nor-NOHA bei 4230 ± 3894 cpm und bei Aktivierung mit nor-NOHA bei 3368 ± 297 cpm. Die Zugabe

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

von nor-NOHA hatte demnach keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Lymphozyten. Diese hohe Abweichung in den absoluten *counts per minute* resultiert aus der individuellen Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten aus den verwendeten Blutspenden. Die Proliferation der verschiedenen T-Lymphozyten differiert deutlich voneinander. Jedes Experiment separat betrachtet, zeigt eine geringe Standardabweichung, was durch die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Normierung in Abbildung 12 gezeigt werden konnte.

Im Vergleich zu der Aktivierung ohne PMN-Überstand war in den Aktivierungsbedingungen mit PMN-Überstand ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 eine deutliche Veränderung der Proliferation zu erkennen. In den Bedingungen mit einem Verhältnis von 1:1 gab es sowohl in der Bedingung ohne nor-NOHA, als auch in der Bedingung mit nor-NOHA keinen signifikanten Unterschied zu den Medium-Bedingungen. Ab einem Verhältnis von 5:1 war jedoch zu sehen, dass die Proliferation in den Bedingungen ohne nor-NOHA vollständig inhibiert wurde.

Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA zeigte sich dagegen ein starker Anstieg der Proliferation. Dieser Anstieg korrelierte mit dem PMN:T-Verhältnis. Von 1:1 bis 20:1 war ein kontinuierlicher Anstieg zu sehen. Erst ab einem Verhältnis von 50:1 sank die Proliferation wieder ab. Maximal wurde sie also in der 20:1-Bedingung mit nor-NOHA. Der Mittelwert betrug 24631 ± 12866 cpm, was einer 11-fachen Erhöhung im Vergleich zur konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand entspricht.

CFSE-Assay

Für den CFSE-Assay wurden die T-Lymphozyten in verschiedenen Bedingungen in der Durchflusszytometrie gemessen. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der kovalent an intrazelluläre Moleküle bindet. Die Aufnahme von CFSE in die T-Lymphozyten kann somit durch die Fluoreszenz-Emission der Zellen gemessen werden. Mit jeder Zellteilung halbiert sich die Konzentration des intrazellulären CFSE von der Mutter- auf die zwei Tochter-Zellen. Eine Halbierung der Konzentration des CFSE zeigt also einen Mitose-Zyklus dieser Zelle an. Daher lässt sich mit Hilfe des CFSE-Assays die Anzahl der Zellteilungen einer Zellpopulation über einen bestimmten Zeitraum hinweg darstellen. In der Durchflusszytometrie wurde die Intensität der Fluoreszenz des CFSE im FITC-A Kanal gemessen. Die Stärke der FITC-A-Aktivität korreliert somit mit der intrazellulären Konzentration von CFSE.

Die T-Lymphozyten wurden mit dem fluoreszierenden CFSE gefärbt und mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert. Im Anschluss daran wurden sie für 96 Stunden in den PMN-Überständen (Verhältnisse 1:1 bis 20:1) mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Als Medium-Bedingungen wurden die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Bedingungen mit

4. Ergebnisse

CFSE-gefärbten T-Lymphozyten angesetzt. Zur Bestimmung des unspezifischen zellulären Fluoreszenz-Hintergrundes wurden ungefärbte T-Lymphozyten in der Durchflusszytometrie gemessen. Die nachgewiesene FITC-A-Aktivität diente zur passenden Einstellung der Untergrenze des FITC-A-Kanals für alle Medium- und PMN-Bedingungen. Zudem wurde die Aktivitäten der mit CFSE-gefärbten T-Lymphozyten vor der 96-stündigen Inkubation gemessen. Diese Fluoreszenzaktivität definierte die höchste Menge an CFSE, die die T-Lymphozyten vor der ersten Zellteilung aufnehmen konnten (vergleiche Abbildung 40 auf Seite 179 im Anhang). Der Mittelwert der relativen Fluoreszenz-Intensität lag hier bei 2269. Diese Aktivität legte die Obergrenze der intrazellulären CFSE-Aktivität der T-Lymphozyten fest. Außerdem ist in Abbildung 40 auf Seite 179 im Anhang die CFSE-Aktivität ohne Aktivierung sowie nach Aktivierung in +Arg- und –Arg-Medium dargestellt.

In Abbildung 13 ist ein repräsentatives Ergebnis eines CFSE-Assays eines Blutspenders dargestellt. Die Ergebnisse der jeweiligen PMN:T-Verhältnisse sind in den Abbildungen 13a-13d getrennt voneinander abgebildet. Auf der X-Achse ist die FITC-A-Aktivität und damit auch die CFSE-Aktivität logarithmisch aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die *counts* an, also die Anzahl an T-Lymphozyten, die in dieser FITC-A-Aktivität detektiert wurden.

Zu sehen ist die CFSE-Aktivität der T-Lymphozyten in drei farbigen Kurven:

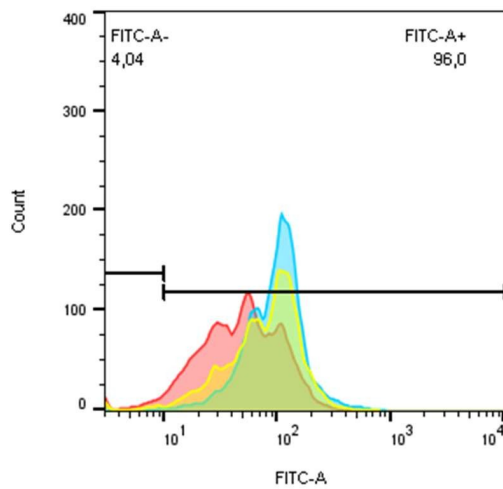
- gelb: T-Lymphozyten aktiviert in +Arg-Medium
- blau: T-Lymphozyten aktiviert in PMN-Überstand
- rot: T-Lymphozyten aktiviert in PMN-Überstand mit Zugabe von nor-NOHA

In +Arg-Medium ist durch die Maxima der Kurve erkennbar, dass die T-Lymphozyten während der 96-stündigen Inkubation mehrere Zellteilungszyklen durchliefen. Die Mehrheit der T-Lymphozyten wurde jedoch mit maximaler CFSE-Aktivität gemessen. Sie proliferierten während des Experiments nicht.

Die Proliferation der T-Lymphozyten unterschied sich bei Aktivierung in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA sowohl im CFSE-Assay als auch im [³H]-Thymidin-Assay (Abbildung 12), deutlich von den Kontrollbedingungen, in denen die T-Lymphozyten in +Arg-Medium aktiviert wurden. Entgegen den Beobachtungen im [³H]-Thymidin-Assay war diese Änderung jedoch im CFSE-Assay in allen PMN:T-Verhältnissen erkennbar und nicht erst ab einem Verhältnis von 5:1. Die T-Lymphozyten zeigten bei Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA eine geringere Proliferation als die T-Lymphozyten in der konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand. In dem 1:1-Verhältnis konnte noch ein kleiner Teil der T-Lymphozyten mit nur einem durchlaufenen Zellzyklus nachgewiesen werden. Ab einem Verhältnis von 5:1 proliferierten die T-Lymphozyten jedoch nicht mehr.

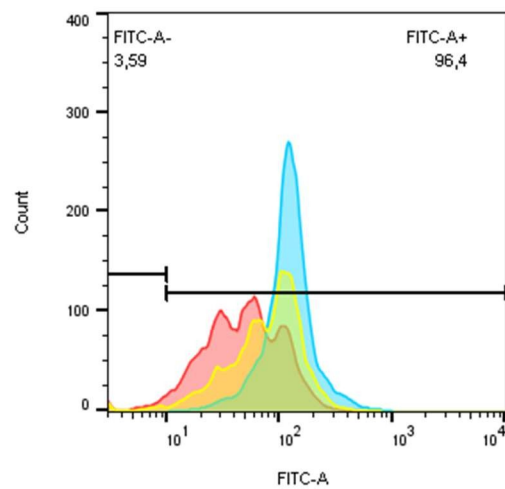
4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

(a) PMN : T-Lymphozyten 1:1



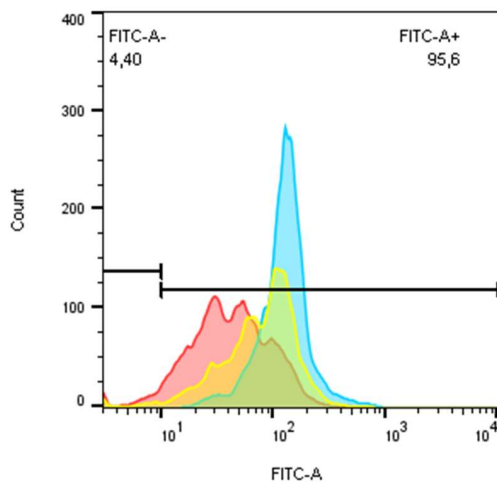
T-Lymphozyten	Count	Median-FITC-A
aktiviert in +Arg-Medium	10000	61,1
aktiviert in PMN-Überstand 1:1	6969	99,9
aktiviert in PMN-Überstand 1:1 mit nor-NOHA	7205	48,7

(b) PMN : T-Lymphozyten 5:1



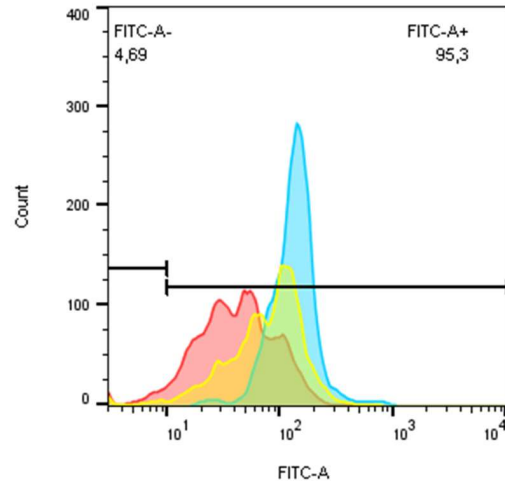
T-Lymphozyten	Count	Median-FITC-A
aktiviert in +Arg-Medium	10000	61,1
aktiviert in PMN-Überstand 5:1	7555	120
aktiviert in PMN-Überstand 5:1 mit nor-NOHA	7288	48,1

(c) PMN : T-Lymphozyten 10:1



T-Lymphozyten	Count	Median-FITC-A
aktiviert in +Arg-Medium	10000	61,1
aktiviert in PMN-Überstand 10:1	7781	126
aktiviert in PMN-Überstand 10:1 mit nor-NOHA	7319	40,6

(d) PMN : T-Lymphozyten 20:1



T-Lymphozyten	Count	Median-FITC-A
aktiviert in +Arg-Medium	10000	61,1
aktiviert in PMN-Überstand 20:1	7840	133
aktiviert in PMN-Überstand 20:1 mit nor-NOHA	7393	41,4

Abb. 13: CFSE-Assay: Proliferation von T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte und CFSE-gefärbte T-Lymphozyten wurden für 96 Stunden in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Eine Halbierung der CFSE-Aktivität zeigt einen durchlaufenen Zellzyklus der T-Lymphozyten an. Zu sehen ist ein repräsentatives Ergebnis. Die T-Lymphozyten zeigten bei Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA eine geringere Proliferation verglichen mit der Aktivierung in +Arg-Medium. Im Gegensatz dazu war bei Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA eine Hyperaktivierung der Proliferation erkennbar.

4. Ergebnisse

Die maximale mittlere Fluoreszenz-Intensität konnte im 20:1-Verhältnis detektiert werden und liegt bei 133. Somit übersteigt die CFSE-Aktivität der T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand deutlich die konventionell aktivierten T-Lymphozyten. Hier liegt die mittlere Fluoreszenz-Aktivität lediglich bei 84,1.

Im Vergleich dazu war nach Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit nor-NOHA eine deutlich niedrigere CFSE-Aktivität messbar. Die T-Lymphozyten durchliefen hier also mehrere Zellzyklen und proliferierten stark. Dies war in allen PMN:T-Verhältnissen zu beobachten. Mit zunehmendem Verhältnis stellte sich eine abnehmende Fluoreszenzintensität dar. Minimal wird die mittlere Fluoreszenz-Intensität in dem 10:1-Verhältnis mit nur 40,6.

Zusammenfassend zeigte sich also durch Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand ohne nor-NOHA eine Zunahme der CFSE-Aktivität und damit eine Abnahme der durchlaufenen Zellzyklen und der Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA war der gegenteilige Effekt zu beobachten. Die T-Lymphozyten stellten sich mit niedriger CFSE-Aktivität also mit mehr durchlaufenen Zellzyklen und vermehrter Proliferation dar. Diese Beobachtungen stimmen mit denen aus dem [³H]-Thymidin-Assay aus Abbildung 12 überein.

4.1.3. Proliferation der T-Lymphozyten unter Inhibition der PMN-Arginase durch CB-1158

Zur Bestätigung der in Kapitel 4.1.2 beobachteten Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten wurde neben zwei verschiedenen Methoden zur Evaluation der Proliferation zusätzlich auch ein weiterer Arginase-Inhibitor verwendet. CB-1158 ist, wie nor-NOHA, ein Arginase 1- und 2-Inhibitor [122, 123]. Für den [³H]-Thymidin-Assay wurden die T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und für 48 Stunden im PMN-Überstand mit und ohne CB-1158 inkubiert (vergleiche Kapitel 4.1.2). Es wurden die PMN:T-Verhältnisse von 1:1 bis 20:1 verwendet. Zudem wurden die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt.

Die Proliferation der T-Lymphozyten ohne Medium-Bedingungen zeigt in Abbildung 14 ein ähnliches Bild, wie es in Abbildung 12 mit nor-NOHA zu sehen ist. Ohne Aktivierung und nach Aktivierung in –Arg-Medium war erneut keine Proliferation erkennbar. Im Gegensatz dazu überstieg sie nach Aktivierung mit CB-1158 die Proliferation ohne CB-1158. Der Unterschied der Proliferation dieser beiden Bedingungen war jedoch statistisch nicht signifikant. Somit hatte die Zugabe von CB-1158, genau wie die Zugabe von nor-NOHA, keinen Effekt auf die Proliferation. Die absoluten *counts per minute* lagen nach Aktivierung ohne CB-1158 bei

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

3263 ± 1582 cpm und mit CB-1158 bei 7843 ± 2118 cpm und wichen somit nicht signifikant von der Proliferation des [³H]-Thymidin-Assays mit nor-NOHA in Abbildung 12 ab.

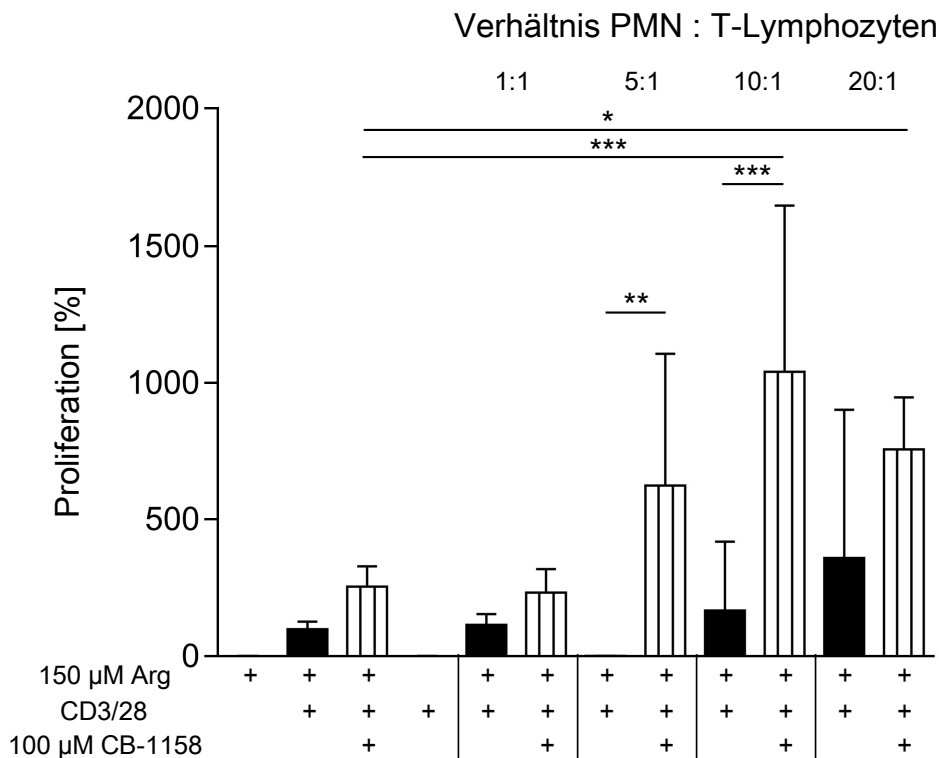


Abb. 14: Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne CB-1158: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden 48 Stunden in PMN-Überstand mit und ohne CB-1158 inkubiert. Die Proliferation wurde mittels des [³H]-Thymidin-Assays gemessen. Zu sehen ist die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Wie schon in Abbildung 12 war eine starke Hyperaktivierung bei Inhibition der PMN-Arginase durch CB-1158 zu messen. Nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne CB-1158 zeigten die T-Lymphozyten in allen Verhältnissen eine geringere Proliferation. Während ohne gleichzeitige Arginase-Inhibition bei einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 wiederum eine komplette Inhibition der Proliferation gemessen wurde, fand sich bei Zunahme des Verhältnisses eine T-Lymphozyten-Proliferation auf dem Niveau nach Aktivierung ohne PMN-Überstand.

Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit CB-1158 dagegen zeigte sich ab dem 5:1-Verhältnis ein deutlicher Anstieg der Proliferation verglichen mit der Bedingung ohne PMN-Überstand. Im 10:1-Verhältnis ließ sich ein weiterer Anstieg erkennen, wohingegen die Proliferation im 20:1-Verhältnis wieder leicht abfiel. Diese Beobachtung erinnert an den Abfall der Proliferation von dem 20:1-Verhältnis zum 50:1-Verhältnis in Abbildung 12. Ihr Maximum erreichte die Proliferation somit im 10:1-Verhältnis mit 29253 ± 7807 cpm. Dies

4. Ergebnisse

entspricht einer 10-fachen Steigerung der Proliferation der konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass sich in den [³H]-Thymidin-Assays eine Suppression der Proliferation nach Aktivierung ohne Inhibitor nachweisen lässt. Die Zugabe beider Inhibitoren führte zu einem starken Anstieg der Proliferation ab einem Verhältnis von 5:1. Dieser Anstieg korrelierte bei beiden Inhibitoren mit dem Anstieg des PMN:T-Verhältnisses. Sowohl die absoluten *counts per minute*, als auch der relative Anstieg der Proliferation waren in den jeweiligen Experimentalreihen mit den beiden Arginase-Inhibitoren vergleichbar.

4.1.4. Proliferation verschiedener T-Lymphozyten-Populationen in PMN-Überstand

Für die bisherigen Experimente wurden die T-Lymphozyten mittels negativer Selektion als CD3⁺-T-Lymphozyten isoliert. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde der Einfluss des PMN-Überstandes auf die Subpopulationen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten untersucht. Dafür wurden die T-Lymphozyten, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, nach CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten getrennt isoliert. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde anhand der Expression der charakteristischen Oberflächenproteine CD4 und CD8 gemessen. Dabei lag die Expression von CD4 in vier voneinander unabhängigen Versuchen stets $\geq 98\%$ und die von CD8 in drei voneinander unabhängigen Versuchen bei $\geq 83\%$. Das Ergebnis einer repräsentativen Messung ist im Anhang in Abbildung 39 auf Seite 178 dargestellt.

Die Proliferation beider Subpopulationen wurde identisch zu dem [³H]-Thymidin-Assay der CD3⁺-Gesamtpopulation der T-Lymphozyten gemessen (vergleiche Abbildung 12). Dazu wurden beide Subpopulationen jeweils mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und im PMN-Überstand (PMN:T-Verhältnis 1:1 bis 20:1) mit und ohne nor-NOHA für 48 Stunden inkubiert. Außerdem wurden für beide Subpopulationen die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der [³H]-Thymidin-Assays beider Subpopulationen nebeneinander. In Abbildung 15a ist die Proliferation der CD4⁺-T-Lymphozyten und in Abbildung 15b die der CD8⁺-T-Lymphozyten zu sehen. Ohne Aktivierung beziehungsweise nach Aktivierung in +Arg- oder -Arg-Medium verhielten sich beide Subpopulationen ähnlich wie die Gesamtpopulation an CD3⁺-T-Lymphozyten, deren Proliferation in Abbildung 12 dargestellt ist. Dabei war sie ohne Aktivierung und nach Aktivierung in -Arg-Medium so gering, dass sie graphisch nicht darstellbar war. Nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

unterschied sie sich nicht signifikant voneinander. Das heißt, auch in den Subpopulationen hatte die Zugabe von nor-NOHA keinen Effekt auf die Proliferation.

Bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* proliferierten beide Subpopulationen gleich stark in den Medium-Bedingungen. Nach Aktivierung ohne nor-NOHA lag die Proliferation der CD4⁺-T-Lymphozyten bei 1453 ± 516 cpm und die der CD8⁺-T-Lymphozyten bei 1909 ± 523 cpm. Nach Aktivierung mit nor-NOHA proliferierten die CD4⁺-T-Lymphozyten mit 1421 ± 703 cpm und die CD8⁺-T-Lymphozyten mit 1558 ± 510 cpm. Damit unterschieden sich die konventionellen Aktivierungsbedingungen der beiden Subpopulationen nicht signifikant voneinander und auch nicht von der Gesamtpopulation der CD3⁺-T-Lymphozyten (in Abbildung 12 dargestellt).

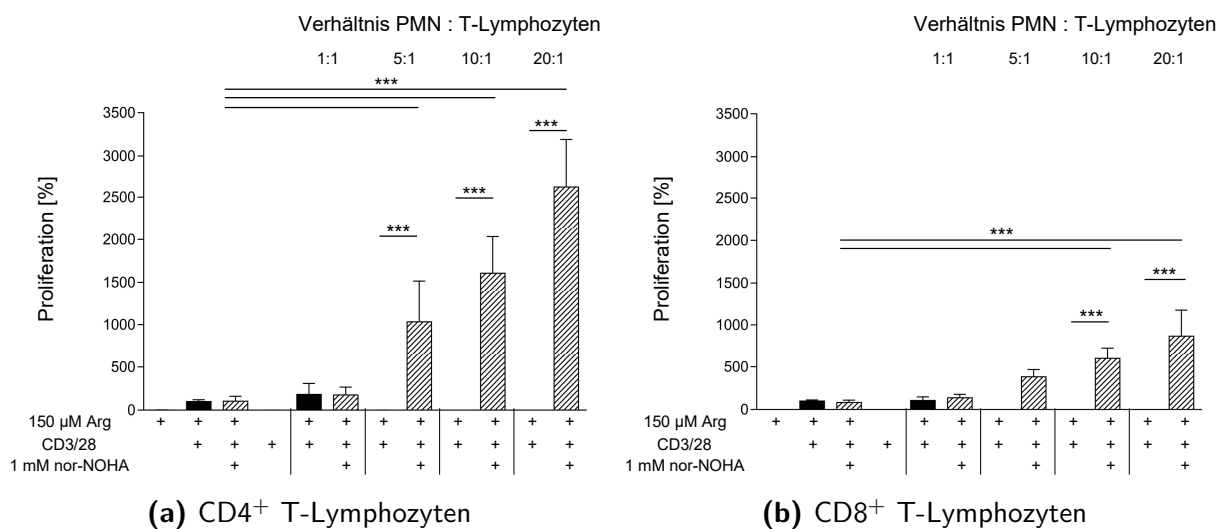


Abb. 15: Proliferation der CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte, mittels negativer Selektion aufgereinigte, CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten wurden jeweils in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidin-Assay gemessen. Zu sehen sind für beide Subpopulationen die Auswertungen von vier unabhängigen Experimenten.

Beide Subpopulationen zeigten eine veränderte Proliferation nach Inkubation in PMN-Überstand. Diese wird ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 sichtbar. Nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA war sie in beiden Subpopulationen durch den PMN-Überstand vollständig supprimiert. Dagegen war nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ein kontinuierlicher Anstieg der Proliferation in Korrelation zu dem PMN:T-Verhältnis erkennbar.

Trotz dieses grundlegend gemeinsamen Anstiegs der Proliferation nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ sich zwischen den beiden Subpopulationen ein deutlicher Un-

4. Ergebnisse

terschied erkennen. Bei den CD4⁺-T-Lymphozyten in Abbildung 15a zeigte sich ein stärkerer Anstieg der Proliferation als in den CD8⁺-T-Lymphozyten. So stieg die Proliferation der CD4⁺-T-Lymphozyten im 5:1-Verhältnis mit nor-NOHA auf das 10-fache der Aktivierung ohne PMN-Überstand, wohingegen die Proliferation der CD8⁺-T-Lymphozyten (Abbildung 15b) in dieser Bedingung auf das Vierfache anstieg. Ähnliches ließ sich auch in den 10:1- und 20:1-Verhältnissen mit nor-NOHA beobachten. Im 10:1-Verhältnis lag die Proliferation der CD4⁺-T-Lymphozyten bei 1609 ± 424 % und die der CD8⁺-T-Lymphozyten bei 601 ± 128 % im Vergleich zur konventionellen Aktivierung. Im 20:1-Verhältnis erreichte die Proliferation der CD4⁺-T-Lymphozyten sogar 2618 ± 573 % und die der CD8⁺-T-Lymphozyten 869 ± 304 %. Bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* fiel dieser Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen ebenfalls auf. So zeigten die CD4⁺-T-Lymphozyten eine maximale Proliferation von 37620 ± 11363 cpm im 20:1-Verhältnis mit nor-NOHA. Die CD8⁺-T-Lymphozyten dagegen proliferierten in dieser Bedingung mit 16217 ± 5979 cpm.

4.1.5. Proliferation der T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Arginase 1-Aktivität

Die bisherigen Experimente zeigten einen Einfluss von PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA auf die Proliferation der T-Lymphozyten. Ohne Inhibition der Arginase 1 der PMN konnte eine komplette Suppression der Proliferation beobachtet werden, während es nach Inhibition der Arginase 1 der PMN zu einer Hyperaktivierung der Proliferation kam. Um zu verstehen, ob diese Hyperaktivierung auf der Inhibition der Arginase 1 basierte oder andere Mechanismen beziehungsweise Faktoren der PMN relevant waren, wurden die T-Lymphozyten für diesen [³H]-Thymidin-Assay zusätzlich zu dem PMN-Überstand auch in +Arg-Medium mit dem Zusatz von rekombinanter Arginase 1 mit und ohne nor-NOHA inkubiert.

Um den Effekt der aus den PMN freigesetzten beziehungsweise der rekombinanten Arginase 1 auf die Proliferation der T-Lymphozyten vergleichen zu können, wurden gleiche Aktivitäten der rekombinanten und granulozytären Arginase 1 eingesetzt. Zur Bestimmung der Aktivität der granulozytären Arginase 1, wurden die PMN über Nacht bei -20°C eingefroren und am nächsten Tag mittels Ultraschall sonifiziert. Nach Zugabe von Arginin verstoffwechselt die granulozytäre Arginase 1 im Sonikat das Arginin in Harnstoff und Ornithin. Die Menge an gebildetem Harnstoff pro Zeit diente der Bestimmung der Aktivität der Arginase 1 im Sonikat. Dazu wurde die Konzentration des Harnstoffs mit einer Farbreaktion optisch sichtbar gemacht und anschließend mit einem Spektrophotometer gemessen. Mit Hilfe der Konzentration des Harnstoffes konnte die Arginase 1-Aktivität berechnet werden (vergleiche Kapitel 3.2.6.2). Für das Experiment wurden folgende Aktivitäten verwendet: 100 mU/ml, 300 mU/ml, 600 mU/ml und 1000 mU/ml.

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Die vier unterschiedlichen Aktivitäts-Bedingungen wurden aus PMN-Sonikat und aus +Arg-Medium mit rekombinanter Arginase 1 (hier nur 100 bis 600 mU/ml) mit und ohne nor-NOHA für 24 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt. Die T-Lymphozyten wurden mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und in den Überständen des PMN-Sonikat, der rekombinanten Arginase 1 und den Kontrollmedien für 48 Stunden inkubiert.

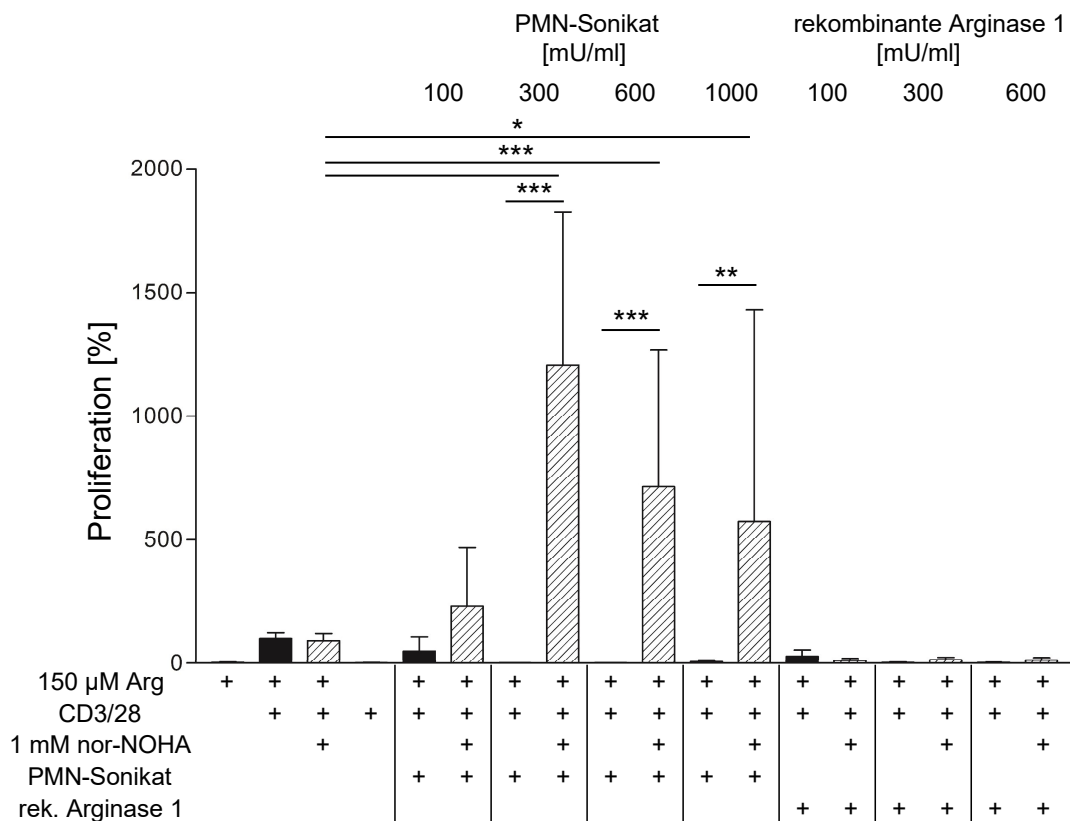


Abb. 16: Proliferation der T-Lymphozyten in definierter Arginase-Aktivität mit und ohne nor-NOHA: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden in Überständen definierter Arginase-Aktivität mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Für die Überstände wurde granulozytäre Arginase 1 aus PMN-Sonikat sowie rekombinante Arginase 1 verwendet. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde mittels des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays evaluiert. Zu sehen ist die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse des anschließend durchgeführten $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays zu sehen. In den vier Medium-Bedingungen zeigte die Proliferation das von vorherigen Ergebnissen bekannte Bild. Ohne Aktivierung beziehungsweise nach Aktivierung in -Arg-Medium war keine Proliferation darstellbar. Nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA unterschied sie sich nicht signifikant. Dies schließt eine Beeinflussung der Proliferation

4. Ergebnisse

der T-Lymphozyten durch die Zugabe von nor-NOHA aus. Wie schon in den vorherigen Experimenten zeigte sich sowohl nach Aktivierung in PMN-Sonikat als auch in +Arg-Medium mit rekombinanter Arginase 1 jeweils ohne nor-NOHA eine Abnahme der Proliferation. Nach Inkubation mit der rekombinanten Arginase 1 war sie in den Aktivitäten 300 mU/ml und 600 mU/ml so gering, dass sie graphisch nicht mehr darstellbar war. Somit wurde die Proliferation sowohl von PMN-Sonikat, als auch von rekombinanter Arginase 1 alleine supprimiert.

In den Bedingungen mit nor-NOHA dagegen war ein deutlicher Unterschied zwischen der Inkubation mit PMN-Sonikat beziehungsweise mit der rekombinanten Arginase 1 erkennbar. Nach Aktivierung in PMN-Sonikat zeigte sich ein starker Anstieg der Proliferation verglichen mit der Aktivierung in +Arg-Medium ab einer Arginase-Aktivität von 300 mU/ml. Dabei war der maximale Anstieg bei einer Arginase-Aktivität von 300 mU/ml zu erkennen. Hier stieg die Proliferation auf das 12-fache der konventionellen Aktivierung an. Bei 600 und 1000 mU/ml nahm der Anstieg wieder ab. Die Proliferation war aber mit 712 ± 556 cpm bei 600 mU/ml und mit 572 ± 857 cpm bei 1000 mU/ml dennoch signifikant höher als nach Inkubation ohne PMN-Sonikat. Dass die Proliferation in hohen PMN:T-Verhältnissen wieder abnahm, konnte auch in Abbildung 12 im 50:1-Verhältnis mit nor-NOHA und im 20:1-Verhältnis mit CB-1158 in Abbildung 14 beobachtet werden.

Nach Inkubation mit rekombinanter Arginase 1 mit nor-NOHA ließ sich jedoch kein Anstieg der Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung erkennen. Tendenziell stellte sich hier eher eine Abnahme der Proliferation dar, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant ist. Erwartungsgemäß hätte die Proliferation nach Aktivierung mit rekombinanter Arginase durch die Zugabe des Arginase 1-Inhibitors wieder auf das Niveau der konventionellen Aktivierung ansteigen sollen. Diese Beobachtung legt nahe, dass andere Bestandteile des PMN-Sonikats für die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten verantwortlich sind.

4.1.6. Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand bei Arginin-Supplementation

Die granulozytäre und auch die rekombinante Arginase 1 aus Abbildung 16 supprimierten die Proliferation der T-Lymphozyten. Dies konnte jeweils im [³H]-Thymidin-Assay gemessen werden. Das geschieht durch die Depletion von Arginin im Medium [25]. An dieser Stelle stellen sich folgende Fragen:

- Ist es möglich, diesen Effekt durch höhere Arginin-Konzentrationen im Medium aufzuheben?
- Wird die Hyperproliferation der T-Lymphozyten durch den PMN-Überstand mit nor-NOHA bei Arginin-Supplementation weiter gesteigert?

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Um diese Fragen zu überprüfen, wurden die PMN in diesem Experiment in drei Medien mit unterschiedlich hohen Arginin-Konzentrationen (150, 500 und 1000 μM) in den Verhältnissen 5:1 bis 20:1 mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden anschließend für 48 Stunden in den Überständen inkubiert. Als Medium-Bedingungen wurden die vier Bedingungen angesetzt, die in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurden. Zusätzlich wurden für die höheren Arginin-Konzentrationen jeweils T-Lymphozyten in den Medien mit höherer Arginin-Konzentration mit und ohne nor-NOHA aktiviert. Somit wurden die T-Lymphozyten in jeder der drei Arginin-Konzentration mit und ohne Arginase-Inhibitor inkubiert. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse des [^3H]-Thymidin-Assays dargestellt. Die Balkenfarbe zeigt die Arginin-Konzentration im Medium an. Schwarze Balken stehen für eine Arginin-Konzentration von 150 μM , die blauen für 500 μM und die roten für 1000 μM . Die ersten vier Balken im 150 μM Medium sowie die ersten beiden Balken im 500 μM und 1000 μM Medium zeigen die Proliferation der T-Lymphozyten in den Kontrollbedingungen.

In den Medium-Bedingungen mit einer Arginin-Konzentration von 150 μM war die Proliferation ähnlich zu den bereits aus Abbildung 12 bekannten Beobachtungen. Nach Aktivierung mit und ohne nor-NOHA unterschied sich die Proliferation nicht signifikant voneinander, also beeinflusste nor-NOHA die Proliferation der T-Lymphozyten nicht. Auch in den beiden Aktivierungsbedingungen des Mediums mit 500 μM Arginin und 1000 μM Arginin war zwischen der Inkubation mit und ohne nor-NOHA kein signifikanter Unterschied erkennbar. Auch zwischen den verschiedenen Arginin-Konzentrationen gab es keinen signifikanten Unterschied. Dies zeigten auch die absoluten *counts per minute*. So lag die Proliferation nach Aktivierung ohne nor-NOHA im Medium mit einer Arginin-Konzentration von 150 μM bei 2642 ± 1543 cpm, von 500 μM bei 2524 ± 1128 cpm und von 1000 μM bei 2019 ± 1423 cpm. Nach Aktivierung mit nor-NOHA proliferierten die T-Lymphozyten mit 3082 ± 1888 cpm im Medium mit 150 μM Arginin, mit 3728 ± 2852 cpm im Medium mit 500 μM Arginin und mit 3327 ± 2812 cpm im Medium mit 1000 μM Arginin.

Die in schwarzen Balken dargestellten Bedingungen entsprechen den bereits in Abbildung 12 gezeigten. Die Proliferation der T-Lymphozyten war nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA im 5:1-Verhältnis supprimiert und im 10:1- und 20:1-Verhältnis vergleichbar zur konventionellen Aktivierung. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA war im Gegensatz dazu ein starker Anstieg der Proliferation zu erkennen. Dieser Anstieg korrelierte mit dem PMN:T-Verhältnis. Somit erreichte sie ihr Maximum im 20:1-Verhältnis mit einer 30-fachen Proliferation im Vergleich zur Aktivierung ohne PMN-Überstand.

In den beiden höheren Arginin-Konzentrationen war ein etwas anderes Bild zu sehen. Sowohl im Medium mit 500 μM Arginin als auch im Medium mit 1000 μM Arginin war bei Akti-

4. Ergebnisse

vierung in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA stets ein Anstieg der Proliferation der T-Lymphozyten erkennbar. Dieser war jedoch nur bei Zugabe von nor-NOHA signifikant. Bei Betrachtung der einzelnen PMN:T-Verhältnisse wird klar, dass die Proliferation mit nor-NOHA stets höher war als ohne. Durch den PMN-Überstand ohne nor-NOHA wurde die Proliferation in diesen hohen Arginin-Konzentrationen im Medium nicht supprimiert, sondern stimuliert.

Im Medium mit einer Arginin-Konzentration von 500 μM war nach Inkubation im PMN-Überstand ohne nor-NOHA im Gegensatz zum Medium mit 150 μM Arginin keine Suppression der Proliferation zu sehen, sondern ein kontinuierlicher Anstieg vom 5:1-Verhältnis bis zum 20:1-Verhältnis. Durch Zugabe von nor-NOHA konnte die Proliferation in den jeweiligen Verhältnissen sogar darüber hinaus gesteigert werden. Maximal wurde sie im 10:1-Verhältnis mit nor-NOHA mit einer 18-fachen Proliferation im Vergleich zur Aktivierung ohne PMN-Überstand.

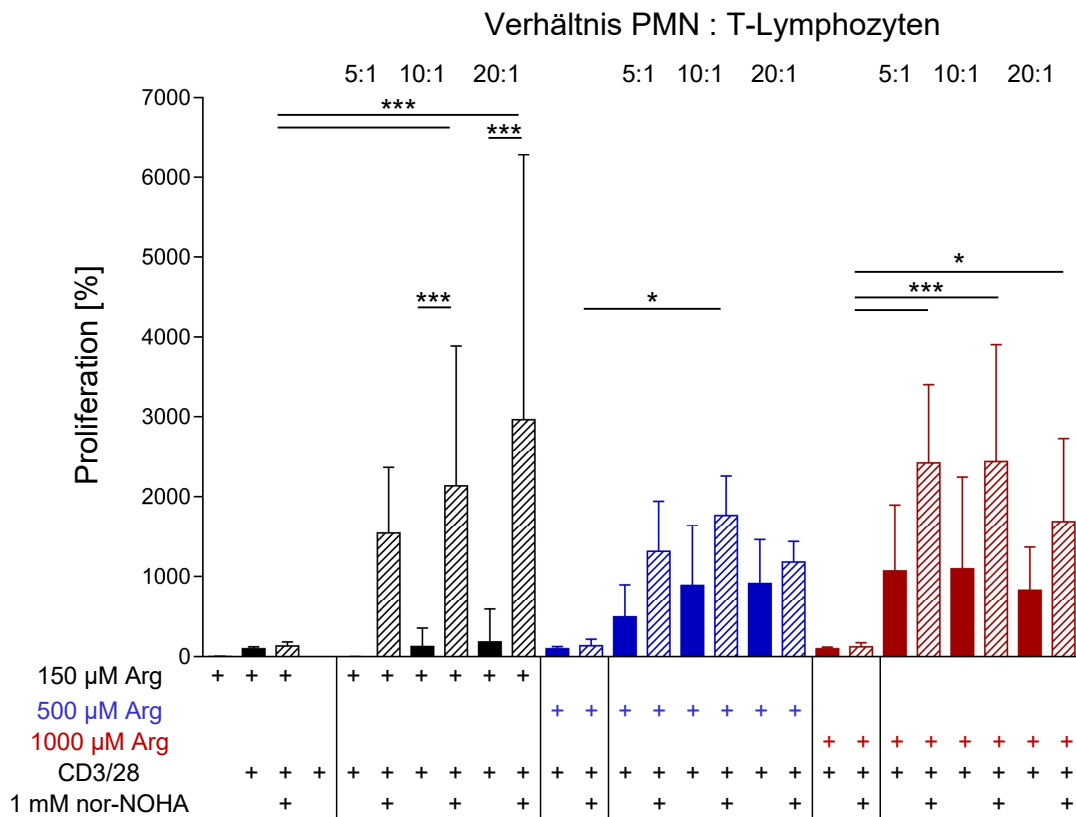


Abb. 17: Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA in Medien verschiedener Arginin-Konzentrationen: Die PMN wurden mit und ohne nor-NOHA in Medien verschieden hoher Arginin-Konzentrationen (150, 500 und 1000 μM) inkubiert. Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden anschließend für 48 Stunden in den PMN-Überständen inkubiert und die Proliferation mittels ^3H -Thymidin-Assay evaluiert. Die Abbildung zeigt die Auswertung von drei (in den 10:1- und 20:1-Verhältnisse von vier) unabhängigen Experimenten.

