

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

Hyperaktivierung humaner T-Zellen durch neutrophile Granulozyten unter  
Arginaseinhibition

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

Vorgelegt von

Simone Verena Liebhäuser  
aus Augsburg

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Gottfried Munder

2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Ellen Ildicho Closs

3. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Marina Kreutz

Tag der Promotion: 10. November 2025

Nutzungslizenz: Urheberrechtsschutz (in C-1.0)

*Für meine Eltern* [REDACTED]

*und*

*alle Menschen, die mich immer unterstützt haben*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>4</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
4.1	<i>Die Tumormikroumgebung, ihre Bestandteile und die Rolle in der Tumorgenese.....</i>	<i>1</i>
4.1.1	Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle im TME .....	4
4.1.2	MDSCs und ihre Rolle in der tumorinduzierten Immunsuppression .....	7
4.1.3	Myeloische Zellen im TME: PMN, TANs oder MDSCs?.....	8
4.1.4	T-Zellen: Aktivierung, Differenzierung und Rolle im TME .....	10
4.1.4.1	T-Zellaktivierung über den TCR und nachgeschaltete Signalwege .....	10
4.1.4.2	Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	13
4.1.4.3	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im tumorimmunologischen Kontext .....	15
4.1.4.4	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im tumorimmunologischen Kontext.....	17
4.1.4.5	T-Zell Gedächtniszellen.....	18
4.1.4.5.1	Modelle der Gedächtniszellendifferenzierung.....	18
4.1.4.5.2	Eigenschaften und Oberflächenmarker der Gedächtniszellen .....	20
4.1.4.6	T-Zellen im TME: Mechanismen der Tumorevasion.....	22
4.1.4.6.1	T-Zell-Anergie.....	23
4.1.4.6.2	T-Zell-Erschöpfung .....	24
4.1.4.6.3	T-Zell-Seneszenz.....	24
4.1.5	Arginase im TME .....	24
4.1.5.1	Arginin Metabolismus.....	24
4.1.5.2	Arginase .....	26
4.1.5.3	Bedeutung von Arginin für T-Zellen und Auswirkung der Arginindepletion im TME.....	26
4.2	<i>Herausforderungen und Strategien der Tumorthherapie .....</i>	<i>28</i>
4.2.1	Immunsuppression durch MDSCs und mögliche Therapiestrategien .....	28
4.2.2	Herausforderung zellulär basierter Tumoreimmuntherapien und mögliche Lösungsstrategien..	29
4.2.3	Herausforderungen der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren .....	31
4.2.4	Arginase-Inhibition als vielversprechender Ansatz in der Tumoreimmuntherapie .....	32
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
5.1	<i>Materialien .....</i>	<i>35</i>
5.1.1	Medien und Zelllinien .....	35
5.1.1.1	Medien.....	35
5.1.1.2	Zelllinien .....	36
5.1.2	Chemikalien, Puffer und Kits.....	37
5.1.2.1	Chemikalien .....	37
5.1.2.2	Puffer und Lösungen.....	39
5.1.2.3	Kits .....	40
5.1.3	Antikörper .....	42
5.1.3.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	42
5.1.3.2	Isotypen Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	42
5.1.3.3	Antikörper für den Western Blot .....	43
5.1.3.4	Sekundäntikörper für Western Blot .....	43
5.1.4	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	43
5.1.4.1	Materialien .....	43
5.1.4.2	Geräte.....	44
5.1.5	Software und Statistik.....	46

5.1.6	Ethikantrag.....	46
5.2	<i>Methoden</i> .....	46
5.2.1	Zellisolation aus Vollblut .....	46
5.2.1.1	Isolation der PBMC .....	46
5.2.1.2	Isolation der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen.....	47
5.2.1.3	Isolation der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	47
5.2.1.4	Isolation der Granulozyten .....	47
5.2.2	Zellbiologische Methodik .....	48
5.2.2.1	Bestimmung der Zellzahl .....	48
5.2.2.2	Kultivierung von T-Zellen .....	48
5.2.2.3	Generieren von PMN-Überständen.....	49
5.2.2.4	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	49
5.2.2.5	Kokultur von PMN und T-Zellen.....	50
5.2.2.6	Transwellkultur von PMN und T-Zellen .....	51
5.2.2.7	Einfrieren von PMN-Überständen .....	51
5.2.2.8	Kryokonservierung von Zellen .....	52
5.2.2.9	Kultivierung von K562-A2 (CD80 <sup>+</sup> ) .....	52
5.2.2.10	Retrovirale Transduktion von T-Zellen mit dem Einzelketten-TCR spezifisch für p53 <sub>264-272</sub> .....	52
5.2.2.10.1	Transfektion von Phoenix Ampho Zellen .....	52
5.2.2.10.2	Transduktion von PBMCs.....	52
5.2.2.10.3	Restimulation transduzierter T-Zellen .....	53
5.2.3	Biochemische Methodik.....	53
5.2.3.1	Durchflusszytometrie.....	53
5.2.3.2	Nachweis der Zellproliferation mittels DNA inkorporiertem [ <sup>3</sup> H]-Thymidin .....	54
5.2.3.3	Mikroskopische Darstellung der T-Zellmorphologie.....	54
5.2.3.3.1	Lichtmikroskopie.....	54
5.2.3.3.1.1	Erstellen von Cytospin Präparaten .....	54
5.2.3.3.1.2	Färbung der Präparate und Mikroskopie .....	55
5.2.3.3.2	Elektronenmikroskopie .....	55
5.2.3.4	Zytotoxizität.....	55
5.2.3.5	Degranulation .....	56
5.2.3.6	Glukoseaufnahme.....	57
5.2.3.7	Messung des Energiemetabolismus mittels Agilent Seahorse .....	58
5.2.3.7.1	Mito Stress Test .....	58
5.2.3.7.2	Energie Phänotyp Test .....	61
5.2.3.8	Kinase Profiler Array .....	62
5.2.3.9	Western Blot.....	63
5.2.3.9.1	Proteingewinnung aus Zelllysaten .....	63
5.2.3.9.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	64
5.2.3.9.3	Proteinprobenaufbereitung.....	64
5.2.3.9.4	SDS-Gel Herstellung und Gelelektrophorese .....	65
5.2.3.9.5	Western Blot (Wet-Blot) .....	66
5.2.3.9.6	Auswertung der Western Blot Daten.....	67
5.2.4	Statistik und Signifikanzen .....	67
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>68</b>
6.1	<i>Auswirkung verschiedener T-Zell- und PMN-Kulturbedingungen auf die T-Zellproliferation</i> .....	68
6.1.1	Vergleich unterschiedlicher T-Zellzahlen bei Aktivierung in PMN-Überständen .....	68
6.1.2	Untersuchung der Auswirkung von radikalen Sauerstoffspezies in T-Zell-PMN-Kokultur .....	70
6.1.3	Kultivierung von T-Zellen mit PMN in Transwell-Kultur .....	71
6.1.4	Einfluss verschiedener Kulturmedien zur PMN-Überstand-Generierung auf die T-Zellproliferation und Hyperaktivierung .....	72
6.2	<i>Keine T-Zell Hyperaktivierung in PMN-Überstand durch Zugabe von Citrullin</i> .....	73
6.3	<i>Kältestabilität der immunstimulatorischen Faktoren der PMN</i> .....	75
6.4	<i>Einfluss der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die Morphologie der T-Zellen</i> .....	76
6.4.1	Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen mittels Lichtmikroskopie.....	76