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Auch im Medium mit einer Arginin-Konzentration von 1000 μM zeigte sich keine Suppression durch den PMN-Überstand ohne nor-NOHA, jedoch eine Hyperaktivierung nach Inkubation in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA. Die Zugabe von nor-NOHA führte auch in dieser Arginin-Konzentration zu einer weiteren Steigerung der Proliferation in den jeweiligen Verhältnissen. Das Maximum der Proliferation lag hier ebenfalls im 10:1-Verhältnis mit nor-NOHA mit einem 24-fachen Anstieg gegenüber der konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand.

Die absoluten *counts per minute* der Medium-Bedingungen der verschiedenen Arginin-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich in der maximalen Proliferation der T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Arginin-Konzentrationen. Im Medium mit einer Arginin-Konzentration von 150 μM lag sie im 10:1-Verhältnis bei 31658 ± 4477 cpm, im Medium mit einer Arginin-Konzentration von 500 μM im 20:1-Verhältnis bei 29021 ± 9847 cpm und im Medium mit 1000 μM Arginin auch im 20:1-Verhältnis bei 27675 ± 17263 cpm.

Durch die bisherigen Experimente konnte also gezeigt werden, dass die Proliferation der T-Lymphozyten durch Inkubation im PMN-Überstand komplett supprimiert wurde. Durch Zugabe eines Arginase-Inhibitors kam es nicht nur zu einer Rekonstitution der Proliferation auf Niveau der Aktivierung ohne PMN-Überstand, sondern zu einer Hyperaktivierung. Diese Hyperaktivierung war nicht auf einen unspezifischen Effekt des Inhibitors zurückzuführen, da zwei unterschiedliche Inhibitoren verwendet wurden. Sie konnte sowohl in CD4^+ - als auch in CD8^+ -T-Lymphozyten beobachtet werden und korrelierte dabei mit dem ansteigenden Verhältnis von PMN:T. Bei Supplementation des durch die Arginase der PMN verbrauchten Arginins konnte sowohl ohne als auch mit Arginase-Inhibitor eine Hyperaktivierung beobachtet werden. Durch Inkubation in +Arg-Medium mit Zugabe von rekombinanter Arginase 1 und Arginase-Inhibitor war dagegen keine Hyperaktivierung zu sehen.

4.1.7. Proliferation der T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der PMN

In den bislang durchgeführten Experimenten wurden die PMN zur Generierung des Überstandes stets mit und ohne nor-NOHA für 72 Stunden inkubiert. Um zu verstehen, wann die PMN ihre supprimierenden und stimulierenden Faktoren in den Überstand abgeben, wurden in diesem Experiment drei verschiedene Inkubationszeiten der PMN gewählt. Die PMN wurden dafür mit und ohne nor-NOHA für 24, 48 und 72 Stunden in den PMN:T-Verhältnissen 1:1 bis 20:1 inkubiert. Anschließend wurden mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten in den unterschiedlichen PMN-Überständen für 48 Stunden inkubiert. Zudem wurden für jede Inkubationszeit der PMN die vier Medium-Bedingungen

4. Ergebnisse

angesetzt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der drei $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays. Die Proliferation der T-Lymphozyten in den Medium-Bedingungen der drei Inkubationszeiten der PMN war identisch zu der, in den vorherigen $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays beobachteten (vergleiche Abbildung 12). Auch hier hatte die Zugabe von nor-NOHA keinen Einfluss auf die Proliferation.

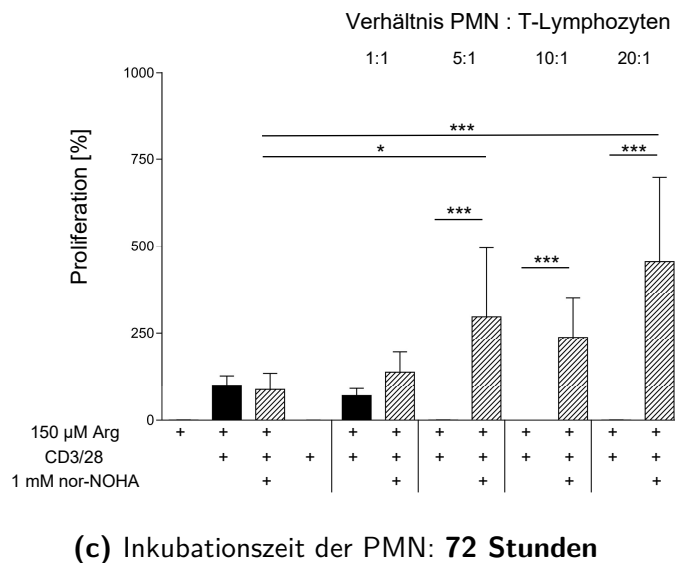
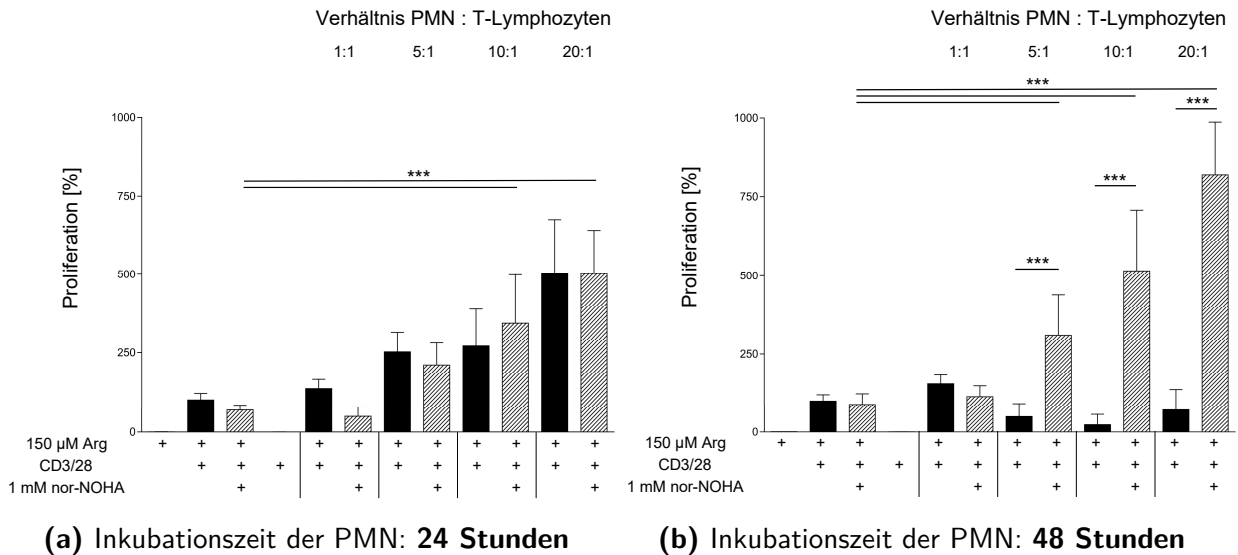


Abb. 18: Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überständen verschiedener Inkubationszeiten mit und ohne nor-NOHA: Die PMN wurden im Medium für 24, 48 oder 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Anschließend wurden die mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten in den Überständen für je 48 Stunden inkubiert. Die Proliferation wurde mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay evaluiert. Zu sehen ist zu jedem Inkubationszeitpunkt die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten.

Bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* war erkennbar, dass die T-Lymphozyten zu allen Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich proliferierten. Sie proliferierten nach

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

Aktivierung ohne nor-NOHA nach 24 Stunden Inkubation der PMN mit 6305 ± 1328 cpm, nach 48 Stunden mit 4266 ± 1495 cpm und nach 72 Stunden mit 9064 ± 6334 cpm. Nach Aktivierung mit nor-NOHA zeigte sich eine Proliferation von 3653 ± 1804 cpm nach 24 Stunden Inkubation der PMN, von 3257 ± 1467 cpm nach 48 Stunden und von 6387 ± 3911 cpm nach 72 Stunden. Die Dauer der Inkubation der PMN mit und ohne nor-NOHA und damit die Dauer der Zellkultur der T-Lymphozyten vor Beginn des eigentlichen Experimentes hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der T-Lymphozyten.

Ab einem Verhältnis von 5:1 unterschied sich die Proliferation nach Inkubation in den PMN-Überständen in allen drei Inkubationszeiten deutlich von den Medium-Bedingungen. Auch zwischen den drei Inkubationszeiten der PMN war ein Unterschied zu erkennen.

Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der PMN (Abbildung 18a) stieg die Proliferation der T-Lymphozyten sowohl mit als auch ohne Zugabe von nor-NOHA ab einem Verhältnis von 5:1 kontinuierlich in Korrelation zum PMN:T-Verhältnis an. Dabei erreichte sie ihr Maximum im 20:1-Verhältnis. Nach Aktivierung in PMN-Überständen ohne nor-NOHA stieg die Proliferation auf 503 ± 170 % der konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand und nach Inkubation in PMN-Überstand mit nor-NOHA auf 502 ± 137 %. Somit gab es nach 24 Stunden Inkubationszeit der PMN keinen signifikanten Unterschied mit und ohne Zugabe von nor-NOHA.

In den beiden längeren Inkubationszeiten der PMN dagegen unterschied sie sich nach Aktivierung in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA deutlich voneinander, wie auch schon in Abbildung 12 beobachtet werden konnte. So zeigte sich nach 48-stündiger Inkubationszeit in Abbildung 18b eine geringere Proliferation der T-Lymphozyten nach Inkubation in PMN-Überstand ohne nor-NOHA verglichen mit der Aktivierung ohne PMN-Überstand. Diese Differenz war jedoch in keiner der PMN:T-Verhältnisse signifikant. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ sich wie in Abbildung 18a ein kontinuierlicher Anstieg der Proliferation in Korrelation zum PMN:T-Verhältnis erkennen. Ihr Maximum erreichte sie im 20:1-Verhältnis und betrug 818 ± 170 % der konventionellen Aktivierung.

Die 72-stündige Inkubation der PMN entspricht dem Experiment, das in Abbildung 12 dargestellt ist. In den Verhältnissen 5:1 bis 20:1 ohne Zugabe von nor-NOHA ließ sich keine Proliferation der T-Lymphozyten mehr feststellen. Sie war vollständig durch den PMN-Überstand supprimiert. Durch Zugabe von nor-NOHA dagegen ließ sich der gleiche starke Anstieg der Proliferation in Korrelation des PMN:T-Verhältnisses beobachten, der schon in den Abbildungen 18a und 18b zu sehen ist. Auch nach 72-stündiger Inkubationszeit der PMN zeigte sich die Proliferation im 20:1-Verhältnis maximal mit 455 ± 243 % der konventionellen Aktivierung.

4. Ergebnisse

Es lässt sich also zusammenfassen, dass sich in allen drei Inkubationszeiten ein kontinuierlicher Anstieg der Proliferation der T-Lymphozyten darstellt. Bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* der maximalen Proliferation des 20:1-Verhältnisses mit nor-NOHA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Inkubationszeiten der PMN. Nach der 24-stündigen Inkubation der PMN lag sie bei 38952 ± 14751 cpm, nach 48-stündiger Inkubation bei 42524 ± 14912 cpm und nach 72-stündiger Inkubation bei 43093 ± 12062 cpm. Die Hyperaktivierung der Proliferation war also schon nach 24 Stunden Inkubation der PMN zu sehen und blieb konstant über den gesamten Inkubationszeitraum bis 72 Stunden bestehen. Die Proliferation des selben 20:1-Verhältnisses ohne nor-NOHA zeigte allerdings einen großen Unterschied zwischen den drei Inkubationszeiten der PMN. Sie lag nach 24 Stunden Inkubation der PMN bei 35162 ± 9898 cpm, nach 48 Stunden bei 4770 ± 3523 cpm und nach 72 Stunden proliferierten die T-Lymphozyten nur noch mit 76 ± 103 cpm. Bei Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme bis hin zum vollständigen Erliegen der Proliferation der T-Lymphozyten mit Verlängerung der Inkubationszeit der PMN.

4.1.8. Arginin-Konzentration im Medium nach PMN- und T-Lymphozyten-Inkubation

Im Verlauf der Inkubation des [³H]-Thymidin-Assays (vergleiche Abbildung 12) nahm die Arginin-Konzentration im Medium wegen der Verstoffwechslung durch die Arginase 1 der PMN, aber auch aufgrund der Aufnahme von Arginin durch die T-Lymphozyten kontinuierlich ab. Um zu evaluieren, wie schnell und wie weit die Arginin-Konzentration in den verschiedenen PMN- und Kontrollbedingungen absank, wurde in verschiedenen Überständen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie³ die Arginin-Konzentration im Medium gemessen. Dazu wurden PMN für das PMN:T-Verhältnis 10:1 mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils Überstand mit und ohne nor-NOHA für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie abgenommen. Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden im Überstand der verschiedenen Inkubationszeiten der PMN für 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation der T-Lymphozyten wurde erneut in allen Bedingungen Überstand für die Arginin-Konzentrationsbestimmung abgenommen.

Abbildung 19 zeigt die Arginin-Konzentrationen in den oben beschriebenen Bedingungen, sowie die Konzentration von Arginin im eingesetzten +Arg-Medium. Die Ausgangskonzentration im +Arg-Medium, dargestellt im ersten Balken, lag bei 133 ± 9 μM. Auf der linken Seite

³durchgeführt von A. H., Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. I. C., Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Mainz

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

sind die Arginin-Konzentrationen im Verlauf der Inkubation der PMN vor der Zugabe von T-Lymphozyten dargestellt und auf der rechten Seite sind die Arginin-Konzentrationen nach Inkubation der T-Lymphozyten in den verschiedenen inkubierten PMN-Überständen zu sehen.

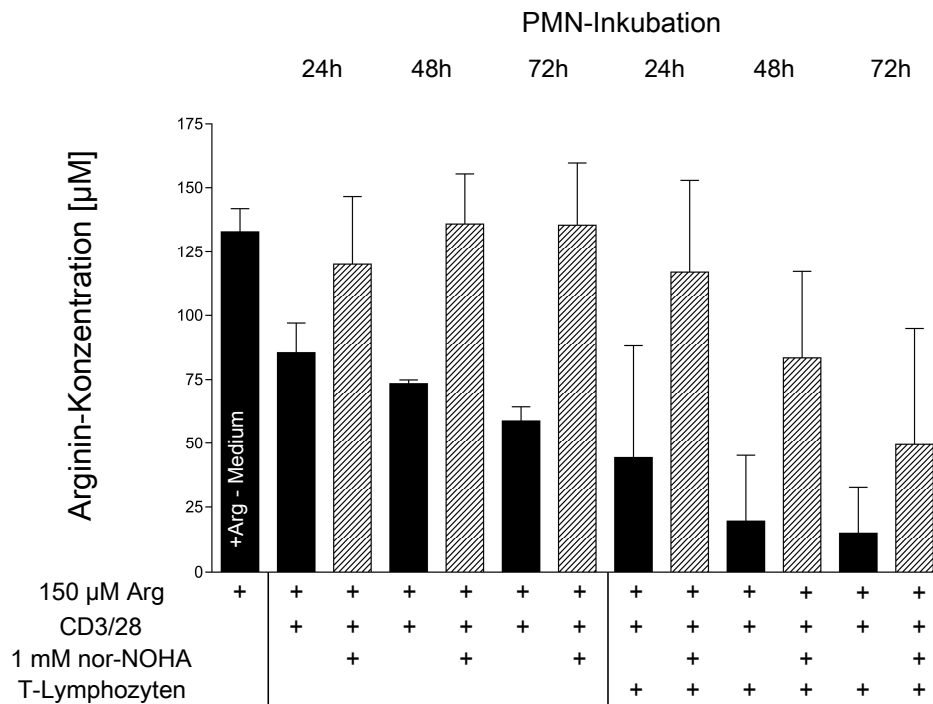


Abb. 19: Arginin-Depletion im Verlauf der Inkubation der PMN und T-Lymphozyten: PMN wurden in einem PMN:T-Verhältnis von 10:1 für 24, 48 und 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden in den verschiedenen Überständen für 48 Stunden inkubiert. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde die Argininkonzentration im Medium nach der Inkubation der PMN und nach der Inkubation der T-Lymphozyten gemessen. Zu sehen ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten (die Bedingungen ohne T-Lymphozyten: ein Experiment).

In den Arginin-Messungen der PMN-Überstände vor T-Lymphozyten-Inkubation war zu erkennen, dass die Arginin-Konzentrationen in den Bedingungen mit nor-NOHA nicht signifikant von der Ausgangskonzentration im +Arg-Medium abwichen. Die Arginase 1 der PMN wurde durch nor-NOHA also zu allen hier gemessenen Zeitpunkten effektiv und vollständig inhibiert. Außerdem veränderte die Aufnahme von Arginin durch die PMN die extrazelluläre Arginin-Konzentration nicht messbar. Diese drei Überstände wiesen deshalb die höchsten Argininkonzentrationen auf. Die Konzentration in den PMN-Überständen ohne nor-NOHA vor T-Lymphozyten-Inkubation nahm dagegen kontinuierlich von 24 Stunden Inkubationszeit der PMN mit $85 \pm 12 \mu\text{M}$, über 48 Stunden mit $74 \pm 1 \mu\text{M}$ bis 72 Stunden auf $59 \pm 6 \mu\text{M}$ ab. Die Arginase 1 der PMN wurde in diesen Überständen nicht inhibiert und depletierte kontinuierlich das Arginin aus dem Medium.

4. Ergebnisse

Auch in den Überständen nach Inkubation der T-Lymphozyten zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Arginin-Konzentration von 24 Stunden Inkubationszeit der PMN mit $44 \pm 44 \mu\text{M}$ über 48 Stunden Inkubationszeit der PMN mit $20 \pm 26 \mu\text{M}$ bis 72 Stunden Inkubationszeit der PMN auf nur noch $15 \pm 18 \mu\text{M}$. Verglichen mit den jeweiligen PMN-Überständen vor T-Lymphozyten-Inkubation nahm die Argininkonzentrationen während der 48 Stunden Inkubation jeweils deutlich ab. Zudem fiel auf, dass die Arginin-Konzentration auch in den Überständen mit nor-NOHA kontinuierlich von 24 Stunden Inkubation der PMN mit $117 \pm 36 \mu\text{M}$ über 48 Stunden Inkubation der PMN mit $83 \pm 34 \mu\text{M}$ bis 72 Stunden Inkubation der PMN mit $49 \pm 45 \mu\text{M}$ abnahm. Die niedrigste Konzentration fand sich im Überstand, in dem die PMN am längsten, also für 72 Stunden ohne nor-NOHA inkubiert wurden und anschließend die T-Lymphozyten für 48 Stunden im Überstand inkubiert wurden. Das alles spricht für eine weitere Verstoffwechslung von Arginin durch die noch in den Überständen vorhandene Arginase 1 oder die Aufnahme des Arginins durch die T-Lymphozyten.

4.1.9. Proliferation der T-Lymphozyten nach kurzen Inkubationen der PMN

Nachdem die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten im vorherigen Kapitel schon nach einer Inkubationszeit der PMN von 24 Stunden beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 18a), wurde die Inkubationszeit der PMN in diesem Experiment weiter verkürzt. Die PMN wurden für das PMN:T-Verhältnis 10:1 lediglich für 5, 10, 15 und 30 Minuten ohne nor-NOHA inkubiert. Nach der kurzen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt. Die PMN wurden in frischem +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA weiter inkubiert bis alle PMN-Bedingungen insgesamt 72 Stunden inkubiert waren.

Die mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten wurden anschließend, wie in den anderen [^3H]-Thymidin-Assays für 48 Stunden mit den folgenden Überständen inkubiert:

- Überstand nach der kurzen Inkubationszeit der PMN
- Überstand nach den vollendeten 72 Stunden Inkubation der PMN ohne nor-NOHA
- Überstand nach den vollendeten 72 Stunden Inkubation der PMN mit nor-NOHA

Zusätzlich wurden PMN gemäß Kapitel 4.1.2 für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA für das 10:1-Verhältnis inkubiert sowie die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt. In Abbildung 20 ist der experimentelle Ablauf schematisch dargestellt.

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

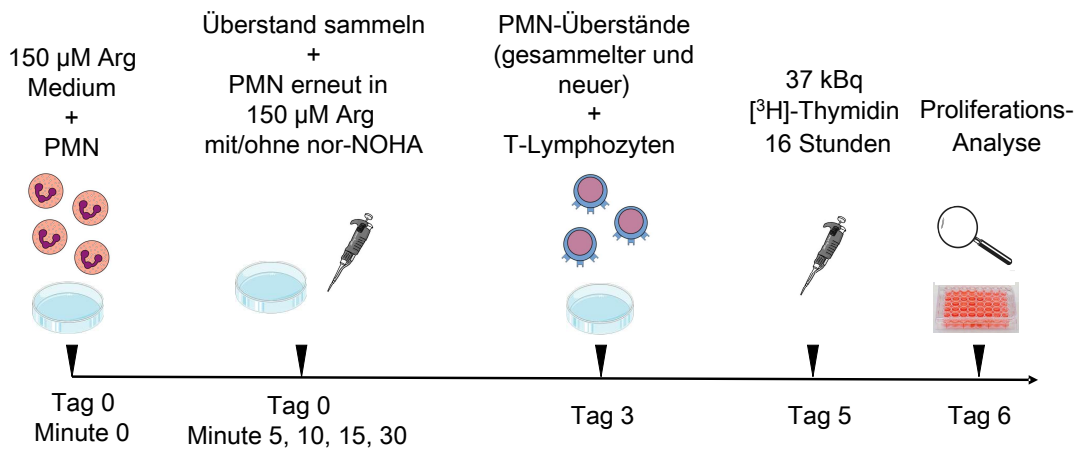


Abb. 20: Schematischer experimenteller Aufbau des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays nach kurzen Inkubationen der PMN: Nach der Isolierung wurden die PMN zunächst für 5, 10, 15 und 30 Minuten inkubiert und davon Überstände generiert. Anschließend wurden sie für 72 Stunden mit und ohne Arginase-Inhibitor inkubiert und ebenfalls davon Überstände generiert. Die T-Lymphozyten wurden dann 48 Stunden in den PMN-Überständen oder in den Medium-Bedingungen inkubiert. Danach wurde das radioaktive $[^3\text{H}]$ -Thymidin hinzugefügt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Abschließend wurde die Proliferation in den verschiedenen Bedingungen analysiert.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse des $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays gezeigt. Die ersten vier Balken des Diagramms stellen, wie schon in den anderen Abbildungen, die Proliferation in den Medium-Bedingungen dar. Die nächsten zwei Balken zeigen die Proliferation nach Aktivierung in PMN-Überständen mit und ohne nor-NOHA, die wie in Abbildung 12 ohne Intervention für 72 Stunden inkubiert wurden. Die folgenden Balken zeigen die Proliferation der T-Lymphozyten mit kurzen Inkubationszeiten der PMN von 5, 10, 15 und 30 Minuten. Karierte Balken stellen die Proliferation der T-Lymphozyten dar, die in den PMN-Überständen der kurzen Inkubation, inkubiert wurden. Im Diagramm sind sie mit einem „+“ in der Zeile „PMN-Überstand (1)“ gekennzeichnet. Die einfarbigen Balken würden die Proliferation nach Inkubation in den PMN-Überständen nach vollendeten 72 Stunden Inkubation ohne nor-NOHA darstellen (vergleiche Kapitel 4.1.1). Durch die komplette Suppression der Proliferation sind diese Balken im Diagramm nicht erkennbar.

Die diagonal gestreiften Balken stellen die Proliferation nach vollendeten 72 Stunden Inkubation der PMN mit nor-NOHA nach der Überstand-Abnahme nach kurzer Inkubation dar. Die Proliferation der T-Lymphozyten in den Medium-Bedingungen zeigte sich ähnlich zu der in Abbildung 12, die den $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay nach 72 Stunden Inkubation der PMN darstellt. Ohne Aktivierung beziehungsweise nach Aktivierung in –Arg-Medium ließ sich keine Proliferation erkennen, während die Proliferation nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA nicht signifikant voneinander abwich und somit Einflüsse von nor-NOHA auf die Proliferation der T-Lymphozyten ausgeschlossen werden konnten.

4. Ergebnisse

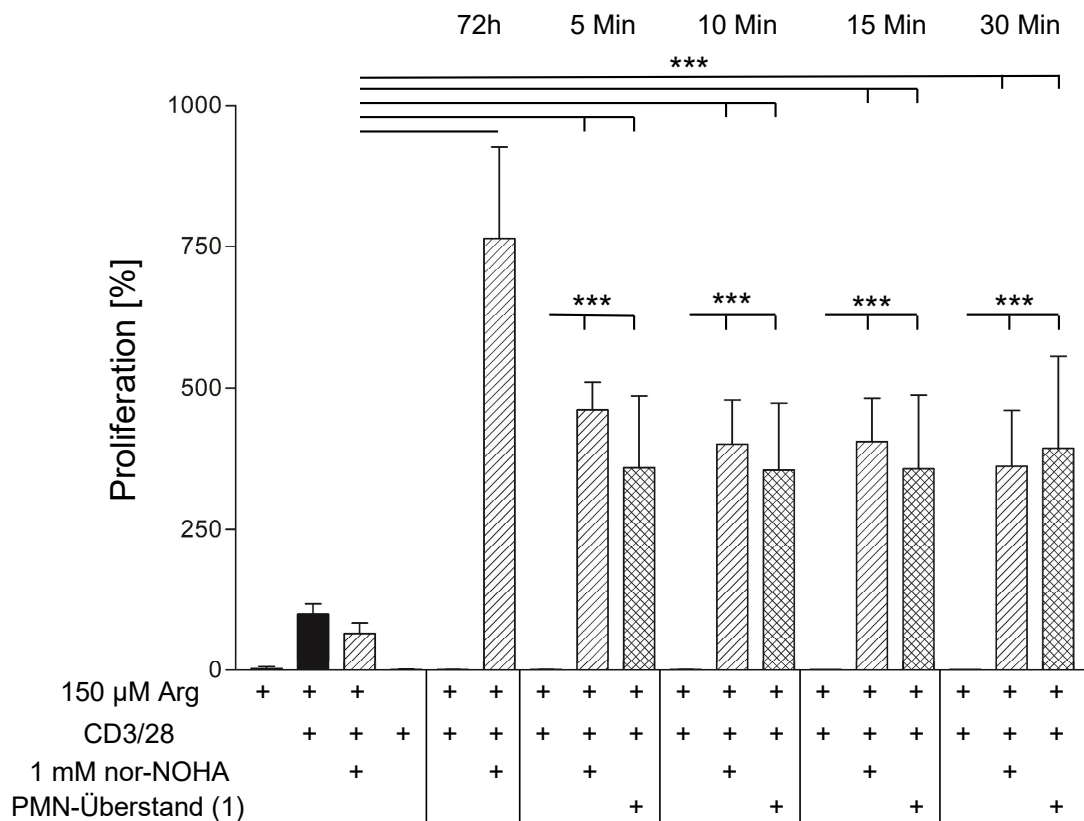


Abb. 21: Proliferation der T-Lymphozyten nach kurzer Inkubation der PMN: Die PMN (Verhältnis 10:1) wurden zunächst für 5, 10, 15 und 30 Minuten inkubiert und Überstand generiert (PMN-Überstand (1)). Anschließend wurden sie in frischem +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA bis zu vollendeten 72 Stunden inkubiert und erneut Überstand generiert. Zudem wurden PMN 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Überstände aller Inkubationen der PMN wurden für 48 Stunden auf mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten inkubiert. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay evaluiert. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Nach Aktivierung der T-Lymphozyten in den PMN-Überständen nach vollendeten 72 Stunden Inkubation ohne nor-NOHA nach vorangegangener kurzer Inkubation war in keiner der Versuchsbedingungen eine Proliferation darstellbar. Ebenso nicht in der PMN-Bedingung nach direkter 72-stündiger Inkubation der PMN ohne nor-NOHA (Abbildung 21: 72 h). Der supprimierende Einfluss der PMN wurde somit erst nach mehr als 30 Minuten in den Überstand abgegeben und war zu allen Inkubationszeiten der PMN in diesem Überstand vorhanden.

Im Gegensatz dazu stieg die Proliferation bereits nach sehr kurzer Inkubation der PMN (Abbildung 21: PMN-Überstand (1)) sowie nach vollendeter 72 Stunden Inkubation der PMN mit nor-NOHA im Vergleich zur konventionellen Aktivierung ohne PMN-Überstand

stark an. Sie zeigte sich dabei in den vier verschiedenen kurzen Inkubationszeiten der PMN nicht signifikant unterschiedlich. So stieg sie nach Aktivierung in den PMN-Überständen aus den kurzen Inkubationen auf das $3\frac{1}{2}$ - bis $4\frac{1}{2}$ -fache der Aktivierung ohne PMN-Überstand an.

Maximal wurde die Proliferation nach Inkubation in den PMN-Überständen nach 5 minütiger Inkubation und anschließender Inkubation mit nor-NOHA bis 72 Stunden. Das Maximum der Proliferation nach kurzer Inkubation der PMN wurde nach 30 Minuten mit 394 ± 162 % der Aktivierung ohne PMN-Überstand erreicht. Auffällig war, dass die Proliferation der T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand der Inkubation für 72 Stunden ohne Intervention mit 764 ± 162 % der konventionellen Aktivierung etwa doppelt so hoch war wie nach der kurzen Inkubation sowie nach den vollendeten 72 Stunden. Dies konnte bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* bestätigt werden. Nach vollendeter 72-stündiger Inkubation der PMN mit nor-NOHA proliferierten die T-Lymphozyten maximal mit 21614 ± 2339 cpm und nach 72 Stunden Inkubation mit nor-NOHA ohne Intervention mit 45168 ± 22512 cpm.

4.1.10. Proliferations-Induktion der T-Lymphozyten durch aktivierte Granulozyten

In den bisherigen Experimenten wurden die T-Lymphozyten stets mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und in den Überständen von nicht-aktivierten PMN kultiviert. In den folgenden Experimenten wurde der Effekt einer zusätzlichen Aktivierung der PMN untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Aktivatoren der PMN verwendet: PMA, fMLP und Ionomycin. Alle drei Aktivatoren stimulieren Leukozyten über intrazelluläre Kaskaden. PMA aktiviert die Proteinkinase C, fMLP aktiviert die G-Protein-gekoppelte Kaskade und Ionomycin erhöht die intrazelluläre Kalzium-Konzentration [124]. Die PMN wurden für 30 Minuten (PMN:T-Verhältnis 10:1) mit oder ohne je einem Aktivator (24 nM PMA, 1 μ M fMLP oder 1 μ M Ionomycin) inkubiert. Nach 30 Minuten Aktivierung wurde der Überstand abgenommen und die PMN erneut in +Arg-Medium mit und ohne Inhibitor bis zu einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden inkubiert.

Zudem wurde PMN-Überstand für 72 Stunden (PMN:T-Verhältnis 10:1) mit und ohne nor-NOHA inkubiert (vergleiche Kapitel 4.1.2). Anschließend wurden sowohl der Überstand der 30 minütigen Aktivierung als auch die Überstände der 72-stündigen Inkubation für 48 Stunden auf mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten inkubiert. Zusätzlich zu den vier Medium-Bedingungen wurden T-Lymphozyten in +Arg-Medium mit je einem der drei Aktivatoren inkubiert.

4. Ergebnisse

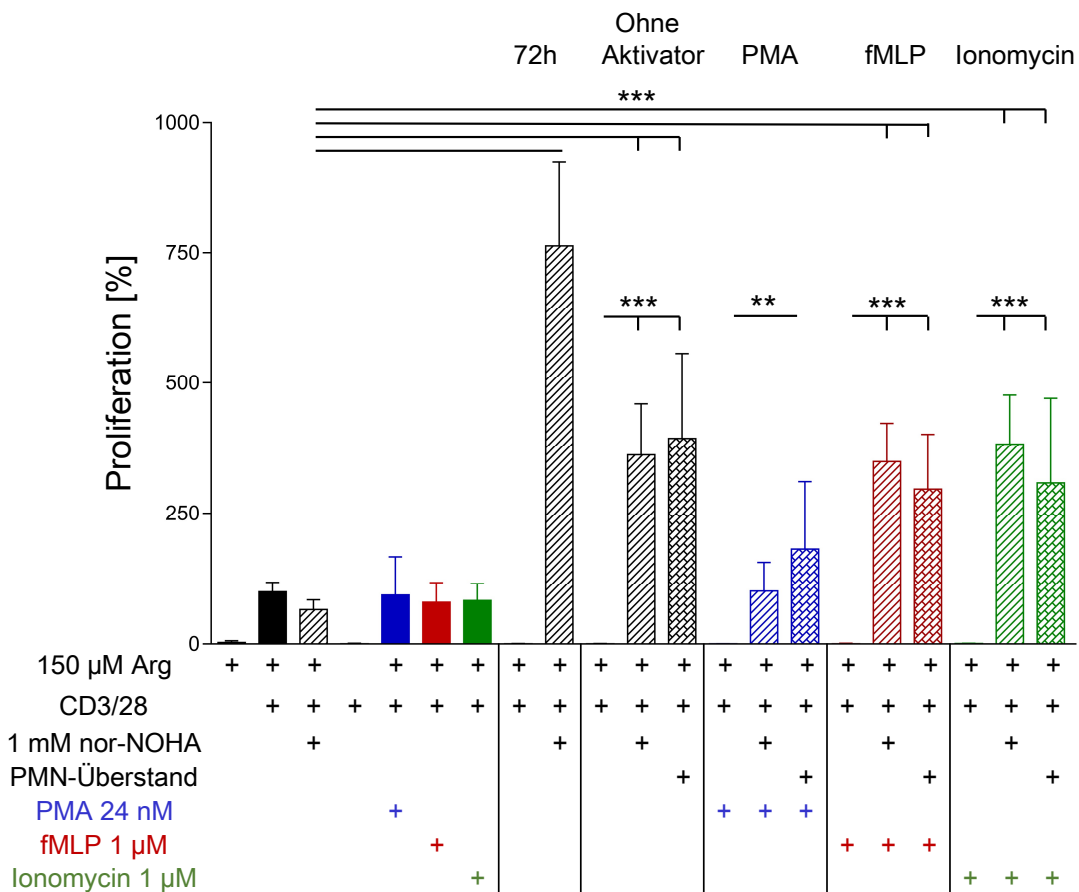


Abb. 22: Proliferation der T-Lymphozyten in aktiviertem PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA: Die PMN wurden für 30 Minuten mit den drei Aktivatoren (PMA, fMLP und Ionomycin) und einmal ohne Aktivator inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die PMN in frischem +Arg-Medium bis zu vollständigen 72 Stunden Inkubation der PMN mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Zudem wurden PMN für 72 Stunden ohne Intervention mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Der Überstand der 30-minütigen Aktivierung sowie die Überstände der 72-stündigen Inkubation der PMN wurden für 48 Stunden auf mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidin-Assay bestimmt. Zu sehen ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des [³H]-Thymidin-Assays dargestellt. In den ersten sieben Balken sind die Medium- und Aktivatoren-Bedingungen zu sehen. In den zwei darauf folgenden Balken ist die Proliferation in PMN-Überstand nach 72-stündiger Inkubation der PMN dargestellt. Diese Proliferation ist in Abbildung 12 ebenfalls zu sehen. Die folgenden Balken zeigen die Proliferation der T-Lymphozyten nach 30-minütiger Inkubation mit und ohne Aktivatoren. Die Proliferation nach Inkubation in PMN-Überstand ohne Aktivator entspricht der 30-minütigen kurzen Inkubation der PMN, die auch in Abbildung 21 dargestellt ist. Einfarbig ist die Proliferation nach Inkubation in 72-stündig inkubiertem PMN-Überstand ohne nor-NOHA dargestellt. Sie ist bei vollständiger Suppression der Proliferation durch den PMN-Überstand nicht sichtbar. Die Proliferation nach vollendeter 72-stündiger Inkubation mit

4.1. Hyperaktivierung der Proliferation von T-Lymphozyten durch PMN

nor-NOHA ist in diagonal gestreiften Balken dargestellt. Mit den karierten Balken ist die Inkubation im PMN-Überstand nach 30-minütiger Inkubation mit und ohne Aktivatoren dargestellt.

Ohne Aktivierung und nach Aktivierung in –Arg-Medium zeigten die T-Lymphozyten, wie schon in Abbildung 12, eine sehr geringe Proliferation. Die anderen Medium-Bedingungen ließen keinen signifikanten Unterschied erkennen. Somit hatte weder die Zugabe von nor-NOHA, noch die Zugabe der drei Aktivatoren einen Einfluss auf die Proliferation. Es zeigte sich nach Aktivierung in +Arg-Medium eine Proliferation von 5301 ± 2568 cpm. Nach Aktivierung in PMN-Überstand nach vollständiger 72-stündiger Inkubation ohne nor-NOHA war sie, wie schon in Abbildung 21 beobachtet werden konnte, so gering, dass sie graphisch hier nicht dargestellt werden konnte.

Nach Inkubation in PMN-Überstand, der direkt für 72 Stunden mit nor-NOHA inkubiert wurden (Abbildung 22: 72 h), zeigte sich eine Proliferation von 42753 ± 22269 cpm. Dies bedeutet eine Steigerung auf $764 \pm 162\%$ der konventionellen Aktivierung. Dieser Anstieg war auch in Abbildung 21 erkennbar. Nach 30-minütiger Inkubation der PMN mit fMLP oder Ionomycin ohne Aktivator war ebenso ein Anstieg sichtbar. Sowohl nach 30-minütiger Inkubation der PMN mit und ohne Aktivatoren ohne nor-NOHA als auch nach darauf folgender vollständiger 72-stündiger Inkubation mit nor-NOHA ließ sich eine Steigerung der Proliferation erkennen. Eine maximale Proliferation von 21080 ± 12007 cpm zeigte sich ohne Aktivator aber mit nor-NOHA. Dies entspricht einer Steigerung auf $394 \pm 162\%$ der Proliferation nach Aktivierung ohne PMN-Überstand.

Ähnlich wie in Abbildung 21 unterschied sie sich innerhalb der Aktivierungsbedingung nach 30-minütiger Aktivierung und nach 72-stündiger Inkubation nicht signifikant voneinander. Der Anstieg der Proliferation nach 30-minütiger Inkubation mit und ohne Aktivator war, wie auch in Abbildung 21 halb so hoch, wie der Anstieg nach direkter 72-stündiger Inkubation mit nor-NOHA. Nach Aktivierung mit PMA war dagegen keine signifikante Hyperaktivierung der Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung feststellbar.

4.2. Proliferation der T-Lymphozyten in Kokultur mit PMN

Bei Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand konnte eine ausgeprägte Hyperstimulation der Proliferation beobachtet werden (Abbildungen 12 bis 22). Im Folgenden sollen entsprechende Untersuchungen in einem PMN-T-Lymphozyten-Kokulturmodell erfolgen. In Kokulturen lassen sich Zell-Zell-Interaktionen sowie Interaktionen auf stofflicher Basis untersuchen, da hier zwei Zellpopulationen zeitgleich im selben Medium inkubiert werden.

4.2.1. [³H]-Thymidin-Assay der direkten Kokultur von T-Lymphozyten und PMN

Für eine direkte Kokultur wurden PMN und mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten in den PMN:T-Verhältnissen 1:1 bis 20:1 für 48 Stunden mit und ohne nor-NOHA in einem Well inkubiert. Pro Well wurden wie im [³H]-Thymidin-Assay mit PMN-Überstand in Kapitel 4.1.2, $5 \cdot 10^4$ T-Lymphozyten eingesetzt. Zudem wurden die vier Medium-Bedingungen angesetzt. Die Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des [³H]-Thymidin-Assays.