6.4.2	Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen mittels Elektronenmikroskopie.....	77
6.5	<i>Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf den Metabolismus der T-Zellen.....</i>	81
6.5.1	Untersuchung des Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen mittels Seahorse Energiephänotyp Test und Mito Stress Test .....	81
6.5.1.1	Energiemetabolismus der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen – Energie Phänotyp .....	81
6.5.1.2	Energiemetabolismus der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen – Mito Stress Test.....	83
6.5.1.3	Energiemetabolismus der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen – Mito Stress Test.....	86
6.5.1.4	Untersuchung der Präferenz der Art der Energiegewinnung mittels OCR/ECAR-Ratio.....	88
6.5.2	Untersuchung der Glukoseaufnahme hyperaktivierter T-Zellen .....	89
6.5.3	Untersuchung der Expression von GLUT-1 auf T-Zellen.....	91
6.6	<i>Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf den Phänotyp der T-Zellen .....</i>	92
6.6.1	Untersuchung der CD28/CD57 Expression auf T-Zellen.....	92
6.6.2	Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen.....	98
6.6.3	Untersuchung der T-Zellphänotypen von Patienten mit Multiplem Myelom.....	104
6.6.3.1	Untersuchung der CD28/CD57 Expression auf T-Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark .....	104
6.6.3.2	Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark .....	107
6.7	<i>Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf das phosphorylierte Proteom der T-Zellen gemessen mittels Proteom Profiler™ Array.....</i>	111
6.8	<i>Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf Proteine der T-Zellrezeptorsignalkaskade.....</i>	113
6.8.1	Akt .....	114
6.8.2	S6 .....	115
6.8.3	4EBP1 .....	116
6.8.4	Erk1/2 (p42/44).....	117
6.8.5	p38 MAPK.....	117
6.8.6	eIF4E.....	118
6.9	<i>Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zelldegranulation .....</i>	119
6.10	<i>Auswirkung der PMN bedingten Hyperaktivierung auf T-Zellen in Langzeitkultur .....</i>	120
6.10.1	Untersuchung der Langzeitproliferation hyperaktivierter T-Zellen .....	120
6.10.2	Untersuchung der Zytotoxizität hyperaktivierter T-Zellen in Langzeitkultur .....	121
6.10.3	Untersuchung des CD4/CD8 Verhältnisses von T-Zellen in Langzeitkultur .....	122
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
7.1	<i>T-Zellhyperaktivierung abhängig von spezifischen Kultivierungsbedingungen.....</i>	125
7.1.1	Hyperaktivierung abhängig von PMN:T-Zell-Verhältnis und Kultivierungskonzentration .....	125
7.1.2	Hyperaktivierung womöglich abhängig von Aktivierungsstatus der PMN und T-Zellen? .....	126
7.1.3	Arginase und direkter Zell-Zellkontakt (und nicht ROS) als Hauptmechanismen der PMN induzierten T-Zellsuppression .....	127
7.1.4	Beeinflussung der Hyperaktivierung durch Mediumzusätze .....	128
7.1.4.1	Kein Einfluss der Argininkonzentration auf T-Zellhyperaktivierung .....	129
7.1.4.2	Sichtbarkeit der Hyperaktivierung nur unter Verwendung von dialysiertem FCS .....	130
7.1.5	Hyperaktivierung erhält natürliches CD4 <sup>+</sup> zu CD8 <sup>+</sup> T-Zellverhältnis in Langzeitkultur .....	132
7.2	<i>T-Zellhyperaktivierung ist argininabhängig - keine Hyperaktivierung durch Citrullin-Supplementierung möglich</i> 132	
7.3	<i>Verstärkte Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der Proteintranslation, Aktivierung und Metabolismus in hyperaktivierten T-Zellen.....</i>	134
7.3.1	Gesteigerte Phosphorylierung von STAT-Proteinen .....	134
7.3.2	Vermehrte Expression von HSP60 in hyperaktivierten T-Zellen .....	135
7.3.3	Verstärkte Phosphorylierung von PYK2 in hyperaktivierten T-Zellen .....	135
7.3.4	TCR-Signaltransduktion: Verstärkte Phosphorylierung der Schlüsselproteine der Proteintranslation in hyperaktivierten T-Zellen .....	135
7.4	<i>Gesteigerter Metabolismus in hyperaktivierten T-Zellen.....</i>	137

7.4.1	Hyperaktivierte T-Zellen zeigen sowohl gesteigerte Glykolyse als auch OXPPOS .....	137
7.4.2	Gesteigertes Metabolismus hyperaktiverter T-Zellen vereinbar mit der Differenzierung in TCM 138	
7.4.3	Gesteigertes Metabolismus hyperaktiverter T-Zellen als Überlebensvorteil im TME.....	138
7.4.4	Verstärkte Glukoseaufnahme in hyperaktivierten T-Zellen ohne erhöhte GLUT-1 Expression	139
7.5	<i>Phänotypische Merkmale hyperaktiverter T-Zellen vereinbar mit gesteigerter Translation und Metabolismus .....</i>	140
7.6	<i>PMN sezernierte Faktor(en) induzieren TCM-Differenzierung und reduzieren Seneszenz .....</i>	142
7.6.1	Reduktion der Seneszenz und Induktion eines aktivierten T-Zellphänotypen.....	142
7.6.2	Vermehrte Differenzierung zu TCM .....	143
7.6.3	Reduktion der Seneszenz und gesteigerte TCM-Differenzierung durch Hyperaktivierung in T- Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom.....	145
7.7	<i>Therapeutischer Einsatz.....</i>	146
7.7.1	T-Zellhyperaktivierung und TCM-Differenzierung als Vorteil in der zellulär basierten Tumorthherapie bzw. (Tumor)Vakzinierung .....	146
7.7.2	Identifikation der hyperaktivierenden Mechanismen bzw. Arginaseinhibition als Möglichkeit in der Therapie der Sepsis oder Hyperinflammationssyndrome.....	148
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>169</b>
10.1	<i>T-Zellproliferation in [cpm] .....</i>	169
10.2	<i>OCR- und ECAR-Werte von frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen .....</i>	169
10.3	<i>Proteom Profiler<sup>TM</sup> Array von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen .....</i>	170
10.4	<i>Langzeit Proliferation von T-Zellen in RPMI, huRPMI und PMN-ÜS mit nor-NOHA .....</i>	171
10.5	<i>T-Zellproliferation in RPMI mit 0, 5, 10 und 20 % dial. FCS.....</i>	171
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>172</b>
<b>12</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>173</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

2-NBDG	2-( <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Amino)-2-Deoxyglucose
<sup>3</sup> H	Tritium
4EBP1	eIF4E- bindendes Protein 1
Abb.	Abbildung
ABH	2-( <i>S</i> )-amino-6-borono-hexanoic acid
ADC	Arginin-Decarboxylase
AG	Arbeitsgruppe
AGAT	Arginin-Glycin-Amidino-transferase
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
ARG1/2	Arginase 1/2
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS 1	Argininosuccinat-Synthase 1
ATP	Adenosin-triphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
CAT	Kationischer Aminosäuretransporter
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i>
CPM	Counts Per Minute
CPS I	Carbamoylphosphat-Synthetase I
(D)PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DAG	Diacylglycerin
DAMP	<i>Damage/Danger-associated molecular pattern</i> , Schaden/Gefahr-assoziertes molekulares Muster
DC	<i>Dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i> , extrazelluläre Ansäuerungsrate

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal-Transition</i> , Epitheliale-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor</i> , Granulozyten-Monocyten/Marophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HDN	<i>High-density neutrophils</i> , PMN mit hoher Dichte in der Zellisolation
HIF-1	Hypoxie-induzierter-Faktor-1
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- $\alpha$ bzw. $\beta$	Interferon $\alpha$ bzw. $\beta$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-phosphat
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive
JAK	Janus-Kinasen
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LDN	<i>Low-density neutrophils</i> , PMN mit geringer Dichte in der Zellisolation
LOX-1	Lecitin-ähnlicher oxidiertes Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> , mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDSC	<i>Myeloid-derived Suppressor Cell</i> , Myeloische Supressorzelle

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
M-MDSC	Mononukleäre MDSC
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MnK1	<i>MAPK-interacting Kinase 1</i>
MPO	Myeloperoxidase
mTORc 1/2	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2</i>
NE	Neutrophile Elastase
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i> , neutrophiles extrazelluläres Netz
NF-kB	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B cells</i> , Transkriptionsfaktor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOHA	N-Hydroxy-L-Arginin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase, NO-Synthase
Nor-NOHA	N <sup>W</sup> -Hydroxy-nor-L-Arginin
NAC	N-Acetylcystein
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OAT	Ornithin-Aminotransferase
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i> , mitochondrialer Sauerstoffverbrauch
ODC	Ornithin Decarboxylase
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzelle
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PDL-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1 Ligand</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D

PLC	Phospholipase C
PLCy1	Phospholipase Cy1
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear Neutrophils</i> , neutrophile Granulozyten
PMN-MDSC	Polymorphonukleäre MDSC
PMN-ÜS	Überstand der neutrophilen Granulozyten
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma, Serin/Threonin-Proteinkinase
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , G-Protein
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffverbindungen
RPMI	Medium, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SHP-1	<i>SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1</i>
S6K1	p70 S6- Kinase
TAN	<i>Tumor associated Neutrophil</i> , tumorinfiltrierende Neutrophile Granulozyten
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i> , Trisgepufferte Salzlösung
TBST	<i>Tris-buffered Saline + 0,1 % Tween-20</i>
TCM	<i>Central Memory T cell</i> , zentrale Gedächtniszelle
TCR	<i>T Cell Receptor</i> , T-Zellrezeptor
TEFF	<i>Effector T cell</i> , Effektorzelle
TEM	<i>Effector Memory T cell</i> , Effektor Gedächtniszelle
TEMRA	<i>Effector Memory T cell Receptor Antagonist</i> , terminal differenzierte Effektor Gedächtniszelle
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
Th	T-Helferzelle
TME	Tumor Microenvironment
TN	naïve T-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

TSCM	<i>Stemcell-like Central Memory T cell</i> , Stammzellähnliche zentrale Gedächtniszelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
UPR	<i>unfolded protein response</i> , ungefaltete Proteinreaktion
ÜS	Überstand
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Endothelwachstumsfaktor
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
ZAP70	Zetaketten-assoziierte Proteinkinase von 70 kDa

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Tumormikroumgebung. ....	2
<b>Abbildung 2:</b> TCR-Signaltransduktion. ....	11
<b>Abbildung 3:</b> Prozesse der Gedächtniszellbildung. ....	19
<b>Abbildung 4:</b> Oberflächenmarker der T-Zell Differenzierung. ....	21
<b>Abbildung 5:</b> Arginin Metabolismus. ....	25
<b>Abbildung 6:</b> Einsatz von Arginase-Inhibitoren INCB001158, nor-NOHA, CB-280 und OATD-02 in klinischen Studien. ....	33
<b>Abbildung 7:</b> Allgemeiner Versuchsaufbau. ....	50
<b>Abbildung 8:</b> Mito Stress Test Schema. ....	59
<b>Abbildung 9:</b> Energiephänotyp. ....	62
<b>Abbildung 10:</b> T-Zellproliferation. ....	68
<b>Abbildung 11:</b> T-Zellproliferation in PMN/T-Zell Kokultur mit und ohne Zugabe des Radikalfängers N-Acetylcystein. ....	70
<b>Abbildung 12:</b> T-Zellproliferation in Transwellkultur mit PMN. ....	71
<b>Abbildung 13:</b> Auswirkung unterschiedlicher Medienbedingungen auf die T-Zellproliferation. ....	72
<b>Abbildung 14:</b> T-Zellproliferation in PMN-Überständen mit Zugabe von Citrullin und Arginin. ....	74
<b>Abbildung 15:</b> T-Zellproliferation in eingefrorenen und wieder aufgetauten PMN-Überständen. ....	76
<b>Abbildung 16:</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. ....	77
<b>Abbildung 17:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. ....	78
<b>Abbildung 18:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahmen von konventionell aktivierten bzw. hyperaktivierten T-Zellen. ....	79
<b>Abbildung 19:</b> Mitochondrienanzahl pro Schnittebene in T-Zellen unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen. ....	80
<b>Abbildung 20:</b> Energie Phänotyp der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	82
<b>Abbildung 21:</b> OCR- und ECAR-Werte von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf. ....	84
<b>Abbildung 22:</b> Basale OCR- und ECAR-Werte der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	84
<b>Abbildung 23:</b> Hyperaktivierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen zeigen stark erhöhte metabolische Aktivität. ....	85
<b>Abbildung 24:</b> OCR- und ECAR-Werte von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf. ....	87
<b>Abbildung 25:</b> Basale OCR- und ECAR-Werte der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	87
<b>Abbildung 26:</b> Hyperaktivierte CD8 <sup>+</sup> T-Zellen zeigen stark erhöhte metabolische Aktivität. ....	88

<b>Abbildung 27:</b> OCR/ECAR-Ratio für CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	89
<b>Abbildung 28:</b> Glukoseaufnahme in CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	90
<b>Abbildung 29:</b> GLUT-1 Transporter Expression auf CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	91
<b>Abbildung 30:</b> Einteilung der T-Zellpopulation anhand der Expression von CD28 und CD57. .....	92
<b>Abbildung 31:</b> CD28/CD57 Expression auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	93
<b>Abbildung 32:</b> CD28/CD57 Expression auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	94
<b>Abbildung 33:</b> CD28/CD57 Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	96
<b>Abbildung 34:</b> CD28/CD57 Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	97
<b>Abbildung 35:</b> Einteilung der T-Zellphänotypen in Subtypen anhand der Expression von CD45RA und CD62L.....	98
<b>Abbildung 36:</b> CD45RA/CD62L Expression auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	99
<b>Abbildung 37:</b> CD45RA/CD62L Expression auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	100
<b>Abbildung 38:</b> CD45RA/CD62L Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	102
<b>Abbildung 39:</b> CD45RA/CD62L Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.....	103
<b>Abbildung 40:</b> T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom: CD28/CD57 Expression auf CD8 <sup>+</sup> (A, B) und CD4 <sup>+</sup> (C, D) T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA. ....	105
<b>Abbildung 41:</b> T-Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiple Myelom: CD28/CD57 Expression auf CD8 <sup>+</sup> (A, B) und CD4 <sup>+</sup> (C, D) T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA. ....	106
<b>Abbildung 42:</b> T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression auf CD8 <sup>+</sup> (A, B) und CD4 <sup>+</sup> (C, D) T-Zellen aktiviert in in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA. ....	108
<b>Abbildung 43:</b> T-Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression auf CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA. ....	110
<b>Abbildung 44:</b> Proteom Profiler™ Array (Human Phospho-Kinase Assay) von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen.....	112

<b>Abbildung 45:</b> Darstellung der untersuchten Proteine im TCR-Signalweg.....	114
<b>Abbildung 46:</b> Phosphorylierung von Akt in T-Zellen. ....	114
<b>Abbildung 47:</b> Phosphorylierung von S6 in T-Zellen. ....	115
<b>Abbildung 48:</b> Abbildung 52: Phosphorylierung von 4EBP1 in T-Zellen. ....	116
<b>Abbildung 49:</b> Phosphorylierung von Erk1/2. ....	117
<b>Abbildung 50:</b> Phosphorylierung von p38 MAPK in T-Zellen. ....	118
<b>Abbildung 51:</b> Phosphorylierung von eIF4E in T-Zellen. ....	118
<b>Abbildung 52:</b> T-Zell Degranulation.....	119
<b>Abbildung 53:</b> Langzeitproliferation von transduzierten T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS mit nor-NOHA.....	121
<b>Abbildung 54:</b> Zytotoxizität von T-Zellen aus Langzeitkultur in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit nor-NOHA.....	122
<b>Abbildung 55:</b> CD8 T-Zellanteil in +Arg-RPMI-Medium, huRPMI-Medium und PMN-ÜS mit nor-NOHA Langzeitkultur. ....	123

## **Anhang**

<b>Abbildung 1:</b> T-Zellproliferation in [cpm].....	169
<b>Abbildung 2:</b> OCR- und ECAR-Werte von frisch isolierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf. .	169
<b>Abbildung 3:</b> Proteom Profiler™ Array von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen. .	170
<b>Abbildung 4:</b> Langzeitproliferation von transduzierten T-Zellen in huRPMI, +Arg-RPMI und PMN-ÜS mit nor-NOHA.....	171
<b>Abbildung 5:</b> T-Zellproliferation in RPMI mit unterschiedlichen dial. FCS-Konzentrationen. ....	171

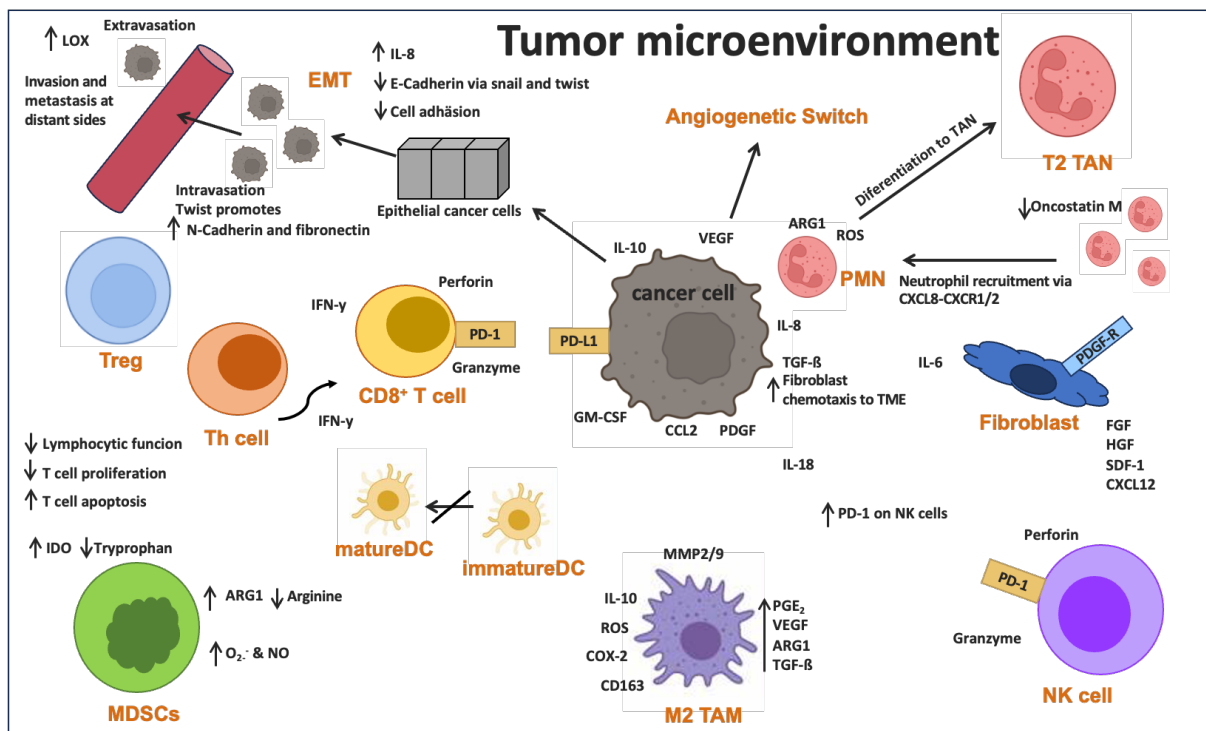
### 3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> CD4 T-Zellen - Subtypen, ihre Zytokinprofile und Aufgaben in der Immunantwort .....	15
<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Medien.....	35
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Medienzusätze .....	35
<b>Tabelle 3:</b> Medienzusammensetzung.....	36
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Zelllinien .....	36
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Chemikalien.....	37
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.....	39
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Kits.....	40
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	42
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Isotypen-Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	42
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Antikörper für Western Blot .....	43
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot .....	43
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Materialien .....	43
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Geräte.....	44
<b>Tabelle 14:</b> Verwendete Programme/Software.....	46
<b>Tabelle 16:</b> Bedeutung der Seahorse Messwerte .....	60
<b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung Trenngel für SDS-PAGE .....	65
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung Sammelgel für SDS-PAGE .....	65
<b>Tabelle 15:</b> Signifikanzen .....	67