Wie schon in Abbildung 12 beobachtet, zeigte sich ohne Aktivierung und nach Aktivierung in –Arg-Medium nahezu keine Proliferation der T-Lymphozyten. Die Proliferation nach Aktivierung in +Arg-Medium wurde wie in allen [³H]-Thymidin-Assays auf 100 % normiert. Anders als in den bisherigen Abbildungen unterschied sich die Proliferation der Aktivierung in +Arg-Medium mit nor-NOHA signifikant von der ohne nor-NOHA. Sie lag bei nur 21 ± 15 % der zweiten Kontrollbedingung. Dies lässt auf einen negativen Effekt des Inhibitors nor-NOHA auf die frisch isolierten T-Lymphozyten schließen. Die Proliferation in +Arg-Medium war mit 13901 ± 6612 cpm deutlich höher als in den vorherigen [³H]-Thymidin-Assays (zum Beispiel in Kapitel 4.1.2). Nach Zugabe von nor-NOHA in das +Arg-Medium proliferierten die T-Lymphozyten mit 3668 ± 4142 cpm, ähnlich wie in Abbildung 12. Hier lag die Proliferation nach Aktivierung in +Arg-Medium bei 4230 ± 3894 cpm und nach Zugabe von nor-NOHA bei 3368 ± 297 cpm.

Nicht nur in den Medium-Bedingungen zeigte sich in der Kokultur ein anderes Bild der Proliferation verglichen mit den T-Lymphozyten nach Inkubation im PMN-Überstand, sondern auch in den Bedingungen mit den PMN ließen sich deutliche Unterschiede erkennen. In keiner der PMN:T-Verhältnisse war eine im Kontext der Aktivierung in PMN-Überstand induzierte Hyperaktivierung der T-Lymphozyten zu sehen. Die Proliferation sank mit Anstieg des PMN:T-Verhältnisses kontinuierlich ab.

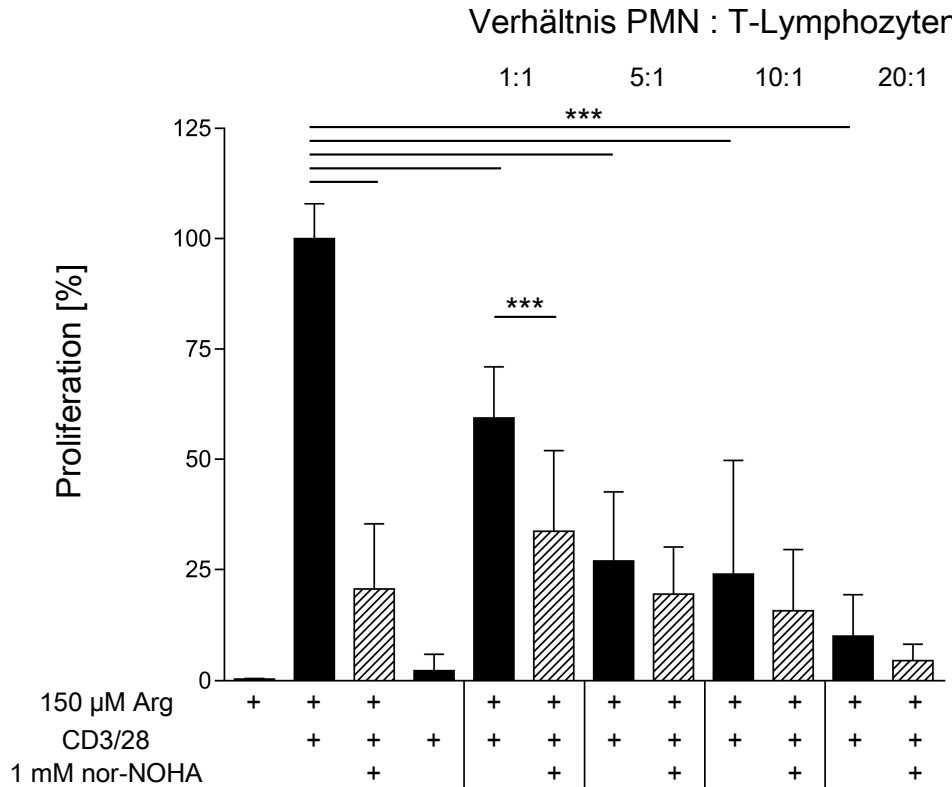


Abb. 23: Proliferation der T-Lymphozyten in direkter Kokultur mit PMN mit und ohne nor-NOHA: PMN und mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden im selben Well mit und ohne Zugabe von nor-NOHA für 48 Stunden inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidin-Assay quantifiziert. Zu sehen ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

Nach Aktivierung in der Kokultur mit den PMN und Zugabe von nor-NOHA zeigte sich dabei eine geringere Proliferation der T-Lymphozyten als nach Kokultur mit den PMN ohne nor-NOHA. Minimal wurde sie im 20:1-Verhältnis. Hier erreichten die T-Lymphozyten ohne nor-NOHA nur 10 ± 9 % der Proliferation nach Aktivierung ohne Kokultur mit PMN. Nach Aktivierung in der Kokultur mit den PMN mit Zugabe von nor-NOHA lag sie lediglich bei 5 ± 4 %.

4.2.2. Transwell-Kultur

Im Gegensatz zur direkten Kokultur ermöglichen Experimente im Transwell-System Untersuchungen zu Interaktionen zweier Zellpopulationen ausschließlich durch lösliche, durch die Zellen ins Medium sezernierte Stoffe, ohne direkte Zell-Zell-Interaktionen. Dies wird ermöglicht durch die räumliche Trennung der Zellen durch den Transwell-Filter. Die beiden zu untersuchenden Zellpopulationen befinden sich dennoch im selben Medium. PMN und mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden dafür direkt nach

4. Ergebnisse

der Isolierung in den PMN:T-Verhältnissen 1:1 bis 20:1 im Transwell-System für 48 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Zusätzlich wurden die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt. Die T-Lymphozyten wurden dafür zu $2 \cdot 10^5$ Zellen in das Well einer 24-Well-Platte direkt ins Medium vorgelegt. Anschließend wurden die PMN mit dem wieder entfernbaren Filter (Porengröße $0,4 \mu\text{m}$) im selben Medium inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Filter mit den PMN entfernt und je ein Viertel der T-Lymphozyten-Suspension in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Danach konnte die Proliferation der T-Lymphozyten mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay gemessen werden. Die Ergebnisse dieses Assays sind in Abbildung 24 dargestellt.

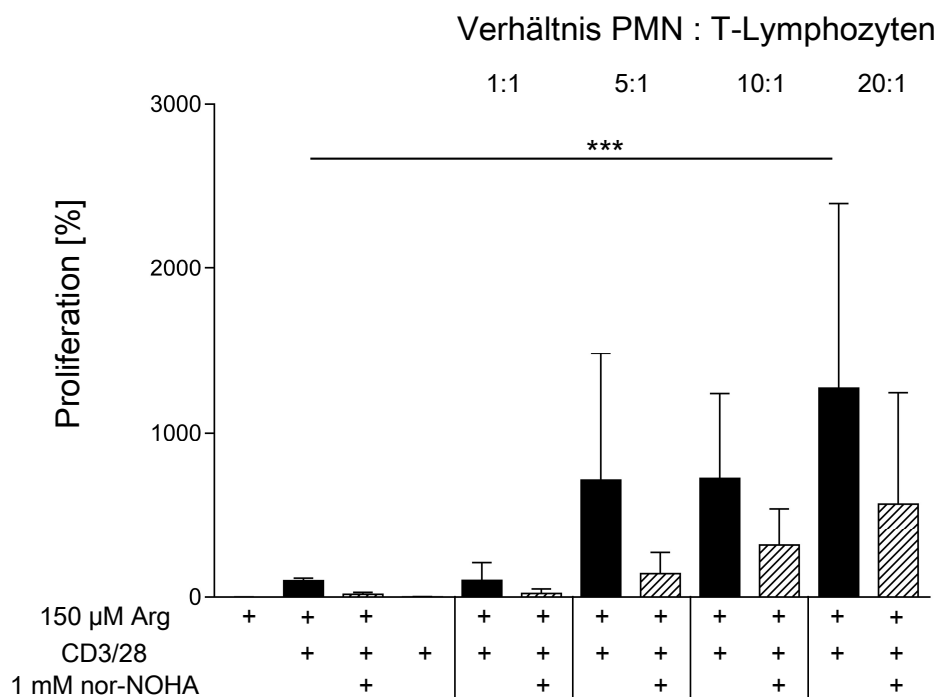


Abb. 24: Proliferation der T-Lymphozyten in Transwell-Kokultur mit PMN mit und ohne nor-NOHA: PMN und mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden in den Verhältnissen 1:1 bis 20:1 im selben Medium mit und ohne nor-NOHA für 48 Stunden im Transwell-System räumlich getrennt voneinander inkubiert. Die Proliferation wurde mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay evaluiert. Die Abbildung zeigt die, wie üblich normierten, Mittelwerte jeweils \pm der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Proliferation der T-Lymphozyten in den Kontrollbedingungen zeigte in der Transwell-Kultur ein ähnliches Bild, wie es in der direkten Kokultur schon gemessen werden konnte (vergleiche Abbildung 23). Ohne Aktivierung und nach Aktivierung in $-\text{Arg}$ -Medium zeigte sich keine Proliferation der T-Lymphozyten. Nach Aktivierung in $+\text{Arg}$ -Medium und Zugabe von nor-NOHA ließ sich mit 278 ± 121 cpm eine signifikant geringere Proliferation messen als nach Aktivierung in $+\text{Arg}$ -Medium ohne Zugabe von nor-NOHA mit 2883 ± 3078 cpm. Somit

4.2. Proliferation der T-Lymphozyten in Kokultur mit PMN

zeigt sich auch hier ein negativer Einfluss von nor-NOHA auf die Proliferation. Im Unterschied zu Abbildung 23 war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant. Insgesamt lag die Proliferation in der Transwell-Kokultur niedriger als in der direkten Kokultur. Hier lag sie nach Aktivierung in +Arg-Medium ohne nor-NOHA bei 13901 ± 6612 cpm und mit Zugabe von nor-NOHA bei 3668 ± 4142 cpm.

Verglichen mit den Medium-Bedingungen der Experimente mit PMN-Überstand wie zum Beispiel in Abbildung 12 zeigte sich nach Aktivierung ohne nor-NOHA eine ähnliche Proliferation wie in dieser Transwell-Kokultur. In Abbildung 12 proliferierten die T-Lymphozyten ohne nor-NOHA mit 4230 ± 3894 cpm. Nach Zugabe von nor-NOHA unterschied sie sich mit 3368 ± 297 cpm nicht signifikant von der Aktivierung ohne nor-NOHA. Der Unterschied beider beschriebenen Experimente liegt in der Kultivierungsdauer der T-Lymphozyten. In der Transwell-Kultur wurden die T-Lymphozyten direkt nach der Isolierung aktiviert und im Assay eingesetzt, wohingegen die T-Lymphozyten in Abbildung 12 während der 72 Stunden Inkubation der PMN im Inkubator kultiviert wurden.

In den PMN-Bedingungen zeigte sich in Abbildung 24 ein Bild, das weder zu den Beobachtungen aus den Experimenten der PMN-Überstände in Abbildung 12 noch zu der in Abbildung 23 gezeigten direkten Kokultur beider Zellpopulationen passte. Die Proliferation der T-Lymphozyten stieg ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 nach der Transwell-Kultivierung mit und ohne nor-NOHA kontinuierlich an. Nach Zugabe von nor-NOHA war dieser Anstieg jedoch nicht statistisch signifikant. Die Proliferation war nach Aktivierung in der Transwell-Kultur mit den PMN ohne nor-NOHA stets höher als mit Zugabe von nor-NOHA. Nach Transwell-Kultivierung sowie in den Medium-Bedingungen zeichnete sich eine geringere Proliferation nach Zugabe von nor-NOHA aus.

Maximal proliferierten die T-Lymphozyten im 20:1-Verhältnis ohne nor-NOHA mit 1274 ± 1121 % der konventionellen Aktivierung. Im 20:1-Verhältnis mit nor-NOHA erreichten die T-Lymphozyten 567 ± 680 % der Proliferation der Aktivierung in +Arg-Medium. Die T-Lymphozyten zeigten also in allen PMN-Bedingungen der Transwell-Kultur eine Hyperaktivierung ihrer Proliferation.

4.3. Aktivierung der T-Lymphozyten durch PMN

In den Kapiteln 4.1 und 4.2 wurde der Einfluss der PMN und des PMN-Überstandes auf die Proliferation der T-Lymphozyten analysiert. Neben der Proliferation sind auch andere Aspekte der T-Lymphozyten-Aktivierung für ihre Aufgaben im humanen Immunsystem wichtig. Nach den Untersuchungen zum Einfluss der PMN auf die Proliferation unter pharmakologischer Arginase 1-Inhibition wurde deshalb in diesem Kapitel die immunologische Aktivität untersucht. Dazu gehört neben der Interferon- γ -Sekretion und der Expression von Oberflächenproteinen, welche die Aktivierung oder Erschöpfung der T-Lymphozyten anzeigen, auch die Zytotoxizität der T-Lymphozyten.

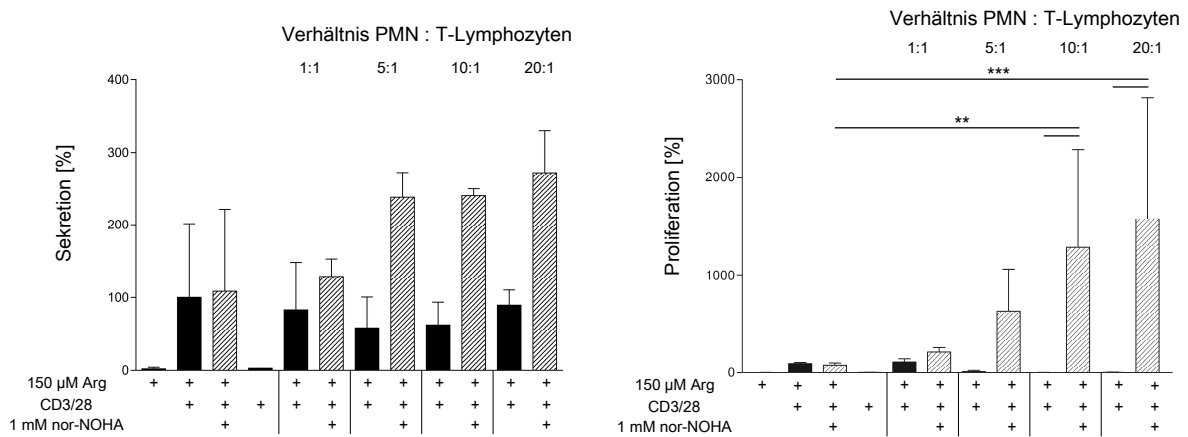
4.3.1. Steigerung der Interferon- γ -Sekretion

Interferon- γ ist eines der immunstimulierenden Zytokine, welches durch aktivierte T-Lymphozyten sezerniert wird [71]. Zur Evaluation des Einflusses des PMN-Überstandes auf die Interferon- γ -Sekretion wurde mittels ELISA die Interferon- γ -Konzentration im Medium nach Inkubation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA bestimmt. Die PMN wurden dazu in den, in Kapitel 4.1.2 beschriebenen, PMN:T-Verhältnissen von 1:1 bis 20:1 für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Anschließend wurden mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten in den PMN-Überständen für 48 Stunden inkubiert. Außerdem wurden die aktivierten T-Lymphozyten in den vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen inkubiert. Als Proben für den ELISA wurden die Überstände nach der 48-stündigen Inkubation verwendet. Die Ergebnisse des ELISA sind in Abbildung 25a dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Interferon- γ -Konzentration in den Proben abzulesen. Im Vergleich mit der Konzentration im Rahmen der Aktivierung in +Arg-Medium lässt sich die veränderte Sekretion durch die PMN-Bedingungen erkennen.

Einfarbige Balken zeigen wie in den Proliferations-Assays Bedingungen ohne nor-NOHA und diagonal gestreifte Balken Bedingungen mit nor-NOHA. Der [^3H]-Thymidin-Assay in Abbildung 25b zeigt die Proliferation der T-Lymphozyten in den selben PMN-Bedingungen. Das Ergebnis dieses Proliferations-Assays stimmt mit den schon in Abbildung 12 beschriebenen Beobachtungen überein. Nach Inkubation in PMN-Überstand ohne nor-NOHA ist die T-Lymphozyten-Proliferation supprimiert, wohingegen sie nach Aktivierung in PMN-Überständen mit nor-NOHA hyperaktiviert ist.

Ohne Aktivierung und nach Aktivierung in –Arg-Medium ließ sich nahezu kein Interferon- γ im Medium messen. Nach Aktivierung in +Arg-Medium zeigte sich eine Interferon- γ -Konzentration von 793 ± 804 pg/ml ohne Zugabe von nor-NOHA und von 861 ± 895 pg/ml mit Zugabe von nor-NOHA. Es gab somit keinen signifikanten Einfluss von nor-NOHA auf

die Interferon- γ -Sekretion konventionell aktivierter T-Lymphozyten. Diese Beobachtungen in den Medium-Bedingungen passen zu der in Abbildung 25b dargestellten Proliferation in den gleichen Bedingungen.



(a) ELISA: Interferon- γ -Sekretion der aktivierten T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA

(b) [3 H]-Thymidin-Assay: Proliferation der aktivierten T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA

Abb. 25: Vergleich der Interferon- γ -Sekretion und -Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Im Überstand davon wurde mittels ELISA die Interferon- γ -Konzentration und mittels [3 H]-Thymidin-Assay die Proliferation gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der normierten Konzentrationen von zwei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen in Prozent. Der Mittelwert der absoluten *counts per minute* der zweiten Kontrollbedingung (+Arg-Medium mit aktivierten T-Lymphozyten ohne nor-NOHA) wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Bedingungen zu dieser Kontrollbedingung normiert.

Nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA ließ sich in allen PMN:T-Verhältnissen ein Rückgang der Interferon- γ -Konzentration im Vergleich zur Aktivierung ohne PMN-Überstand feststellen. Das Minimum fand sich mit 464 ± 333 pg/ml im 5:1-Verhältnis. Jedoch war die Abnahme in keinem der Verhältnisse statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu stieg die Interferon- γ -Konzentration nach Inkubation der T-Lymphozyten in den PMN-Überständen mit nor-NOHA ab einem PMN:T-Verhältnis von 5:1 deutlich an. Dabei ließ sich ein kontinuierlicher Anstieg von der 1:1- bis zur 20:1-Bedingung erkennen. So fand sich die maximale Interferon- γ -Konzentration von 2165 ± 452 pg/ml im Überstand des 20:1-Verhältnisses mit nor-NOHA. Das entsprach 273 ± 57 % der Konzentration nach konventioneller Aktivierung. Der Anstieg der Interferon- γ -Konzentration nach Inkubation in den PMN-Überständen mit nor-NOHA war aber bei insgesamt zwei Experimenten statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass T-Lymphozyten, die in ihrer Proliferation in Abbildung 25b supprimiert sind, auch eine geringe Interferon- γ -Sekretion in Abbildung 25a auf-

4. Ergebnisse

weisen. Im Gegensatz dazu findet sich bei hyperaktivierter Proliferation der T-Lymphozyten ein Anstieg der Interferon- γ -Sekretion nach Aktivierung in PMN-Überständen mit nor-NOHA. Somit korreliert der Anstieg der Proliferation mit einer Steigerung der Interferon- γ -Sekretion.

4.3.2. Expression von Aktivierungs- und Oberflächenproteinen

Die Oberflächenproteine von T-Lymphozyten sind zentral in Aktivierungs- beziehungsweise Inhibierungsprozesse der adaptiven Immunantwort involviert und geben Auskunft über sowohl die Aktivität als auch die Erschöpfung der Zelle. In der Durchflusszytometrie kann die Expression verschiedener Oberflächenproteine der T-Lymphozyten nach Inkubation in den verschiedenen PMN-Überständen gemessen werden. Die PMN wurden dafür im PMN:T-Verhältnis von 10:1 mit und ohne nor-NOHA für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und in den PMN-Überständen und als Kontrolle in +Arg-Medium jeweils mit und ohne nor-NOHA für 1, 2 und 3 Tage aktiviert.

Für die Evaluation der Oberflächenproteine wurde deren Expression direkt vor und nach der Inkubation in PMN-Überstand in der Durchflusszytometrie gemessen. Die T-Lymphozyten wurden dafür mit den Antikörpern in Einfachfärbung markiert. Um unspezifische Antikörperbindung beziehungsweise Fluoreszenzemissionen zu detektieren, wurden für jeden verwendeten Antikörper T-Lymphozyten parallel mit der Isotyp-Kontrolle des Antikörpers gefärbt und in der Durchflusszytometrie als Negativkontrollen gemessen. Mit Hilfe der Isotyp-Kontrollen wurden die Quadrantengrenzen in der durchflusszytometrischen Auswertung für die zugehörigen Antikörper festgelegt. So wurde der Nullpunkt jedes Kanals nach der Isotyp-Kontrolle mit einer Fluoreszenzpositivität der T-Lymphozyten von $\leq 1\%$ festgelegt.

In Abbildung 26 ist die Entwicklung der Expressionen der Oberflächenproteine CD25, CD69, CD28, CD57, PD-1, TIGIT, CTLA-4, CD160, LAG-3 und TIM-3 dargestellt. Gezeigt ist der Verlauf der Inkubation der T-Lymphozyten im PMN-Überstand und im +Arg-Medium. In den Diagrammen sind die Inkubationstage durch senkrechte Linien in der darunter liegenden Tabelle getrennt. Im ersten Balken lässt sich die Expression des Oberflächenproteins direkt vor der Inkubation erkennen. Dieser Balken ist mit „Tag 0“ gekennzeichnet. Die anderen Balken sind nach den drei Inkubationszeiten beschriftet. Schwarze Balken stellen die Expression nach Inkubation in +Arg-Medium dar und blaue Balken die nach Inkubation in PMN-Überständen. Bedingungen ohne nor-NOHA werden durch unifarbene Balken und Bedingungen mit nor-NOHA durch diagonal gestreifte Balken dargestellt. Die Expression der Oberflächenproteine ist als Prozent der positiven Zellen auf der Y-Achse aufgetragen. Im Gegensatz zu den Proliferations-Experimenten ist hier der absolut gemessene Anteil der positiven Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent dargestellt. Zudem wurden die drei Versuche nicht normiert.

Abbildung 26a: CD25-Expression

CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors. Es wird bei Aktivierung induziert und vermittelt durch Bindung von auto- und parakrin sezerniertem IL-2 physiologisch eine sich verstärkende T-Lymphozyten-Antwort. Die Expression von IL-2 ist abhängig von extrazellulärem Arginin [25]. Aus diesem Grund zeigten die T-Lymphozyten vor der Aktivierung und Inkubation keine CD25-Expression. Nach der Aktivierung stieg sie sowohl in +Arg-Medium als auch in den PMN-Überständen an. Dabei ließ sich im zeitlichen Verlauf der Inkubation in +Arg-Medium ein kontinuierlicher Anstieg der CD25-positiven Zellen bis zu $80 \pm 10\%$ am dritten Tag erkennen. Es gab dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen Inkubation mit und ohne nor-NOHA. Die Zugabe des Inhibitors hat demnach keinen Einfluss auf die Expression. Nach Inkubation im PMN-Überstand ohne nor-NOHA ließ sich zu allen Inkubationszeitpunkten eine geringere Expression erkennen im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Maximal wurde sie am zweiten Tag der Inkubation mit nur $37 \pm 13\%$. Die T-Lymphozyten, die im PMN-Überstand mit nor-NOHA aktiviert wurden, ließen schon am ersten Tag der Inkubation einen starken Anstieg der Expression erkennen. Das Maximum wurde auch hier nach zwei Tagen Inkubation mit $87 \pm 1\%$ erreicht. Nach Aktivierung in PMN-Überstand zeigte sich also mit und ohne der Zugabe von nor-NOHA ein Anstieg der Fraktion CD25-positiver Zellen vom ersten auf den zweiten Inkubationstag, gefolgt von einem leichten Rückgang vom zweiten zum dritten Inkubationstag. Nach Inkubation in +Arg-Medium war dagegen ein kontinuierlicher Anstieg der CD25-positiven Zellen zu sehen. Somit zeigten T-Lymphozyten, die in ihrer Proliferation aktiviert wurden (vergleiche Abbildung 12), eine vermehrte Expression von CD25 und eine geringere, wenn ihre Proliferation supprimiert wurde.

Abbildung 26b: CD69-Expression

Neben CD25 ist auch CD69 ein Oberflächenprotein, das von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Im Gegensatz zu CD25 ist CD69 unabhängig von der Arginin-Konzentration im Medium [25]. Von nicht aktivierten T-Lymphozyten wurden beide Oberflächenproteine nicht exprimiert. Nach der Aktivierung und im zeitlichen Verlauf der Inkubation stellten sich die T-Lymphozyten sowohl nach Aktivierung in +Arg-Medium als auch in PMN-Überstand als CD69-positiv dar. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den +Arg-Medium-Bedingungen oder den PMN-Überständen. Auch die Zugabe von nor-NOHA sowie die verschiedenen Inkubationszeitpunkten veränderten die Expression nicht signifikant. Der Anteil der CD69-positiven T-Lymphozyten variierte zwischen maximal $91 \pm 4\%$ an Tag 1 in +Arg-Medium ohne nor-NOHA und minimal $60 \pm 17\%$ an Tag 3 in PMN-Überstand mit nor-NOHA.

Abbildung 26c: CD28-Expression

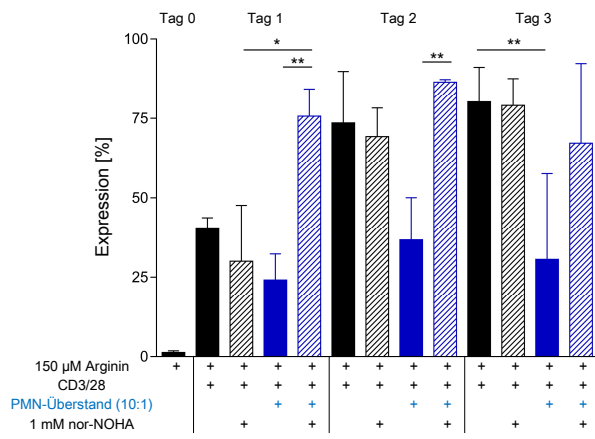
CD28 ist ein konstitutiv exprimiertes kostimulierendes Protein auf T-Lymphozyten [14]. An Tag 0 ließ sich daher eine hohe CD28-Expression der T-Lymphozyten von $82 \pm 5\%$ erkennen. Durch die Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads sank die Expression am ersten Tag der Inkubation in allen Bedingungen stark ab. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA war dabei die höchste Expression von $20 \pm 10\%$ zu erkennen, während sie im +Arg-Medium nur bei $2 \pm 1\%$ lag. Am zweiten Tag der Inkubation war ein leichter Anstieg nach Aktivierung in +Arg-Medium sowie nach Aktivierung in den PMN-Überständen ohne nor-NOHA zu sehen. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA fiel im Gegensatz dazu ein starker Anstieg auf $72 \pm 16\%$ auf. Am dritten Tag der Inkubation stieg der Anteil an CD28-positiven T-Lymphozyten auch nach Inkubation in +Arg-Medium ohne nor-NOHA auf $72 \pm 12\%$ und auf $65 \pm 19\%$ mit nor-NOHA an. Die Expression näherte sich damit jener nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA mit $82 \pm 4\%$ an. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA und in +Arg-Medium zeigte sich somit ein kontinuierlicher Anstieg über die gesamte Inkubationszeit. Der Unterschied lag darin, dass der Hauptanstieg nach Inkubation in +Arg-Medium vom zweiten auf den dritten Inkubationstag erfolgte und nach Inkubation in PMN-Überstand mit nor-NOHA bereits vom ersten auf den zweiten Inkubationstag. Der Anteil an CD28-positiven T-Lymphozyten war nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA zu allen Inkubationszeitpunkten am höchsten. In PMN-Überstand ohne nor-NOHA war er dagegen zu allen Inkubationszeitpunkten gering. Somit korrelierte neben CD25 auch die Expression von CD28 mit der in Abbildung 12 beobachteten Hyperaktivierung und Suppression der Proliferation durch den PMN-Überstand.

Abbildung 26d: CD57-Expression

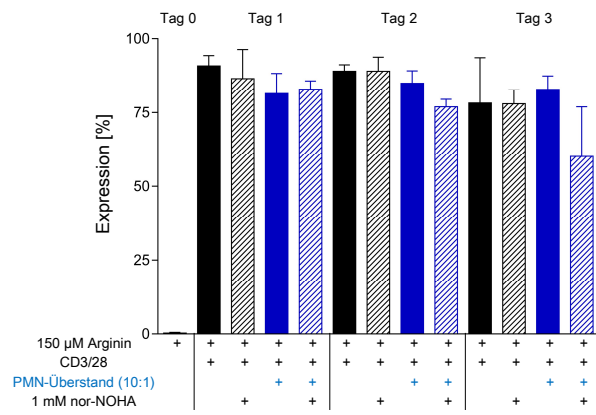
Das Oberflächenprotein CD57 gilt als Indikator für schlecht proliferierende und ruhende T-Lymphozyten, die dafür ein hohes zytotoxisches Potential aufweisen [40]. Der Anteil an CD57-positiven T-Lymphozyten lag sowohl vor als auch über den gesamten Inkubationszeitraum nach Inkubation in +Arg-Medium oder PMN-Überstand auf einem niedrigen Niveau zwischen $16 \pm 3\%$ an Tag 1 in +Arg-Medium ohne nor-NOHA und $26 \pm 2\%$ an Tag 3 in der PMN-Bedingung mit nor-NOHA. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA war ein leichter Anstieg im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Der Anteil an CD57-positiven T-Lymphozyten stieg hier von $22 \pm 3\%$ am ersten Tag auf $26 \pm 2\%$ am dritten Tag an. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen (die Zugabe von nor-NOHA und die Inkubationszeitpunkte) waren jedoch nicht statistisch signifikant.

4.3. Aktivierung der T-Lymphozyten durch PMN

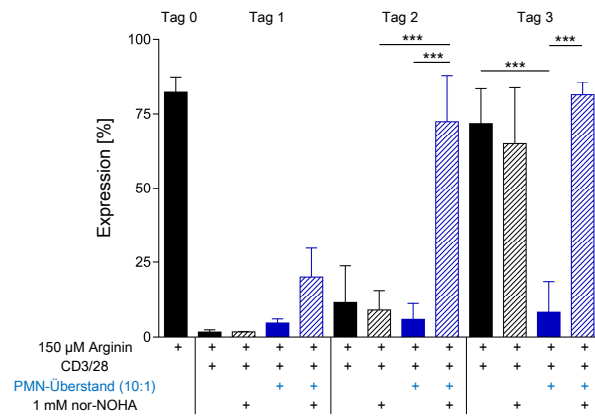
(a) CD25-Expression



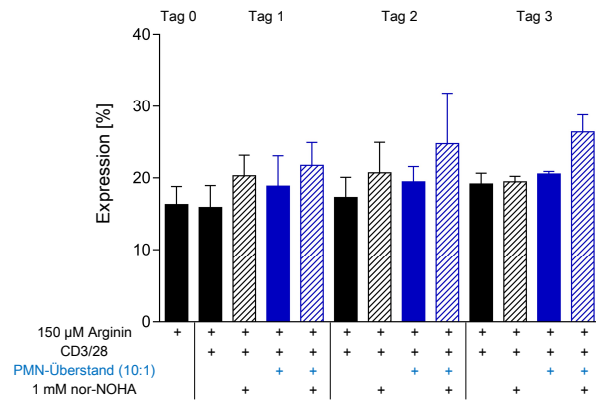
(b) CD69-Expression



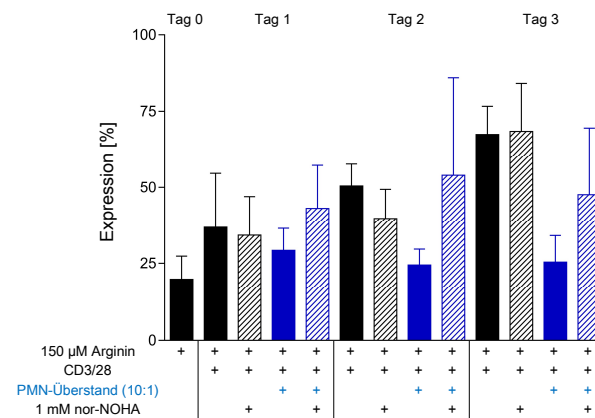
(c) CD28-Expression



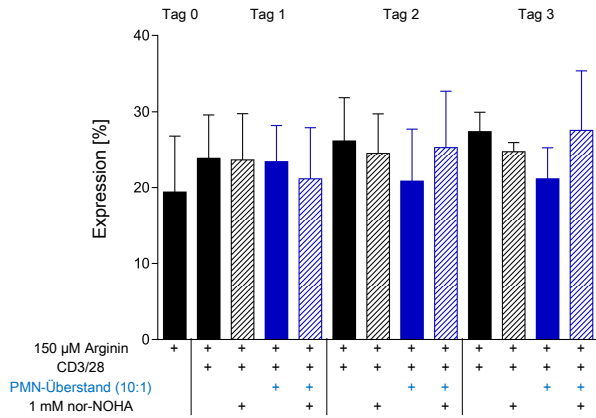
(d) CD57-Expression



(e) PD-1-Expression



(f) TIGIT-Expression



4. Ergebnisse

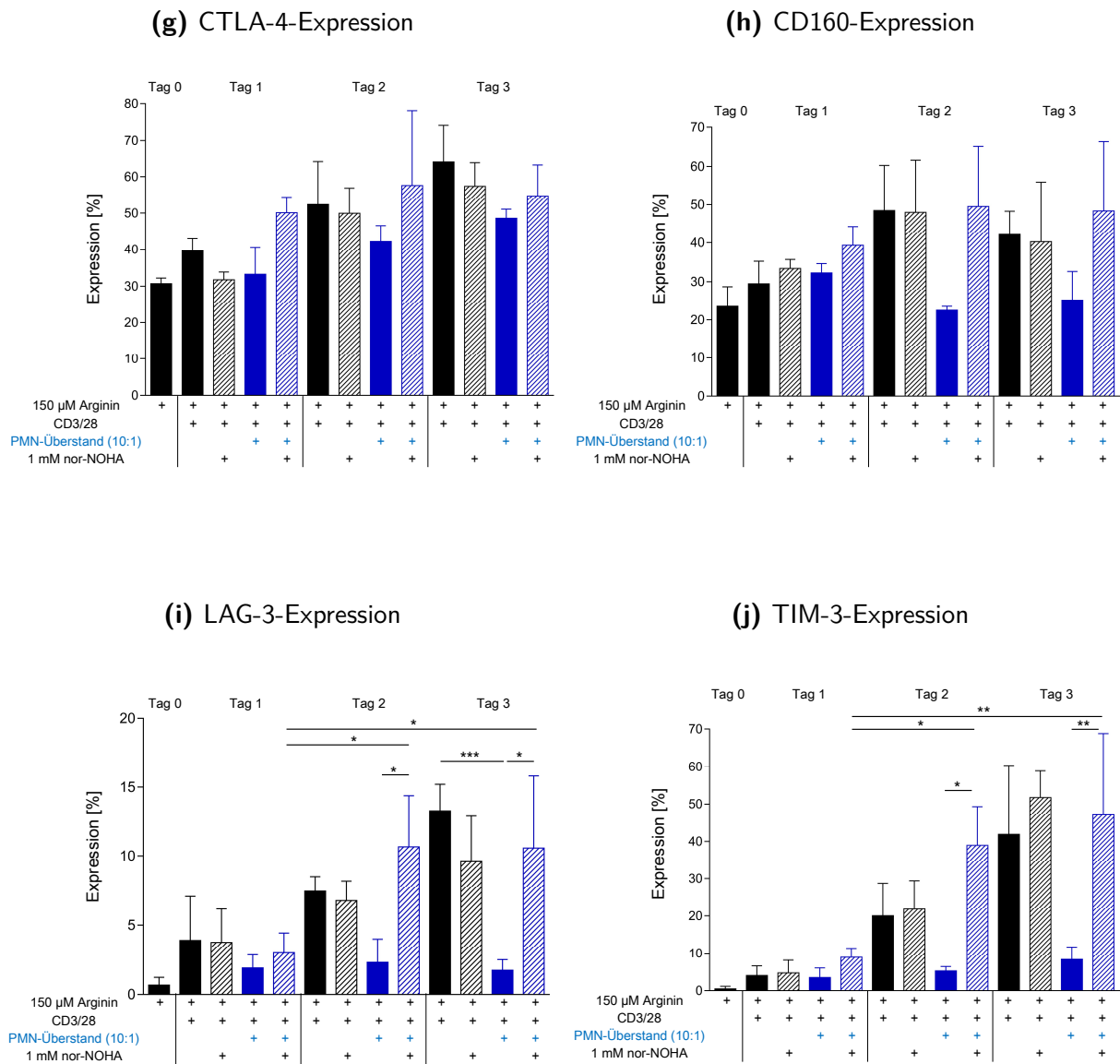


Abb. 26: Expression von Oberflächenproteinen der T-Lymphozyten: Mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierte T-Lymphozyten wurden in PMN-Überstand (Verhältnis 10:1) oder in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA für 1, 2 und 3 Tage inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde die Expression der Oberflächenproteine mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zu sehen sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die jeweiligen Standardabweichungen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen, die das angegebene Oberflächenprotein exprimieren.

Abbildung 26e: PD-1-Expression

Die Expression des sogenannten „programmed cell death protein 1“ lässt je nach Dauer der Expression verschiedene Schlüsse zu. PD-1 wird in aktivierten T-Lymphozyten vermehrt expri-

miert. Durch Interaktion mit dem PD-1-Liganden wird die Aktivierung der T-Lymphozyten und deren Proliferation supprimiert [30]. Bei anhaltender Aktivierung steht die Abnahme der Expression jedoch für die beginnende Erschöpfung der T-Lymphozyten [26]. So zeigte sich vor der Aktivierung nur ein Anteil von $20 \pm 8\%$ PD-1-positiven T-Lymphozyten. Nach der Aktivierung und Inkubation in +Arg-Medium ließ sich über den gesamten Inkubationszeitraum ein kontinuierlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter, Anstieg erkennen. Dabei lag die maximale Expression am dritten Tag bei $69 \pm 16\%$ nach Zugabe von nor-NOHA zu +Arg-Medium. Der Anteil an PD-1-positiven T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ ebenso einen statistisch nicht signifikanten Anstieg am ersten und zweiten Tag der Inkubation erkennen. Allerdings sank der Anteil am dritten Tag der Inkubation wieder ab. Somit zeigte sich hier eine maximale Expression am zweiten Tag der Inkubation mit $54 \pm 32\%$. Im Gegensatz dazu stand der Anteil an PD-1-positiven T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA. Hier zeigte sich im Verlauf der Inkubation keine signifikante Änderung. Er schwankte lediglich zwischen maximal $29 \pm 7\%$ am ersten Tag der Inkubation und minimal $24 \pm 5\%$ am zweiten Tag. Es ließen sich also zwischen der konventionellen Aktivierung und der Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA keine signifikanten Unterschiede in der Expression von PD-1 erkennen.

Abbildung 26f: TIGIT-Expression

Das Akronym TIGIT steht für *t cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*. Durch immunregulatorische dendritische Zellen können T-Lymphozyten über TIGIT in ihrer Aktivität supprimiert werden [28]. Die TIGIT-Expression der T-Lymphozyten ließ in allen Bedingungen über den gesamten Inkubationszeitraum keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen. Sie lag zwischen minimal $19 \pm 7\%$ vor der Inkubation und maximal $28 \pm 8\%$ am dritten Tag in der PMN-Bedingung mit nor-NOHA.

Abbildung 26g: CTLA-4-Expression

CTLA-4 ist der Gegenspieler des kostimulierenden Proteins CD28. Es bindet an die selben Rezeptoren. Statt dem stimulierenden Signal wird durch CTLA-4 jedoch ein hemmendes Signal ausgelöst [26]. Vor der Aktivierung stellte sich ein Anteil von $31 \pm 2\%$ der T-Lymphozyten als CTLA-4-positiv dar. Im Verlauf der Inkubation zeigte sich sowohl in +Arg-Medium als auch in den PMN-Überständen ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils an CTLA-4 positiven T-Lymphozyten. Dabei ließ sich zwischen den T-Lymphozyten in +Arg-Medium und denen in PMN-Überstand kein signifikanter Unterschied erkennen. Auch die Zugabe von nor-NOHA bewirkte keinen signifikanten Unterschied des Anteils an CTLA-4-positiven T-Lymphozyten. Der größte positive Anteil mit $64 \pm 10\%$ konnte in den T-Lymphozyten beobachtet werden, die drei Tage in +Arg-Medium ohne nor-NOHA inkubiert wurden.