## 4 Einleitung

### 4.1 Die Tumormikroumgebung, ihre Bestandteile und die Rolle in der Tumorgenese

2000 definierten Hanahan und Weinberg in ihrer Arbeit „*Hallmarks of Cancer*“ verschiedene Merkmale, die es Tumorzellen grundsätzlich ermöglichen zu überleben, zu proliferieren und sich zu verbreiten. Dies diente dem allgemeinen Verständnis der Komplexität neoplastischer Erkrankungen. Diese Merkmale umfassen (i) die eigenständige Proliferation unabhängig von Wachstumssignalen, (ii) die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (iii) die Widerstandsfähigkeit gegen den Zelltod, (iv) das unlimitierte Replikationspotential, (v) die anhaltende Angiogenese und (vi) die Fähigkeit der Gewebsinvasion und Metastasierung. (1). Ergänzend hierzu entwickelte sich in den folgenden Jahren die Erkenntnis („*Hallmarks of Cancer: The Next Generation*“), über den veränderten Metabolismus von Tumorzellen und die Fähigkeit der Tumormimmunevasion. Ermöglicht werden diese und auch die zuvor beschriebenen Charakteristika durch (i) die genomische Instabilität und die Mutationsfähigkeit von Tumorzellen und (ii) die tumorinduzierte Inflammation. Es wird deutlich, dass das Verständnis der Tumorbilogie nur möglich ist, wenn nicht nur Tumorzellen alleine, sondern auch die von Tumoren rekrutierten Zellen betrachtet werden, die eine protumorale Mikroumgebung bilden (*Tumor Microenvironment*, TME) bzw. eine tumorfördernde Inflammation unterstützen (2). Das TME beinhaltet u.a. folgende Komponenten (siehe Abbildung 1): (i) infiltrierende Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMN), Mastzellen oder antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC) wie dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC), sowie T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), (ii) Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine, oder Wachstumsfaktoren sowie (iii) die extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) mit verschiedenen Strukturproteinen. In unterschiedlichen Stadien der Tumorgenese zeigen diese Bestandteile immer wieder Veränderungen und weisen somit unterschiedliche Funktionen auf (3, 4).



**Abbildung 1: Tumormikroumgebung.** Dargestellt sind die zellulären Bestandteile des TME, die Vielzahl der Signalmoleküle und deren Interaktionen. Modifiziert nach Barriga et al. 2019 (5)

Das proinflammatorische Milieu des TME nimmt neben der Tumorentstehung ebenfalls eine Rolle in zwei Mechanismen der Tumorentstehung ein. Hierzu zählt ein entscheidender Schritt des Tumorzellwachstums, der „*angiogenic switch*“, sowie eines der Grundlagenmechanismen für die Tumorzellinvasion und Metastasierung, die „*epithelial-mesenchymal-transition*“ (EMT). Sobald Tumore eine gewisse Größe erreichen, ist die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen eingeschränkt. Dieser Zustand kann von Tumoren durch den *angiogenic switch* überwunden werden. Es kommt zum Überwiegen proangiogener Faktoren (wie VEGF), welche die Bildung neuer Blutgefäße fördern, sodass Nährstoffe und Sauerstoff für das weitere Tumorzellwachstum bereitgestellt werden können. Die neu entstandenen Tumorgefäße stellen zusätzlich einen Weg für die hämatogene Metastasierung dar (6). Die EMT beschreibt einen Vorgang, der in epithelialen (Tumor)zellverbänden zum Verlust von Zellpolarität und Zellverbindung beiträgt und somit zum Erwerb mesenchymaler Eigenschaften führt. Physiologisch ist EMT ein in der Embryonalentwicklung beschriebener Vorgang und spielt zudem eine Rolle in der Wundheilung (7). EMT in Tumoren wird vor allem über den *Transforming Growth Factor β* (TGF-β) initiiert (8). Metastasierung umfasst nicht nur EMT, sondern auch eine umfassende Zellinvasionsskizade. Diese beinhaltet die Migration der Tumorzellen ins tumorumgebende Stroma, den Übertritt der Tumorzellen in die Blutbahn, das Überleben in der Blutbahn und die dortige Immunevasion, die erneute Extravasation und die Formierung von Mikrometastasen, welche durch verstärktes Wachstum in Makrometastasen transformieren (9). Ein Invasionsmechanismus ist der Verlust des

epithelialen Cadherin (E-Cadherin), einem Adhäsionsmolekül. Dies führt dazu, dass Tumorzellen ihre Zellpolarität sowie ihre Adhäsion im epithelialen Zellverband verlieren und somit die Fähigkeiten erlangen zu migrieren, invasiv zu wachsen und anschließend zu metastasieren (10).

2022 ergänzten Hanahan und Weinberg in die „*Hallmarks of Cancer: New Dimensions*“ weitere Merkmale. Hierunter fallen epigenetische Zellumprogrammierungen, welche unter anderem durch die Tumorumgebung wie Hypoxie, verschiedene Zytokine oder die Interaktion mit tumorinfiltrierenden Zellen vermittelt werden. Aber auch polymorphe Mikrobiome, wie sie zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, auf der Haut oder den weiblichen Geschlechtsorganen zu finden sind, und ihr Zusammenspiel mit der Tumorphogenese werden thematisiert. Als weitere Punkte werden die zelluläre Plastizität von Tumorzellen genannt, sowie die zelluläre Seneszenz der Tumorzellen selbst, aber auch die Seneszenz der tumorumgebenden Zellen und ihre Interaktion mit dem Tumor (11).

Es wird deutlich, dass das Verständnis der Tumorgenese weitaus komplexer ist als die zunächst angenommenen sechs Basis-Merkmale. Die Komplexität der Tumorgenese spiegelt aber auch die vielfältigen therapeutischen Anknüpfungspunkte wider. Beispielsweise ermöglicht die Erforschung des TME unterschiedlicher Tumorentitäten das Erlangen eines detaillierten Verständnisses über Tumorphogenese, Metastasierung, Signal- und Zytokinproduktion, Depletion von Nährstoffen oder Sauerstoff, Akkumulation von Schadstoffen, das Zusammenspiel von tumorinfiltrierenden Immunzellen und die Mechanismen der Tumormunevasion. Hierdurch entsteht die Möglichkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze. In zahlreichen Tumorentitäten wurde die klassische Chemotherapie, welche primär über verschiedene Mechanismen die Zellteilung bzw. Proliferation der Tumorzellen hemmt und somit in das zuallererst beschriebene „*Hallmark*“ eingreift, durch zahlreiche zielgerichtete Therapeutika, die in die verschiedenen Prozesse des TME eingreifen, ergänzt oder abgelöst (2, 3). In diesem Zusammenhang sind hier vor allem die Mechanismen der Tumormunevasion hervorzuheben. Immunzellen, die sich zahlreich im TME befinden, wären an sich in der Lage Tumorzellen bzw. neoplastische Zellen zu erkennen und auch zu bekämpfen. Galassi et al. beschreiben in „*The hallmarks of cancer immune evasion*“ drei Hauptmechanismen der Tumormunevasion: (i) Tarnung: Mechanismen maligner Zellen sind hier beispielsweise eine veränderte oder gestörte Prozession bzw. Präsentation von Antigenen oder Gewebebarrieren. (ii) Suppression der Aktivität von Immunzellen und Induktion von immunsuppressiven Zellen: Hierzu zählen zum einen die Suppression von T-Zellen über Immuncheckpointsignalwege, ein verändertes anti-inflammatorisches Zytokinsekretom und die metabolischen Einschränkungen von Immunzellen im TME. Auch die Akkumulation schädlicher Metaboliten sowie die Reduktion essentieller Metaboliten wie Glukose, Sauerstoff oder auch die Aminosäuren Arginin, welche für die T-Zellproliferation essentiell ist, können in

diesem Kontext genannt werden (12). Der Abbau von Arginin erfolgt über das Enzym Arginase (ARG), welches entweder vom Tumor selbst oder aber von tumorassoziierten PMN oder Myeloiden Suppressorzellen (MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*) sezerniert wird (13-15). Die oben beschriebene Induktion von immunsuppressiver Zellen bezieht sich zu großen Teilen auf genau diese MDSC (iii) Abschirmung maligner Zellen gegen die Zytotoxizität der Immunzellen: Hierzu zählen eine gestörte Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen Tumorzellen und den antitumoralen Immunzellen, defekte Zelltodsignalwege oder die Hochregulation von Kompensationsmechanismen in Tumorzellen gegen die zytotoxischen Effekte von Immunzellen (12).

Die folgende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der tumorinduzierten Inflammation und einem bestimmten Mechanismus der Tumormunevasion, der Arginase vermittelten Depletion der für T-Zellen essentiellen Aminosäure Arginin. Den Hauptbestandteil stellt die Interaktion von PMN und T-Zellen unter Arginase-Inhibition dar. Die folgenden einleitenden Kapitel thematisieren demnach PMN, ihre Veränderung und Rolle im TME, T-Zellen, ihre Aktivierung und Differenzierung und die Rolle der Arginase im TME.

#### **4.1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle im TME**

Die Rolle von PMN im peripheren Blut wie auch im TME ist komplex. Für verschiedene Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der PMN im peripheren Blut erhöht ist. Eine hohe Anzahl an PMN ist mit einer schlechteren Prognose und reduzierterem Gesamtüberleben assoziiert. Tumore induzieren durch die Produktion von Myelopoese stimulierenden Zytokinen wie G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) die Granulopoese im Knochenmark sowie die Freisetzung der neu gebildeten Granulozyten aus dem Knochenmark (16-18). Verschiedene Chemokine und Zytokine, welche die Rekrutierung von PMN ins TME begünstigen, wurden identifiziert. Tumore oder tumorassoziierte Zellen sezernieren die Chemokine CXCL (C-X-C Motif Chemokine Ligand, CXCL) 1, 2, 5, 6 und 8, welche über die Rezeptoren CXCR (C-X-C Motif Chemokine Receptor, CXCR) 2 und 1 auf PMN chemotaktisch wirken. Aber auch Zytokine, wie die Interleukine (IL) IL-17A, IL-6, Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und TGF- $\beta$ , können PMN ins TME rekrutieren (19).