Abbildung 26h: CD160-Expression

Bei dem Oberflächenprotein CD160 handelt es sich ebenfalls um einen inhibitorischen Rezeptor der T-Lymphozyten. Die Expression von CD160 wird wie bei PD-1, TIGIT und CTLA-4 durch die Aktivierung der T-Lymphozyten gesteigert. Bei dauerhafter Aktivierung zeigt das Oberflächenprotein die Erschöpfung der T-Lymphozyten an [39]. Daher lag der Anteil der CD160-positiven T-Lymphozyten vor der Aktivierung bei nur $24 \pm 5\%$. Durch die Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand ohne nor-NOHA änderte sich dieser Anteil nicht signifikant im zeitlichen Verlauf der Inkubation. Nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA sowie in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ sich eine Zunahme des CD160-positiven Anteils der T-Lymphozyten erkennen. Maximal wurde der Anteil nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA nach zwei Tagen Inkubation mit $50 \pm 16\%$. Der Anteil an CD160-positiven T-Lymphozyten unterschied sich in +Arg-Medium und PMN-Überstand mit nor-NOHA nicht signifikant voneinander.

Abbildung 26i: LAG-3-Expression

Das sogenannte *lymphocyte-activation gene 3* ist ein weiteres inhibitorisches Oberflächenprotein der T-Lymphozyten. Auch LAG-3 wird in aktivierten T-Lymphozyten vermehrt exprimiert und ist bei prolongierter Aktivierung ein Hinweis auf die Erschöpfung des T-Lymphozyten [39]. Deshalb stellten sich die T-Lymphozyten vor der Aktivierung nur zu $1 \pm 1\%$ LAG-3-positiv dar. Nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA war keine relevante Veränderung des Anteils an LAG-3-positiven T-Lymphozyten messbar. Ganz im Gegenteil dazu ließ sich nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA sowie in PMN-Überstand mit nor-NOHA ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils an LAG-3-positiven T-Lymphozyten erkennen. Zwischen diesen T-Lymphozyten gab es keinen signifikanten Unterschied, wie auch schon bei CD160 beobachtet wurde. Das Maximum an positiven T-Lymphozyten fand sich mit $13 \pm 2\%$ nach Aktivierung in +Arg-Medium ohne die Zugabe von nor-NOHA nach drei Tagen Inkubation. Dieser Anstieg ist statistisch signifikant, dennoch ist der Anteil an LAG-3-positiven T-Lymphozyten auch nach drei Tagen Inkubation gering.

Abbildung 26j: TIM-3-Expression

Ein weiteres inhibitorisches Oberflächenprotein ist das *t cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*. Auch TIM-3 wird wie PD-1, TIGIT, CD160 und LAG-3 durch Aktivierung auf T-Lymphozyten exprimiert und dient als Hinweis auf die Erschöpfung der T-Lymphozyten [39]. Deshalb ließ sich hier ebenso nur ein geringer Anteil von $1 \pm 1\%$ TIM-3-positiver T-Lymphozyten vor der Aktivierung der T-Lymphozyten darstellen. Genau wie bei LAG-3 änderte sich nach Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand ohne nor-NOHA der Anteil an positiven T-Lymphozyten im Verlauf der Inkubation nicht signifikant.

Nach Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA und auch in PMN-Überstand mit nor-NOHA zeigte sich der Anteil an TIM-3-positiven T-Lymphozyten kontinuierlich ansteigend im zeitlichen Verlauf. Einen Unterschied der Anteile in den +Arg-Medien und im PMN-Überstand mit nor-NOHA konnte nicht beobachtet werden. Der maximale Anteil an TIM-3-positiven T-Lymphozyten lag bei $52 \pm 7\%$ nach Aktivierung in +Arg-Medium mit nor-NOHA nach drei Tagen Inkubation.

Nach Betrachtung aller gemessenen Oberflächenproteine lässt sich folgendes zusammenfassen:

- Hyperstimulierte T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA zeigten eine Arginin-abhängige Aktivierung (CD25 und CD28), während suppressierte T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA keine Arginin-abhängige Aktivierung zeigten.
- In der Arginin-unabhängigen Aktivierung (CD69) sowie in der Seneszenz (CD57) unterscheiden sich die T-Lymphozyten in den verschiedenen Bedingungen und Aktivierungen nicht.
- Die Aktivierung in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA sowie die konventionelle Aktivierung führte nicht zu einer veränderten Expression der Oberflächenmarker, die eine Erschöpfung der T-Lymphozyten anzeigen (PD-1, TIGIT, CTLA-4, CD160).
- T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA zeigten eine verminderte Expression von LAG-3 und TIM-3 im Vergleich zur Zugabe von nor-NOHA und der konventionellen Aktivierung.

4.3.3. Zytotoxizität

Neben den Oberflächenproteinen und der Sekretion von Interferon- γ ist die Zytotoxizität eine der wichtigsten Aufgaben der T-Lymphozyten, vor allem der CD8⁺-T-Lymphozyten, im humanen Immunsystem. Mittels des sogenannten Zytotoxizitäts-Assays lässt sich diese quantitativ evaluieren. Die T-Lymphozyten wurden dafür zunächst mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert, wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben. Die transduzierten T-Lymphozyten konnten so mit Hilfe der K562-A2-Zellen wöchentlich restimuliert und expandiert werden. Die K562-A2-Zellen wurden dafür mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und anschließend bestrahlt. Sie exprimieren das *human leukocyte antigen A2* (HLA-A2), das von den transduzierten T-Lymphozyten erkannt werden kann. Die Frequenz der T-Lymphozyten wurde dabei wöchentlich mittels Durchflusszytometrie mit anti-CD3 Antikörper-Färbung überprüft. Die Frequenz der erfolgreich transduzierten T-Lymphozyten wurde mit anti-V β -3 Antikörper-Färbung kontrolliert. Der V β -3-Antikörper markiert dabei die β -Kette des transduzierten p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen T-Zell-Rezeptors. Ein repräsentatives Ergebnis der wöchentlichen Überprüfung ist im Anhang in Abbildung 39 auf Seite 178 dargestellt. Für die Experimente wurden Zellpopulationen mit einem Anteil von mindestens 79 % CD3- und V β -3-positiven transduzierten T-Lymphozyten verwendet. Die zellspezifische Zytotoxizität der transduzierten T-Lymphozyten wurde im Folgenden mit Hilfe von HLA-A2-positiven SAOS-2-Osteosarkomzellen analysiert.

4.3.3.1. Proliferation der transduzierten T-Lymphozyten

Vor der Evaluation der Zytotoxizität der transduzierten T-Lymphozyten wurde überprüft, ob sich diese in ihrer Proliferation genauso verhalten wie die polyklonal mittels anti-CD3/anti-CD8-gekoppelten Beads aktivierten physiologischen T-Lymphozyten. Dazu wurden die PMN gemäß Kapitel 4.1.2 in den PMN:T-Verhältnissen 1:1 bis 20:1 mit und ohne nor-NOHA für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die transduzierten T-Lymphozyten Antigen-spezifisch mit den K562-A2-Zellen (mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und bestrahlt) und im PMN-Überstand für weitere 48 Stunden koinkubiert. Zusätzlich wurden die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen angesetzt. Die Proliferation der transduzierten T-Lymphozyten wurde im [³H]-Thymidin-Assay gemessen, dessen Ergebnisse in Abbildung 27 dargestellt sind.

Die Proliferation in den Medium-Bedingungen wich hier von der in Abbildung 12 dargestellten Proliferation der polyklonal mittels anti-CD3/anti-CD8-gekoppelten Beads aktivierten physiologischen T-Lymphozyten ab. Ohne Aktivierung zeigten die T-Lymphozyten in +Arg-Medium keine Proliferation. Nach Aktivierung unterschied sich die Proliferation in +Arg-Medium mit und ohne Zugabe von nor-NOHA sowie in –Arg-Medium nicht signifikant voneinander. Somit hatte auch in den transduzierten T-Lymphozyten die Zugabe von nor-NOHA keinen Effekt auf

die Proliferation. Interessanterweise hatte aber auch das Fehlen von Arginin im Medium keinen negativen Einfluss auf die Proliferation. Bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* der Medium-Bedingungen zeigte sich nach Aktivierung ohne nor-NOHA mit 12372 ± 5665 cpm eine höhere Proliferation der transduzierten, Antigen-spezifisch aktivierten T-Lymphozyten als in den mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten aus Abbildung 12, die nur mit 4230 ± 3894 cpm proliferierten. Auch nach Aktivierung mit nor-NOHA in +Arg-Medium sowie in –Arg-Medium zeigten die transduzierten T-Lymphozyten mit 7842 ± 3449 cpm in +Arg-Medium mit nor-NOHA und mit 5977 ± 4220 cpm in –Arg-Medium höhere *counts per minute* als die polyklonal aktivierten physiologischen T-Lymphozyten. Besonders hoch war die Diskrepanz in der –Arg-Medium-Bedingung. Hier lag sie nach Aktivierung der T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD8 gekoppelten Beads bei nur 29 ± 12 cpm.

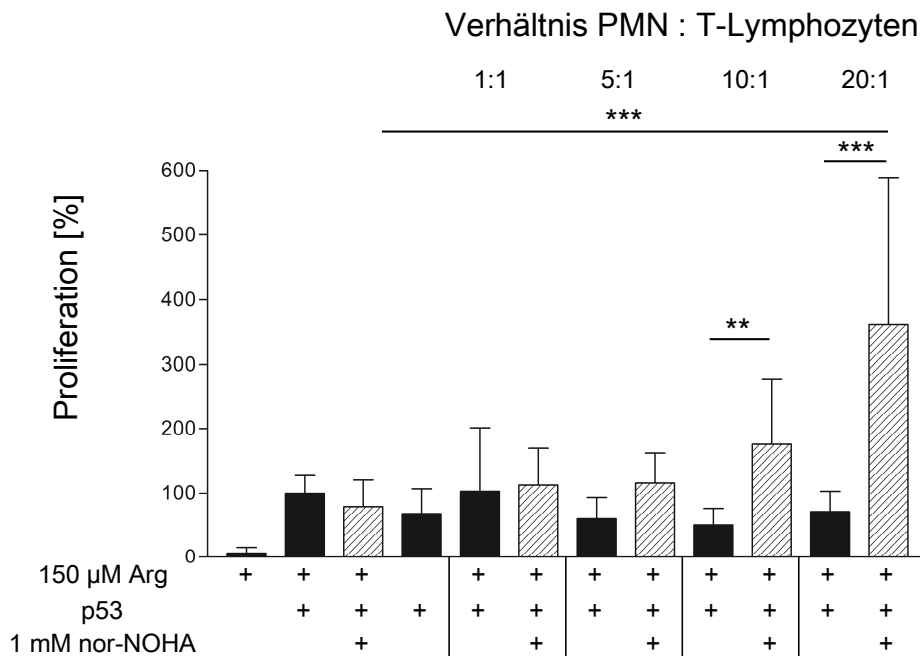


Abb. 27: Antigen-spezifische Proliferation der mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten: K562-A2-Zellen wurden mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und bestrahlt. Die mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten wurden mit den K562-A2-Zellen Antigen-spezifisch aktiviert und anschließend in PMN-Überstand mit und ohne nor-NOHA für 48 Stunden koinkubiert. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde mittels [³H]-Thymidin-Assay evaluiert. Auch hier wurde die Proliferation nach Aktivierung in +Arg-Medium ohne Zugabe von nor-NOHA als 100 % normiert und die übrigen Aktivierungen zu dieser in Relation gesetzt. Zu sehen ist die Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten mit drei individuellen transduzierten T-Lymphozyten-Populationen in Prozent.

Nach Aktivierung in PMN-Überstand ohne nor-NOHA zeigte sich in allen PMN:T-Verhältnissen eine leicht niedrigere Proliferation verglichen mit der Antigen-spezifischen Aktivierung in

4. Ergebnisse

+Arg-Medium. Diese Abnahme war allerdings statistisch nicht signifikant. Es war also im Gegensatz zu den polyklonal mittels anti-CD3/anti-CD8-gekoppelten Beads aktivierten physiologischen T-Lymphozyten in Abbildung 12 keine Suppression der Proliferation zu sehen. Diese Beobachtung passt zu der bestehenden Proliferation in –Arg-Medium, in der auch keine Suppression der Proliferation durch Arginin-Mangel zu erkennen war.

Die Proliferation nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ im Gegensatz dazu einen kontinuierlichen Anstieg im Vergleich zur Aktivierung ohne PMN-Überstand erkennen. Diese Entwicklung ähnelt der, die in Abbildung 12 beobachtet werden konnten. Das Maximum wurde im PMN:T-Verhältnis von 20:1 mit $211 \pm 70\%$ der Aktivierung in +Arg-Medium erreicht. Es war demnach eine Aktivierung der Proliferation durch den PMN-Überstand mit nor-NOHA zu sehen. Diese war jedoch deutlich geringer als in den polyklonal aktivierten physiologischen T-Lymphozyten, die maximal mit $1082 \pm 833\%$ der konventionellen Aktivierung proliferierten. Allerdings fiel bei Betrachtung der absoluten *counts per minute* dieser Bedingung auf, dass die transduzierten T-Lymphozyten mit 28327 ± 16094 cpm kaum weniger proliferierten als die polyklonal aktivierten physiologischen T-Lymphozyten aus Abbildung 12 (31134 ± 32328 cpm). Somit lag der Unterschied der relativen Aktivierung der Proliferation an der hohen Ausgangsproliferation der transduzierten T-Lymphozyten, die in den Medium-Bedingungen erkennbar war.

4.3.3.2. Zytotoxizität der T-Lymphozyten

Im [³H]-Thymidin-Assay in Abbildung 27 konnte eine Hyperaktivierung der Proliferation der transduzierten T-Lymphozyten beobachtet werden. Somit verhalten sie sich vergleichbar zu den polyklonal mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten physiologischen T-Lymphozyten in Abbildung 12. Die Zytotoxizität wurde anhand des Überlebens von SAOS-2-Zellen gemessen. Diese sind HLA-A2-positive immortalisierte Osteosarkom-Zellen, die adhärent im Well wachsen. Sie exprimieren aufgrund einer homozygoten p53-Deletion endogen kein p53.

Zunächst wurden die PMN, wie für die [³H]-Thymidin-Assays, für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Dabei wurde die dreifache Konzentration der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Verhältnisse verwendet, da für den Zytotoxizitäts-Assay auch die dreifache Konzentration an T-Lymphozyten eingesetzt wurde. So ergaben sich für die PMN:T-Verhältnisse 5:1 bis 20:1 eine Konzentration der PMN von $3 \cdot 10^6 - 12 \cdot 10^6$ Zellen/ml und für die T-Lymphozyten von $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Zudem wurden die vier Medium-Bedingungen nach Kapitel 4.1.1 angesetzt. Die transduzierten T-Lymphozyten wurden mit K562-A2-Zellen (mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und bestrahlt) Antigen-spezifisch aktiviert und für 48 Stunden in den Medien oder PMN-Überständen mit und ohne nor-NOHA inkubiert.

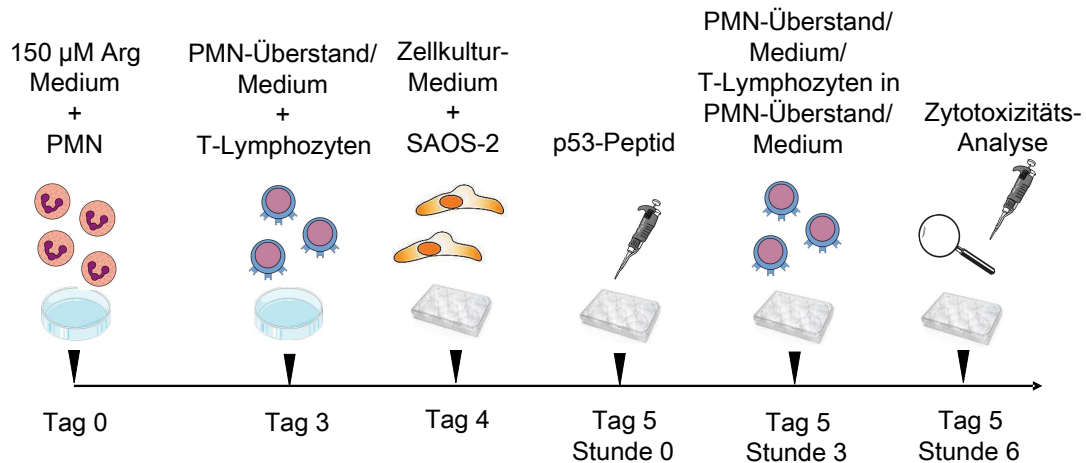


Abb. 28: Experimenteller Aufbau des Zytotoxizitäts-Assays: PMN wurden mit und ohne nor-NOHA für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Antigen-spezifisch aktivierte T-Lymphozyten in PMN-Überstand oder in Medium für 48 Stunden inkubiert. Zur Aktivierung wurden K562-A2-Zellen mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen, bestrahlt und im Verhältnis 1:2 mit den T-Lymphozyten inkubiert. Die HLA-A2-positiven SAOS-2-Zellen wurden in Zellkulturmedium in 24-Well-Platten vorgelegt. Die adhären wachsenden SAOS-2-Zellen wurden mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Überstände, Medien sowie T-Lymphozyten in Überständen oder Medien auf den SAOS-2-Zellen inkubiert. Beendet wurde die Inkubation bei vollständigem Ablösen der SAOS-2-Zellen in einem Well.

Während der Inkubation der PMN und T-Lymphozyten wurden SAOS-2-Zellen in die Wells vorgelegt, sodass sie adhären anwachsen konnten. Um ein T:SAOS-2-Verhältnis von 3:1 zu erreichen, wurden die T-Lymphozyten in $3 \cdot 10^5$ Zellen/Well eingesetzt. Drei Stunden vor Inkubation mit den T-Lymphozyten wurden die SAOS-2-Zellen mit 0,05 ng/ml des p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptids beladen. So konnten sie von den mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten Antigen-spezifisch erkannt und mittels Zytotoxizität eliminiert werden. Die aktivierten T-Lymphozyten wurden in den PMN-Überständen oder den Medium-Bedingungen vorsichtig auf die SAOS-2-Zellen geschichtet und inkubiert. Neben den T-Lymphozyten-Bedingungen wurde als Kontrolle jeder Überstand und jedes Medium ohne T-Lymphozyten in gleicher Konzentration und in gleichem Volumen auf den Tumorzellen inkubiert. So konnten toxische Effekte der Medien auf die Tumorzellen überprüft werden. Um eine unspezifische Zytotoxizität der T-Lymphozyten zu überprüfen, wurden die Tumorzellen zusätzlich in einem Well nicht mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und dann mit T-Lymphozyten inkubiert, die in PMN-Überstand (20:1) mit nor-NOHA aktiviert wurden. Als Referenzwert der Viabilität der SAOS-2-Zellen wurden sie in einem Well in ihrem gewohnten Zellkulturmedium inkubiert. Der schematische Aufbau des Experiments ist in Abbildung 28 dargestellt.

Eine stündliche mikroskopische Kontrolle der SAOS-2-Zellen zeigte nach drei Stunden das

4. Ergebnisse

erste komplette Ablösen der Tumorzellen vom Plattenboden in einer der Bedingungen. Durch die Zytotoxizität der transduzierten T-Lymphozyten wurden die SAOS-2-Zellen Antigen-spezifisch eliminiert. Tote Tumorzellen lösen sich vom Plattenboden ab. Um den größtmöglichen Unterschied der Zytotoxizität der T-Lymphozyten in den PMN-Bedingungen zu den Kontrollbedingungen detektieren zu können, wurde an dieser Stelle der Versuch beendet.

Nach dem Beenden des Zytotoxizitäts-Assays wurden die noch adhärennten SAOS-2-Zellen mit Formaldehyd-Lösung konserviert und die abgetöteten abgewaschen. Mittels Kristallviolett-Lösung konnten ausschließlich die lebenden Zellen angefärbt werden, denn die Kristallviolett-Lösung bindet an Proteine sowie an die DNA. Deshalb korreliert die Intensität des Violetts mit der Menge an verbliebenen, nicht abgetöteten Tumorzellen. Ausschnitte einer 24-Well-Platte eines repräsentativen Zytotoxizitäts-Assays dieser Färbung sind in Abbildung 29 dargestellt. Zur quantitativen Auswertung wurden die überlebenden SAOS in SDS-Lösung resuspendiert. In Suspension konnte die Intensität der Violett-Färbung mittels des Spektrophotometers als optische Dichte bestimmt werden. Sie korreliert mit dem Überleben der Tumorzellen und somit umgekehrt auch mit der Zytotoxizität der T-Lymphozyten. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 30 zu sehen. Die Bedingung, in der die SAOS-2-Zellen in ihrem gewohnten Zellkulturmedium inkubiert wurden, wurde für die quantitative Auswertung als 100%-iges Überleben normiert und die übrigen Bedingungen zu diesem Wert in Relation gesetzt.

In der ersten Zeile in Abbildung 29 sind die SAOS-2-Zellen inkubiert in ihrem Zellkulturmedium gezeigt. Diese zwei Wells dienen als optische Referenz der Farbintensität als 100 % Viabilität der SAOS-2-Zellen. Alle anderen Wells zeigten die SAOS-2-Zellen nach Inkubation mit T-Lymphozyten nach Aktivierung in Medium oder PMN-Überstand. In der zweiten Zeile ist die Aktivierung der T-Lymphozyten in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA sowie in –Arg-Medium ohne nor-NOHA dargestellt. In der dritten Zeile wurden die T-Lymphozyten in den PMN-Bedingungen ohne nor-NOHA und in der vierten Zeile mit nor-NOHA aktiviert, jeweils in den PMN:T-Verhältnissen 5:1 (links) bis 20:1 (rechts).

Im Vergleich zur Bedingung in der ersten Zeile war die violette Farbe nach Aktivierung der T-Lymphozyten in Medium nur leicht abgeschwächt. Nach Aktivierung in PMN-Überstand war im Gegensatz dazu eine starke Abnahme der Farbintensität zu erkennen. Hierbei war eine klare positive Korrelation zwischen der verstärkten T-Lymphozyten-Zytotoxizität und dem PMN:T-Verhältnis. Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit Zugabe von nor-NOHA zeigte sich in jedem Verhältnis eine weitere Abschwächung der Viabilität verglichen mit der Inkubation ohne nor-NOHA. Somit war die Farbintensität im Verhältnis 5:1 ohne Zugabe von nor-NOHA am höchsten (vergleichbar zu der Aktivierung in +Arg-Medium ohne nor-NOHA)

4.3. Aktivierung der T-Lymphozyten durch PMN

und im 20:1-Verhältnis mit Zugabe von nor-NOHA ließ sich kaum noch die violette Farbe erkennen. Diese Bedingung der minimalen Farbintensität war auch im Mikroskop die erste Bedingung, in der das vollständige Ablösen der Tumorzellen sichtbar wurde, weswegen das Experiment beendet wurde.

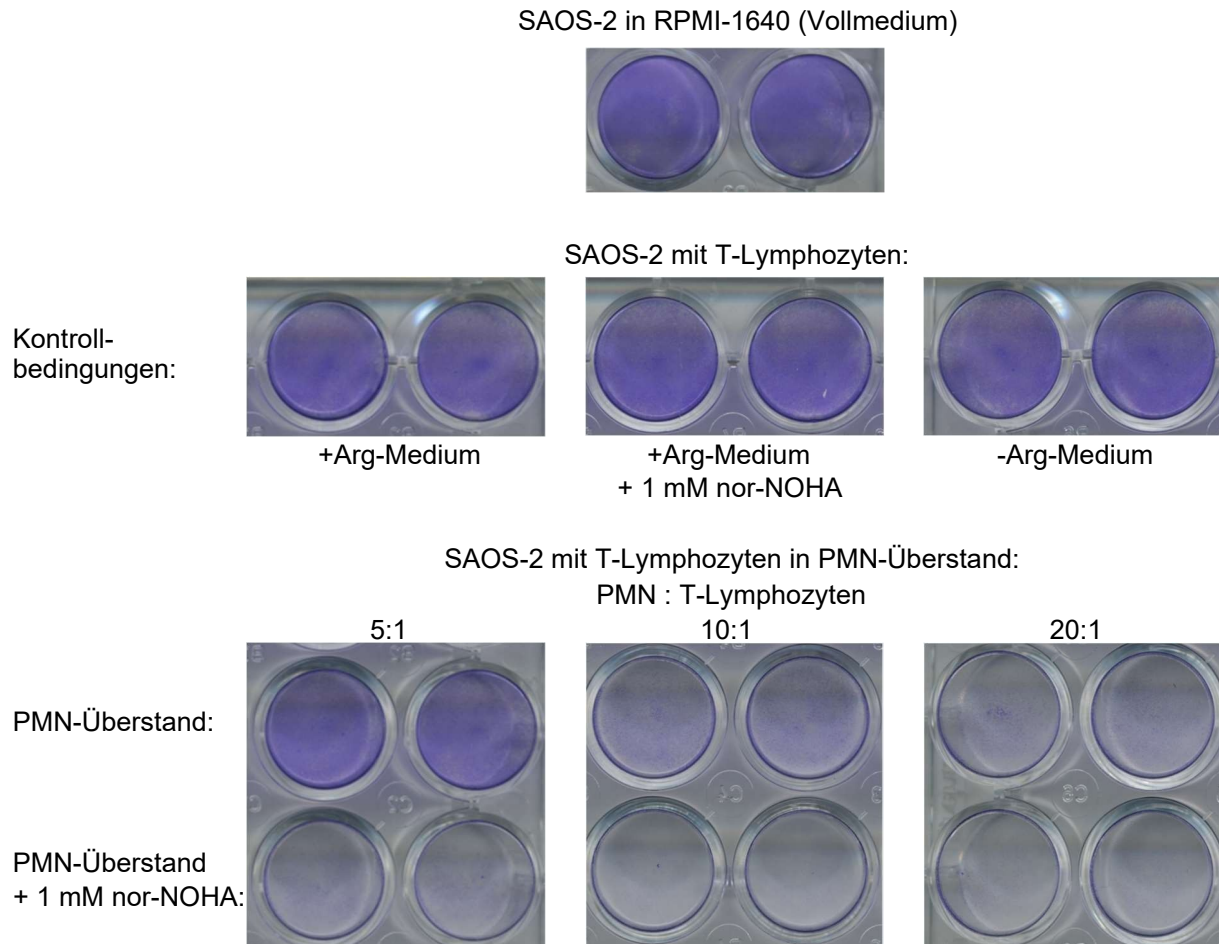


Abb. 29: Antigen-spezifische Zytotoxizität der mit dem T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten: Kristallviolett-Färbung: Die PMN wurden für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA in den PMN:T-Verhältnissen 5:1 bis 20:1 inkubiert. Die T-Lymphozyten wurden mit K562-A2-Zellen (mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen und bestrahlt) für 48 Stunden in PMN-Überstand oder Medium inkubiert und so aktiviert. Die HLA-A2-positiven SAOS-2-Zellen wurden vorgelegt, sodass sie adhären anwachsen konnten. Anschließend wurden sie mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen. Die Überstände, Medien und die T-Lymphozyten jeweils in Überstand oder Medium wurden im Anschluss auf den Tumorzellen inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Tumorzellen in einem Well wurde der Versuch beendet. Die noch adhärenen SAOS-2-Zellen wurden fixiert und die Vitalität mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert. Zu sehen ist die 24-Well-Platte eines repräsentativen Experimentes.

4. Ergebnisse

In der quantitativen Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (vergleiche Abbildung 30) wird die Viabilität der SAOS-2-Zellen in Prozent dargestellt. Sie wird in Relation zur Viabilität in Kulturmedium angegeben. Wie schon in vorherigen Abbildungen stehen einfarbige Balken für eine Aktivierung ohne nor-NOHA und diagonal gestreifte Balken für die Zugabe von nor-NOHA. In den schwarzen Balken sind die Kontrollbedingungen zu sehen. Im ersten Balken ist das Überleben der nicht mit p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladenen SAOS-2-Zellen gezeigt. Sie wurden mit T-Lymphozyten inkubiert, die in PMN-Überstand des 20:1-Verhältnisses mit nor-NOHA aktiviert wurden. Es war keine signifikante Änderung des Überlebens der SAOS-2-Zellen zu erkennen, was eine unspezifische Zytotoxizität der T-Lymphozyten ausschließt. In den darauf folgenden schwarzen Balken (zwei bis acht) sind die Tumorzellen in allen Bedingungen ohne T-Lymphozyten inkubiert worden. Auch in diesen Bedingungen waren keine signifikanten Unterschiede zu der Inkubation in normalem Zellkulturmedium der SAOS-2-Zellen zu sehen. Die verwendeten Überstände und Medien waren demnach nicht toxisch für die Tumorzellen.

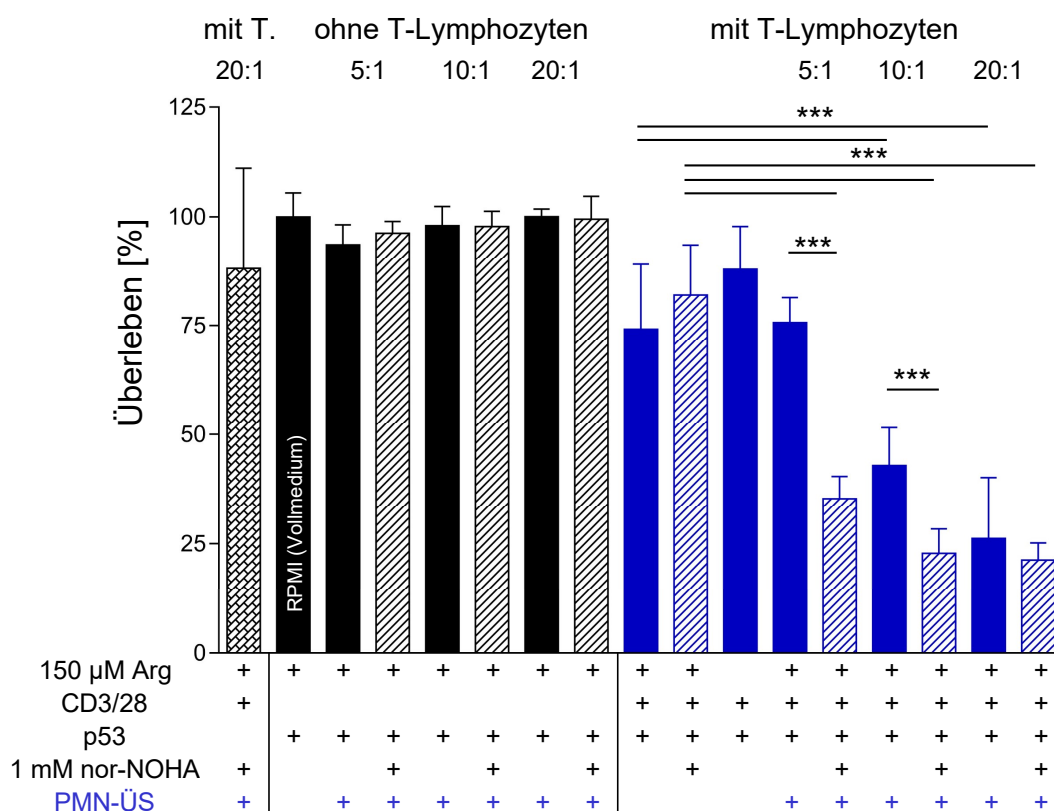


Abb. 30: Antigen-spezifische Zytotoxizität der mit dem T-Zell-Rezeptor transduzierten T-Lymphozyten: quantitative Auswertung des Überlebens der SAOS-2-Zellen. Nach der Kristallviolett-Färbung in Abbildung 29 wurden die SAOS-2-Zellen resuspendiert und die optische Dichte mittels eines Spektrophotometers gemessen. Sie korreliert mit der Viabilität der Tumorzellen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung in Prozent. Der Mittelwert der absoluten *counts per minute* der Bedingung, in der die SAOS-2-Zellen in ihrem Zellkulturmedium inkubiert wurden, wurde auf 100 % festgelegt und die anderen Bedingungen zu dieser Kontrollbedingung normiert.

Die blauen Balken stellen das Überleben der SAOS-2-Zellen nach T-Lymphozyten-Inkubation dar. Die ersten drei Balken zeigen die Inkubation der T-Lymphozyten in Medium-Bedingungen und die letzten sechs Balken die in PMN-Überständen. Es zeigte sich nach Aktivierung in +Arg-Medium ein signifikanter Abfall der Viabilität der Tumorzellen im Vergleich zur Inkubation in normalem Zellkulturmedium. Das geringste Überleben der SAOS-2 Zellen ließ sich mit einer Viabilität von $74 \pm 15\%$ nach Inkubation der T-Lymphozyten in +Arg-Medium ohne nor-NOHA erkennen. Zwischen der Aktivierung in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen, sodass ein Einfluss von nor-NOHA auf die Zytotoxizität der T-Lymphozyten unwahrscheinlich ist. Nach Aktivierung in –Arg-Medium war dagegen der Abfall der Viabilität auf $88 \pm 10\%$ im Vergleich zum Zellkulturmedium nicht statistisch signifikant.

Nach Inkubation in PMN-Überständen ließ sich im Vergleich zu der Aktivierung in +Arg-Medium in allen Verhältnissen mit und ohne nor-NOHA ein deutlicher Rückgang der Viabilität der Tumorzellen feststellen. Lediglich im 5:1-Verhältnis ohne Zugabe von nor-NOHA blieb die Viabilität jener nach Aktivierung in +Arg-Medium ohne nor-NOHA. Ohne Zugabe von nor-NOHA waren im 10:1-Verhältnis nur noch $43 \pm 9\%$ der SAOS-2-Zellen viabel und im 20:1-Verhältnis nur noch $26 \pm 14\%$. Mit Zugabe von nor-NOHA nahm die Viabilität sogar noch weiter ab auf eine Viabilität von $35 \pm 5\%$ im 5:1-Verhältnis, $23 \pm 6\%$ im 10:1-Verhältnis und nur noch $21 \pm 4\%$ im 20:1-Verhältnis. In allen Verhältnissen war die Tumorzell-Viabilität nach Inkubation mit nor-NOHA schlechter als ohne. Mit steigendem PMN:T-Verhältnis nahm die Viabilität der SAOS-2-Zellen kontinuierlich ab.

Nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA ist also folgendes zu sehen:

- eine Hyperaktivierung der Proliferation in Abbildung 12
- eine gesteigerte Interferon- γ -Sekretion in Abbildung 25
- eine Zunahme der Expression von Aktivierungs-Oberflächenproteinen in Abbildung 26
- eine Zunahme der Zytotoxizität hier in Abbildung 30

Interessanterweise war nach Aktivierung in PMN-Überständen ohne nor-NOHA dennoch eine Steigerung der Zytotoxizität erkennbar, obwohl diese T-Lymphozyten nicht proliferierten (Abbildung 12), nicht hinsichtlich ihrer Zytokin-Sekretion aktiviert waren und nicht vermehrt Aktivierungs-Oberflächenproteine exprimierten (Abbildungen 25 und 26).

4.4. Einfluss von PMN-Überstand auf die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien

Nachdem die Zytotoxizität der T-Lymphozyten auf die SAOS-2-Zellen untersucht wurde, sollte nachfolgend geprüft werden, ob Tumorzellen ebenso wie T-Lymphozyten durch den PMN-Überstand in ihrer Proliferation beeinflusst werden können. Die SAOS-2-Zellen können dafür nicht verwendet werden, da sie adhärent wachsen und so ein [³H]-Thymidin-Assay nicht möglich ist. Stattdessen wurden folgende drei Myelom-Zelllinien untersucht: NCI-H929, FD50 und U266. Die PMN wurden dafür, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, in den PMN:Tumorzellen-Verhältnissen von 1:1 bis 20:1 für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Danach wurde jede Tumorzelllinie separat für 48 Stunden in den verschiedenen PMN-Überständen inkubiert.

Zudem wurden drei Medium-Bedingungen angesetzt:

- +Arg-Medium ohne nor-NOHA
- +Arg-Medium mit nor-NOHA
- –Arg-Medium ohne nor-NOHA

In den Abbildungen 31a bis 31c sind die Ergebnisse der drei Tumorzelllinien getrennt voneinander dargestellt.

31a: NCI-H929

In Abbildung 31a ließ sich nach Inkubation in +Arg-Medium eine starke Proliferation der NCI-H929-Zellen erkennen. Sie lag in +Arg-Medium ohne Zugabe von nor-NOHA bei 30959 ± 11639 cpm und bei 22922 ± 9422 cpm nach Inkubation mit Inhibitor. Somit war ein Effekt von nor-NOHA auf die Proliferation unwahrscheinlich. Nach Inkubation in –Arg-Medium war die Proliferation mit 962 ± 1901 cpm signifikant geringer als in +Arg-Medium. Nach Inkubation der Tumorzellen in den PMN-Überständen ohne nor-NOHA war ein signifikanter Abfall der Proliferation verglichen mit der Proliferation in +Arg-Medium zu sehen. Schon im 1:1-Verhältnis lag sie nur noch bei 46 ± 35 %. Mit Zunahme des PMN:Tumorzellen-Verhältnis sank die Proliferation weiter auf ein Minimum von 9 ± 7 % im 10:1-Verhältnis ab. Nach Inkubation der Tumorzellen in PMN-Überstand mit nor-NOHA zeigte sich in allen PMN:Tumorzellen-Verhältnissen wieder eine Rekonstitution der Proliferation ohne signifikanten Unterschied zu der Inkubation in +Arg-Medium. Eine Hyperaktivierung der Proliferation wie in den T-Lymphozyten war nicht zu beobachten.

31b: FD50

Die Proliferation der FD50-Zellen in Abbildung 31b verhielt sich ähnlich wie die der NCI-H929-Zellen. Nach Inkubation in –Arg-Medium zeigte sich ein statistisch nicht signifikantes Absinken der Proliferation verglichen mit der Proliferation in +Arg-Medium. Die Proliferation in +Arg-Medium mit und ohne nor-NOHA unterschied sich nicht voneinander. Somit hatte die Zugabe von nor-NOHA auch hier keinen signifikanten Einfluss. Die Proliferation der FD50-Zellen war generell niedriger als die der NCI-H929-Zellen. So proliferierten die FD50 zum Beispiel im +Arg-Medium ohne nor-NOHA mit nur 24292 ± 18945 cpm.

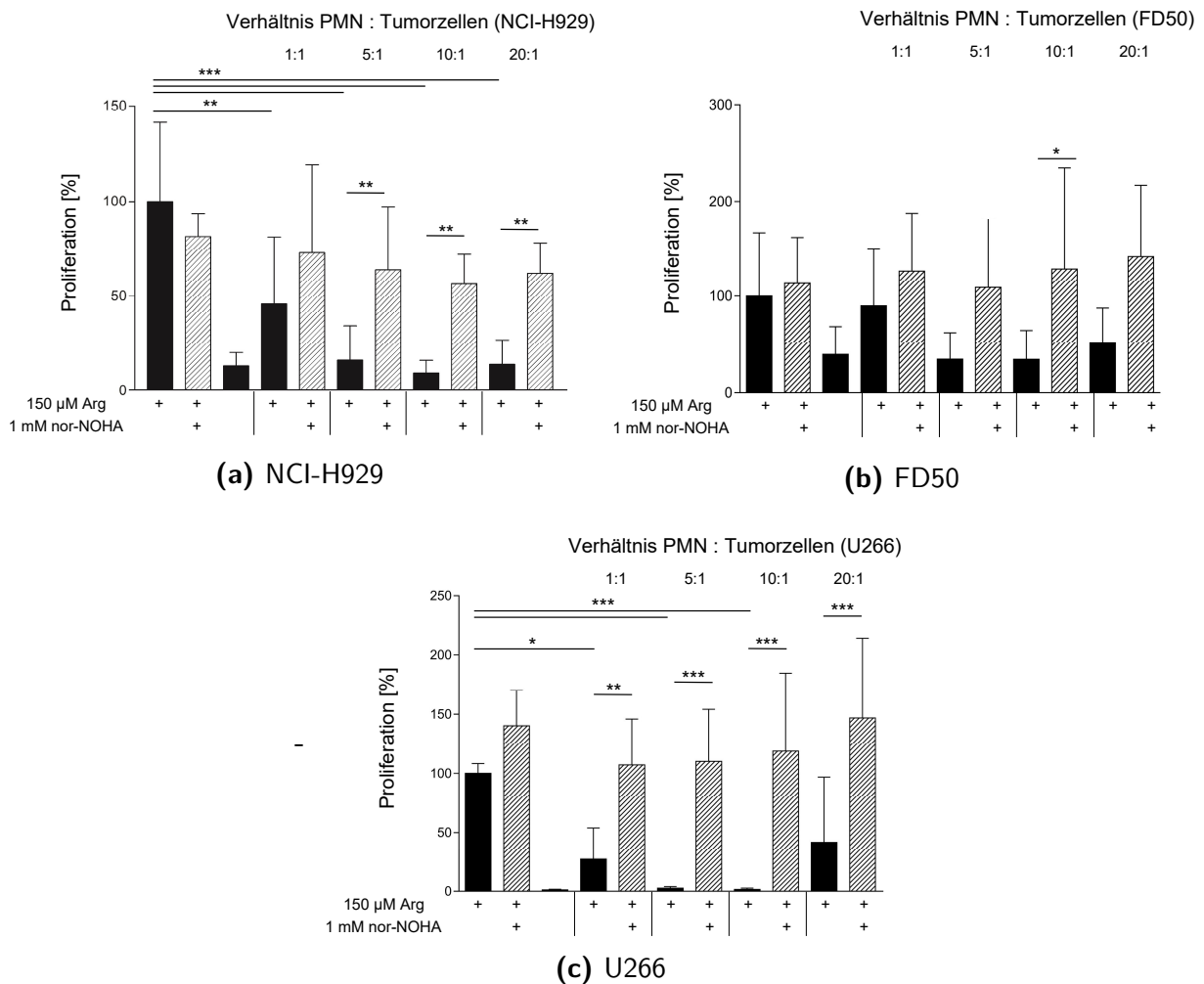


Abb. 31: Proliferationen von Tumorzelllinien in PMN-Überstand: Die PMN wurden für 72 Stunden mit und ohne nor-NOHA inkubiert. Anschließend wurde der PMN-Überstand für 48 Stunden auf drei verschiedenen Tumorzelllinien inkubiert: NCI-H929, FD50 und U266. Die Proliferation der Tumorzellen wurde anschließend mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay evaluiert. Zu sehen ist von den drei Tumorzellen jeweils die Zusammenfassung von je drei unabhängigen Experimenten.