Lange Zeit bestand die Annahme, PMN würden eine homogene ausdifferenzierte Zellpopulation darstellen. Diese Vorstellung beruhte auf ihren Eigenschaften, wie der relativ begrenzten Lebenszeit, der geringen transkriptionellen Aktivität und der Unfähigkeit nach dem extravasalen Austritt zum Infektionsort wieder zurück ins vaskuläre System zu remigrieren (20). Insbesondere auf der Grundlage der in Ruhe mit im Mittel ca. 7 Stunden gemessenen Lebensdauer humaner PMN wurde angenommen, dass PMN nur einen geringeren Einfluss auf die Tumorgenese haben als andere Immunzellen (18, 21).

Im Infektionsgeschehen oder bei chronischer Inflammation wird die Lebenszeit von PMN durch Hemmung der Apoptose, vermittelt durch Zytokine, Pathogen-assoziierte Moleküle (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) oder im Kontext von Gewebeschädigung (*damage/danger-associated molecular pattern*, DAMP) verlängert (20). Ng et al. zeigten, dass PMN im TME eine deutlich verlängerte Vitalität (im Mittel 41,8 h) aufweisen als im peripheren Blut (22).

Auch die Annahme einer geringen transkriptionelle Aktivität musste modifiziert werden. PMN zeigen eine sehr variable epigenetisch und genetisch regulierte Genexpression und eine je nach Situation oder Umgebung angepasste Transkription und Proteinsynthese (20). Zudem konnte eine Subpopulation von PMN identifiziert werden, welche im Unterschied zu zirkulierenden PMN die Oberflächenmoleküle ICAM-1<sup>high</sup> CXCR1<sup>low</sup> exprimieren und somit die Eigenschaft der umgekehrten Transmigration zurück ins vaskuläre System besitzen. Diese PMN sind so in der Lage, sowohl in sekundären lymphatischen Organen als auch im Knochenmark die Immunantwort zu modellieren (23-25). PMN weisen demnach eine hohe Plastizität auf (26). Gerade im TME, aber auch im Rahmen von Infektionskrankheiten oder chronischen Entzündungen, sind sie vielen Reizen ausgesetzt, die zu Veränderungen des Zellphänotyps führen (16, 27). Immer mehr Forschungen über PMN in gesunden Probanden wie auch in Tumorpatienten zeigen, dass diese im peripheren Blut (20) und im Knochenmark (28) eine starke Heterogenität aufweisen. Es wird somit deutlich, dass PMN als komplexe Zellpopulation im Bereich der Tumormunologie eine bedeutende Rolle einnehmen. Eine Herausforderung ist es, dieses weite Spektrum an PMN und ihre Funktionen im TME bzw. in der Tumorgenese zu charakterisieren. Nicht nur die Differenzierung und Plastizität der PMN im TME sind vielfältig, sondern auch ihre Rolle in Bezug auf Tumorinitiierung, Tumorwachstum und -angiogenese, Invasion und Metastasierung sowie Chemotherapieresistenz (16).

Im Rahmen der Tumorentstehung etablieren Tumore ein proinflammatorisches TME. Es kommt zur Rekrutierung von PMN, welche u.a. reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) produzieren. ROS führen zu DNA-Schäden und somit zu Mutationen, welche einen wichtigen Mechanismus der Tumorinitiierung darstellen (29). Auch in der weiteren Tumorgenese sind ROS beteiligt und führen z.B. zur Immunsuppression im TME (30) und Chemotherapieresistenz (31) oder fördern EMT und somit die Tumorinvasion und Metastasierung (32). Auf der anderen Seite können PMN über ROS auch antitumorale Funktionen einnehmen, da diese zur Lyse von Tumorzellen führen können (33).

Über die Sekretion von Signalmolekülen wie Endothelwachstumsfaktoren (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), Onkostatin M oder TGF- $\beta$  fördern PMN die Tumorangio-genese, Chemotherapieresistenz und induzieren in Makrophagen im TME eine Polarisation in Richtung protumoraler M2 Makrophagen (32). Der Einfluss der PMN wird über

die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17, CXC- oder CC-Chemokine verstärkt, da diese zu einer weiteren Rekrutierung von PMN ins TME führen (32). Zusätzlich werden über die Sekretion von CCL2, CCL3, CCL19 und CCL20 Makrophagen und DCs rekrutiert (34). Den aus den Granula der PMN freigesetzten Enzymen, wie die neutrophile Elastase (NE) oder Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), werden ebenfalls protumorale Eigenschaften zugesprochen (34). Erhöhte NE oder MMP-9 Werte in Tumoren sind mit schlechtem Gesamtüberleben (35) sowie mit Tumorzellmigration, -invasion und Metastasierung assoziiert. MMP-9 im Speziellen ist am „angiogenetic switch“ beteiligt (36-38). Der NE vermittelte Abbau des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin führt im Rahmen der EMT zu erhöhter Tumorzellmigration und Invasion (36). NE ist ebenfalls in so genannten neutrophilen extrazellulären Netzen (*neutrophil extracellular trap*, NET) zu finden. NETs sind von PMN freigesetzte Netze aus DNA, NE, MMP-9, Myeloperoxidase (MPO), Cathepsin E und Histonen und dienen der Elimination von Pathogenen, Bakterien und Pilzen (39). In Lungentumoren wurde beschrieben, dass NETs zirkulierende Tumorzellen binden und somit Metastasierung fördern (40, 41). Über die Expression von Arginase 1 (ARG1) sind PMN in der Lage, Arginin im TME oder am Ort einer Infektion abzubauen. Die Aminosäure Arginin ist essenziell für die Aktivierung, Proliferation und Funktion von T-Zellen. Eine Depletion von Arginin im TME führt zu Suppression und reduzierter antitumorale Aktivität von T-Zellen (42). Neben der gestörten Proliferation und Aktivierung induziert der Argininmangel in T-Zellen den Zellzyklusarrest, beeinträchtigt die Ausbildung einer suffizienten immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und Tumorzelle und reduziert die Zytokinproduktion (15). Die Arginasevermittelte Arginindepletion im TME ist somit ein wichtiger Mechanismus der Tumormimmunevasion und wird als Grundlage dieser Arbeit nochmal in Kapitel 4.1.5 (Arginase im TME) detailliert beschrieben.

In Rahmen der Tumorgenese oder auch durch Chemotherapie kommt es zu der von Hanahan et al. beschriebenen Seneszenz in Tumorzellen, aber auch in tumorassoziierten Zellen wie T-Zellen oder Fibroblasten (11). Es konnte gezeigt werden, dass das Sekretom seneszenten Zellen im TME eine protumorale Umgebung schafft. IL-6 fördert zudem die Tumorzellproliferation und gemeinsam mit IL-8 die EMT. Faktoren wie VEGF und CXCL5 fördern die Angiogenese. Über IL-6 und CCL2 kommt es zur Rekrutierung von myeloischen Zellen ins TME, welche zur Suppression von antitumoralen Immunzellen wie T-Zellen und NK-Zellen führen (43). Über die Sekretion von IL-4RA können PMN eine therapieinduzierte Seneszenz in Tumorzellen aufheben, Tumorzellen wieder in proliferierende Zellen umwandeln und somit die Entstehung einer Therapieresistenz bzw. eines Tumorrezidivs fördern (44). Die mögliche protumorale Funktion von PMN wird durch die Ergebnisse von Jamieson et al. unterstützt, die in Mausmodellen zeigen konnten, dass eine komplette PMN-Depletion (mittels CXCR2-Antikörper) das Tumorwachstum hemmt (45).

#### 4.1.2 MDSCs und ihre Rolle in der tumorinduzierten Immunsuppression

Myeloische Zellen umfassen eine Vielzahl an Entitäten. Hierunter fallen mononukleäre Zellen wie Makrophagen, DC, granulozytäre Zellen wie neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Mastzellen. In Reaktion auf einen pathogenen Stimulus kommt es zur Induktion der Myelopoese im Knochenmark und myeloische Zellen werden zur Bekämpfung und Elimination von Pathogenen wie Bakterien aktiviert (46). Kommt es hingegen zu einer persistierenden Stimulation des Knochenmarks, beispielsweise im Rahmen einer chronischen Entzündung oder durch von Tumoren sezernierten Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (47), G-CSF (48, 49), VEGF (50), IL-6 (18) oder Prostaglandin E2 (PGE2) (51), führt dies zur andauernden verstärkten Induktion der Myelopoese. Die unter diesen Bedingungen entstandenen myeloischen Zellen differenzieren zusätzlich in unterschiedliche Subpopulationen, welche sich in ihrem genetischen Profil, Proteom bzw. Transkriptom und ihrer Funktionalität von normal differenzierten myeloischen Zellen unterscheiden (46, 52, 53). Aber auch Botenstoffe wie pro-inflammatorische Zytokine, die von Tumoren und tumorinfiltrierenden Zellen produziert werden, induzieren im TME einen veränderten Phänotyp in myeloischen Zellen (52, 54, 55). Ein funktionelles und definierendes Hauptmerkmal dieser myeloischen Zellen ist die Suppression der antitumoralen Immunantwort (56). In Zusammenschau des myeloischen Ursprungs und der supprimierenden Eigenschaft entstand der Name „*Myeloid-derived suppressor cells*“ (MDSC) (57). Es werden im wesentlichen mononukleäre MDSC (M-MDSC) und polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) beschrieben (58). Im Rahmen der klassischen Zellisolation können unterschiedliche PMN-Subpopulationen in Tumorpatienten unterschieden werden. Nach der Zentrifugation und Auftrennung der Zellen nach ihrer Dichte mittels Ficoll® oder Histopaque® sind die MDSCs wegen ihrer geringeren Zelldichte in der PBMC-Fraktion zu finden, während PMN auf Grund der höheren Dichte in einer anderen Fraktion zu finden sind (59, 60). Eine genaue Charakterisierung der MDSCs über die Expression eindeutiger Oberflächenmarker ist Gegenstand der aktuellen Forschung. M-MDSCs können über die Expression von CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup> definiert werden und PMN-MDSCs über die Expression von CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>. Auch CD34, S1009/A8, IL4Ra und HLA-DR<sup>low/-</sup> werden als mögliche Marker für MDSCs aufgeführt (61-64).

Da diese Arbeit die Interaktion von PMN und T-Zellen untersucht, liegt der Fokus im folgenden Abschnitt auf der Rolle der PMN-MDSCs. PMN-MDSCs sind sowohl im peripheren Blut von Tumorpatienten, Patienten mit chronischen Infektionen als auch direkt im Tumorgewebe zu finden. Über ähnliche Mechanismen wie „gewöhnliche“ PMN kommt es durch PMN-MDSCs zur Suppression der antitumoralen Immunantwort. Durch die Produktion von ROS wird die Funktionalität des T-Zellrezeptors (*T cell receptor*, TCR) gestört und somit die antigenspezifische Immunantwort gegen Tumorzellen supprimiert (30, 65, 66). Es kommt zur Herabregulation der Haupthistokompatibilitätskomplexe I (*Major Histocompatibility Complex*,

MHC) und MHC-II auf der Zellmembran von Tumorzellen bzw. APCs und somit zur Umgehung der antigenspezifischen Erkennung des Tumors durch die T-Zellen (67). ROS hemmen ebenfalls die Migration der T-Zellen in den Tumor (68). PMN-MDSCs exprimieren ARG1 und führen durch die Arginindepletion im TME zur Suppression der T-Zellaktivierung und Proliferation (69, 70). Die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) führt zum Abbau der Aminosäure Tryptophan. Ein Mangel an Tryptophan führt zur Beeinträchtigung der TCR-Stimulation und Signalvermittlung. Die Differenzierung in Effektor T-Zellen (TEFF) ist beeinträchtigt, T-Zellen werden anerg, gehen in Apoptose oder differenzieren zu protumoralen regulatorischen T-Zellen (Tregs). Über die entstandenen Tryptophan-Abbauprodukte wie Kynurenin, aber auch durch IDO selbst kommt es zur Beeinträchtigung der Aktinpolymerisation in T-Zellen sowie zur beeinträchtigten TCR-Signalweiterleitung (71-73). Zudem exprimieren PMN-MDSCs inhibitorische Oberflächenproteine wie PD-L1, CD80, CD86, CD112 oder CD115 (67). MDSCs besitzen auch direkt protumorale Eigenschaften wie die Regulation des Tumorwachstums, der Tumorangiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung über die Expression von u.a. VEGF oder MMP-9 (52). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Menge an MDSCs in soliden Tumoren mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert (74).

#### **4.1.3 Myeloische Zellen im TME: PMN, TANs oder MDSCs?**

In der tumorimmunologischen Forschung bestehen verschiedene Konzepte, die versuchen, die Rolle von PMN in Tumorpatienten und im TME einzuordnen. Hierbei sind zum einen die „gewöhnlichen“ PMN zu nennen, die in erhöhter Anzahl im peripheren Blut von Tumorpatienten zirkulieren. Außerdem existieren PMN, die den Tumor direkt infiltrieren (*tumor associated neutrophils*, TAN) und somit Teil des direkten TMEs werden. Zusätzlich wird die vom Tumor induzierte Subpopulation der PMN-MDSCs diskutiert. Die Charakterisierung der heterogenen PMN-Subgruppen erfolgt bislang über Funktion, Oberflächenmarker, zelluläre Dichte und Transkriptionsfaktoren (22).

TANs wurden von Fridlender et al. in zwei Subgruppen unterteilt. TGF- $\beta$  fördert die Differenzierung in so genannte N2 Neutrophile (75), während eine TGF- $\beta$  Inhibition oder eine Stimulation über IFN- $\beta$  eine Differenzierung in den N1 Phänotyp zu Folge hat (75, 76). N1 TANs wirken zytotoxisch und hemmend auf das Tumorwachstum über die Verstärkung der antitumoralen Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (75). N2 TANs fördern hingegen das Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung und supprimieren die antitumorale Immunantwort (38). Auch hier werden als Hauptmechanismen ROS und eine hohe ARG1 Expression beschrieben, über welche die T-Zellfunktion supprimiert wird (77). Auf Grund der immunsuppressiven Eigenschaft der N2 TANs wurden diese durch Gabrilovich et al. den PMN-MDSCs zugeordnet, da sie das Hauptkriterium der PMN-MDSCs, die Immunsuppression im

TME, erfüllen (52). Ng et al. beschrieben, eine Vielzahl phänotypisch verschiedener PMN, die den Tumor infiltrieren und anschließend im TME zu einem homogenen protumoralen Phänotyp transformieren, welche im Gegensatz zu anderen PMN dcTRAIL-R1 exprimieren und ein terminal differenziertes Genprofil aufweisen. Auch diese durch Ng et. al. beschriebenen T3 PMN zeigen protumorale Eigenschaften über die Expression von VEGFa (22). Zilionis et al. waren in der Lage, basierend auf Transkriptionsanalysen fünf Subgruppen der TANs (N1 - N5) in Lungentumoren zu identifizieren (78). Weitere Studien zeigten, dass in Tumorpatienten durch die tumorinduzierte gesteigerte Myelopoese vermehrt unreife PMN ins periphere Blut ausgeschwemmt werden. Es wird angenommen, dass diese unreifen PMN, induziert durch den Tumor, im peripheren Blut oder im TME in Subtypen differenzieren, welche die Tumorgenese fördern (18). Durch die bereits erwähnte Dichtezentrifugation, welche zur Zellisolation genutzt wird, finden sich in Tumorpatienten zwei PMN-Hauptgruppen. Zum einen existieren PMN mit niedriger Dichte (*low-density neutrophils*, LDN), die in der PBMC-Fraktion enthalten sind. LDNs beinhalten heterogene PMN-Subpopulationen, unter anderem reife PMN und die beschriebenen unreifen PMN. Der Fraktion der LDN werden protumorale und immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. Interessanterweise sind PMN-MDSCs in der Fraktion der LDNs zu finden. Auf der anderen Seite gibt es PMN mit hoher Dichte (*high-density neutrophils*, HDN), bei welchen es sich um reife PMN handelt und denen ähnlich wie dem N1 Phänotyp antitumorale Funktionen zugeschrieben werden (26, 79). Condamine et al. konnten zeigen, dass 15 - 50 % der PMN in Tumoren den Lecitin-ähnlichen oxidierten Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LOX-1) exprimieren, welcher hingegen in PMN von gesunden Spendern nicht exprimiert wird. Zudem beschreiben sie, dass durch metabolischen Stress, welcher im TME vorherrscht, gewöhnliche PMN in PMN-MDSCs differenzieren. Sie definieren die LOX-1 Expression als Merkmal für PMN-MDSCs (59). Da nicht 100 % der PMN im TME LOX-1 exprimieren und somit den PMN-MDSCs zugeordnet werden können, besteht durchaus die Möglichkeit, dass das TME unterschiedliche PMN-Phänotypen enthält. Wie einleitend bereits dargestellt, weisen PMN eine hohe Plastizität auf und reagieren dynamisch auf ihre Umgebung (80).

Die Frage, wie viele PMN-Subtypen im peripheren Blut von Tumorpatienten oder im TME zu finden sind, ist nicht abschließend geklärt. So müssen insbesondere auch die Speziesunterschiede (Maus-Mensch) in den publizierten Ergebnissen stets bedacht werden. Auch das Konzept der MDSCs ist weiterhin Bestandteil der aktuellen Forschung. Ziel ist, zu ermitteln, ob es sich bei MDSCs um eine eigenständige Population handelt, die durch die tumorinduzierte Myelopoese aus Vorläuferzellen entsteht, oder ob es sich um gewöhnliche bzw. auch unreife PMN handelt, die erst im peripheren Blut oder im TME zu MDSCs differenzieren. Zwar werden einzelne antitumorale Funktionen von PMN beschrieben, in der

Gesamtheit besitzen PMN im tumorimmunologischen Kontext aber deutlich protumorale Eigenschaften und wirken immunsuppressiv (77).