4. Ergebnisse

Nach Inkubation in den PMN-Überständen ohne nor-NOHA zeigten die FD50-Zellen wie die NCI-H929-Zellen eine Abnahme der Proliferation verglichen mit den Kontrollbedingungen. Allerdings war diese Abnahme in keinem Verhältnis statistisch signifikant. Minimal wurde sie im Verhältnis 10:1 mit $34 \pm 31\%$. Auch nach Inkubation in PMN-Überstand mit nor-NOHA ließ sich keine signifikant veränderte Proliferation gegenüber der Proliferation in +Arg-Medium erkennen. Somit zeigten auch die FD50-Zellen durch die Zugabe von nor-NOHA eine Rekonstitution der Proliferation auf das Niveau der Proliferation in +Arg-Medium. Eine Induktion der Hyperaktivierung der Proliferation durch PMN-Überstand mit nor-NOHA konnte nicht beobachtet werden.

31c: U266

Abbildung 31c zeigt die Proliferation der U266-Zellen. Im Gegensatz zu den anderen beiden Tumorzelllinien in den Abbildungen 31a und 31b ließ sich nach Inkubation in –Arg-Medium keinerlei Proliferation messen. Nach Inkubation in +Arg-Medium zeigte sich eine sehr hohe Proliferation. Sie lag ohne Zugabe von nor-NOHA bei 177817 ± 56168 cpm, nach Zugabe von nor-NOHA war sie nicht signifikant unterschiedlich, sodass auch hier ein Einfluss von nor-NOHA auf die Proliferation unwahrscheinlich ist. Nach Inkubation in PMN-Überstand ohne nor-NOHA zeigten die U266-Zellen in dem PMN:Tumorzellen-Verhältnis von 5:1 und 10:1 praktisch keine Proliferation mehr ($2 \pm 1\%$ der Proliferation in +Arg-Medium). Auch im 1:1- und 20:1-Verhältnis sank die Proliferation im Vergleich zur Kontrollbedingung deutlich ab. Nach Inkubation in den PMN-Überständen mit nor-NOHA zeigten die U266-Zellen wie die anderen Tumorzelllinien keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Proliferation in +Arg-Medium. Auch hier wurde durch die Zugabe von nor-NOHA die Proliferation der Kontrollbedingungen in den PMN-Bedingungen rekonstituiert.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass alle drei Tumorzelllinien eine Suppression der Proliferation durch den PMN-Überstand ohne nor-NOHA zeigten. Nach Inkubation in PMN-Überstand mit nor-NOHA war allerdings im Gegensatz zu den T-Lymphozyten in Abbildung 12 keine Hyperaktivierung zu sehen, sondern lediglich die Rekonstitution der Proliferation auf das Niveau dieser in +Arg-Medium.

4.5. Mechanismus der Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN-Überstand

Es konnte in den bisherigen Experimenten beobachtet werden, dass durch die PMN-Arginase 1-induzierte Arginin-Depletion sowohl die Proliferation als auch die Aktivität der T-Lymphozyten supprimiert werden kann. Durch Inhibition der Arginase 1 war entgegen den Erwartungen nicht nur eine Rekonstitution auf das Niveau der Kontrollbedingungen zu sehen, sondern eine Hyperstimulation der Proliferation, der Aktivierung sowie der Zytotoxizität. Von zentraler Bedeutung ist die Identifikation des Mechanismus dieser Hyperaktivierung durch den PMN-Überstand. Eine Möglichkeit wären lösliche, durch die PMN sezernierte Zytokine im Überstand, die mit den T-Lymphozyten interagieren können. Zur Untersuchung dieses Mechanismus wurden zunächst die von den PMN sezernierten Zytokine ermittelt und danach der Einfluss dieser Zytokine auf die Proliferation der T-Lymphozyten evaluiert.

4.5.1. Zytokin-Sekretion der PMN

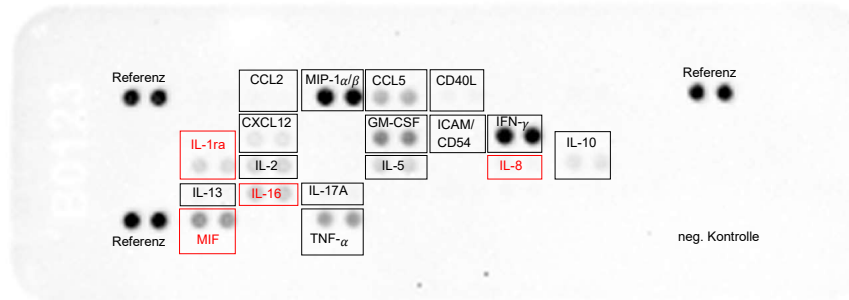
Zur Detektion der von T-Lymphozyten und PMN sezernierten Zytokine wurden Überstände des [³H]-Thymidin-Assays aus Abbildung 12 mit dem *human proteome profiler*TM array mittels klassischem Sandwich-ELISA untersucht. In dem *human cytokine array* konnten 36 Zytokine getestet werden (vergleiche Liste der Zytokine im Anhang in Abbildung 42b auf Seite 182). Dazu wurde eine mit *capture antibodies* markierte Membran verwendet. Die *capture antibodies* waren jeweils punktförmig als Doubletten auf der Membran verankert. Die Zytokine der verwendeten Proben konnte so spezifisch an diese Antikörper binden. Anschließend wurde diese Zytokin-Antikörper-Bindung mit biotinylierten *detection antibody* markiert. Anschließend wurde Streptavidin *horseradish* Peroxidase hinzugefügt, die an das Biotin bindet und so die Enzymaktivität zur Detektion der Chemilumineszenz im spezifischen Substrates darstellt. Die gemessene Lumineszenz korrelierte mit der Menge an detektiertem Zytokin (Zuordnung der Zytokine zu den *spots* im Anhang in Abbildung 42a auf Seite 181) [125]. Im molekularen *imaging*-System (*iBright*) konnte die Chemilumineszenz der Zytokine an den spezifischen Koordinaten der Testmembran detektiert werden. Mit Hilfe der Intensität der Lumineszenz ließ sich quantitativ die Konzentration der Zytokine bestimmen.

Als Proben für die Testmembranen wurden Überstände des Proliferations-Assays verwendet. Um die Sekretion der PMN zu bestimmen, wurde PMN-Überstand des 10:1-Verhältnisses nach 72 Stunden Inkubation der PMN mit nor-NOHA getestet. Für die Bestimmung der Sekretion der T-Lymphozyten wurde die zweite Kontrollbedingung (vergleiche Kapitel 4.1.1) genutzt. Als dritte Probe wurde schließlich der Überstand von T-Lymphozyten in PMN-Überstand des Verhältnisses 10:1 mit nor-NOHA verwendet. In dieser Bedingung konnte die PMN-Sekretion,

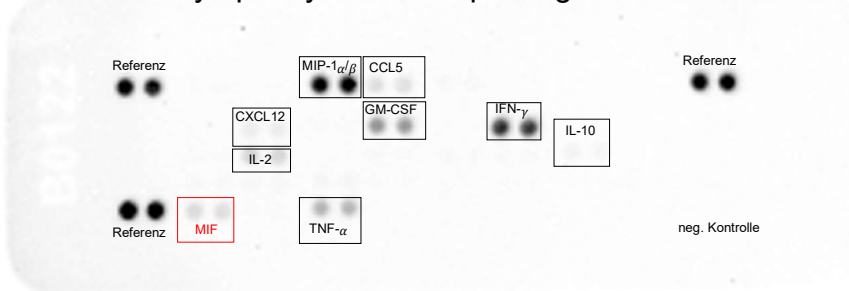
4. Ergebnisse

sowie die durch die PMN beeinflusste Sekretion der T-Lymphozyten detektiert werden. In Abbildung 32 sind die detektierten Zytokine auf den drei Testmembranen dargestellt.

T-Lymphozyten in PMN-Überstand (PMN:T 10:1) mit nor-NOHA:



T-Lymphozyten in 150 μ M Arg-Medium:



PMN-Überstand mit nor-NOHA:

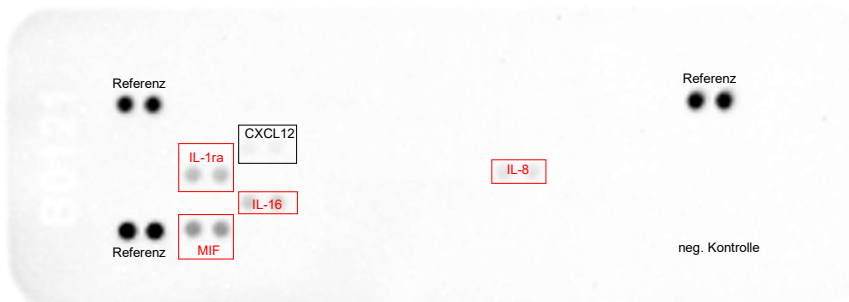


Abb. 32: Human cytokine array: Testmembranen mit detektierten Zytokinen:

Die Zytokine in PMN-Überstand (PMN:T Verhältnis 10:1, mit nor-NOHA), Überstand von T-Lymphozyten in PMN-Überstand (PMN:T Verhältnis 10:1, mit nor-NOHA) und Überstand von T-Lymphozyten in +Arg-Medium wurden mit Hilfe des *human proteome profiler*TM array mittels klassischem Sandwich-ELISA gemessen. Auf den Membranen verankerte *capture antibodies* konnten spezifisch durch Zytokine gebunden werden. *Detection antibodies* markierten die Zytokin-Antikörper-Bindungen und wurden wiederum von Streptavidin *horseradish* Peroxidase gebunden. Diese Bindungen bildeten die Enzymaktivität für das Chemilumineszenz Substrat. Die produzierte Lumineszenz korrelierte mit der Menge an gebundenem Zytokin. Zu sehen sind die Testmembranen von einem Experiment, auf denen die detektierten Zytokine der drei Überstände als punktförmige Doubletten detektiert wurden. In rot sind Zytokine der Granulozyten markiert, die möglicherweise die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten induzieren könnten.

4.5. Mechanismus der Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN-Überstand

Auf der obersten Membran sind die sezernierten Zytokine der T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand abgebildet, darunter die Sekretion der T-Lymphozyten nach Aktivierung in +Arg-Medium und ganz unten die der PMN. Jedes detektierte Zytokin erschien durch eine Doublette an *spots* an der definierten Koordinate auf der Membran. Auf jeder Membran sind links oben und unten sowie rechts oben drei *spot*-Paare als positive Kontrolle und rechts unten eine negative Kontrolle erkennbar.

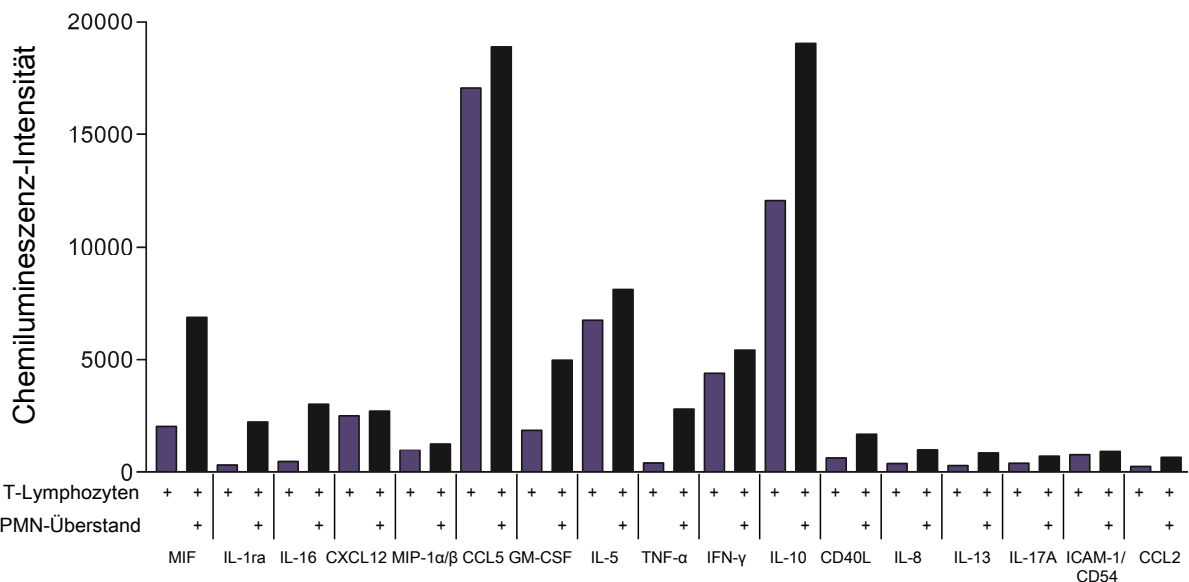


Abb. 33: Human cytokine array: Quantifizierung der von T-Lymphozyten sezernierten Zytokine: Die T-Lymphozyten wurden in +Arg-Medium oder in PMN-Überstand (PMN:T-Verhältnis 10:1) mit nor-NOHA aktiviert. Mittels klassischem Sandwich-ELISA wurden die Zytokine an Chemilumineszenz produzierende Antikörper gebunden. Diese emittierte Chemilumineszenz korrelierte mit der relativen Menge an sezernierten Zytokinen. Zu sehen ist die mittels molekularem *imaging*-System (*iBrighT*) bestimmte Chemilumineszenz-Intensität von einem Experiment.

In Abbildung 33 ist die Chemilumineszenz-Intensität und somit auch die relative Menge an sezernierten Zytokinen der T-Lymphozyten dargestellt. Blaue Balken zeigen die Sekretion nach Aktivierung in +Arg-Medium und schwarzen Balken die Sekretion nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA. Auffällig war, dass die Sekretion aller von den T-Lymphozyten sezernierten Zytokine durch die Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA im Vergleich zur Aktivierung in +Arg-Medium stimuliert wurde. Besonders hoch war die Sekretion von MIF, IL-1ra, GM-CSF, TNF- α , IL-10, CD40-Ligand (CD40L), IL-8, IL-13 und CCL2. Berücksichtigt werden müssen bei dieser Betrachtung jedoch auch, die durch die Granulozyten in den PMN-Überstand sezernierten Zytokine. Sie sind in der Probe, in der die T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit nor-NOHA aktiviert wurden, ebenso zu finden. Die Sekretion der Zytokine könnte autokrin eine Stimulation und Hyperaktivierung der T-Lymphozyten zur

4. Ergebnisse

Folge gehabt haben. Durch die PMN sezernierte Zytokine könnten jedoch ebenfalls parakrin die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten induzieren. In Abbildung 34 sind die vier Zytokine dargestellt, die im PMN-Überstand hauptsächlich detektiert werden konnten. Diese vier Zytokine sind IL-1ra, IL-8, IL-16 und MIF. Sie wurden durch die Granulozyten deutlich stärker sezerniert als durch die T-Lymphozyten. CXCL12 konnte im PMN-Überstand nur schwach detektiert werden und wurde deshalb nicht weiter in Betracht gezogen.

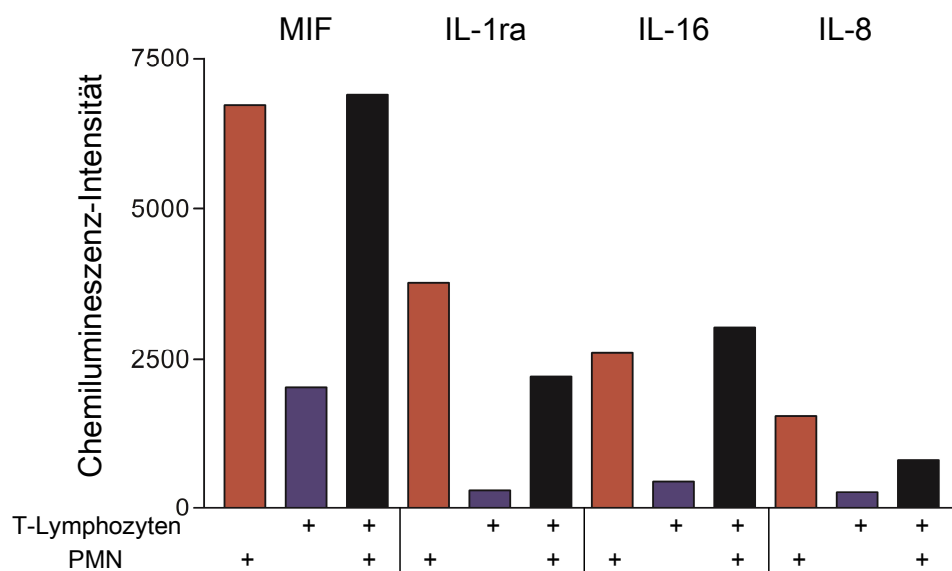


Abb. 34: Human cytokine array: Quantifizierung der von den PMN sezernierten Zytokine: Von den in Abbildung 32 detektierten Zytokinen sind die vier von den PMN sezernierten Zytokine dargestellt. Mittels eines klassischen Sandwich-ELISA wurden die Zytokine mit einem Chemilumineszenz-produzierenden Substrat markiert. Die emittierte Lumineszenz konnte mit einem molekularen *imaging*-System (*iBrigth*) gemessen werden. Sie korreliert mit der relativen Menge des Zytokins im Überstand. Gezeigt ist die Chemilumineszenz-Intensität von MIF, IL-1ra, IL-8 und IL-16 von einem Experiment.

Es fand sich von den vier Zytokinen bei MIF die stärkste Chemilumineszenz-Intensität. Die anderen drei Zytokine wurden von den T-Lymphozyten kaum sezerniert. Wie schon in Abbildung 33 gezeigt, überstieg die Sekretion der T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA bei allen vier Zytokinen die Sekretion nach konventioneller Aktivierung. Auffällig war, dass die Sekretion von MIF und IL-16 in den T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand mit nor-NOHA die des PMN-Überstandes überstieg. Im Gegensatz dazu lag die Sekretion von IL-1ra und IL-8 unter dem Niveau der Sekretion des PMN-Überstands. Bei IL-1ra und IL-8 konnte die Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten nach Aktivierung in PMN-Überstand nicht durch Addition der Sekretion der PMN und konventionell aktivierten T-Lymphozyten erzeugt werden. Dies lässt auf Interaktionen der beiden Zellen, Beeinflussung der T-Lymphozyten-Sekretion oder veränderte Aufnahme der Zytokine schließen.

4.5.2. Proliferation der T-Lymphozyten bei Zugabe von PMN-sezernierten Zytokinen

Die vier im *human cytokine array* ermittelten Zytokine des PMN-Überstandes wurden hinsichtlich einer möglichen Hyperaktivierung der T-Lymphozyten untersucht. Dazu wurden die T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktiviert und in +Arg-Medium mit je 20 ng/ml der rekombinanten Zytokine für 48 Stunden inkubiert. Jedes Zytokin wurde einzeln getestet und zudem auch mögliche Kombinationen der Zytokine. Im Anschluss wurde die Proliferation im [³H]-Thymidin-Assay gemessen. Dies ist in Abbildung 35 dargestellt.

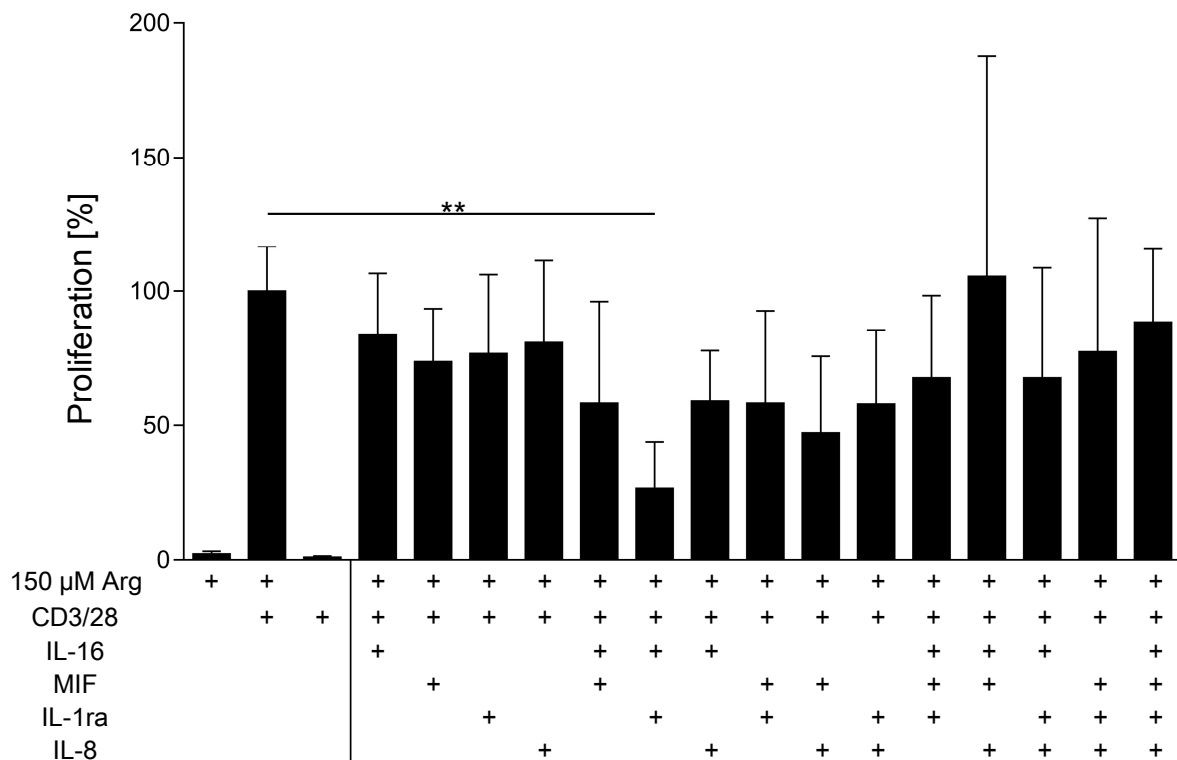


Abb. 35: Proliferation der T-Lymphozyten unter Zugabe von rekombinanten Zytokinen: Die mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads aktivierten T-Lymphozyten wurden für 48 Stunden in +Arg-Medium mit einem Zytokin oder einer Kombination der rekombinanten Zytokine, wie angegeben, inkubiert. Jedes Zytokin wurde in der Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde mittels [³H]-Thymidin-Assay quantifiziert. Zu sehen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Als Kontrollbedingungen wurden T-Lymphozyten in folgenden Bedingungen angesetzt (vergleiche Kapitel 4.1.1):

1. nicht aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
2. aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
3. aktivierte T-Lymphozyten in –Arg-Medium

4. Ergebnisse

In Abbildung 35 sind die zusammengefassten Ergebnisse der [³H]-Thymidin-Assays dargestellt. Die Zugabe der Zytokine führte hierbei weder bei Einzel-Zugabe noch in allen getesteten Kombinationen zu einer signifikanten Beeinflussung der T-Lymphozyten-Proliferation. Insbesondere war keine Hyperproliferation detektierbar. Lediglich die Kombination von IL-1ra und IL-16 führte zu einer signifikanten Änderung, jedoch zu einer Reduktion der Proliferation. Die vier hier untersuchten Zytokine sind somit nicht für den hyperstimulierenden Effekt des PMN-Überstandes bei gleichzeitiger Arginase 1-Inhibition verantwortlich.

5. Diskussion

5.1. Interaktion von PMN und T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind eine der wichtigsten Komponenten des adaptiven Immunsystems. In Infektionen, ebenso wie im Tumor-Mikromilieu, spielen ihre Aktivität und Zytotoxizität eine essentielle Rolle. Ihre Effektivität und Proliferation werden durch humorale Faktoren und den direkten Zell-Zell-Kontakt bestimmt. Dabei üben die Tumorzellen selbst einen starken Einfluss auf die Aktivität der T-Lymphozyten aus. Darüber hinaus bestimmen die in das Tumorstroma immigrierenden Immunzellen maßgeblich die Effektivität der Abwehr durch die T-Lymphozyten. Dieser Einfluss der anderen Immunzellen kann dabei sowohl aktivierend als auch suppressiv ausfallen. Hierbei sind vor allem die neutrophilen Granulozyten als entscheidender Faktor zu nennen. Aus diesem Grund gerät die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und PMN zunehmend in den Fokus der modernen Forschung.

Aktuell stehen die beobachteten Eigenschaften der PMN im gegenseitigen Konflikt zueinander. Die Frage der Wirkung von PMN auf T-Lymphozyten ist deutlich mit der Frage der Wirkung auf Tumore verknüpft. Eine Aktivierung der T-Lymphozyten bewirkt indirekt eine Suppression des Tumors und bestätigt die anti-tumorale Eigenschaft der PMN [126, 127]. Eine Supprimierung der T-Lymphozyten dagegen kann das Tumorstroma indirekt fördern, wodurch die pro-tumoralen Eigenschaften der PMN bekräftigt werden [25, 70, 120]. Es konnten mehrfach sowohl anti-tumorale [64, 68, 81, 82] als auch pro-tumorale [89, 52, 53, 58, 64, 68, 81, 85, 90, 91, 92, 128] Wirkungen beobachtet werden. In Kapitel 2.2.1 wurde die Rolle der PMN in Tumor-Erkrankungen bereits näher erläutert.

Die Suppression der T-Lymphozyten basiert in Tumor-Erkrankungen unter anderem auf der Arginin-Depletion durch das Enzym Arginase 1 [25]. Es wird durch den Tumor selbst sowie durch MDSC und PMN freigesetzt [116]. Seit der Entdeckung dieses Mechanismus zur Suppression der T-Lymphozyten liegt das Interesse der Forschung in der Untersuchung der Konsequenzen dieser Arginase 1-vermittelten Arginin-Depletion und zudem in deren Blockade durch verschiedene Arginase-Inhibitoren. Eine wichtige Konsequenz der erfolgreichen Blockade ist dabei die Aktivität und Proliferation der T-Lymphozyten. In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss von PMN auf die Aktivität, die Proliferation und die Zytotoxizität der T-Lymphozyten

5. Diskussion

in Abhängigkeit von einer Inhibition der Arginase 1 untersucht. Der experimentelle Aufbau hierfür wurde so nah wie möglich an die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Körper angepasst:

- Die Medien zur Inkubation der PMN und T-Lymphozyten wurden mit einer Arginin-Konzentration von 150 μM verwendet. Dies entspricht der physiologischen Arginin-Konzentration [25].
- Die *in vitro* Verhältnisse von PMN zu T-Lymphozyten (1:1 bis 50:1) wurden in Anlehnung an die physiologischen *in vivo* Verhältnisse gewählt (vergleiche Kapitel 3.2.3.1). In Tumoren und deren unmittelbarer Umgebung sind die T-Lymphozyten kontinuierlich in ungefähr gleicher Konzentration präsent. Die PMN dagegen sind vor allem am Rand der Tumore und weniger im soliden Inneren des Tumors zu finden. So findet die direkte Interaktion von T-Lymphozyten und PMN vor allem am Rand des Tumors statt. Zudem akkumulieren sich T-Lymphozyten und PMN an sogenannten Hotspots auch im soliden Tumor, um miteinander zu interagieren. Es zeigt sich also physiologisch eine Dominanz der PMN gegenüber den T-Lymphozyten am Rand des Tumors und an diesen Hotspots [126, 129].
- Die frühe Phase einer Inflammation und Tumorerkrankung ist geprägt durch die Invasion der PMN in den sich formierenden Tumor. Im Gegensatz dazu erreichen die T-Lymphozyten den Ort der Inflammation oder des Tumors erst ein bis zwei Tage später [25]. Durch den Tumor werden die PMN deshalb früh aktiviert und sezernieren ihre Granula. Sie gelten als die vorderste Front des Immunsystems und agieren dementsprechend schnell. Aus diesem Grund wurde die Inkubation der PMN in den verschiedenen Medien und Konzentrationen mit drei Tagen gewählt. In dieser Zeit könnte *in vivo* die Arginase 1 das Arginin im Tumor-Mikromilieu depletieren, bevor die T-Lymphozyten eintreffen. Auch *in vitro* kommt es durch die Kurzlebigkeit der PMN schnell zur Apoptose oder Nekrose der Zellen. Dadurch werden die Inhalte ihrer Granula also auch die Arginase 1 aus den azurophilen Granula freigesetzt [130]. Die Arginin-Depletion im Medium ist somit ähnlich dem physiologischen Arginin-Verbrauch in Tumorerkrankungen.

Zur Inkubation der T-Lymphozyten wurde der zellfreie Überstand der PMN nach Inkubation im Medium verwendet, wodurch lediglich humorale Interaktionen und keine direkten Zell-Zell-Interaktionen möglich waren. Als Arginase-Inhibitoren wurde sowohl der kompetitive Inhibitor nor-NOHA eingesetzt als auch CB-1158. Beide Inhibitoren blockieren extrazelluläre Arginase 1 und Arginase 2 [123].

Die Interaktion zwischen PMN und T-Lymphozyten sowie die Wirkung der Inhibition von Arginase 1 wurde bereits mit ähnlichen experimentellen Ansätzen in diversen Studien untersucht

[7]. Hierfür wurden die T-Lymphozyten entweder in Kokultur [72, 103, 126, 128, 6] mit den PMN kultiviert oder in PMN-Sonikat [25] inkubiert.

In allen zitierten Studien zeigte sich ohne die Zugabe der Inhibitoren stets eine vollständige Suppression der Proliferation, Aktivität und Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten unter dem Einfluss der PMN. Durch Einsatz beider, in den Studien verwendeten, Inhibitoren (nor-NOHA und CB-1158) konnte in den T-Lymphozyten das Niveau der konventionellen Aktivierung (bei CB-1158 zumindest auf 90 % [70]) wieder hergestellt werden. Dabei handelte es sich um die Zytokin-Sekretion (zum Beispiel um die Interferon- γ -Sekretion) sowie um die Aktivität und Proliferation [70, 25]. Somit konnte durch die Inhibition der Arginase 1 effektiv die Arginin-Depletion blockiert und die Suppression der T-Lymphozyten verhindert werden [25, 103, 128, 131]. Dies bestätigte die Arginase 1 als einen der Schlüsselmechanismen zur PMN-induzierten Immunsuppression.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nur eine Wiederherstellung der Aktivierung der T-Lymphozyten durch die Arginase-Inhibition erreicht werden. Erstaunlicherweise zeigte sich unter dem Einfluss des PMN-Überstandes und Zugabe eines Arginase-Inhibitors eine starke Hyperaktivierung der Proliferation, der Zytokin-Sekretion, der Aktivität und der Zytotoxizität der T-Lymphozyten.

5.2. Suppression der T-Lymphozyten durch PMN

Die alleinige Inkubation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand ohne Arginase-Inhibitor löste in allen Experimenten eine komplette Suppression der T-Lymphozyten aus (vergleiche Abbildungen 12-30), sobald die Konzentration der PMN die der T-Lymphozyten überstieg. Diese Suppression bezog sich sowohl auf die Proliferation (Abbildungen 12-25b) als auch auf die Interferon- γ -Sekretion (Abbildung 25a, Seite 101), den Aktivierungsphänotyp (Abbildung 26, Seite 106) sowie die Zytotoxizität (Abbildung 30, Seite 116). Auch die direkte Kokultur und die Transwell-Kultur von PMN und T-Lymphozyten bestätigten die Suppression der Proliferation (vergleiche Abbildungen 23 und 24, Seite 97 und 98).

Wie bereits erwähnt, ist die Suppression der T-Lymphozyten durch PMN in Kokulturen und mittels PMN-Sonikat bereits beschrieben worden [72, 103, 126, 128, 6, 25]. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass PMN-Überstand ebenfalls eine Suppression der Proliferation bedingt [76]. Verschiedene Mechanismen der Supprimierung sind inzwischen detektiert worden. Eine Übersicht der wichtigsten Mechanismen ist in Abbildung 36 dargestellt.

Arginase 1:

Die Arginase 1 wird im Tumor-Mikromilieu oder während der Inflammation kontinuierlich durch MDSC und PMN im Zuge der Apoptose und Nekrose sezerniert. Im Multiplen Myelom konnte im Vergleich zu gesunden Blutspendern eine erhöhte Expression an Arginase 1 in granulozytären Zellen beobachtet werden [128]. Dies führt zu einer verstärkten Sekretion des Enzyms. In Tumor-Patienten konnte im Serum zudem generell eine erhöhte Aktivität der Arginase 1 im Vergleich zu gesunden Blutspendern gemessen werden. Durch die Arginin-Suppression und die damit verbundene Suppression der Immunantwort gelingt dem Tumor das Entkommen vor der Immunabwehr, was die Tumor-Progression und Metastasierung ermöglicht [103, 70, 120, 129, 128].

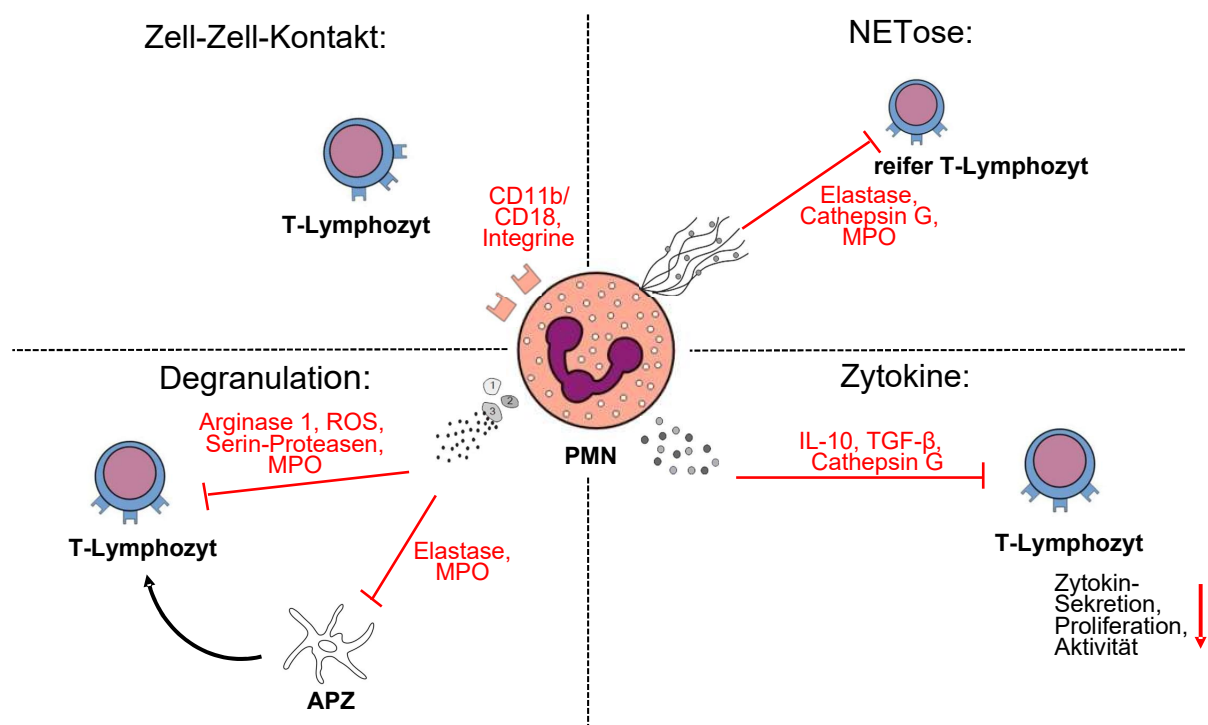


Abb. 36: Mechanismen der Suppression der T-Lymphozyten durch PMN: PMN können T-Lymphozyten über direkten Zell-Zell-Kontakt supprimieren. Dies geschieht mit Hilfe der Oberflächenproteine CD11b/CD18. Durch Degranulation und Freisetzung von Arginase 1, Serin-Proteasen und ROS werden T-Lymphozyten direkt inhibiert. Elastase supprimiert die APZ, was indirekt eine Aktivierung der T-Lymphozyten verhindert. Zytokine wie IL-10 und TGF- β inhibieren die T-Lymphozyten. Außerdem supprimieren die Bestandteile der NETose reife T-Lymphozyten. Details und zitierte Literatur siehe Kapitel 5.2.

Die Arginase 1 ist intrazellulär in den azurophilen Granula der PMN gespeichert. Granulozyten sind äußerst kurzlebige Zellen, deren Apoptose *in vitro* bereits nach kurzer Zeit eingeleitet wird. Die extrazelluläre Arginase verstoffwechselt das sich im Medium befindende Arginin zu Ornithin und Harnstoff [25]. Dies ist an der sinkenden Arginin-Konzentration im

Verlauf der Inkubation in Abbildung 19 auf Seite 89 zu erkennen. Bereits nach 24 Stunden PMN-Inkubation sank die Konzentration im Vergleich zum verwendeten Medium deutlich ab. Nach 48 und 72 Stunden war weiterhin die kontinuierliche Arginin-Depletion durch die Arginase 1 der PMN zu sehen. Die T-Lymphozyten sind auf Arginin im Medium angewiesen und verstoffwechseln während der Inkubation ebenfalls intrazellulär Arginin.

Die Suppression der T-Lymphozyten durch Arginase 1 ist bereits vielfach bestätigt worden [89, 25, 60, 63, 70, 71, 72, 132]. Ab einer Arginin-Konzentration von 40 μM im Medium konnte eine Inhibition der Proliferation der T-Lymphozyten nachgewiesen werden [63]. Dementsprechend wurde schon nach 48 stündiger Inkubation der PMN die Arginin-Konzentration durch die Arginase 1 so weit depletiert, dass eine Proliferation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand nicht mehr möglich war. Dies ist in Abbildung 18 auf Seite 86 dargestellt. Nach Inkubation der T-Lymphozyten in PMN-Sonikat konnte bereits nach einer Stunde Inkubation die Suppression der Proliferation festgestellt werden [25]. In Arginin-freiem Medium zeigten die T-Lymphozyten keinerlei Proliferation, Zytokin-Sekretion und auch keine zytotoxische Aktivität (vergleiche Abbildungen 12-25b, 30).

Zusätzlich zur Suppression der Proliferation wird auch die Expression der CD3 ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors inhibiert [5]. Außerdem bewirkt die Arginase 1 einen Arrest der T-Lymphozyten in der G₀-Phase des Zellzyklus [4, 89]. Ferner generiert Arginase 1 durch die Arginin-Depletion mit Hilfe der Reduktase-Domäne des Enzyms iNOS Superoxide und ROS und erhöht somit den oxidativen Stress auf die T-Lymphozyten [114].

Weitere Enzyme und Zytokine:

Die in den Granula der PMN gespeicherten Enzyme und Zytokine wirken sowohl pro-inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch. Verschiedenste Effekte auf T-Lymphozyten sind inzwischen bekannt:

- Cathepsin G reduziert die Rekrutierung der T-Lymphozyten und deren Empfindlichkeit auf Stimulation [7, 133].
- MPO supprimiert die Proliferation der T-Lymphozyten und die Antwort von vor allem CD4⁺ T-Lymphozyten [134, 135].
- Das Cathelicidin LL-37 induziert in stimulierten zytotoxischen T-Lymphozyten die Apoptose [136].
- IL-10 und TGF- β inhibieren die Aktivität von hauptsächlich T_H17-Zellen [5].

5. Diskussion

- Die PMN generieren mit Hilfe verschiedener Enzyme (zum Beispiel iNOS) H_2O_2 und ROS. So werden die T-Lymphozyten vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt [89, 69, 5, 137].
- Neben der Arginase 1 inhibieren auch andere Serin-Proteasen die Aktivität der T-Lymphozyten. Dies ist an einer verminderten Expression des Oberflächenproteins CD25 zu erkennen [5].

NETose

In der NETose setzen die PMN Enzyme frei, wie zum Beispiel die Elastase, Cathepsin G und die MPO. Diese Enzyme werden in DNA-Netzen gespeichert und inhibieren die ausdifferenzierten, reifen T-Lymphozyten. Die Elastase inhibiert zudem auch die Reifung von APZ und bewirkt so indirekt eine weitere Suppression der T-Lymphozyten [7].