#### **4.1.4 T-Zellen: Aktivierung, Differenzierung und Rolle im TME**

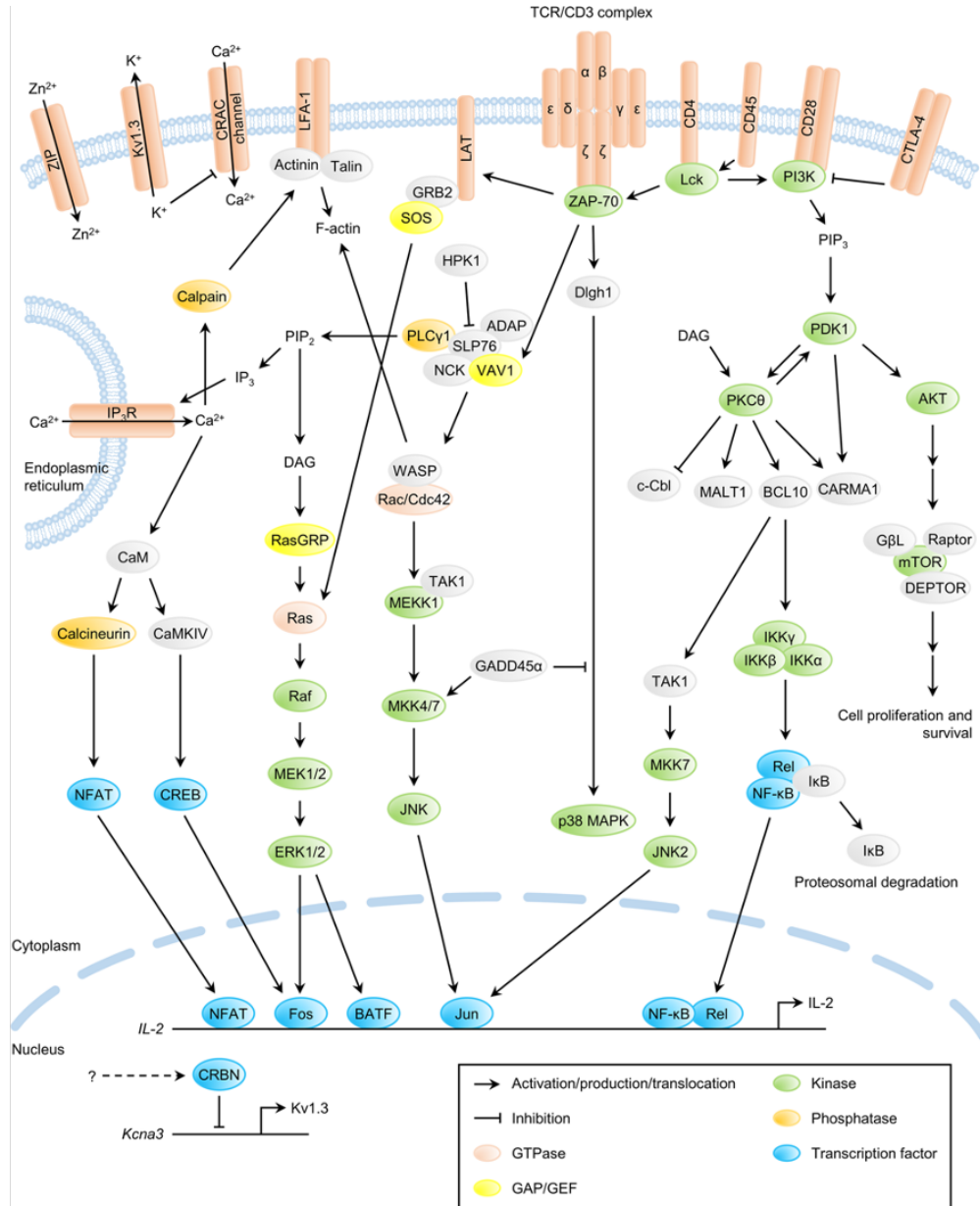
Im Rahmen der Immunantwort erfüllen T-Zellen folgende Aufgaben. Nach Kontakt der T-Zelle mit einem Antigen kommt es zur Elimination dieses für den Menschen potenziell schädigenden Antigens und zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, um zukünftig schneller und gezielter auf dieses Antigen reagieren zu können. In beiden Aspekten spielt die Rekrutierung und Aktivierung anderer Immunzellen eine wichtige Rolle. Es sind sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems an diesen Prozessen beteiligt. Die Entwicklung der T-Zellen beginnt als hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark. Als noch undifferenzierte Vorläuferzelle gelangen sie in den Thymus und exprimieren dort den TCR sowie die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8. Über die sogenannte positive Selektion erfolgt die Selektion der T-Zellen, die einen funktionalen TCR besitzen. Thymuszellen präsentieren zelleigene Antigene in der Verbindung mit MHC-I und MHC-II, sodass zusätzlich eine Unterteilung in CD4<sup>+</sup> (binden an MHC-II) und in CD8<sup>+</sup> T-Zellen (binden an MHC-I) erfolgt. Die darauffolgende negative Selektion eliminiert T-Zellen, die potenziell autoreaktiv reagieren könnten. Thymusepithelzellen und auch DCs präsentieren den T-Zellen körpereigene Antigene. Bindet die T-Zelle daran, wird die Apoptose eingeleitet. Bei den nun selektierten T-Zellen handelt es sich um naive T-Zellen (TN), die nun in den sekundären lymphatischen Organen, präsentiert über APCs, mit Antigenen in Kontakt kommen und zunächst in TEFFs differenzieren, klonal expandieren und anschließend Gedächtniszellen bilden (81).

##### **4.1.4.1 T-Zellaktivierung über den TCR und nachgeschaltete Signalwege**

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt über die Interaktion des TCR mit einem Peptid-Antigen, welches über MHC-Moleküle präsentiert wird. Zudem kommt es über weitere Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen wie CD28 (bindet an B7) oder CD27 (bindet an CD70) zu ko-stimulatorischen Signalen (82). Mit der Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor wird eine Vielzahl von Signalwegen innerhalb der T-Zellen aktiviert. Diese umfassen unter anderem das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Zytokinproduktion und die Zellproliferation. Distales Ziel wichtiger Signalwege innerhalb von proliferierenden und aktivierten T-Zellen ist die Proteintranslation, welche einen strikt regulierten Prozess innerhalb der Zelle darstellt. An der anschließenden klonalen Expansion der T-Zellen sind verschiedenen Zytokine, vor allem aber IL-2, was sowohl autokrin als auch parakrin wirkt, beteiligt (83).

Der TCR besteht aus mehreren Untereinheiten, zum einem dem TCR-Komplex, welcher aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette (in einem geringen Teil der T-Zellen auch  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten) und den CD3  $\gamma$  /  $\delta$  /  $\epsilon$  /  $\zeta$ -Untereinheiten besteht. Die CD3-Untereinheiten enthalten Immunrezeptor-

Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAM), welche sich auf der zytosolischen Seite des TCR/CD3-Komplexes befinden und somit das TCR-Signal nach intrazellulär weiterleiten (84). Eine Übersicht über die TCR-Aktivierung und nachgeschalteten Signalwege bietet Abbildung 2.



**Abbildung 2: TCR-Signaltransduktion** dargestellt sind die der TCR-Aktivierung nachgeschalteten intrazellulären Signalwege. Übernommen aus Hwang, 2020, (84)

Kommt es zur antigenspezifischen Bindung des TCR an ein MHC-I oder MHC-II Molekül und zur ausreichenden Ko-Stimulation z.B. über CD28, erfolgt als einer der ersten Schritte in der TCR-Signalkaskade die Phosphorylierung der ITAMs durch Tyrosinkinasen der Src-Familie wie Lck oder Fyn (85). Daraufhin kommt es zur Rekrutierung der Zetaketten-assoziierten Proteinkinase von 70 kDa (ZAP70) an den T-Zellrezeptor und deren anschließende Aktivierung über Lck. Aktiviertes ZAP70 bindet an LAT (*Linker for activation of T cells*, LAT)

und phosphoryliert dieses. Anschließend kommt es zur Rekrutierung von verschiedenen Signalmolekülen (86). Unter anderem erfolgt die Aktivierung von Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) hydrolysiert, wodurch die beiden *Second Messenger* Inositol-3-phosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) entstehen (87). Das lösliche IP $_3$  sorgt durch Bindung an Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum für eine intrazelluläre Kalziumerhöhung, was wiederum zur Aktivierung weiterer Signalwege und Transkriptionsfaktoren führt (88). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche u.a. über die Aktivierung der Proteinkinase D (PKD) zur Translokation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B cells*) in den Zellkern führt. Gleichzeitig wird über DAG und die aktivierte PKC ein Ras-Raf-MAP-Kinase Signalweg aktiviert, an dessen Ende die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) Erk1/2 steht (87, 89). Über das aktivierte G-Protein Ras wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, aktiviert, welche wiederum die MAP-Kinase-Kinase MEK1/2 aktiviert, welche wiederum die MAP-Kinase Erk1/2 aktiviert (90, 91). Über Erk1/2 werden verschiedene in Zellwachstum und Zellzyklus involvierte Signalwege aktiviert, die für die Proliferation und das Überleben von T-Zellen eine wichtige Rolle spielen (90).

Zusätzlich phosphoryliert Erk1/2 die *MAPK-interacting Kinase 1* (Mnk1), welche den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) phosphoryliert. Zur Initiierung der Translation bildet sich ein Komplex, bestehend aus eIF4E, eIF4A und eIF4G, in welchem eIF4E für die Rekrutierung der mRNA sorgt, in dem das 5' Ende gebunden wird. Es folgt die Anlagerung von Ribosomen an die mRNA und somit die Initiierung der Translation (92, 93).

Die p38 MAPK wird ebenfalls über ZAP70 aktiviert. Die Aktivierung von p38 MAPK erfolgt vor allem durch Stress und Zytokine. Anschließend aktiviert auch p38 MAPK die Kinase Mnk1, wodurch der oben beschriebene Signalweg über eIF4E eingeleitet wird. Über ZAP70 und den ko-stimulatorischen Rezeptor CD28 wird zudem die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Diese phosphoryliert PIP $_2$  zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP $_3$ ) und es kommt zur Rekrutierung der Phosphoinositid-dependent Kinase 1 (PDK1). PDK1 phosphoryliert Akt an der Thr308 Stelle (87, 91, 94). Die Phosphorylierung von Akt an der Ser473 Stelle erfolgt über mTORc2 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*, mTORc2) (91). In vielen humanen Zellen ist Akt an der Regulation des Zellmetabolismus beteiligt. In T-Zellen spielt Akt zudem eine große Rolle bei der Koordination der Transkription von Effektormolekülen und Zytokinen bzw. die Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle. Akt nimmt eine bedeutende Rolle in der Differenzierung von T-Zellen in Effektorzellen ein (95). Eine wichtige Rolle spielen hier die Transkriptionsfaktoren FOXO, welche über Akt aktiviert werden. Es kommt zum Beispiel zur Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L, welches für die Transmigration von T-Zellen relevant ist oder die Expression von CCR7 (*chemokine receptor*, CCR), welcher T-Zellen den Eintritt in sekundär lymphatische Organe ermöglicht (96).