Direkter Zell-Zell-Kontakt:

In Kokulturen interagieren Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt miteinander. Über die Adhäsionsproteine CD11b/CD18 können PMN direkt T-Lymphozyten supprimieren [7, 66, 67, 69]. Zudem konnte eine CD18-bedingte Sekretion von Arginase 1 detektiert werden [138]. Andere Beobachtungen zeigten die Notwendigkeit von Integrinen zur Inhibition der T-Lymphozyten durch die PMN [5]. In der direkten Kokultur in Abbildung 23 auf Seite 97 ist die Proliferation der T-Lymphozyten trotz Arginase-Inhibition durch die PMN supprimiert. Es lässt sich keine Hyperaktivierung nach Zugabe des Inhibitors erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass die Zell-Zell-Kontakt-bedingten inhibitorischen Effekte der PMN mögliche aktivierende Effekte in der Kokultur dominieren.

Suppression von APZ

APZ sind die wichtigsten Coaktivatoren der T-Lymphozyten. Mit Hilfe ihrer Oberflächenproteine und ihrer Zytokin-Sekretion üben sie besonderen Einfluss auf die T-Lymphozyten aus. Werden die APZ durch die PMN *in vivo* supprimiert, so bewirkt dies auch sekundär eine Suppression der T-Lymphozyten-Aktivität. Diese Inhibition wird vor allem durch Elastase [7, 139], die MPO [7, 5] und eine hohe Konzentration von α -Defensinen [140] ausgelöst.

5.3. Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN

Durch die Zugabe eines Inhibitors der Arginase 1 zu der Inkubation der PMN konnte in den, in Kapitel 5.1 benannten, Studien [25, 103, 128, 131] stets eine Suppression der T-Lymphozyten verhindert werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal nicht nur eine Wiederherstellung der Proliferation, sondern eine Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch PMN-Überstand mit Zugabe eines Arginase-Inhibitors gezeigt werden. Diese Hyperaktivierung ließ sich in der Proliferation der T-Lymphozyten (Abbildungen 12-25b), in der Interferon- γ -Sekretion (Abbildung 25a, Seite 101), in der Aktivität der T-Lymphozyten (Abbildung 26, Seite 106) und auch in der Zytotoxizität der T-Lymphozyten (Abbildung 30, Seite 116) erkennen. Diese vier Eigenschaften der T-Lymphozyten wurden in dieser Arbeit genauer untersucht.

5.3.1. Proliferation

In den Abbildungen 12-25b zeigte sich eine deutliche Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten, die mit PMN-Überstand und Arginase-Inhibitor inkubiert wurden. Diese Hyperaktivierung korrelierte dabei mit dem Verhältnis von PMN, die zur Generierung des Überstandes inkubiert wurden, zu T-Lymphozyten. Je mehr PMN inkubiert wurden, desto stärker proliferierten die T-Lymphozyten anschließend im PMN-Sekretom-Überstand. Diese Beobachtung konnte durch zwei verschiedene Methoden, dem [^3H]-Thymidin-Assay (Abbildung 12, Seite 72) sowie dem CFSE-Assay (Abbildung 13, Seite 75) bestätigt werden. Dadurch konnten Methoden-spezifische systematische Fehler ausgeschlossen werden.

Entgegen der Annahme ließ sich mit Steigerung des Verhältnisses von PMN zur Generierung des Überstandes zur T-Lymphozyten-Inkubation keine konstant lineare Steigerung der Proliferation erreichen. Beide Inhibitoren zeigten bei Überschreiten der maximalen Hyperaktivierung bei einer bestimmten Konzentration der PMN für den Überstand wieder eine Abnahme der Hyperaktivierung. Bei Zugabe von nor-NOHA stellten sich die T-Lymphozyten am stärksten aktiviert in dem Überstand bei einem PMN:T-Verhältnis von 20:1 dar, während bei Zugabe von CB-1158 das PMN:T-Verhältnis von 10:1 zur Steigerung der Proliferation optimal war. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung wäre die maximale Ausschöpfung des proliferativen Potentials der T-Lymphozyten. Allerdings würde dies lediglich das Ausbleiben einer weiteren Steigerung der Proliferation erklären, nicht jedoch den Abfall bei weiterer Steigerung der Konzentration der PMN. Die ist jedoch zum Beispiel in Abbildung 16 auf Seite 81 bei Steigerung der Arginase-Aktivität erkennbar. Hier nimmt die Proliferation nach Überschreiten des Maximums bei einer Arginase-Aktivität von 300 mU/ml kontinuierlich mit der weiteren Steigerung der Arginase-Aktivität ab. Dies spricht dafür, dass eine Aktivität von 300 mU/ml der PMN-Arginase einem PMN:T-Verhältnis von 20:1 (vergleiche Abbildung 12) entspricht. Es

5. Diskussion

ist anzunehmen, dass die Arginase-Aktivität bei sehr hohen Enzymkonzentrationen nicht mehr vollständig durch den jeweiligen Arginase-Inhibitor gehemmt wird. In der Folge sollte Arginin wieder verstoffwechselt werden und die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten sollte abnehmen.

Des Weiteren wurde die Inhibition der Arginase durch zwei verschiedene Inhibitoren (nor-NOHA in Abbildung 12 auf Seite 72 und CB-1158 in Abbildung 14 auf Seite 77) getestet. Beide Substanzen sind Arginase 1- und 2-Inhibitoren. Die iNOS dagegen wird von beiden nicht beeinflusst. CB-1158 zeigt ein geringes Potential die Zellmembran zu überwinden und kann somit die intrazellulär gelegene Arginase 2 in den T-Lymphozyten nur geringfügig beeinflussen [70]. Beide Inhibitoren weisen eine höhere Affinität zur Arginase 1 als zur Arginase 2 auf [122]. Somit inhibieren beide vor allem die durch die PMN freigesetzte Arginase 1. Eine Abnahme der Proliferation der T-Lymphozyten nach Zugabe der Inhibitoren zur konventionellen Aktivierung konnte nicht festgestellt werden (vergleiche Abbildung 12 und 14). Dies bestätigte eine vernachlässigbar geringe Inhibition der Arginase 2 der T-Lymphozyten. Eine effiziente Arginase 2-Inhibition hätte zu einer Zunahme der Zytotoxizität und einer Blockade von PD-1 geführt. Außerdem ändert sich je nach Verfügbarkeit von Arginin der Metabolismus von aktivierten T-Lymphozyten. Hohe Arginin-Konzentrationen bewirken eine Verschiebung des Metabolismus von vorwiegend Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung [111]. In Arginase 2-Knockout-Mäusen zeigte sich eine gesteigerte anti-tumorale Zytotoxizität und eine vermehrte Umwandlung der T-Lymphozyten in *memory*-Zellen [141]. In den Abbildungen 12, 14, 30 und 26e (auf den Seiten 72, 77, 116 und 105) konnte jedoch kein verändertes Verhalten der T-Lymphozyten nach Zugabe der Arginase-Inhibitoren im Vergleich zur konventionellen Aktivierung beobachtet werden.

Die Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten konnte in beiden Subpopulationen der T-Lymphozyten sowohl in CD4⁺- als auch in CD8⁺-T-Lymphozyten beobachtet werden (Abbildung 15 auf Seite 79). Dabei ist die Hyperaktivierung in den CD4⁺-T-Lymphozyten jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Möglicherweise werden CD8⁺-T-Lymphozyten durch die Arginase 1 der MDSC und PMN stärker supprimiert als CD4⁺-T-Lymphozyten [72]. CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten haben unterschiedliche Funktion und sind auch durch unterschiedliche Mechanismen und Zytokine aktivierbar. Die α -Defensine der PMN zum Beispiel aktivieren CD4⁺-T-Lymphozyten über den NF- κ B-Signalweg [142]. Außerdem könnte das von den PMN sezernierte Cathelicidin LL-37 und das Lactoferrin eine Rolle spielen. Das antimikrobielle Peptid LL-37 stimuliert unspezifisch aktivierte CD4⁺-T-Lymphozyten [7, 143]. Es konnte auch in den CD8⁺-T-Lymphozyten eine Aktivierung durch das Cathelicidin LL-37 festgestellt werden. Allerdings gibt es auch konträre Beobachtungen bei stimulierten zytotoxischen T-Lymphozyten, in denen durch das Cathelicidin LL-37 die Apoptose induziert wurde [136]. Außerdem konnte die vermehrte Differenzierung der CD8⁺-T-Lymphozyten in

memory-Zellen festgestellt werden [144]. Alle diese Beobachtungen zusammen könnten zur stärkeren Hyperaktivierung der CD4⁺-T-Lymphozyten beitragen.

Die mittlere Aktivität der Arginase 1 der PMN wurde bei 1550 ± 459 mU pro Milligramm zellulärem Protein gemessen [25]. Mit 1737 ± 265 mU pro Milligramm zellulärem Protein lag die mittlere Aktivität der PMN-Arginase in dieser Arbeit etwas höher. Beim Einsatz von PMN-Sonikat konnte schon ab einer Aktivität von 100 mU/ml eine Inhibition der Proliferation und Interferon- γ -Sekretion der T-Lymphozyten beobachtet werden. Diese Suppression konnte durch die Zugabe von nor-NOHA vollständig aufgehoben werden. Bei Zugabe von rekombinanter Arginase 1 ins Medium zur Inkubation der T-Lymphozyten (in gleicher Aktivität: 100 mU/ml) konnte ebenso eine Suppression der Proliferation festgestellt werden. Durch Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA konnte jedoch in diesem Experiment keine Hyperaktivierung detektiert werden (vergleiche Abbildung 16 auf Seite 81). Die Proliferation der T-Lymphozyten mit der rekombinanten Arginase 1 konnte durch nor-NOHA nicht wieder auf das Niveau der konventionellen Aktivierung angehoben werden. Diese Beobachtungen konnten letztlich nicht geklärt werden. Somit ähnelt das Verhalten der T-Lymphozyten unter Einfluss der rekombinanten Arginase 1 dem der Kokultur mit PMN in Abbildung 23 auf Seite 97. Auch schon in früheren Experimenten zeigte sich diese Interaktion der beiden Zellpopulationen. [25].

Da auch Tumorzellen auf Arginin angewiesen sind und ihre Proliferation in der Arginin-Depletion sinkt, wird die rekombinante Arginase 1 in Studien als neuartiges Tumorthapeutikum untersucht. In einer Studie konnte, wie auch hier in Abbildung 16, eine Zytotoxizität der rekombinanten Arginase gegenüber humanen Zellen beobachtet werden. Gewebsschäden traten in den Mäusen bei Verdopplung der effektiven therapeutischen Dosis auf [145]. In therapeutischen Dosen wird die rekombinante Arginase von den Mäusen aber sehr gut vertragen [70, 118, 146, 147].

In den Proliferations-Assays wurde eine Arginin-Konzentration von 150 μ M verwendet. Das entspricht der physiologischen Arginin-Konzentration im Serum [25]. Eine Erhöhung der Arginin-Konzentration zeigte in Abbildung 17 auf Seite 84 keine weitere Hyperaktivierung der Proliferation. Jedoch konnte dadurch in der 72 stündigen Inkubationszeit das Arginin durch die Arginase 1 nicht vollständig depletiert werden. Aus diesem Grund wurde die Suppression der T-Lymphozyten durch den PMN-Überstand abgemildert beziehungsweise komplett verhindert.

Die Suppression durch die Arginase 1 konnte erst nach 48-stündiger Inkubation der PMN zur Überstandgenerierung vollständig beobachtet werden (vergleiche Abbildung 18 auf Seite 86). Die Hyperaktivierung der Proliferation im PMN-Überstand mit nor-NOHA war jedoch schon deutlich früher erkennbar. Bereits nach fünf Minuten der Inkubation der PMN im

5. Diskussion

Medium und anschließender Kultivierung der T-Lymphozyten für 48 Stunden ließ sich in Abbildung 21 auf Seite 92 ein klarer Anstieg der Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung erkennen. In den fünf Minuten der Inkubation wurden die PMN nicht stimuliert. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass die PMN durch die Manipulation bei der Isolation in gewissem Maße aktiviert wurden. Deshalb wurden auch die Auswirkung einer gezielten Aktivierung untersucht. Sie sind auf Seite 94 in Abbildung 22 dargestellt. Hierbei wurden PMA, fMLP oder Ionomycin zur Aktivierung der PMN verwendet. Eine Aktivierung induziert in den PMN die Freisetzung ihrer Granula und danach ihre Apoptose [72]. Es werden zunächst die sekretorischen Vesikel, dann die Gelatinase-haltigen, die spezifischen und zum Schluss die azurophilen Granula der PMN sezerniert. Es konnte beobachtet werden, dass die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten-Proliferation durch die zusätzliche Aktivierung der PMN nicht weiter gesteigert werden konnte. Mit fMLP und Ionomycin aktivierte PMN stimulierten die T-Lymphozyten in gleichem Maß wie nicht aktivierte PMN. Durch die Aktivierung mit PMA ließ sich sogar eine deutlich geringere Hyperaktivierung erkennen. Diese Beobachtungen machen eine Isolierungs-bedingte Aktivierung der PMN, welche die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten bewirkt, unwahrscheinlich.

PMA induziert die NETose in den PMN [7, 148, 149, 150, 151]. Dadurch wird der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert [52]. Dies führt zur Aktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten und zusätzlich zur Hemmung der Apoptose [152]. Allerdings werden durch die NETose auch inhibitorische Enzyme wie Elastase, Cathepsin G und die MPO sezerniert. Zudem induziert PMA die vermehrte Sekretion von α -Defensinen, von Arginase 1 sowie der MMP-9 [59, 153]. Es wird sowohl die Freisetzung von spezifischen als auch von azurophilen Granula gefördert [56]. Die α -Defensine wirken chemotaktisch auf naive T-Lymphozyten sowie *memory*-Zellen und fördern ihre Migration in die Lymphknoten [7, 154]. Außerdem konnte eine Aktivierung der CD4⁺-T-Lymphozyten über den NF- κ B-Signalweg beobachtet werden [142]. Im Gegensatz dazu wirken sich jedoch Arginase 1 und die MPO inhibierend auf die T-Lymphozyten-Proliferation aus [7]. Zudem bewirkt die Aktivierung mit PMA eine massive H₂O₂-Ausschüttung durch die PMN [82]. H₂O₂ oder andere ROS inhibieren stark die Aktivität und Effektivität von T-Lymphozyten, indem sie die Proliferation und Zytokin-Sekretion supprimieren [63, 67, 69, 5, 137, 155]. Die beschriebenen inhibitorischen Prozesse überwiegen nach PMA-Aktivierung die aktivierenden Mechanismen.

Der Leukozyten-Aktivator fMLP erhöht die Expression von Mac-1 in den Zellmembranen der PMN. Dies hätte in der Kokultur eine inhibitorische Wirkung. Deshalb ist die Proliferation der T-Lymphozyten in der Kokultur mit den PMN massiv supprimiert [102]. Da hier nur der zellfreie Überstand der PMN verwendet wurde, haben Zelloberflächen-Proteine keine inhibitorischen Effekte auf die T-Lymphozyten. Außerdem induziert fMLP die Sekretion der

Inhalte der azurophilen Granula, wie zum Beispiel die Arginase 1, die MPO, die Elastase, die Proteinase 3 sowie α -Defensine [58, 153]. Ebenso wird die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Zellmembran und der daraus resultierenden Freisetzung der Inhalte gefördert. Spezifische Granula werden allerdings durch die Aktivierung mit fMLP nicht mobilisiert [56]. In Abbildung 22 auf Seite 94 konnte hier gezeigt werden, dass die hyperaktivierenden Effekte die inhibitorischen dominieren.

Genau wie PMA induziert auch Ionomycin die NETose und die Sekretion von Arginase 1 in den PMN [60, 149, 150, 151]. Dennoch zeigte sich auch nach Aktivierung der PMN mit Ionomycin hier keine weitere Steigerung der Proliferation. Möglicherweise lassen die Beobachtungen der Hyperaktivierung nach Aktivierung der PMN auf eine maximale Aktivierung der T-Lymphozyten schließen, die sich durch zusätzliche Stimulation der PMN im Kontext der Sekretom-Überstandgenerierung nicht noch steigern lassen.

Eine Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten ist ein vielversprechender Ansatz der immunmodulatorischen Therapie verschiedener Tumore. Dies ist jedoch nur möglich, wenn sich der hyperaktivierende Effekt ausschließlich auf die Proliferation der T-Lymphozyten, nicht jedoch auf die Tumorzellen positiv auswirkt. Dies konnte in Abbildung 31 auf Seite 119 an drei verschiedenen Tumorzelllinien des multiplen Myeloms bestätigt werden. Durch Inkubation der Tumorzellen mit PMN-Überstand zeigte sich die gewohnte Suppression der Proliferation. Dies bestätigte, dass Tumore auf das Arginin im Medium angewiesen sind. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Arginase 1 in den Tumorzellen vermehrt Apoptose auslöst [95]. Eine gewisse Restaktivität der Proliferation blieb jedoch in den Tumorzellen auch in vollständiger Arginin-Depletion bestehen, während in den T-Lymphozyten die Proliferation vollständig supprimiert wurde. Nach Zugabe des Arginase-Inhibitors zeigten die Tumorzellen keine Hyperaktivierung, sondern lediglich eine Wiederherstellung der Proliferation auf das Niveau der konventionellen Aktivierung. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass nor-NOHA die Apoptose reduziert, die durch die Arginase 1 induziert wird [95]. Viele Studien zeigten zudem eine Steigerung der Proliferation von Tumorzellen durch PMN. Dies konnte jedoch nur im Zusammenhang mit aus dem Tumor-Mikromilieu sezernierten Zytokinen beobachtet werden. Diese induzieren die Differenzierung der PMN zu immun-supprimierenden LDN, TAN oder MDSC [58, 68, 85, 91]. Die hier verwendeten PMN stammen von gesunden Blutspendern und haben somit keine durch ein Tumor-Mikromilieu *in vivo* induzierten immun-supprimierenden, pro-tumoralen Eigenschaften.

5.3.2. Aktivierungs- und Erschöpfungs-Oberflächenmarker

Die Oberflächenproteine von Zellen kennzeichnen ihren Aktivitäts- beziehungsweise Erschöpfungszustand (*exhaustion*). Die Viabilität der T-Lymphozyten wird durch die PMN und die dadurch resultierende Arginin-Depletion nicht beeinflusst [25], ihre Aktivität jedoch schon. Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren vor allem CD25 und CD69. Dabei ist CD69 unabhängig von der Arginin-Konzentration im Medium, während die Expression von CD25 davon abhängt [25]. In Abbildung 26 auf Seite 106 konnte diese Arginin-Abhängigkeit der Expression von CD25 und das Fehlen derselben bei der Expression von CD69 bestätigt werden. Klar erkennbar ist, dass die Aktivität der T-Lymphozyten in PMN-Überstand supprimiert ist und nach Zugabe des Arginase-Inhibitors ansteigt. Die Expression von CD69 dagegen steigt sowohl mit als auch ohne Zugabe des Arginase-Inhibitors an. Dies konnte bei T-Lymphozyten nicht nur unter Einfluss der PMN, sondern auch durch TAN beobachtet werden [53]. In der Kokultur mit TAN konnte ein Anstieg der CD69-Expression festgestellt werden [126]. Auch die Suppression von CD25 durch die Arginase 1 wurde bereits beschrieben [25].

Zur Stimulation der T-Lymphozyten wurden anti-CD3/anti-CD28 gekoppelte Beads verwendet. Dadurch kam es zu dem auf Seite 105 in Abbildung 26c deutlich erkennbaren Verlust des Oberflächenproteins CD28. Der Verlust der Expression ist nach einer Stimulation mit anti-CD28 bereits beschrieben worden [156]. CD28 ist für das zweite Signal der T-Lymphozyten-Stimulation essentiell. Eine Expression von CD28 gibt die Bereitschaft der T-Lymphozyten zur T-Zell-spezifischen Aktivierung an. Klar erkennbar ist, dass die T-Lymphozyten nach Inkubation in PMN-Überstand die Expression von CD28 nicht steigern, im Gegensatz zu konventionell aktivierten T-Lymphozyten. Erstaunlicherweise zeigten die T-Lymphozyten nach Inkubation in PMN-Überstand und Zugabe des Arginase-Inhibitors eine noch schnellere und höhere Re-Expression von CD28. Von PMN-Peptiden ist bereits bekannt, dass sie die Expression von CD28 steigern können [142] und ebenfalls, dass stark proliferierende T-Lymphozyten eine hohe Expression von CD28 aufweisen [156]. Dies konnte hier bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Aktivierungs-Oberflächenproteinen und dem kostimulierenden CD28 lässt sich bei den inhibitorischen Oberflächenproteinen PD-1, TIGIT, CTLA-4 und CD160 keine signifikante Änderung der Expression nach Inkubation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit oder ohne die Zugabe des Arginase-Inhibitors erkennen (vergleiche Abbildung 26 auf Seite 106). Dies schließt eine übermäßige Induktion der Erschöpfung der T-Lymphozyten durch den PMN-Überstand und durch die Arginase 1 beziehungsweise den Arginase-Inhibitor aus.

In der Expression der Oberflächenproteine LAG-3 und TIM-3 war im Gegensatz zu den inhibitorischen Oberflächenproteinen ein Unterschied im Verhalten der T-Lymphozyten nach

Zugabe des Arginase-Inhibitors zu erkennen. Die Expression beider Oberflächenproteine nahm nach der konventionellen Aktivierung kontinuierlich zu. Genauso verhielt sie sich nach Inkubation in PMN-Überstand und Arginase-Inhibition. Ohne Arginase-Inhibition zeigte sich jedoch keine Steigerung der Expression beider Oberflächenproteine. LAG-3 und TIM-3 werden vor allem auf aktivierten, Interferon- γ sezernierenden T-Lymphozyten exprimiert, um eine übermäßige Aktivierung zu unterbinden. LAG-3 fördert die Differenzierung der T-Lymphozyten zu T_{reg}-Zellen, die ebenso eine übermäßige T-Lymphozyten-Aktivierung verhindern sollen. Das Protein wird vor allem auf CD4⁺-T-Lymphozyten exprimiert. Diese Subpopulation wurde durch die PMN stärker aktiviert (vergleiche Abbildung 15, Seite 79). Dies erklärt die beobachtete starke Zunahme der Expression. Allerdings gelten LAG-3 und TIM-3 auch als Anzeichen von dysfunktionalen und erschöpften Zellen [29]. Die verminderte Expression der beiden Oberflächenproteine nach Inkubation in PMN-Überstand ohne Arginase-Inhibitor könnte also einerseits ein Hinweis auf eine supprimierte Aktivierung der T-Lymphozyten sein. Alternativ könnte die geringe Zahl an vitalen und proliferierenden T-Lymphozyten nach Inkubation in PMN-Überstand die im Vergleich zu den anderen Bedingungen geringe Expression erklären.

CD57 ist ein Oberflächenprotein, das die Seneszenz der T-Lymphozyten anzeigt. Auch hier zeigte sich keine Induktion der Seneszenz durch den PMN-Überstand mit oder ohne Arginase-Inhibitor.

Zusammengefasst aktiviert der PMN-Überstand, wenn die Arginase 1 inhibiert wurde, die T-Lymphozyten über das Maß der konventionellen Aktivierung hinaus, ohne Zeichen einer übermäßigen Erschöpfung oder Seneszenz hervorzurufen.

5.3.3. Zytokin-Sekretion

In Kokulturen mit TAN aus frühen Stadien von Tumoren konnte bereits eine gesteigerte Interferon- γ -Sekretion der T-Lymphozyten nachgewiesen werden [53, 126]. Auch in Abbildung 25a auf Seite 101 ist klar eine gesteigerte Interferon- γ -Konzentration in den Überständen der stärker proliferierenden und aktivierten T-Lymphozyten, die in PMN-Überstand mit Arginase-Inhibitor inkubiert wurden, erkennbar. Der PMN-Überstand ohne Arginase-Inhibition suppressierte die Interferon- γ -Sekretion auf ein Minimum. Somit bestätigte sich, dass die PMN einen großen Einfluss auf die Sekretion der T-Lymphozyten ausüben können [89]. PMN-Überstand alleine suppressiert die Sekretion, während durch die Zugabe von nor-NOHA als Arginase 1-Inhibitor die Steigerung der Interferon- γ -Sekretion bestätigt werden konnte [115].

5. Diskussion

Nicht nur die Sekretion von Interferon- γ wird durch die Kokultur mit TAN stimuliert, sondern die Sekretion von vielen typischen T-Lymphozyten-Zytokinen und sogar der zytotoxischen Granula. Eine Ausnahme dieser Steigerung ist die des anti-inflammatorischen Interleukin-10, dessen Sekretion durch die TAN nicht gesteigert wird [53].

Unter dem Einfluss des PMN-Überstandes konnten neben Interferon- γ auch andere Zytokine als Arginin-abhängig detektiert werden. Die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und IL-17 stieg durch die Inkubation der T-Lymphozyten in PMN-Überstand mit Arginase-Inhibitor [157]. Die Kombination der Zytokine spricht für eine vermehrte Differenzierung der CD4⁺-T-Lymphozyten zu T_H2- und T_H17-Zellen.

5.3.4. Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der T-Lymphozyten wird durch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors gesteuert. Nach Bindung an ein Peptid, das durch die Tumorzellen auf MHC-I präsentiert wird, werden die zytotoxischen Granula der CD8⁺-T-Lymphozyten freigesetzt. Bei Aktivierung der T-Lymphozyten wird zum einen der Fas-Ligand vermehrt exprimiert. Dies ist transkriptionell gesteuert. Er bindet an den Fas-Rezeptor der Tumorzelle. Dadurch wird im Zellinneren die Apoptose-Kaskade über die Caspase 3 ausgelöst. Zum anderen sind in den zytotoxischen Granula Perforin und Granzym B gespeichert. Durch Perforin werden Kanäle in der Zellmembran der Tumorzellen gebildet. Durch diese Kanäle gelangt Granzym B ins Zellinnere und aktiviert zusätzlich die Caspase 3. Somit induzieren die T-Lymphozyten über zwei verschiedene Wege die Apoptose der Tumorzelle. Weniger häufig führen die T-Lymphozyten nicht durch Apoptose, sondern durch alternative Wege zum Zelltod der Tumorzellen [158, 159].

Auf Seite 116 in Abbildung 30 ist die Zytotoxizität von T-Lymphozyten gezeigt. Dafür wurden sie mit einem p53-Peptid₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert. Es wurden Tumorzellen verwendet, die nach exogener Peptidzugabe das p53-Peptid₂₆₄₋₂₇₂ auf MHC-I präsentieren. Die antigenspezifische Bindung und Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten vermittelt die gezielte Abtötung der Tumorzelle. Dabei reduziert p53 in der Tumorzelle zusätzlich die Expression von PDL-1. PDL-1 würde an PD-1 der T-Lymphozyten binden und deren Aktivität inhibieren [159]. Abbildung 30 zeigt deutlich, dass die T-Lymphozyten durch die Inkubation mit dem PMN-Überstand in ihrer Fähigkeit der zytotoxischen Tumorabwehr stimuliert wurden. Dabei zeigten die T-Lymphozyten, die Antigen-spezifisch aktiviert wurden unter den gewählten kurzzeitigen Assay-Bedingungen nur eine sehr mäßige Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen. Die in dem PMN-Überstand inkubierten T-Lymphozyten wurden in ihrer Zytotoxizität verstärkt stimuliert, sodass in der höchsten PMN-Konzentration und zusätzlicher Gabe des Arginase-Inhibitors nach drei Stunden circa 80% der Tumorzellen

eliminiert wurden (im Mikroskop zeigte sich optisch eine vollständige Elimination der Tumorzellen). Bekannt ist, dass in den ersten zwei Stunden der Inkubation die zytotoxische Aktivität der T-Lymphozyten am höchsten ist [160]. Auch die schlecht proliferierenden T-Lymphozyten zeigten nach Inkubation in PMN-Überstand ohne Arginase-Inhibitor eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität ab einem PMN:T-Verhältnis von 10:1. Die Unterschiede der Zytotoxizität nach Inkubation mit und ohne Arginase-Inhibitor lassen sich möglicherweise durch die zahlenmäßige Differenz der T-Lymphozyten erklären. Stark proliferierende T-Lymphozyten sind schlecht proliferierenden T-Lymphozyten zahlenmäßig und damit auch in ihrer Gesamt-Zytotoxizität überlegen. Umso erstaunlicher ist die starke Zytotoxizität der T-Lymphozyten in PMN-Überstand ohne Inhibitor im Vergleich zur alleinigen Antigen-spezifischen Aktivierung. Somit hat die Arginase 1 nur einen untergeordneten negativen Einfluss auf die Zytotoxizität. Die aktivierenden Faktoren der PMN haben dafür eine umso größere Bedeutung.

Durch das hier gewählte geringe Verhältnis der T-Lymphozyten zu den Tumorzellen von 3:1 und die kurze Inkubationszeit von drei Stunden konnte die größtmögliche Differenzierung zwischen den Antigen-spezifisch aktivierten und den in PMN-Überstand inkubierten T-Lymphozyten detektiert werden. Antigen-spezifisch aktivierte T-Lymphozyten zeigten schon in einer anderen Studie in einem höheren Verhältnis von 5:1 nach vier Stunden Inkubation lediglich eine geringe Zytotoxizität. Sie töteten ungefähr 15% der Tumorzellen [160]. Dementsprechend handelt es sich in der hier verwendeten T-Lymphozyten-Population um aktive zytotoxische T-Lymphozyten. Dies unterstreicht die Bedeutung der außergewöhnlich hohen Zytotoxizität nach der Inkubation in PMN-Überstand.

5.4. Mechanismus der Hyperaktivierung

In Studien konnte bereits mehrfach eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch Granulozyten beobachtet werden. In Kokultur von TAN oder PMN mit T-Lymphozyten konnte bereits eine gesteigerte Proliferation von CD8⁺-T-Lymphozyten beobachtet werden, wenn die T-Lymphozyten nicht optimal mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Beads stimuliert wurden. Obwohl LDN große Ähnlichkeiten mit den MDSC aufweisen [101], konnte eine T-Lymphozyten-Aktivierung durch LDN in autoimmunen Erkrankungen nachgewiesen werden (zum Beispiel bei systemischem Lupus erythematodes) [161]. Auch TAN aus frühen Stadien von Lungen-Karzinomen zeigten aktivierende Effekte auf T-Lymphozyten. Sie stimulierten die Proliferation, die Aktivierung (CD25-Expression), die Zytokin-Sekretion (Interferon- γ) und die Zytotoxizität. Dabei wurden jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen auf Seite 79 in Abbildung 15 CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten gleichermaßen beeinflusst. Auch die PMN von Patienten mit Lungen-Karzinom führten zu einer T-Lymphozyten-Aktivierung. Allerdings stimulierten sie nur deren Proliferation und nicht ihre Aktivität, Zytokin-Sekretion und Zytotoxizität [53, 93]. Diese Aktivierung basierte auf **direkten Zell-Zell-Kontakten** und konnte deshalb in einer Transwell-Platte nicht beobachtet werden. Durch die Blockade von CD54/ICAM-1 ließ sich die Stimulation reduzieren, sodass eine Beteiligung dieser Strukturen nahe liegt. Zudem konnte eine erhöhte Expression von CD54/ICAM-1 durch die PMN nachgewiesen werden. Die PMN zeigten außerdem eine erhöhte Viabilität. In einer anderen Studie konnte in der Kokultur mit den PMN und TAN sowohl eine gesteigerte Aktivität und Zytokin-Sekretion als auch eine vermehrte Differenzierung der CD8⁺ T-Lymphozyten zu *memory*-Zellen festgestellt werden [126].

In PMN kann durch Aktivierung temporär die **Expression von Antigenen auf MHC-II** sowie die Expression von CD80/CD86 ausgelöst werden. So können sie T-Lymphozyten aktivieren, genau wie APZ [63, 162]. Vor allem zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten werden dadurch aktiviert und außerdem deren Reifung und Zytokin-Produktion stimuliert [162, 163].

PMN können nicht nur wie **APZ** agieren, sondern diese zusätzlich auch **aktivieren** [5, 164, 165]. Aktivierte PMN zeigen eine vermehrte Sekretion der Chemotaxine CCL3, CCL4, CCL5 und CCL20, wodurch APZ vermehrt zu den Lymphknoten geleitet werden. Neben der Rekrutierung von APZ fördern die PMN die Zytokin-Sekretion und die Expression wichtiger Oberflächenproteine der APZ zur T-Lymphozyten-Aktivierung (zum Beispiel CD86) [5, 166, 167, 168]. Dies geschieht über direkten Zell-Zell-Kontakt der APZ mittels CD11b/CD18 der PMN [169] oder durch Enzyme, wie zum Beispiel Lactoferrin [7]. Die Reifung der APZ wird durch die Sekretion von TNF- α durch die PMN gefördert [165, 169, 170, 171]. Dies resultiert in einer vermehrten Effektivität der APZ in der

Aktivierung sowie in einer gesteigerten Proliferation der T-Lymphozyten (vor allem von T_H1-Helferzellen der CD4⁺-T-Lymphozyten [169, 172]). Unter anderen Umständen können die PMN jedoch auch die Aktivierung der APZ verhindern [165]. Hier wird erneut die Dualität der PMN im Bezug auf ihre Rolle in der Immun- und vor allem in der Tumorabwehr deutlich.

Durch die **NETose** der PMN differenzieren naive T-Lymphozyten vermehrt aus und können dann schneller und besser auf die Stimulation des T-Zell-Rezeptors reagieren [5]. Ihre Aktivität wird gesteigert, was an der erhöhten Expression von CD25 und CD69 sichtbar wird. Außerdem wird durch die NETose die Reifung der APZ stimuliert und die Expression von kostimulierenden Oberflächenproteinen wie CD80/CD86 und MHC-II gesteigert [7].

Im Gegensatz zu vielen Studien ([84, 85, 86, 87, 88]), in denen die Konzentration von PMN ein schlechter prognostischer Faktor ist, zeigte sich in kolorektalen Karzinomen die **Kombination** einer erhöhten Konzentration von **PMN** sowie **T-Lymphozyten** als **günstiger prognostischer Faktor**. Allerdings konnte hier eine Verzerrung der Ergebnisse durch Angiogenese-Mechanismen (VEGF-Konzentration) nicht ausgeschlossen werden [126].

Anti-tumorale Eigenschaften der PMN konnten unter anderem in Patienten mit kolorektalen, sowie pulmonalen Tumoren beobachtet werden. In Patienten mit hohen PMN-Konzentrationen stieg in positiver Korrelation zur Konzentration auch das Gesamtüberleben der Patienten. Dies war jedoch nicht auf eine direkte anti-tumorale Effektivität der PMN zurückzuführen, sondern auf eine gesteigerte Aktivität, Proliferation und Zytokin-Sekretion von CD8⁺-T-Lymphozyten. Patienten mit einer kombinierten Infiltration von PMN und T-Lymphozyten in den Tumor hatten eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit Infiltration lediglich einer der beiden Immunzell-Populationen. Somit zeigte sich hier eine Steigerung der anti-tumoralen Effektivität der T-Lymphozyten durch Interaktion mit den PMN in der unmittelbaren Tumor-Umgebung [126, 127].

Diese Beobachtungen stehen im völligen Gegensatz zu den inhibitorischen Mechanismen der PMN und TAN, die in Kapitel 5.2 beschrieben wurden. In Abbildung 37 sind die hier erläuterten, aktivierenden Mechanismen der PMN den inhibitorischen (vergleiche Abbildung 36 auf Seite 130) gegenübergestellt. Als Erklärung dieses Gegensatzes wird aktuell eine Entwicklung der Eigenschaften der TAN von anti-tumoral und immun-stimulierend in frühen Tumorstadien zu pro-tumoral und immun-suppressiv in späteren Tumorstadien als am wahrscheinlichsten angenommen [89, 173]. Auch in PMN wurde dieser Wandel des Einflusses auf Tumorzellen und Immunzellen bereits beobachtet. In den ersten 24 Stunden zeigten PMN eine Zytotoxizität gegen Tumorzellen und reduzierten so deren Progress. Danach jedoch proliferierten die überlebenden Tumorzellen unter dem Einfluss der PMN noch schneller

[97, 93]. Möglich ist auch, dass der Phänotyp und die Oberflächenproteine der Tumorzellen entscheidend für den Wandel der Eigenschaften der PMN sind.

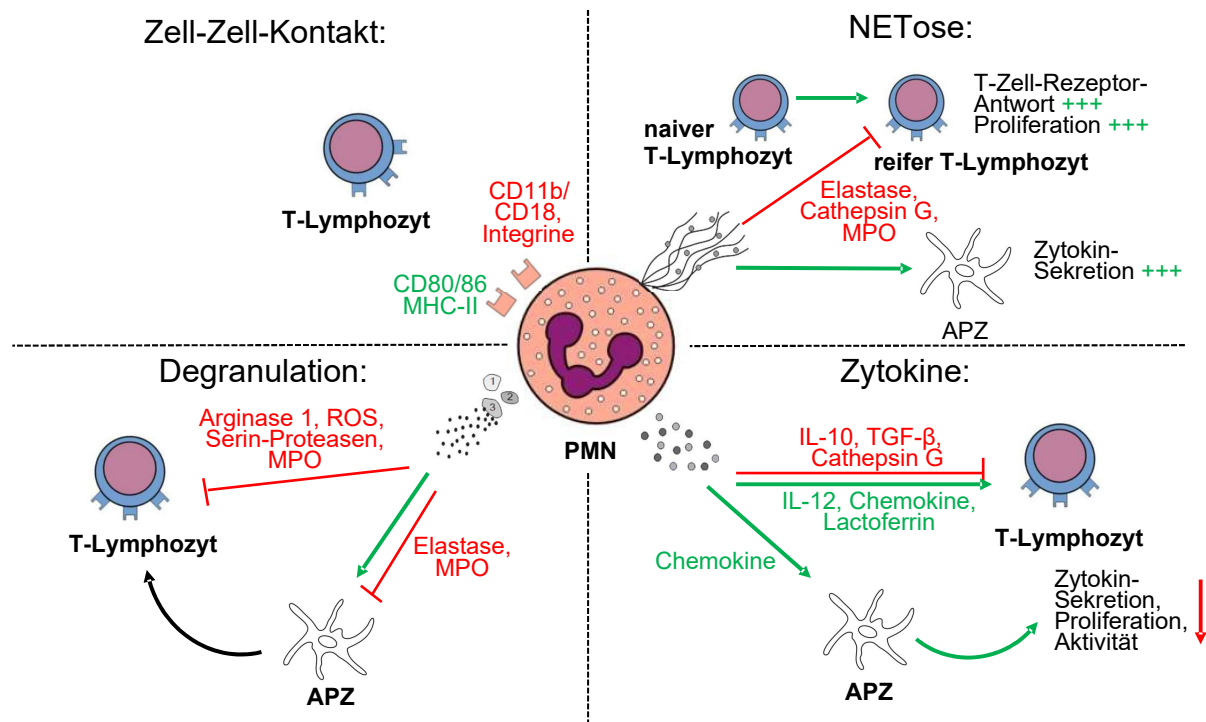


Abb. 37: Mechanismen des Einflusses der PMN auf die T-Lymphozyten: Neben den supprimierenden Eigenschaften der PMN (vergleiche Abbildung 36 auf Seite 130) können auch aktivierende Mechanismen beobachtet werden. Zytokine und Chemokine rekrutieren und aktivieren die APZ, die wiederum T-Lymphozyten aktivieren. Dies geschieht durch die Antigen-Präsentation der APZ. Auch PMN können Antigene präsentieren und so die aktivierende Rolle der APZ übernehmen. Außerdem fördern die PMN mit Hilfe der NETose die Reifung von naiven T-Lymphozyten zu ausdifferenzierten, reifen T-Lymphozyten. Ferner führt die NETose zu einer erhöhten und schnelleren T-Zell-Rezeptor-Antwort.

Ein weiterer Unterscheidungspunkt der immun-suppressiven oder immun-stimulierenden PMN ist deren Differenzierungsgrad, also die Reife der einzelnen Zelle. Hierfür ist CD10 ein geeigneter Marker. Er wird nur von reifen PMN exprimiert. Diese CD10⁺-PMN zeigen immun-suppressive Eigenschaften, während die unreifen CD10⁻-PMN immun-stimulierend agieren. Sie bewirken eine vermehrte Proliferation und Zytokin-Sekretion der T-Lymphozyten [138]. Diese Beobachtung passt zu dem oben beschriebenen Progress der PMN-Eigenschaften im zeitlichen Verlauf.

Unter optimaler Stimulation der PMN konnte im Kontext dieser Arbeit zum ersten Mal eine Hyperaktivierung von T-Lymphozyten durch nicht aktivierten PMN-Überstand beobachtet werden, der nicht durch ein Tumor-Mikromilieu geprägt, sondern aus gesunden Blutspendern generiert wurden.

Der Unterschied zwischen dieser Arbeit und den bereits publizierten Studien mit PMN und T-Lymphozyten von gesunden Spendern liegt im experimentellen Aufbau. Hier wurde der zellfreie Überstand der PMN zur Inkubation der T-Lymphozyten verwendet, während in den anderen Studien Kokulturen der beiden Zellpopulationen untersucht wurden beziehungsweise die Interaktionen von PMN-Sonikat und T-Lymphozyten. In der Kokultur ermöglichen direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen den PMN und T-Lymphozyten deren inhibitorische Interaktion [67, 6, 174] über die Oberflächenproteine CD11b/CD18 [7]. Dies erklärt, warum in den Überstands-Experimenten (vergleiche Abbildungen 12-22), in der Transwell-Kultur (vergleiche Abbildung 24 auf Seite 98) im Gegensatz zur direkten Kokultur (vergleiche Abbildung 23 auf Seite 97) eine Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten erkennbar ist [174]. Im Transwell-System sind keine direkten Zell-Zell-Kontakte möglich. Auch MDSC supprimieren T-Lymphozyten nur in der direkten Kokultur, während im Transwell-System keine Suppression detektierbar ist [175].

In den früheren Untersuchungen mit PMN-Überstand wurden keine Arginase-Inhibitoren eingesetzt. Lediglich in einer Arbeit wurde, ähnlich dem zellfreien Überstand, zellfreier Eiter mit nachweislicher Arginase 1-Aktivität zur Inkubation der T-Lymphozyten verwendet und auch die Auswirkungen der Arginase-Inhibition analysiert. In den Ergebnissen lässt sich tatsächlich eine Tendenz der Hyperaktivierung der T-Lymphozyten erkennen. Die Proliferation ist nach Zugabe des Arginase-Inhibitors höher als nach der konventionellen Aktivierung. Diese Tendenz war im dortigen Versuchsaufbau jedoch nicht statistisch signifikant. Für den zellfreien 3:1 verdünnten Eiter wurde, lässt sich naturgemäß kein vergleichbares PMN:T-Verhältnis rechnerisch ermitteln beziehungsweise abschätzen [25]. In geringen PMN:T-Verhältnissen konnte auch in dieser Arbeit keine Hyperaktivierung nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 12 auf Seite 72). Dies könnte eine Erklärung für die geringe statistische Signifikanz der Experimente mit dem zellfreien Eiter sein. Sogar in Patienten (mit Sepsis) konnte durch Arginase-Inhibition eine Erholung der T-Lymphozyten erreicht werden [115].

T-Lymphozyten gelten als einer der entscheidenden neuen therapeutischen Ansätze in der modernen Tumor-Therapie. Die Aktivierung der T-Lymphozyten und deren spezifische Prägung auf den jeweiligen Tumor des individuellen Patienten ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet. Daher wurde auch in dieser Arbeit ein Fokus auf die Aufklärung des Mechanismus der Hyperaktivierung der T-Lymphozyten durch den PMN-Überstand gelegt. Die Hoffnung der aktuellen Forschung liegt in der Übertragung der Erkenntnisse in die praktische Tumorthherapie. Durch die Verwendung lediglich des zellfreien Überstandes der PMN konnten direkte Zell-Zell-Kontakte der beiden Zellpopulationen verhindert werden. Somit entfällt diese Möglichkeit als Erklärung der beobachteten Hyperaktivierung. Im Folgenden sind weitere aktivierende Mechanismen und ihre Plausibilität für die beobachtete Hyperaktivierung erörtert.

5.4.1. Arginin-Stoffwechsel

Eine simple Erklärung der Hyperaktivierung wäre eine erhöhte Sensitivität der T-Lymphozyten nach Inkubation im PMN-Überstand gegenüber dem vorhandenen Arginin. Diese Theorie konnte jedoch durch den Einsatz supra-physiologischer Konzentrationen in Abbildung 17 auf Seite 84 ausgeschlossen werden. Durch supra-physiologische Arginin-Konzentrationen (500 μM und 1000 μM) zeigte sich keine verstärkte Hyperaktivierung der T-Lymphozyten. Es konnte lediglich der Suppression durch den PMN-Überstand ohne Arginase-Inhibitor vorgebeugt werden. Die Hyperaktivierung selbst blieb jedoch von dem Arginin-Überschuss im Medium unbeeinflusst.

Zwischen den beiden strukturell verschiedenen Inhibitoren konnte kein signifikanter Unterschied in der Hyperaktivierung festgestellt werden. Dadurch konnten Inhibitor-spezifische unbekannte aktivierende Nebeneffekte weitgehend ausgeschlossen werden. Zudem konnten bei den verwendeten Konzentrationen keine toxischen Effekte der beiden Inhibitoren beobachtet werden. Im Konflikt dazu stehen die Beobachtungen in der direkten Kokultur sowie in der Transwell-Kultur. In beiden Experimenten zeigte sich eine deutliche Inhibition der Proliferation der T-Lymphozyten in konventioneller Aktivierung bei Zugabe von nor-NOHA (vergleiche Abbildung 23, Seite 97 und Abbildung 24, Seite 98). Diese Suppression könnte möglicherweise doch auf eine gewisse Toxizität des Inhibitors nor-NOHA hinweisen. Die T-Lymphozyten sind in diesen Experimenten direkt nach der Isolierung eingesetzt worden. Im Gegensatz dazu gab es bei den Überstand-Experimenten immer eine 72-stündige Ruhephase. Es ist durchaus möglich, dass die T-Lymphozyten direkt nach der Isolierung vulnerabler sind.

In verschiedenen Maus-Experimenten konnte allerdings keine Toxizität des Inhibitors nachgewiesen werden [70, 118, 147, 176]. Lediglich in Tumorzellen konnte ein negativer Einfluss von nor-NOHA beobachtet werden. Im hepatozellulären Karzinom zeigte sich eine gesteigerte Apoptose sowie eine verminderte Invasion und Migration. Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Aktivität der iNOS und der damit gesteigerten Konzentration von NO zurückzuführen [177]. Auch in Tumorzellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie ließen sich inhibitorische *off-target* Effekte von nor-NOHA erkennen, die nicht auf die Inhibition der Arginase 2 zurückzuführen waren (Arginase 2 ist in der chronischen myeloischen Leukämie deutlich aktiver als die Arginase 1) [178]. In den T-Lymphozyten konnten allerdings bisher keine dieser *off-target* Effekte von nor-NOHA beobachtet werden. Die Ursache der Abnahme der Proliferation der T-Lymphozyten verbleibt also bisher ungeklärt.

Ein *off-target*-Effekt des Enzyms selbst konnte durch den Einsatz einer rekombinanten Arginase 1 ebenfalls ausgeschlossen werden, da durch das rekombinante Enzym bei gleichzeitiger Arginase-Hemmung keine Hyperaktivierung ausgelöst werden konnte.

5.4.2. Granula der PMN

Während die vollständige Suppression durch die Arginase 1 erst nach 48 Stunden der Inkubation der PMN zur Überstandgenerierung beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 18 auf Seite 86), war die Hyperaktivierung der Proliferation im PMN-Überstand mit nor-NOHA schon deutlich früher erkennbar. Schon nach fünf Minuten der Inkubation der PMN im Medium und anschließender Inkubation der T-Lymphozyten für 48 Stunden ließ sich ein deutlicher Anstieg der Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung nachweisen (vergleiche Abbildung 21 auf Seite 92). Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese, dass Faktoren, die durch die PMN sezerniert werden, für die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten verantwortlich sein könnten.

Nachweislich setzen PMN durch Aktivierung, Inflammation und Apoptose ihre Granula und andere zytoplasmatische Zytokine frei [25, 55, 74]. Diese Stoffe sind in dem generierten Überstand vorhanden und können mit den T-Lymphozyten während der 48-stündigen Inkubationszeit interagieren. Dabei könnten sie die T-Lymphozyten direkt aktivieren oder indirekt die Sekretion von auto-aktivierenden Zytokinen wie zum Beispiel IL-2 stimulieren. Die Migration der T-Lymphozyten wird beispielsweise durch die α -Defensine der PMN gesteigert [153, 179]. Die Inhalte der PMN-Granula spielen in der frühesten Phase der humanen Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Dabei werden zuerst die Inhalte der sekretorischen Vesikel und der Gelatinase-haltigen Granula sezerniert [55, 56, 57, 58]. Diese enthalten unter anderem CD16, Mac-1, VAMP2, SNAP-23, Gelatinase, den Komplementfaktor 1, GPI-180 und Lysozym (vergleiche Kapitel 2.1.2.2). Alle membranständigen Proteine scheiden als hyperaktivierende Faktoren aus, denn sie sind im Überstand der PMN nicht enthalten. Möglicherweise könnten lösliche Faktoren dieser beiden Speicher-Vesikel für die Hyperaktivierung verantwortlich sein. Die PMN wurden in den fünf Minuten der Inkubation nicht aktiviert und somit nicht zur Freisetzung ihrer Granula stimuliert. Am ehesten handelt es sich somit um einen kontinuierlich sezernierten Faktor. Wobei hier angefügt werden muss, dass während der Isolation (beschrieben in Kapitel 3.2.2) eine unspezifische Aktivierung der PMN nicht ausgeschlossen werden konnte. Da die Hyperaktivierung durch PMN-Sonikat nicht erreicht werden konnte, lässt sich aktuell lediglich spekulieren, ob die hyperstimulierenden Faktoren der PMN instabil sind und deshalb durch die Sonifikation zerstört wurden.

Eine sehr schnelle Interaktion durch humorale Faktoren konnte auch zwischen T-Lymphozyten und MDSC beschrieben werden. Mit Hilfe von zytosolischen Bestandteilen und direkten Zell-Zell-Kontakten verursachen die MDSC eine Paralyse des Metabolismus der zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten innerhalb von nur 30 Minuten. Dies umfasst den Glukose-Metabolismus,

5. Diskussion

die oxidative Phosphorylierung sowie die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , Interferon- γ , und Granzym B. Als entscheidendes Molekül konnte Methylglyoxal identifiziert werden, welches schon nach kurzer Zeit durch die MDSC sezerniert wird und bereits nach 10 Minuten in den T-Lymphozyten detektierbar ist. Interessanterweise interagiert Methylglyoxal mit intrazellulärem Arginin in den T-Lymphozyten und führt zu dessen Metabolisierung. Neben Arginin wird durch Methylglyoxal auch Glutamin intrazellulär depletiert, was synergistisch zur weiteren Suppression der T-Lymphozyten führt [175]. Somit konnte hier ein sehr schneller Transfer von Substanzen zwischen unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden.

5.4.3. Zytokine

Eine weitere Möglichkeit der Hyperaktivierung liegt in den sezernierten Zytokinen der PMN. Diese könnten die T-Lymphozyten direkt aktivieren, wie es zum Beispiel von IL-12 bereits bekannt ist. IL-12 wird auch von APZ sezerniert [5]. Alternativ wäre es möglich, dass die PMN eine auto-aktivierende Kaskade in den T-Lymphozyten initiieren. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist das dritte stimulatorische Signal, die Sekretion von IL-2. Die Zytokine können konstitutiv gebildet und im Zytosol gespeichert werden. Dadurch können sie im Falle der Apoptose der PMN sehr schnell freigesetzt werden [75, 74, 58]. Dies ist zum Beispiel der Fall bei MIF und IL-16. Alternativ dazu werden die Zytokine nach der Aktivierung *de novo* gebildet. Sezerniert werden sie entweder passiv durch die Zellmembran, aktiv über Transporter oder sie werden wie IL-1ra aktiv über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat exozytiert [73].

Mit Hilfe des *cytokine arrays* konnten die auf Seite 124 in Abbildung 34 aufgezählten Zytokine im PMN- und T-Lymphozyten-Überstand detektiert werden. Am ehesten sind durch die PMN-sezernierte und weniger durch die T-Lymphozyten sezernierte Zytokine für die Hyperaktivierung verantwortlich (vergleiche Kapitel 4.5.1). Dabei konnten folgende vier Zytokine ausfindig gemacht werden: MIF, IL-1ra, IL-8 und IL-16.

MIF wurde ursprünglich als ein Migrations-hemmender Faktor entdeckt, der durch T-Lymphozyten sezerniert wird. Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren verstärkt MIF und verhindern dadurch die unkoordinierte Migration von Makrophagen. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass auch Makrophagen und Granulozyten MIF sezernieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Sekretion von MIF auch die Aktivität von T-Lymphozyten reguliert wird. Durch hohe Konzentrationen von MIF wird die Proliferation und die Zytokin-Sekretion von IL-2 und Interferon- γ stimuliert. Zudem soll MIF eine Rolle in der Kommunikation zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten spielen [15, 180].

IL-16 wurde zunächst als Chemotaxin der T-Lymphozyten entdeckt und wird deshalb auch als der *lymphocyte chemoattractant factor* bezeichnet. Das Zytokin wird zunächst in der Vorstufe pro-IL-16 sezerniert. Beide Formen, das pro-IL-16 und das IL-16, sind bioaktive Moleküle. Das pro-IL-16 wirkt als Transkriptions-Repressor und induziert den G₀-Arrest der T-Lymphozyten. Nach Aktivierung wird pro-IL-16 zu IL-16 aktiviert und die Immunzelle geht in die aktive Phase des Zellzyklus über [181]. IL-16 interagiert direkt mit CD4 und CD9 der T-Lymphozyten und wirkt sich dort positiv auf die Zellmotilität und das Zellwachstum aus. Außerdem stimuliert IL-16 die Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten und deren Migration zum Ort der Entzündung [182]. IL-16 induziert eine gesteigerte Expression des IL-2-Rezeptors. In Kombination mit IL-2 und IL-15 konnte eine vermehrte Proliferation der T-Lymphozyten beobachtet werden [183].

Es sind jedoch auch inhibitorische Wirkungen von IL-16 bekannt. Kommt es zur Bindung von IL-16 an CD4 ohne die Aktivierung des T-Lymphozyten durch die APZ werden T-Zell-vermittelte Aktivierungs-Signale inhibiert [184]. Zudem konnte beobachtet werden, dass erhöhte IL-16-Konzentrationen im Serum mit einer Tumor-Progression in verschiedenen Tumor-Erkrankungen wie zum Beispiel dem multiplen Myelom korrelieren. Außerdem konnte ein vermehrtes Tumorwachstum durch erhöhte IL-16-Konzentrationen beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass IL-16 als Wachstumsfaktor für maligne CD9⁺-Plasmazellen und CD4⁺-Tumor-assoziierte Makrophagen fungiert [181].

IL-8 interagiert als früher Aktivierungs- und Differenzierungs-Faktor mit den T-Lymphozyten [180]. Es wird von ruhenden und sogar verstärkt von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert. In ruhenden T-Lymphozyten hat IL-8 jedoch keine Auswirkung auf den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten. IL-8 induziert eine gesteigerte IL-2-Produktion in aktivierten T-Lymphozyten. Dagegen wird die IL-10-Sekretion der aktivierten Immunzellen inhibiert. Somit zeigen sich pro-inflammatorische Effekte von IL-8. Die Interferon- γ -Sekretion wird durch IL-8 nicht beeinflusst. Durch sehr hohe Konzentrationen von IL-8 können aktivierte T-Lymphozyten allerdings auch in ihrer Aktivität gehemmt werden [185]. In PMN induziert IL-8 die Sekretion des *cationic antimicrobial protein 37*/Azurocidin und von α -Defensinen. Diese Proteine wirken vor allem auf immunkompetente T-Lymphozyten chemotaktisch [153]. Allerdings induziert IL-8 auch die Sekretion von Arginase 1 [103]. Dies ist eine anti-inflammatorische Eigenschaft des Zytokins, weshalb es nicht eindeutig als rein pro-inflammatorisch bezeichnet werden kann.

Im Gegensatz zu den drei oben beschriebenen Zytokinen ist IL-1ra ein anti-inflammatorisches Zytokin. Durch die Bindung an den IL-1-Rezeptor fungiert es als Gegenspieler von IL-1 α und IL-1 β [186]. Induziert wird die Expression von IL-1ra durch IL-1 selbst oder andere Zytokine wie IL-4 und IL-10, die ebenfalls anti-inflammatorisch wirken [73]. Das Fehlen von

5. Diskussion

IL-1ra resultiert in Autoimmunerkrankungen, beispielsweise der rheumatoiden Arthritis [187]. Außerdem wird es bei fieberhaften Infektionen vermehrt ausgeschieden. Eine Blockade der Proliferation der T-Lymphozyten konnte nicht nachgewiesen werden [188]. Im Gegenteil wirkt IL-1ra der zellulären Seneszenz entgegen [89]. Da IL-1ra als Gegenspieler von IL-1 bekannt ist, sind die immunologischen Wirkungen von IL-1 zum besseren Verständnis der Wirkung von IL-1ra entscheidend. IL-1 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das Fieberreaktionen auslöst, die Kortison-Produktion steigert und in der Leber die Produktion von akute Phase Proteinen sowie Komplement-Faktoren induziert. Somit ist IL-1 ein potenter Aktivator der angeborenen Immunität. Zudem wird die adaptive Immunreaktion in Form der T-Lymphozyten stimuliert. IL-1 steigert die Proliferation und Aktivität der T-Lymphozyten vor allem von T_H2 - und T_H17 -Zellen. Zudem wird die Differenzierung der T-Lymphozyten in T_H17 -Zellen priorisiert [73, 189].

Als pro-inflammatorisch und möglicherweise T-Lymphozyten-aktivierende Zytokine bleiben somit IL-16, MIF und IL-8 übrig. Da der/die hyperaktivierende(n) Faktor(en) bereits nach 5 Minuten Inkubation im Überstand der PMN enthalten sind und eine Hyperaktivierung der Proliferation der T-Lymphozyten auslösen, wird eine Beteiligung der im Zytosol gespeicherten Zytokine MIF und IL-16 wahrscheinlich. Zudem ist eine benötigte Modifikation der Faktoren abzuwägen, da keine Hyperaktivierung durch das PMN-Sonikat detektierbar war [25]. Da IL-16 als Vorstufe des pro-IL-16 gespeichert wird und erst durch die PMN umgewandelt werden muss, zeigt sich hier eine schlüssige Erklärung.

In der experimentellen Validierung konnten die erläuterten vier Zytokine, die in Abbildung 35 auf Seite 125 dargestellt sind, jedoch keine Hyperaktivierung in den T-Lymphozyten auslösen. Weder alleine, noch in jeder möglichen Kombination untereinander induzierten die Zytokine in den T-Lymphozyten eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zur konventionellen Aktivierung. Möglicherweise agieren sie lediglich in der Kombination mit anderen durch die PMN oder auch die T-Lymphozyten selbst sezernierten Zytokinen. Oder aber es findet eine bisher unbekannte Modifikation der Zytokine im Überstand statt. Eine andere, wahrscheinliche Erklärung wäre, dass die hyperaktivierenden Faktoren in dem verwendeten *cytokine array* nicht inkludiert und somit nicht detektierbar waren.

5.5. Therapeutische Möglichkeiten

Die Arginin-Depletion durch Arginase 1, welche durch immun-suppressive PMN, MDSC oder die Tumorzellen selbst sezerniert wird, inhibiert die Immunantwort der T-Lymphozyten. Aktivität, Proliferation und Zytotoxizität werden in hohem Maße supprimiert, sodass eine effektive Immunabwehr durch die T-Lymphozyten nicht mehr möglich ist. Die Arginase-Inhibition eröffnet daher eine Perspektive zur therapeutischen Nutzung, zur Reaktivierung des Immunsystems und zur aktiven Bekämpfung von Tumoren.

Im Maus-Modell zeigte sich wie auch beim Menschen eine vermehrte Arginase 1-Konzentration durch gesteigerte Sekretion des Enzyms durch MDSC. Durch Gabe der Arginase-Inhibitoren CB-1158 und nor-NOHA zeigte sich in Mäusen eine Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem konnte eine vermehrte Aktivität und Konzentration von Immunzellen in der unmittelbaren Tumor-Umgebung nachgewiesen werden. Dies galt vor allem für aktivierte (CD25⁺-)CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen. Des Weiteren zeigte sich eine verminderte Aktivität und Konzentration von MDSC. Dadurch ist das Immunsystem aktiv und in der Lage den Tumor zu bekämpfen, wodurch sich die Reduktion der Tumor-Progression erklären lässt [70, 190].

Auch in Ratten konnte durch die Gabe von nor-NOHA die Häufigkeit von Tumoren und die Tumor-Progression gesenkt werden. Die Gesamtsterblichkeit der mit dem Inhibitor behandelten Ratten sank signifikant. Die Inhibition der Arginase 1 resultierte neben dem Ausbleiben der Arginin-Depletion auch in einer Senkung der H₂O₂-Konzentration beziehungsweise geringerer NO- und Polyamin-Konzentrationen im Blut. Dies inhibiert die Tumor-Progression [191, 192]. In der Langzeit-Behandlung von Ratten konnte nor-NOHA zusätzlich zu dem anti-tumoralen Effekt auch das kardio-vaskuläre Risiko senken. Dazu gehören eine Reduktion des Blutdrucks, eine Verbesserung der vaskulären Funktion sowie die Senkung von kardialer Fibrose [147]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine vermehrte Expression oder Aktivität der Arginase 1 durch Verringerung der endothelialen Argininkonzentration und in der Folge der Senkung der NO-Verfügbarkeit mit einer vaskulären Dysfunktion assoziiert ist. Daraus entwickelten sich im Maus-Modell Hypertension (auch pulmonale Hypertension), Arteriosklerose, Diabetes, erektile Dysfunktionen, Myokardischämie und Fettleibigkeit. Außerdem schritt der Alterungsprozess beschleunigt voran [122].

Eine Tumor-Reduktion durch Arginase-Inhibitoren war somit im Maus- und im Ratten-Modell bereits erfolgreich. Neben den Effekten gegenüber den Tumorzellen müssen natürlich auch die Nebenwirkungen eines Medikaments auf den Organismus identifiziert und abgewogen werden. Nebenwirkungen durch die Arginase-Inhibition wären am ehesten in der Leber zu

5. Diskussion

erwartet gewesen. Hier ist die Arginase 1 eines der Schlüsselenzyme im Harnstoffzyklus. Jedoch konnte eine Hepatotoxizität in den Maus-Modellen nicht beobachtet werden [122]. Wahrscheinlich ist dies auf die Eigenschaft der Arginase-Inhibitoren zurückzuführen, schlecht über Zellmembranen zu transferieren und daher nur extrazelluläre Arginase wirksam zu inhibieren. Die hepatische Arginase 1 ist somit für die Inhibitoren nicht gut erreichbar. Daher wurde die Gabe der Arginase-Inhibitoren von den Mäusen gut toleriert [70, 118, 147]. So konnte eine Möglichkeit geschaffen werden, die Arginin-Konzentration im Tumor-Mikromilieu für die T-Lymphozyten zu erhöhen, ohne gastrointestinale Nebenwirkungen und Oszillationen durch die supraphysiologische orale Substitution von Arginin hervorzurufen.

Eine weitere Steigerung der Effektivität der Reduktion der Tumor-Progression bis hin zur Tumor-Reduktion und verminderten Metastasen-Bildung konnte durch die Kombination des Arginase-Inhibitors CB-1158 mit Checkpoint-Inhibitoren (anti-PD-1 oder anti-CTLA-4), mit zellulärer Immuntherapie und mit Chemotherapie erreicht werden. Möglicherweise könnte so bei Immuntherapie-resistenten Patienten durch die Reduktion der Immunsuppression und Aktivierung der Immunabwehr eine Reaktion auf die Immuntherapie bewirkt werden [70].

Bereits im August 2019 startete die erste klinische Phase 1/2 Studie, in der im multiplen Myelom die Kombination von CB-1158 und der subcutanen Daratumumab-Gabe (bindet an CD38 und induziert den Zelltod der Tumorzellen) mit der alleinigen subcutanen Daratumumab-Gabe verglichen wird (EudraCT 2018-004076-35). Außerdem wird CB-1158 alleine oder in Kombination mit Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) in fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen in einer klinischen Phase 1/2 Studie getestet (NCT02903914). Somit sind therapeutische Ansätze der Arginase-Inhibition in Tumor-Patienten ein vielversprechender Ansatz in der modernen Immunmodulation.

6. Zusammenfassung

Die Tumor-induzierte Immunsuppression ist eine der wesentlichen Hürden einer effektiven Tumorelimination. Hierbei wandern unter anderem myeloische Suppressorzellen (MDSC) ins Tumor-Mikromilieu ein, supprimieren potentiell antitumoral wirksame T-Lymphozyten und verhindern so die Elimination der malignen Zellen durch die Immunabwehr. Interessanterweise können auch physiologische neutrophile Granulozyten (PMN) MDSC-Eigenschaften aufweisen und immunsuppressiv wirken: bei Kokulturen von PMN und T-Lymphozyten zeigte sich eine deutliche Inhibition der Proliferation und Aktivität der T-Lymphozyten.

Als ein zentraler Mechanismus der T-Lymphozyten-Suppression durch myeloische Zellen konnte das Enzym Arginase 1 nachgewiesen werden. Sie wird konstitutiv in MDSC und PMN exprimiert, kann aber auch – je nach Tumormodell – einer Expressions-Regulation unterliegen. Arginase 1 metabolisiert Arginin in der Umgebung des Tumors beziehungsweise potentiell auch systemisch. PMN können Arginase 1 nach Aktivierung oder im Rahmen der zellulären Apoptose freisetzen. Im Arginin-Mangel sind Proliferation und Effektorfunktionen der T-Lymphozyten stark beeinträchtigt.

Durch eine Arginase-Inhibition konnte in verschiedenen Tumor-Modellen die Suppression der T-Lymphozyten verhindert und deren Aktivität erneut auf das normale Niveau angehoben werden.

In dieser Arbeit konnte in einem Modell unter Verwendung des zellfreien PMN-Überstandes erstmalig durch Arginase-Inhibition eine sehr starke Hyperaktivierung der T-Lymphozyten gezeigt werden. Dazu wurden die T-Lymphozyten und PMN nicht als Kokultur inkubiert, sondern die T-Lymphozyten wurden in zellfreiem Überstand der PMN aktiviert.

Die Aktivierung der T-Lymphozyten in PMN-Überstand wird durch die Arginase-vermittelte Arginin-Depletion vollständig inhibiert. Im Gegensatz dazu konnte durch die Verwendung eines Arginase-Inhibitors in diesem an die physiologische Realität adaptierten Modell eine starke Aktivierung der Proliferation, der Sekretion bestimmter Zytokine (unter anderem Interferon- γ), der Expression eines dezidiert aktivierten Phänotyps sowie der antigenspezifischen Zytotoxizität der T-Lymphozyten ermöglicht werden. Die Hyperaktivierung war

6. Zusammenfassung

sowohl in CD4⁺- als auch in CD8⁺-T-Lymphozyten nachweisbar und korrelierte positiv mit der Konzentration der für den Überstand eingesetzten PMN. Durch den Einsatz strukturell verschiedener Inhibitoren und methodisch anderer Assays konnten systematische Fehler und *off-target*-Effekte ausgeschlossen und die Hyperaktivierung klar auf einen Faktor bzw. auf mehrere Faktoren im Überstand der PMN zurückgeführt werden.

Die T-Lymphozyten-hyperaktivierende Potenz war bereits nach sehr kurzen PMN-Inkubationszeiten im Überstand zumindest partiell nachweisbar, was auf einen schnellen Sekretionsprozess (aus schnell mobilisierbaren Granula und /oder dem Zytosol) schließen lässt. Konventionelle Sekretagoga konnten allerdings keine weitere Verstärkung induzieren. Mittels *cytokine array* konnten vier vor allem durch die PMN sezernierte Zytokine identifiziert werden: MIF, IL-1ra, IL-8 und IL-16. Keines dieser vier Zytokine konnte jedoch alleine oder in Kombination eine Hyperaktivierung der T-Lymphozyten auslösen. Als nächstes gilt es daher nun den Mechanismus der Hyperaktivierung weiter zu erforschen und die T-Lymphozyten-hyperstimulierende Aktivität humaner PMN molekular zu identifizieren.

Die hier erstmals beschriebene Hyperaktivierung der T-Lymphozyten unter Arginin-Suffizienz mittels Arginase-Inhibition ist ein möglicher vielversprechender Ansatz in der modernen Immuntherapie von Tumoren.

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit sind teilweise publiziert in: Vonwirth V et al. *Inhibition of Arginase 1 Liberates Potent T Cell Immunostimulatory Activity of Human Neutrophil Granulocytes. Frontiers in Immunology. 2021;11(3823) [157]*

Literaturverzeichnis

- [1] Herold G.
Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung; 2021.
- [2] Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al.
Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards [Journal Article].
Nat Commun. 2016;7:12150.
- [3] Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al.
Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity [Journal Article].
Blood. 2005;105(6):2549-56.
- [4] Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC.
L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression [Journal Article].
Blood. 2007;109(4):1568-73.
- [5] Kalyan S, Kabelitz D.
When neutrophils meet T cells: beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential [Journal Article].
Eur J Immunol. 2014;44(3):627-33.
- [6] Yang TH, St John LS, Garber HR, Kerros C, Ruisaard KE, Clise-Dwyer K, et al.
Membrane-Associated Proteinase 3 on Granulocytes and Acute Myeloid Leukemia Inhibits T Cell Proliferation [Journal Article].
J Immunol. 2018;201(5):1389-99.
- [7] Minns D, Smith KJ, Findlay EG.
Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents [Journal Article].
Mediators Inflamm. 2019;2019:8968943.
- [8] Murphy K, Waever C.
Janeway Immunologie (9. Auflage).
Springer Spektrum; 2018.
- [9] Nagel T, Kalden JR, Manger B.

- [Regulation of T-cell activation by CD28 and CTLA-4] [Journal Article].
Med Klin (Munich). 1998;93(10):592-7.
- [10] Maclver NJ, Michalek RD, Rathmell JC.
Metabolic regulation of T lymphocytes [Journal Article].
Annu Rev Immunol. 2013;31:259-83.
- [11] Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R.
Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2002;2(4):251-62.
- [12] Zhu J.
T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity [Journal Article].
Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(10).
- [13] Hirahara K, Nakayama T.
CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm [Journal Article].
Int Immunol. 2016;28(4):163-71.
- [14] Bour-Jordan H, Blueston JA.
CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals [Journal Article].
J Clin Immunol. 2002;22(1):1-7.
- [15] Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al.
An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation [Journal Article].
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(15):7849-54.
- [16] Chen J, Guan L, Tang L, Liu S, Zhou Y, Chen C, et al.
T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases [Journal Article].
DNA Cell Biol. 2019;38(10):1040-7.
- [17] Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U.
Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function [Journal Article].
J Immunol Methods. 2004;293(1-2):127-42.
- [18] Masopust D, Schenkel JM.
The integration of T cell migration, differentiation and function [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2013;13(5):309-20.
- [19] Trinchieri G.

- Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2003;3(2):133-46.
- [20] Esterházy D, Loschko J, London M, Jove V, Oliveira TY, Mucida D.
Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance [Journal Article].
Nat Immunol. 2016;17(5):545-55.
- [21] Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E.
Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells [Journal Article].
Immunobiology. 2003;207(2):85-93.
- [22] Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR.
The activation antigen CD69 [Journal Article].
Stem Cells. 1994;12(5):456-65.
- [23] Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O.
IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets [Journal Article].
J Allergy Clin Immunol. 2009;123(4):758-62.
- [24] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.
Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [Journal Article].
J Immunol. 1995;155(3):1151-64.
- [25] Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, et al.
Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase [Journal Article].
Blood. 2006;108(5):1627-34.
- [26] Catakovic K, Klieser E, Neureiter D, Geisberger R.
T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy [Journal Article].
Cell Commun Signal. 2017;15(1):1.
- [27] Joller N, Kuchroo VK.
Tim-3, Lag-3, and TIGIT [Journal Article].
Curr Top Microbiol Immunol. 2017;410:127-56.
- [28] Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al.
The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells [Journal Article].

- Nat Immunol. 2009;10(1):48-57.
- [29] Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK.
Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation [Journal Article].
Immunity. 2016;44(5):989-1004.
- [30] Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al.
PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2 [Journal Article].
Eur J Immunol. 2002;32(3):634-43.
- [31] Maçon-Lemaître L, Triebel F.
The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells [Journal Article].
Immunology. 2005;115(2):170-8.
- [32] Das M, Zhu C, Kuchroo VK.
Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity [Journal Article].
Immunol Rev. 2017;276(1):97-111.
- [33] Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK.
TIM3 comes of age as an inhibitory receptor [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2020;20(3):173-85.
- [34] Liu W, Garrett SC, Fedorov EV, Ramagopal UA, Garforth SJ, Bonanno JB, et al.
Structural Basis of CD160:HVEM Recognition [Journal Article].
Structure. 2019;27(8):1286-95.e4.
- [35] Tan CL, Peluso MJ, Drijvers JM, Mera CM, Grande SM, Brown KE, et al.
CD160 Stimulates CD8(+) T Cell Responses and Is Required for Optimal Protective Immunity to *Listeria monocytogenes* [Journal Article].
Immunohorizons. 2018;2(7):238-50.
- [36] El-Far M, Pellerin C, Pilote L, Fortin JF, Lessard IA, Peretz Y, et al.
CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses [Journal Article].
J Transl Med. 2014;12:217.
- [37] Lichtenegger FS, Rothe M, Schnorfeil FM, Deiser K, Krupka C, Augsberger C, et al.
Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells [Journal Article].
Front Immunol. 2018;9:385.
- [38] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al.
Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection [Journal Article].

- Nat Immunol. 2009;10(1):29-37.
- [39] Wherry EJ, Kurachi M.
Molecular and cellular insights into T cell exhaustion [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2015;15(8):486-99.
- [40] Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SL, Larbi A.
CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes [Journal Article].
Cancer Immunol Immunother. 2016;65(4):441-52.
- [41] Hu Z, Zou Q, Su B.
Regulation of T cell immunity by cellular metabolism [Journal Article].
Front Med. 2018;12(4):463-72.
- [42] Beckermann KE, Dudzinski SO, Rathmell JC.
Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment [Journal Article].
Cytokine Growth Factor Rev. 2017;35:7-14.
- [43] Werner A, Pieh D, Echchannaoui H, Rupp J, Rajalingam K, Theobald M, et al.
Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic
Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability [Journal Article].
Front Oncol. 2019;9:1268.
- [44] Ren W, Liu G, Yin J, Tan B, Wu G, Bazer FW, et al.
Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation [Journal Article].
Cell Death Dis. 2017;8(3):e2655.
- [45] Werner A, Amann E, Schnitzius V, Habermeier A, Luckner-Minden C, Leuchtner N,
et al.
Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human
T-cell proliferation [Journal Article].
Eur J Immunol. 2016;46(1):92-103.
- [46] Ananieva EA, Powell JD, Hutson SM.
Leucine Metabolism in T Cell Activation: mTOR Signaling and Beyond [Journal Article].
Adv Nutr. 2016;7(4):798s-805s.
- [47] Ma EH, Bantug G, Griss T, Condotta S, Johnson RM, Samborska B, et al.
Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion [Journal Article].
Cell Metab. 2017;25(2):482.
- [48] Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, et al.
Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T
lymphocyte activation [Journal Article].
J Immunol. 2010;185(2):1037-44.

- [49] Edinger AL, Thompson CB.
Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability [Journal Article].
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(3):1107-9.
- [50] Dong C, Fu T, Ji J, Li Z, Gu Z.
The role of interleukin-4 in rheumatic diseases [Journal Article].
Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018;45(8):747-54.
- [51] Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al.
Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1"versus "N2" TAN [Journal Article].
Cancer Cell. 2009;16(3):183-94.
- [52] Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A, Templeton AJ.
Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies [Journal Article].
Mol Cancer. 2017;16(1):137.
- [53] Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, et al.
Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer [Journal Article].
J Clin Invest. 2014;124(12):5466-80.
- [54] Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V.
Coordinated regulation of myeloid cells by tumours [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2012;12(4):253-68.
- [55] Cowland JB, Borregaard N.
Granulopoiesis and granules of human neutrophils [Journal Article].
Immunol Rev. 2016;273(1):11-28.
- [56] Faurschou M, Borregaard N.
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation [Journal Article].
Microbes Infect. 2003;5(14):1317-27.
- [57] Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K.
Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins [Journal Article].
Trends Immunol. 2007;28(8):340-5.
- [58] Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O.
Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines [Journal Article].
Trends Immunol. 2019;40(7):648-64.
- [59] Jacobsen LC, Theilgaard-Mönch K, Christensen EI, Borregaard N.

- Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils [Journal Article].
Blood. 2007;109(7):3084-7.
- [60] Rotondo R, Bertolotto M, Barisione G, Astigiano S, Mandruzzato S, Ottonello L, et al. Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2011;89(5):721-7.
- [61] Morris J S M.
Arginine: master and commander in innate immune responses [Journal Article].
Sci Signal. 2010;3(135):pe27.
- [62] de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM.
NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship [Journal Article].
Cell Mol Immunol. 2019;16(1):19-27.
- [63] Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM.
Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? [Journal Article].
Trends Immunol. 2009;30(11):522-30.
- [64] Mishalian I, Granot Z, Fridlender ZG.
The diversity of circulating neutrophils in cancer [Journal Article].
Immunobiology. 2017;222(1):82-8.
- [65] Leliefeld PH, Koenderman L, Pillay J.
How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses [Journal Article].
Front Immunol. 2015;6:471.
- [66] Tak T, Rygiel TP, Karnam G, Bastian OW, Boon L, Viveen M, et al.
Neutrophil-mediated Suppression of Influenza-induced Pathology Requires CD11b/CD18 (MAC-1) [Journal Article].
Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(4):492-9.
- [67] Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al.
A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 [Journal Article].
J Clin Invest. 2012;122(1):327-36.
- [68] Mukaida N, Sasaki SI, Baba T.
Two-Faced Roles of Tumor-Associated Neutrophils in Cancer Development and Progression [Journal Article].
Int J Mol Sci. 2020;21(10).
- [69] Scapini P, Cassatella MA.

- Social networking of human neutrophils within the immune system [Journal Article].
Blood. 2014;124(5):710-9.
- [70] Steggerda SM, Bennett MK, Chen J, Emberley E, Huang T, Janes JR, et al.
Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in
the tumor microenvironment [Journal Article].
J Immunother Cancer. 2017;5(1):101.
- [71] Werner A, Koschke M, Leuchtner N, Luckner-Minden C, Habermeier A, Rupp J, 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 Rege-
nerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression [Journal
Article].
Front Immunol. 2017;8:864.
- [72] Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al.
Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a sub-
population of activated granulocytes [Journal Article].
Cancer Res. 2009;69(4):1553-60.
- [73] Sims JE, Smith DE.
The IL-1 family: regulators of immunity [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2010;10(2):89-102.
- [74] Roth S, Solbach W, Laskay T.
IL-16 and MIF: messengers beyond neutrophil cell death [Journal Article].
Cell Death Dis. 2016;7:e2049.
- [75] Roth S, Agthe M, Eickhoff S, Möller S, Karsten CM, Borregaard N, et al.
Secondary necrotic neutrophils release interleukin-16C and macrophage migration inhi-
bitory factor from stores in the cytosol [Journal Article].
Cell Death Discov. 2015;1:15056.
- [76] Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al.
B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin
in the marginal zone of the spleen [Journal Article].
Nat Immunol. 2011;13(2):170-80.
- [77] Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M.
Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways
in Macrophages [Journal Article].
Front Immunol. 2014;5:532.
- [78] Zelle-Rieser C, Thangavadivel S, Biedermann R, Brunner A, Stoitzner P, Willenbacher
E, et al.

- T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site [Journal Article].
J Hematol Oncol. 2016;9(1):116.
- [79] Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy [Journal Article].
Nat Med. 2018;24(5):541-50.
- [80] Leblay N, Maity R, Hasan F, Neri P. Deregulation of Adaptive T Cell Immunity in Multiple Myeloma: Insights Into Mechanisms and Therapeutic Opportunities [Journal Article].
Front Oncol. 2020;10:636.
- [81] Giese MA, Hind LE, Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment [Journal Article].
Blood. 2019;133(20):2159-67.
- [82] Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung [Journal Article].
Cancer Cell. 2011;20(3):300-14.
- [83] Gorgun GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans [Journal Article].
Blood. 2013;121(15):2975-87.
- [84] Yoshida M, Taguchi A, Kawana K, Ogishima J, Adachi K, Kawata A, et al. Intraperitoneal neutrophils activated by KRAS-induced ovarian cancer exert antitumor effects by modulating adaptive immunity [Journal Article].
Int J Oncol. 2018;53(4):1580-90.
- [85] Houghton AM. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances [Journal Article].
Cell Cycle. 2010;9(9):1732-7.
- [86] Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma [Journal Article].
J Clin Oncol. 2009;27(28):4709-17.
- [87] Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma [Journal Article].

- Cancer. 2012;118(9):2476-85.
- [88] Shaul ME, Fridlender ZG.
Tumour-associated neutrophils in patients with cancer [Journal Article].
Nat Rev Clin Oncol. 2019;16(10):601-20.
- [89] Lecot P, Sarabi M, Pereira Abrantes M, Mussard J, Koenderman L, Caux C, et al.
Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies [Journal Article].
Front Immunol. 2019;10:2155.
- [90] Liang W, Ferrara N.
The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis [Journal Article].
Cancer Immunol Res. 2016;4(2):83-91.
- [91] Engelman JA, Luo J, Cantley LC.
The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [Journal Article].
Nat Rev Genet. 2006;7(8):606-19.
- [92] Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F, Ardolino M, Fessler E, et al.
Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells [Journal Article].
Cancer Discov. 2016;6(6):630-49.
- [93] Fridlender ZG, Albelda SM, Granot Z.
Promoting metastasis: neutrophils and T cells join forces [Journal Article].
Cell Res. 2015;25(7):765-6.
- [94] Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, et al.
Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer [Journal Article].
Nature. 2014;515(7525):134-7.
- [95] García-Navas R, Gajate C, Mollinedo F.
Neutrophils drive endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cancer cells through arginase-1 release [Journal Article].
Sci Rep. 2021;11(1):12574.
- [96] Zhao T, Jiang Q, Li W, Wang Y, Zou Y, Chai X, et al.
Antigen-Presenting Cell-Like Neutrophils Foster T Cell Response in Hyperlipidemic Patients and Atherosclerotic Mice [Journal Article].
Front Immunol. 2022;13:851713.
- [97] Ackermann MF, Lamm KR, Wiegand GW, Luster MI.

- Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis [Journal Article].
Cancer Res. 1989;49(3):528-32.
- [98] Kim J, Bae JS.
Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment [Journal Article].
Mediators Inflamm. 2016;2016:6058147.
- [99] Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI.
The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment [Journal Article].
Trends Immunol. 2016;37(3):208-20.
- [100] Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K, Ryan EJ.
Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity [Journal Article].
Front Immunol. 2017;8:86.
- [101] Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, et al.
Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2011;89(2):311-7.
- [102] Aarts CEM, Kuijpers TW.
Neutrophils as myeloid-derived suppressor cells [Journal Article].
Eur J Clin Invest. 2018;48 Suppl 2:e12989.
- [103] Mao FY, Zhao YL, Lv YP, Teng YS, Kong H, Liu YG, et al.
CD45(+)CD33(low)CD11b(dim) myeloid-derived suppressor cells suppress CD8(+) T cell activity via the IL-6/IL-8-arginase I axis in human gastric cancer [Journal Article].
Cell Death Dis. 2018;9(7):763.
- [104] Arina A, Bronte V.
Myeloid-derived suppressor cell impact on endogenous and adoptively transferred T cells [Journal Article].
Curr Opin Immunol. 2015;33:120-5.
- [105] Wu H, Zhen Y, Ma Z, Li H, Yu J, Xu ZG, et al.
Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MD-SCs in systemic lupus erythematosus [Journal Article].
Sci Transl Med. 2016;8(331):331ra40.
- [106] Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, et al.

- How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions [Journal Article].
Cancer Immunol Immunother. 2019;68(4):631-44.
- [107] Gabrilovich DI, Nagaraj S.
Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2009;9(3):162-74.
- [108] Murray PJ.
Amino acid auxotrophy as a system of immunological control nodes [Journal Article].
Nat Immunol. 2016;17(2):132-9.
- [109] Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A.
Plasma membrane transporters for arginine [Journal Article].
J Nutr. 2004;134(10 Suppl):2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.
- [110] Grohmann U, Bronte V.
Control of immune response by amino acid metabolism [Journal Article].
Immunol Rev. 2010;236:243-64.
- [111] Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al.
L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity [Journal Article].
Cell. 2016;167(3):829-42.e13.
- [112] Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M.
Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells [Journal Article].
J Immunol. 1999;163(7):3771-7.
- [113] Munder M, Eichmann K, Modolell M.
Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype [Journal Article].
J Immunol. 1998;160(11):5347-54.
- [114] Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, et al.
IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice [Journal Article].
J Immunol. 2003;170(1):270-8.
- [115] Dai XK, Ding ZX, Tan YY, Bao HR, Wang DY, Zhang H.
Neutrophils inhibit CD8(+) T cells immune response by arginase-1 signaling in patients with sepsis [Journal Article].
World J Emerg Med. 2022;13(4):266-73.

- [116] Munder M.
Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system [Journal Article].
Br J Pharmacol. 2009;158(3):638-51.
- [117] Luckner-Minden C, Fischer I, Langhans CD, Schiller M, Kropf P, Müller I, et al.
Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2010;87(6):1125-32.
- [118] Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al.
Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits
T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses [Journal Article].
Cancer Res. 2004;64(16):5839-49.
- [119] Feldmeyer N, Wabnitz G, Leicht S, Luckner-Minden C, Schiller M, Franz T, et al.
Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T
lymphocytes [Journal Article].
Int Immunol. 2012;24(5):303-13.
- [120] Grzywa TM, Sosnowska A, Matryba P, Rydzynska Z, Jasinski M, Nowis D, et al.
Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response [Journal Article].
Front Immunol. 2020;11:938.
- [121] Miret JJ, Kirschmeier P, Koyama S, Zhu M, Li YY, Naito Y, et al.
Suppression of Myeloid Cell Arginase Activity leads to Therapeutic Response in a NSCLC
Mouse Model by Activating Anti-Tumor Immunity [Journal Article].
J Immunother Cancer. 2019;7(1):32.
- [122] Pudlo M, Demougeot C, Girard-Thernier C.
Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century [Journal Article].
Med Res Rev. 2017;37(3):475-513.
- [123] Grobбен Y, Uitdehaag JCM, Willemsen-Seegers N, Tabak WWA, de Man J, Buijsman
RC, et al.
Structural insights into human Arginase-1 pH dependence and its inhibition by the small
molecule inhibitor CB-1158 [Journal Article].
J Struct Biol X. 2020;4:100014.
- [124] Azuma EK, Kitagawa S, Yuo A, Mizoguchi H, Umezawa K, Takaku F, et al.
Activation of the respiratory burst and tyrosine phosphorylation of proteins in human
neutrophils: no direct relationship and involvement of protein kinase C-dependent
and -independent signaling pathways [Journal Article].
Biochim Biophys Acta. 1993;1179(2):213-23.
- [125] Systems R, Inc.
Human Cytokine Array, package insert [Catalog].

- [126] Governa V, Trella E, Mele V, Tornillo L, Amicarella F, Cremonesi E, et al.
The Interplay Between Neutrophils and CD8(+) T Cells Improves Survival in Human
Colorectal Cancer [Journal Article].
Clin Cancer Res. 2017;23(14):3847-58.
- [127] Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, Moon EK, Garfall AL, Rao AS, et al.
Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting
Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer [Journal Article].
Cancer Cell. 2016;30(1):120-35.
- [128] Romano A, Parrinello NL, Simeon V, Puglisi F, La Cava P, Bellofiore C, et al.
High-density neutrophils in MGUS and multiple myeloma are dysfunctional and immune-
suppressive due to increased STAT3 downstream signaling [Journal Article].
Sci Rep. 2020;10(1):1983.
- [129] Si Y, Merz SF, Jansen P, Wang B, Bruderek K, Altenhoff P, et al.
Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector func-
tion by MDSC in human cancer tissue [Journal Article].
Sci Immunol. 2019;4(40).
- [130] Mollinedo F.
Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis [Journal Article].
Trends Immunol. 2019;40(3):228-42.
- [131] Zhang J, Xu X, Shi M, Chen Y, Yu D, Zhao C, et al.
CD13(hi) Neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression
through Arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [Journal Article].
Oncoimmunology. 2017;6(2):e1258504.
- [132] Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Höing B, Kanaan O, Dominas N, et al.
Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell
Subsets [Journal Article].
Clin Cancer Res. 2018;24(19):4834-44.
- [133] Lim JK, Lu W, Hartley O, DeVico AL.
N-terminal proteolytic processing by cathepsin G converts RANTES/CCL5 and related
analogs into a truncated 4-68 variant [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2006;80(6):1395-404.
- [134] Brouwer E, Stegeman CA, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG.
T cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granu-
lomatosis (WG) [Journal Article].
Clin Exp Immunol. 1994;98(3):448-53.
- [135] Odobasic D, Kitching AR, Yang Y, O'Sullivan KM, Muljadi RC, Edgerton KL, et al.

- Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function [Journal Article].
Blood. 2013;121(20):4195-204.
- [136] Mader JS, Marcet-Palacios M, Hancock RE, Bleackley RC.
The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in cytotoxic T lymphocytes [Journal Article].
Exp Cell Res. 2011;317(4):531-8.
- [137] Schmielau J, Finn OJ.
Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients [Journal Article].
Cancer Res. 2001;61(12):4756-60.
- [138] Marini O, Costa S, Bevilacqua D, Calzetti F, Tamassia N, Spina C, et al.
Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells [Journal Article].
Blood. 2017;129(10):1343-56.
- [139] Rodríguez-García M, Oliva H, Climent N, Escribese MM, García F, Moran TM, et al.
Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects [Journal Article].
Clin Immunol. 2009;131(3):374-84.
- [140] Maffia PC, Zittermann SE, Scimone ML, Tateosian N, Amiano N, Guerrieri D, et al.
Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability [Journal Article].
Am J Pathol. 2007;171(3):928-37.
- [141] Martí i Líndez AA, Dunand-Sauthier I, Conti M, Gobet F, Núñez N, Hannich JT, et al.
Mitochondrial arginase-2 is a cell-autonomous regulator of CD8+ T cell function and antitumor efficacy [Journal Article].
JCI Insight. 2019;4(24).
- [142] Vaschetto R, Grinstein J, Del Sorbo L, Khine AA, Voglis S, Tullis E, et al.
Role of human neutrophil peptides in the initial interaction between lung epithelial cells and CD4+ lymphocytes [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2007;81(4):1022-31.
- [143] Thomi R, Schlapbach C, Yawalkar N, Simon D, Yerly D, Hunger RE.
Elevated levels of the antimicrobial peptide LL-37 in hidradenitis suppurativa are associated with a Th1/Th17 immune response [Journal Article].
Exp Dermatol. 2018;27(2):172-7.

- [144] Mihailovic PM, Lio WM, Yano J, Zhao X, Zhou J, Chyu KY, et al.
The cathelicidin protein CRAMP is a potential atherosclerosis self-antigen in ApoE(-/-) mice [Journal Article].
PLoS One. 2017;12(11):e0187432.
- [145] Mauldin JP, Zeinali I, Kleypas K, Woo JH, Blackwood RS, Jo CH, et al.
Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation [Journal Article].
Transl Oncol. 2012;5(1):26-31.
- [146] Agnello G, Alters SE, Rowlinson SW.
Preclinical safety and antitumor activity of the arginine-degrading therapeutic enzyme pegzilarginase, a PEGylated, cobalt-substituted recombinant human arginase 1 [Journal Article].
Transl Res. 2020;217:11-22.
- [147] Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, et al.
Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension [Journal Article].
Cardiovasc Res. 2010;87(3):569-77.
- [148] Park SY, Shrestha S, Youn YJ, Kim JK, Kim SY, Kim HJ, et al.
Autophagy Primes Neutrophils for Neutrophil Extracellular Trap Formation during Sepsis [Journal Article].
Am J Respir Crit Care Med. 2017;196(5):577-89.
- [149] Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al.
Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing [Journal Article].
Nat Med. 2015;21(7):815-9.
- [150] Locke M, Francis RJ, Tsaousi E, Longstaff C.
Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin [Journal Article].
Sci Rep. 2020;10(1):11694.
- [151] Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, et al.
In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review [Journal Article].
PLoS One. 2017;12(5):e0176472.
- [152] Quan P, Moinfar F, Kufferath I, Absenger M, Kueznik T, Denk H, et al.

- Effects of targeting endometrial stromal sarcoma cells via histone deacetylase and PI3K/AKT/mTOR signaling [Journal Article].
Anticancer Res. 2014;34(6):2883-97.
- [153] Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, et al.
Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils [Journal Article].
J Biol Chem. 1996;271(6):2935-40.
- [154] Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J.
Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family [Journal Article].
J Immunol. 2007;179(6):3958-65.
- [155] Schönrich G, Raftery MJ, Samstag Y.
Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression [Journal Article].
Adv Biol Regul. 2020;77:100741.
- [156] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA.
CD28/B7 system of T cell costimulation [Journal Article].
Annu Rev Immunol. 1996;14:233-58.
- [157] Vonwirth V, Bülbül Y, Werner A, Echchannaoui H, Windschmitt J, Habermeier A, et al.
Inhibition of Arginase 1 Liberates Potent T Cell Immunostimulatory Activity of Human Neutrophil Granulocytes [Journal Article].
Frontiers in Immunology. 2021;11(3823).
- [158] Golstein P, Griffiths GM.
An early history of T cell-mediated cytotoxicity [Journal Article].
Nat Rev Immunol. 2018;18(8):527-35.
- [159] Braun MW, Iwakuma T.
Regulation of cytotoxic T-cell responses by p53 in cancer [Journal Article].
Transl Cancer Res. 2016;5(6):692-7.
- [160] Fassy J, Tsalkitzi K, Goncalves-Maia M, Braud VM.
A Real-Time Cytotoxicity Assay as an Alternative to the Standard Chromium-51 Release Assay for Measurement of Human NK and T Cell Cytotoxic Activity [Journal Article].
Curr Protoc Immunol. 2017;118:7.42.1-7.42.12.
- [161] Rahman S, Sagar D, Hanna RN, Lightfoot YL, Mistry P, Smith CK, et al.
Low-density granulocytes activate T cells and demonstrate a non-suppressive role in systemic lupus erythematosus [Journal Article].
Ann Rheum Dis. 2019;78(7):957-66.

- [162] Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch GM.
Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation [Journal Article].
Immunology. 2000;101(4):521-30.
- [163] Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermonprez P, et al.
Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo [Journal Article].
Blood. 2007;110(8):2965-73.
- [164] Morel C, Badell E, Abadie V, Robledo M, Setterblad N, Gluckman JC, et al.
Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice [Journal Article].
Eur J Immunol. 2008;38(2):437-47.
- [165] Schuster S, Hurrell B, Tacchini-Cottier F.
Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2013;94(4):671-5.
- [166] Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY.
Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection [Journal Article].
J Immunol. 2003;171(11):6052-8.
- [167] Bennouna S, Denkers EY.
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 [Journal Article].
J Immunol. 2005;174(8):4845-51.
- [168] Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S.
Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2006;79(5):977-88.
- [169] van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.
Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN [Journal Article].
J Exp Med. 2005;201(8):1281-92.
- [170] Park SJ, Burdick MD, Mehrad B.

- Neutrophils mediate maturation and efflux of lung dendritic cells in response to *Aspergillus fumigatus* germ tubes [Journal Article].
Infect Immun. 2012;80(5):1759-65.
- [171] Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA.
 Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs [Journal Article].
J Immunol. 2013;191(9):4531-9.
- [172] Blomgran R, Ernst JD.
 Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4⁺ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection [Journal Article].
J Immunol. 2011;186(12):7110-9.
- [173] Eruslanov EB, Singhal S, Albelda SM.
 Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap [Journal Article].
Trends Cancer. 2017;3(2):149-60.
- [174] Thewissen M, Damoiseaux J, van de Gaar J, Tervaert JW.
 Neutrophils and T cells: bidirectional effects and functional interferences [Journal Article].
Mol Immunol. 2011;48(15-16):2094-101.
- [175] Baumann T, Dunkel A, Schmid C, Schmitt S, Hiltensperger M, Lohr K, et al.
 Regulatory myeloid cells paralyze T cells through cell-cell transfer of the metabolite methylglyoxal [Journal Article].
Nat Immunol. 2020;21(5):555-66.
- [176] Reid KM, Tsung A, Kaizu T, Jeyabalan G, Ikeda A, Shao L, et al.
 Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) [Journal Article].
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007;292(2):G512-7.
- [177] Li X, Zhu F, He Y, Luo F.
 [Arginase inhibitor nor-NOHA induces apoptosis and inhibits invasion and migration of HepG2 cells] [Journal Article].
Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2017;33(4):477-82.
- [178] Ng KP, Manjeri A, Lee LM, Chan ZE, Tan CY, Tan QD, et al.
 The arginase inhibitor N ω -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 [Journal Article].
PLoS One. 2018;13(10):e0205254.
- [179] Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ.

- Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells [Journal Article].
J Leukoc Biol. 2000;68(1):9-14.
- [180] Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET.
Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation [Journal Article].
BMC Genomics. 2008;9:225.
- [181] Richmond J, Tuzova M, Cruikshank W, Center D.
Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer [Journal Article].
J Cell Physiol. 2014;229(2):139-47.
- [182] Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM.
Signaling and functional properties of interleukin-16 [Journal Article].
Int Rev Immunol. 1998;16(5-6):523-40.
- [183] Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M, et al.
Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2 [Journal Article].
J Immunol. 1998;160(5):2115-20.
- [184] Matsumoto Y, Fujita T, Hirai I, Sahara H, Torigoe T, Ezoe K, et al.
Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin-16- and interleukin-10-cDNA-double-transfected human squamous cell line [Journal Article].
Burns. 2009;35(3):383-9.
- [185] Meniailo ME, Malashchenko VV, Shmarov VA, Gazatova ND, Melashchenko OB, Goncharov AG, et al.
Direct effects of interleukin-8 on growth and functional activity of T lymphocytes [Journal Article].
Int Immunopharmacol. 2017;50:178-85.
- [186] Clements AEB, Murphy WL.
Injectable biomaterials for delivery of interleukin-1 receptor antagonist: Toward improving its therapeutic effect [Journal Article].
Acta Biomater. 2019;93:123-34.
- [187] Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, Dancy P, Frenkel J, van Royen-Kerkhoff A, et al.
An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist [Journal Article].
N Engl J Med. 2009;360(23):2426-37.
- [188] Nicod LP, el Habre F, Dayer JM.

- Natural and recombinant interleukin 1 receptor antagonist does not inhibit human T-cell proliferation induced by mitogens, soluble antigens or allogeneic determinants [Journal Article].
Cytokine. 1992;4(1):29-35.
- [189] Ritvo PG, Klatzmann D.
Interleukin-1 in the Response of Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells [Journal Article].
Front Immunol. 2019;10:250.
- [190] Rodríguez PC, Ochoa AC.
Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives [Journal Article].
Immunol Rev. 2008;222:180-91.
- [191] Avtandilyan N, Javrushyan H, Mamikonyan A, Grigoryan A, Trchounian A.
The potential therapeutic effect of N(G)-hydroxy-nor-L-arginine in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in rats [Journal Article].
Exp Mol Pathol. 2019;111:104316.
- [192] Momma TY, Ottaviani JI.
Arginase inhibitor, N ω -hydroxy-L-norarginine, spontaneously releases biologically active NO-like molecule: Limitations for research applications [Journal Article].
Free Radic Biol Med. 2020;152:74-82.

A. Anhang

A.1. Reinheitskontrollen

Alle verwendeten Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurde jede Zellpopulation auf die Expression ihrer charakteristischen Oberflächenproteine kontrolliert. Der prozentuale Anteil an Zellen, welche die charakteristischen Oberflächenproteine exprimierten, entsprach der Reinheit der Population. Die charakteristischen Oberflächenproteine sind:

PMN	CD66b
T-Lymphozyten	CD3
CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	CD4
CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	CD8
p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -transduzierte T-Lymphozyten	CD3 und v β 3

Die Reinheit der PMN und CD3⁺-T-Lymphozyten betrug stets mehr als 94 %. Die Subpopulationen der T-Lymphozyten wiesen eine mehr als 83 %ige Reinheit auf. Die Reinheit der transduzierten T-Lymphozyten stieg über die Wochen der Stimulation durch die K562-Zellen (mit p53-Peptid beladen und bestrahlt) bis auf über 79 % an. In Abbildung 38 ist ein repräsentatives Ergebnis der Durchflusszytometrie der PMN und in Abbildung 39 jeweils ein Ergebnis der verschiedenen T-Lymphozyten-Populationen dargestellt.

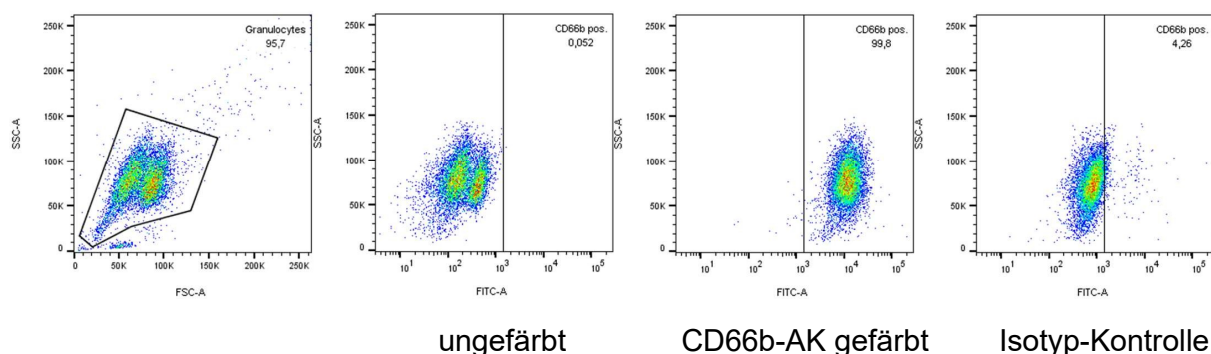
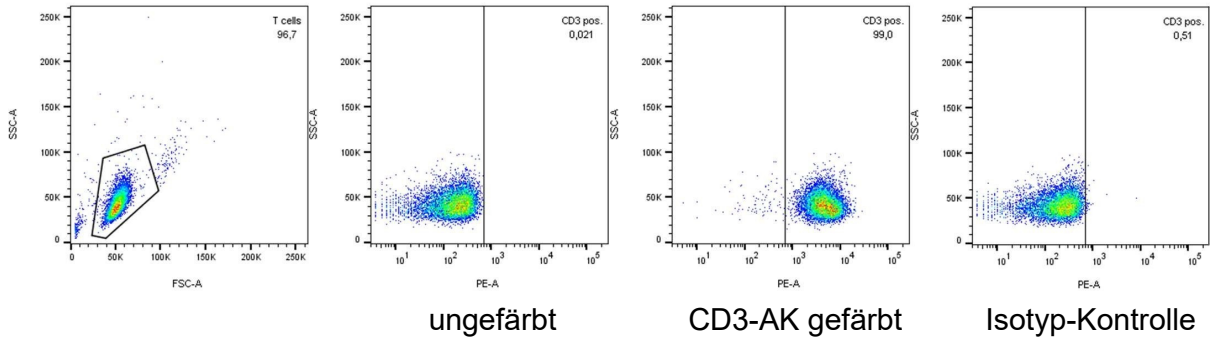


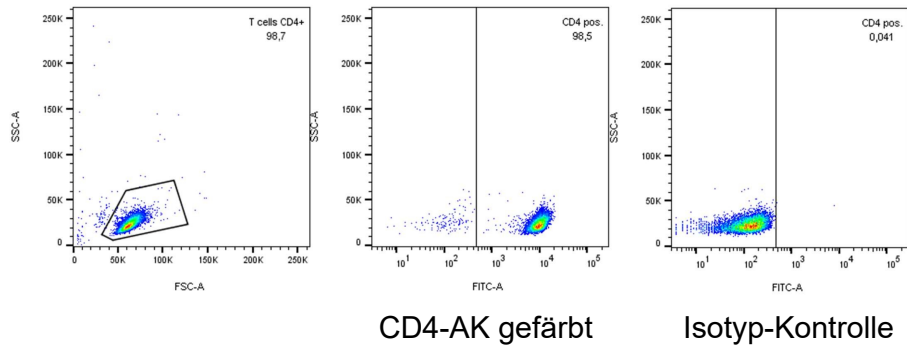
Abb. 38: PMN: Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Expression der charakteristischen Oberflächenproteine der PMN von 29 voneinander unabhängigen Messungen. Die Reinheit der PMN betrug immer ≥ 94 %.

A. Anhang

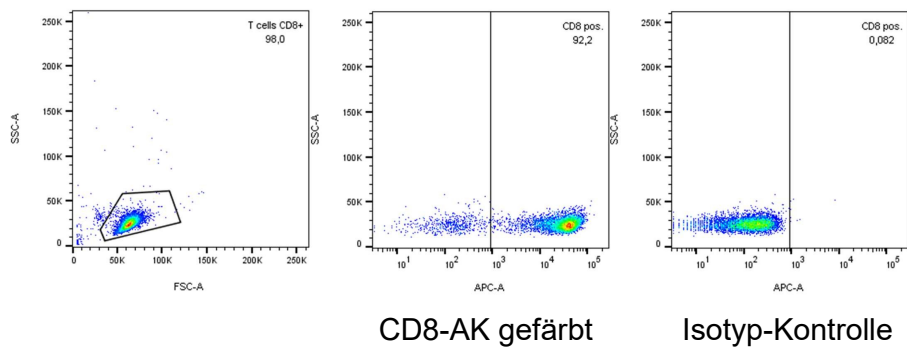
T-Lymphozyten gesamt



CD4⁺-T-Lymphozyten



CD8⁺-T-Lymphozyten



p53₂₆₄₋₂₇₂-transduzierte T-Lymphozyten

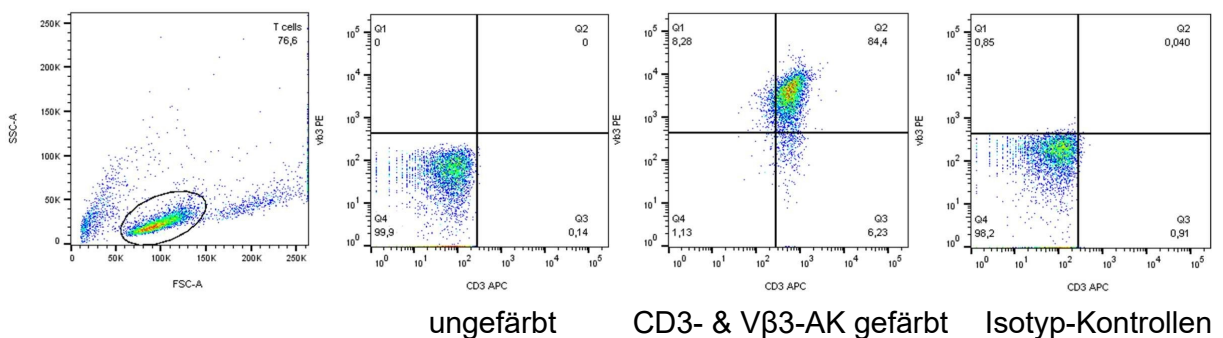


Abb. 39: T-Lymphozyten: Zu sehen ist ein repräsentatives Ergebnis der jeweiligen Expression der charakteristischen Oberflächenproteine der T-Lymphozyten. Die gesamte Population lag in 29 voneinander unabhängigen Messungen bei einer Reinheit der CD3-Expression von $\geq 95\%$. Die Reinheit der CD4⁺-T-Lymphozyten betrug immer $\geq 98\%$, während die CD8⁺-T-Lymphozyten $\geq 83\%$ rein sind. Die Expression von CD3 und vβ3 der transduzierten T-Lymphozyten lag in allen 6 voneinander unabhängigen Messungen bei $\geq 79\%$.

A.2. CFSE-Assay

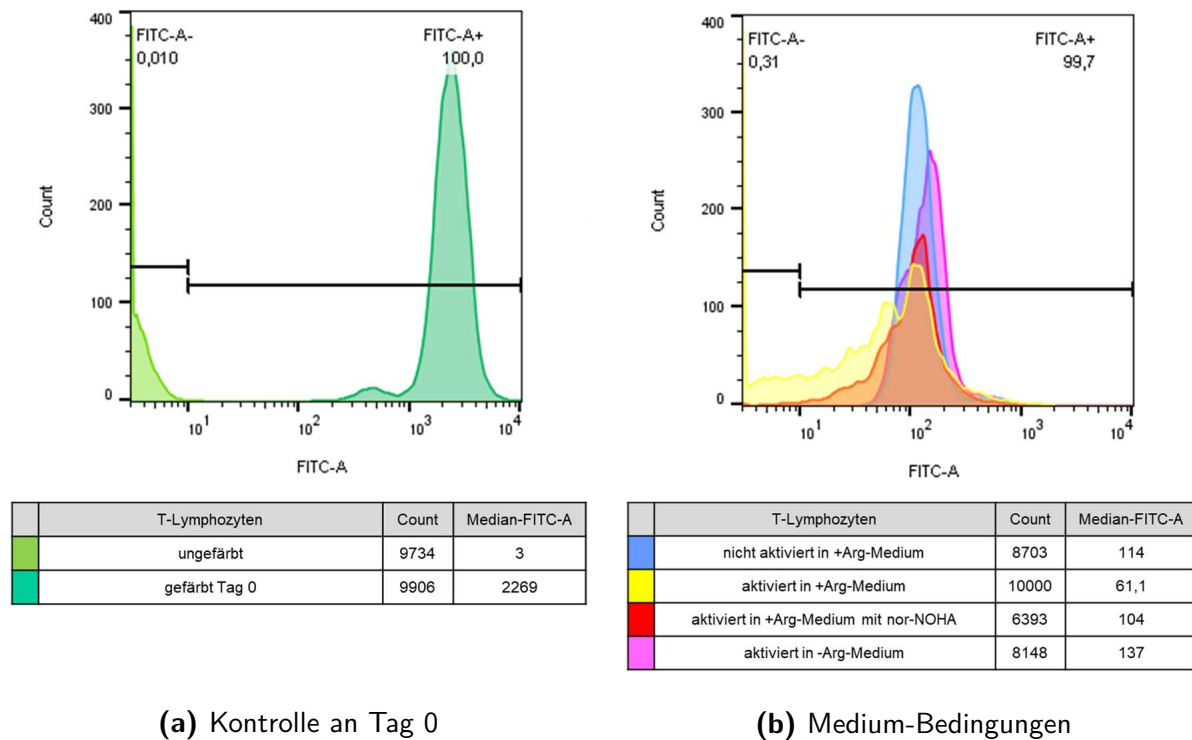


Abb. 40: Kontrollbedingungen des CFSE-Assay: An Tag 0, also am Tag des Versuchsansatzes wurde die CFSE-Fluoreszenzintensität ungefärbter sowie gefärbter T-Lymphozyten gemessen. Diese beiden Messungen dienten als Minimum und Maximum der möglichen Fluoreszenzintensitäten der inkubierten T-Lymphozyten. Nach vier Tagen Inkubation wurden auch in den Medium-Bedingungen die CFSE-Fluoreszenzen gemessen. Aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium mit und ohne Zugabe von nor-NOHA proliferierten sichtbar. Nicht aktivierte T-Lymphozyten, oder in –Arg-Medium aktivierte T-Lymphozyten zeigten keinerlei Proliferation.

Für den CFSE-Assay, dessen Ergebnisse in Kapitel 4.1.2 dargestellt sind, wurden folgende Kontrollbedingungen mittels Durchflusszytometrie gemessen:

- T-Lymphozyten ungefärbt an Tag 0
- T-Lymphozyten mit CFSE gefärbt an Tag 0
- nicht aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
- aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium
- aktivierte T-Lymphozyten in +Arg-Medium mit Zugabe von nor-NOHA
- aktivierte T-Lymphozyten in –Arg-Medium

In Abbildung 40a sind die Kontroll-Bedingungen an Tag 0 dargestellt, während in Abbildung 40b die vier, in Kapitel 4.1.1 beschriebenen, Medium-Bedingungen nach vier Tagen Inkubation

A. Anhang

zu sehen sind. Die gemessene CFSE-Intensität an Tag 0 diente zur *gate*-Einstellung des FITC-A-Kanals. Die Medium-Bedingungen offenbarten die Anfangsintensität der T-Lymphozyten zum Vergleich für die PMN-Bedingungen.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse des CFSE-Assays dargestellt. Übereinander sind die verschiedenen PMN:T-Verhältnisse aufgetragen (von oben nach unten mit aufsteigendem Verhältnis). Die Abbildung 41a zeigt die PMN-Bedingungen ohne Arginase 1-Inhibitor und die Abbildung 41b die Bedingung mit Zugabe von nor-NOHA. In Kapitel 4.1.2 sind die unterschiedlichen Verhältnisse nebeneinander zu sehen. In der hier gewählten Darstellungsart ist die Reduktion der CFSE-Intensität mit zunehmendem PMN:T-Verhältnis in der Bedingung mit nor-NOHA sehr gut erkennbar.

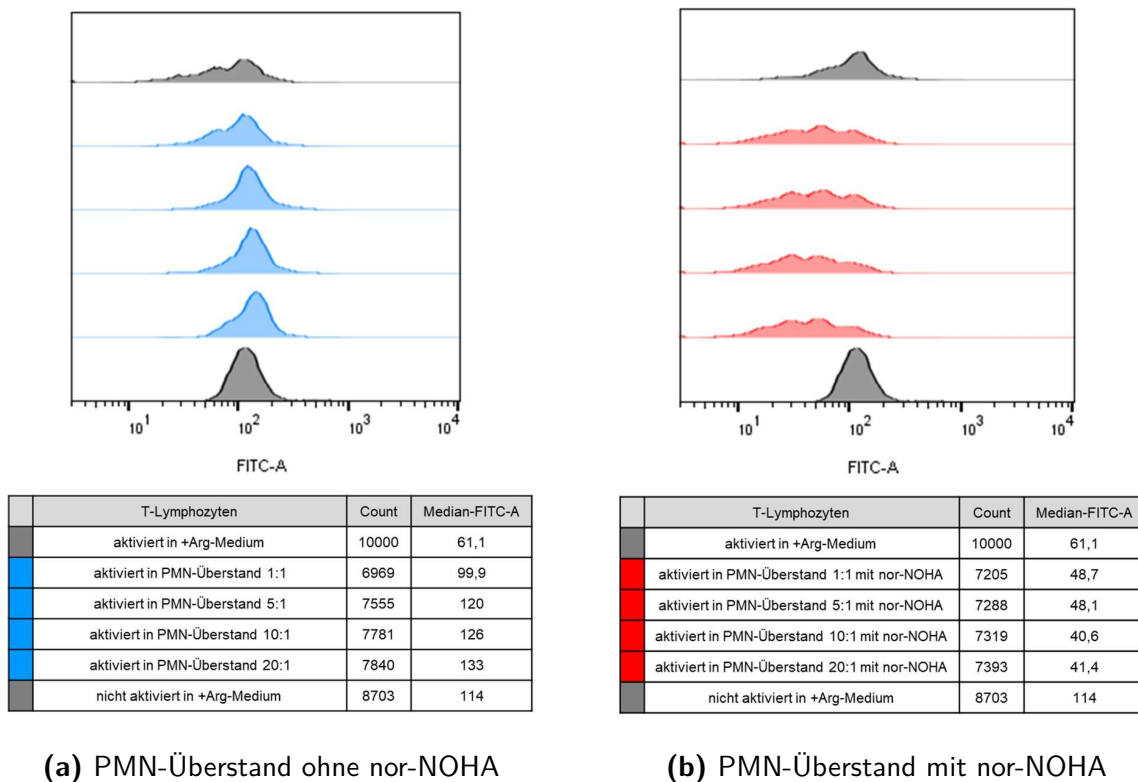
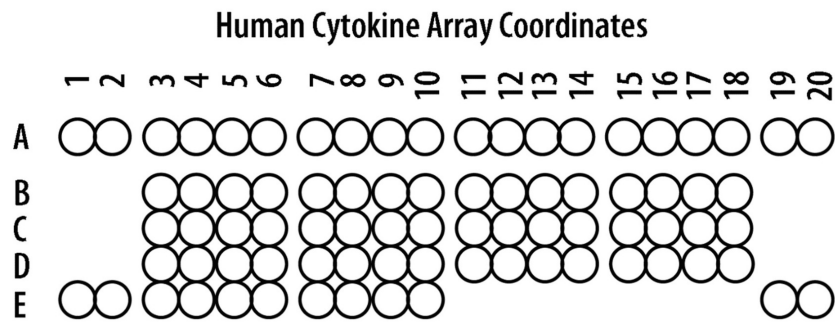


Abb. 41: alle PMN:T-Verhältnisse zusammengefasst: Untereinander sind die CFSE-Fluoreszenzintensitäten der T-Lymphozyten nach Inkubation in PMN-Überstand mit (rot) und ohne (blau) nor-NOHA dargestellt. Dabei nimmt das PMN:T-Verhältnis von oben nach unten kontinuierlich zu. In dem PMN-Überstand ohne nor-NOHA sinkt die CFSE-Fluoreszenz nicht ab. Nach Inkubation in PMN-Überstand mit nor-NOHA dagegen nimmt die CFSE-Konzentration mit steigendem PMN:T-Verhältnis immer weiter ab.

A.3. Human cytokine array



(a) Vorlage zu den Koordinaten der detektierbaren *spots* der Membranen

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
A1, A2	Reference Spots	N/A	————
A3, A4	CCL1/I-309	6346	P500, SCYA1, SCYA2, TCA-3
A5, A6	CCL2/MCP-1	6347	MCAF
A7, A8	MIP-1 α /MIP-1 β	6348/6351	CCL3/CCL4
A9, A10	CCL5/RANTES	6352	————
A11, A12	CD40 Ligand/TNFSF5	959	CD154, CD40LG, gp39, TRAP
A13, A14	Complement Component C5/C5a	727	C5/C5a
A15, A16	CXCL1/GRO α	2919	CINC-1, KC
A17, A18	CXCL10/IP-10	3627	CRG-2
A19, A20	Reference Spots	N/A	————
B3, B4	CXCL11/I-TAC	6373	β -R1, H174
B5, B6	CXCL12/SDF-1	6387	PBSF
B7, B8	G-CSF	1440	CSF β , CSF-3
B9, B10	GM-CSF	1437	CSFa, CSF-2
B11, B12	ICAM-1/CD54	3383	————
B13, B14	IFN- γ	3458	Type II IFN
B15, B16	IL-1 α /IL-1F1	3552	————
B17, B18	IL-1 β /IL-1F2	3553	————
C3, C4	IL-1ra/IL-1F3	3557	————
C5, C6	IL-2	3558	TCGF
C7, C8	IL-4	3565	BCDF, BSF1
C9, C10	IL-5	3567	————
C11, C12	IL-6	3569	BSF-2
C13, C14	IL-8	3576	CXCL8, GCP1, NAP1
C15, C16	IL-10	3586	CSIF
C17, C18	IL-12 p70	3592/3593	CLMF p35

A. Anhang

D3, D4	IL-13	3596	————
D5, D6	IL-16	3603	LCF
D7, D8	IL-17A	3605	CTLA-8
D9, D10	IL-17E	64806	IL-25
D11, D12	IL-18/IL-1F4	3606	IGIF
D13, D14	IL-21	59067	————
D15, D16	IL-27	246778	IL-27 A
D17, D18	IL-32 α	9235	
E1, E2	Reference Spots	N/A	————
E3, E4	MIF	4282	GIF, DER6
E5, E6	Serpin E1/PAI-1	5054	Nexin, PLANH1
E7, E8	TNF- α	7124	TNFSF1A
E9, E10	TREM-1	54210	CD354
E19, E20	Negative Control	N/A	————

(b) Zuordnung der Zytokine zu ihren jeweiligen Koordinatenpunkten [125]

Abb. 42: Zuordnung der detektierten Doubletten: Die schematische Abbildung der Koordinaten lässt die Zuordnung der Doubletten zu den, in der Tabelle aufgelisteten, Zytokinen zu. Es war möglich, diese 36 verschiedenen Zytokine zu detektieren.

Die, in Abbildung 32 auf Seite 122 dargestellten, Membranen lassen sich durch die schematische Darstellung der Koordinaten in Abbildung 42a auswerten. Jede Doublette konnte einem, in Abbildung 42b aufgelistetem, Zytokin zugeordnet werden. Welche Zytokine der T-Lymphozyten und der PMN im *human proteome profiler*TM array detektiert werden konnten, ist in Abbildung 33 auf Seite 123 zu sehen.

B. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Professor Doktor M. M.. Ich danke dir, für die Möglichkeit meine Arbeit in deiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich danke dir, für die intensive und persönliche Betreuung. Ich danke dir für die regelmäßigen Treffen, die mir stets Rückhalt und Sicherheit gaben. Ich danke dir, für deine Begeisterung für mein Thema, die wirklich ansteckend ist und für deine vielen Inspirationen und Ideen. Ich danke dir für all die motivierenden und erkenntnisreichen Gespräche. Ich danke dir für deine ruhige und gelassene Art, die jedes Problem lösen konnte und für deine immer offene Tür.

Mein Dank geht außerdem an Doktor Y. B.. Danke, dass du mir während meiner Zeit in allen fachlichen und praktischen Fragen zur Seite standest. Du hast mich während meiner Zeit im Labor stets unterstützt. Du behieltest den Überblick über die Projekte und hattest immer Zeit für mich und meine vielen Fragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen M. und T. bedanken. Die Arbeit mit euch im Labor hat mir unglaublich viel Spaß gemacht und ich habe mich bei euch sehr wohl gefühlt. Ich konnte mich jederzeit mit Anliegen an euch wenden und ihr wussetet stets eine Lösung. Vielen Dank besonders an Doktor A. W. und E. A. für euer Organisationstalent, für euer Fachwissen und für eure Praxistipps.

Mein Dank gilt außerdem Frau Professor Doktor E. C., für die Unterstützung als meine Zweitgutachterin. Des Weiteren möchte ich mich bei A. H. aus der Arbeitsgruppe C. für die freundliche Durchführung der Arginin-Konzentrationsmessungen bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ihr habt mir die nötige Kraft und den emotionalen Rückhalt gegeben. Ihr wart stets mein Vorbild und meine Motivation. P., du unterstützt mich in allem was ich tue und stehst immer hinter mir. Danke, dass du für mich da bist.