Akt aktiviert außerdem mTORc1. mTOR nimmt eine zentrale Rolle in der Initiierung der Proteintranslation in Zellen ein. Die Proteintranslation kann in Zellen nur dann erfolgreich ablaufen, wenn ausreichend Energie und Metabolite wie Aminosäuren zur Verfügung stehen. Der mTOR-Signalweg dient somit auch als Sensor, der nur bei ausreichender Verfügbarkeit von ATP (Adenosintriphosphat) oder Nährstoffen wie Aminosäuren aktiviert wird (97, 98).

Über mTORc1 kommt es zur Aktivierung von p70 S6-Kinase 1 (S6K1), welche das ribosomale Protein S6 aktiviert. Ebenfalls phosphoryliert mTORc1 eIF4E-bindendes Protein 1 (4EBP1). Im unphosphorylierten und somit im nicht aktivierten Zustand ist 4EBP1 an eIF4E gebunden. Durch die Phosphorylierung von 4EBP1 wird eIF4E erst freigegeben. Die Phosphorylierung von 4EBP1 nimmt somit eine Schlüsselfunktion in der Initiierung der Translation ein (91, 99).

Phosphorylierung ist einer der Hauptmechanismen, um Signale innerhalb von Zellen zu übermitteln und Enzyme zu aktivieren. Durch Dephosphorylierung auf der anderen Seite kann diese Signalweiterleitung demnach unterbrochen werden, in dem es zur Inaktivierung der Enzyme kommt. So stellen z.B. Phosphatasen wie PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*, PTEN) oder SHP-1 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*, SHP-1), welche Lck dephosphoryliert, einen von vielen negativen Rückkopplungsmechanismen dar. Als weiterer Mechanismus ist hier ebenfalls die Ubiquitinierung von TCR-Signalmolekülen wie CD3 $\zeta$ , PKC, ZAP70 oder PLC und somit deren Abbau über Proteasome (84, 100). Auch DAG-Kinasen agieren als negative Regulatoren in der Signalkaskade des TCR (101).

#### 4.1.4.2 Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt über MHC-II. MHC-II wird nur von APCs wie Makrophagen, DCs oder B-Zellen exprimiert. Extrazelluläre Antigene werden von diesen Zellen phagozytiert und fragmentiert auf der Zelloberfläche als Peptide über MHC-II präsentiert (102).

Je nach Stimulation, Art und Menge des Antigens oder immunologischen Milieus (hier ist vor allem das Vorhandensein bzw. die Absenz unterschiedlicher Zytokine von Bedeutung) kommt es in der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zur Differenzierung in unterschiedliche T-Helfer-Zellen (Th) bzw. CD4<sup>+</sup> Subpopulationen, welche anschließend weitere Immunzellen rekrutieren, aktivieren und somit Teil einer umfassenden Immunantwort sind (103) (siehe Tabelle 1).

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Differenzierung u.a. induziert durch:	Zytokinproduktion	Aufgabe
Th1	- intrazelluläre Erreger - Makrophagen und DCs	IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$	- Abwehr intrazellulärer Erreger - Beteiligt an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen - Aktivierung von M1 Makrophagen (pro-inflammatorisch) v.a. über IFN- $\gamma$ (105)

	- IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ (104)		- Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bzw. Tregs v.a. über IL-2 (106) - Regulation der Th2-Antwort
Th2	- extrazelluläre Erreger und Allergene  - Mastzellen, eosinophile Granulozyten, NK-Zellen  - IL-2, IL-4, IL-25, IL-33, IL-11	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25, TNF- $\alpha$	- Induktion des Immunglobulin-Switchs zu IgE - Rekrutierung und Aktivierung von basophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen (106) - Aktivierung von M2 Makrophagen (entzündungshemmend) über u.a. IL-4, IL-10 (105) - Regulation der Th1-Antwort (107)
Th9	- TGF- $\beta$ , IL-4	IL-9, IL-10 (108)	- Aktivierung von Mastzellen - Regulatorische Rolle in Bezug auf Allergien und Autoimmunerkrankungen - Vermittlung antitumorale Immunität (109)
Th17	- IL-6, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$	IL-6, IL-9, IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , CCL20	- Aktivierung von Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen - Regulation von Gewebeinflammation und Barrierefunktionen - Vermittlung in autoimmunen Prozessen - intestinale Homöostase (110)
Th22	- IL-6, TNF- $\alpha$	IL-22, TNF- $\alpha$ , FGF, IL-13	- Infiltration der Epidermis, Unterstützung der Keratinozytenproliferation, Beteiligung an der Wundheilung und an der natürlichen Abwehrbarriere der Haut (111)
Tfh (follikuläre T-Helferzelle)	- IL-6, IL-12, IL-21	IL-21, IL-4, IL-10	- Induktion der B-Zelldifferenzierung zu Plasmazellen und Stimulation der Antikörperproduktion (112)
Treg (regulatorische T-Zelle)	- TGF- $\beta$ , IL-2	IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35	<u>natürliche Tregs (nTregs)</u> - Entstehen im Thymus - Verhindern von Autoimmunprozessen - Reduktion von inflammatorischen Prozessen (Konkurrenz mit anderen TEFFs um IL-2) und Suppression von Immunzellen (somit auch Suppression der antitumorale Immunantwort) - Toleranzentwicklung bei Transplantationen oder der fetomaternalen Toleranz während der Schwangerschaft (113)  <u>induzierte Tregs (iTregs)</u> - Entstehen in der Peripherie - Entstehen durch TCR-Aktivierung aus naiven T-Zellen unter dem Einfluss von

			<p>TGF-<math>\beta</math>, IL-2 oder über PD-L1-PD-Signalwege</p> <p>iTregs und nTregs in Kombination notwendig für eine optimale Toleranzentwicklung (114-117)</p>
--	--	--	---

**Tabelle 1: CD4 T-Zellen – Subtypen, ihre Zytokinprofile und Aufgaben in der Immunantwort** (wenn nicht anders gekennzeichnet in Anlehnung an Luckheeram *et al.* 2012 (103), Zhu *et al.* 2010 (118))

#### 4.1.4.3 CD4<sup>+</sup> T-Zellen im tumorimmunologischen Kontext

Die Rolle der unterschiedlichen CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen in der Immunantwort und in der Tumorimmunreaktion ist komplex. Lange erforscht ist vor allem ihre „helfende“ Rolle in Bezug auf die Aktivierung der B-Zellen zur Bildung von Antikörpern, aber auch die Aktivierung und Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen, welchen die eigentlichen antitumoralen Eigenschaften zugesprochen werden (119). Durch ihre Mediatorrolle in der Immunantwort wirken CD4<sup>+</sup> T-Zellen teilweise regulierend und somit auch hemmend auf die Immunantwort. Dies hat zum einen in der antiinfektiven Immunreaktion den Vorteil, dass überschießende Immunantworten verhindert werden und auch autoreaktive Prozesse unterdrückt werden. Im tumoralen Kontext werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl antitumorale als auch tumorfördernde Eigenschaften zugeschrieben. CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen ihre mediatorischen Eigenschaften, in dem sie über Zytokinbildung oder Rezeptorinteraktion andere Zellen des Immunsystems rekrutieren und in ihren antitumoralen Effekten aktivieren. So stimuliert die IFN- $\gamma$  Produktion der Th1-Zellen Makrophagen, welche wiederum reaktive Sauerstoffspezies bilden, die wiederum zur Tumorzellyse führen können. Th2-Zellen rekrutieren wiederum eosinophile und basophile Granulozyten, und stimulieren die Bildung von eosinophilem kationischem Protein sowie *Major Basic Protein* (120). Einer der bedeutendsten antitumoralen Effekte der Th1-Zellen wird vor allem über die Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erreicht. Über IFN- $\gamma$  werden APC, körpereigene Zellen und auch Tumorzellen stimuliert und es kommt zur verstärkten Expression von MHC-II bzw. vor allem MHC-I, was zur besseren antigenspezifischen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Tumorzellen führt (119). Das von den Th1 Zellen gebildete IL-2 stellt einen entscheidenden Wachstumsfaktor für zytotoxische T-Zellen dar (121). In der Effektorphase nehmen zudem verschiedene Ko-Stimulationen zwischen Th-Zellen und zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Expansion der zytotoxischen T-Zellen und dem Erhalt ihrer Effektorfunktion über einen längeren Zeitraum hinweg ein (122, 123). Auch an der Bildung und Aufrechterhaltung von CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen sind Th1 Zellen beteiligt (124, 125).

Th9 Zellen entstehen unter Einfluss von IL-4 und TGF- $\beta$  aus Th2 Zellen und produzieren überwiegend IL-9 (108). Th9 Zellen rekrutieren und aktivieren Mastzellen und steigern deren antitumorale zytotoxische Aktivität, außerdem wird über das von ihnen sezernierte IL-21 sowohl die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch die zytolytische Funktion von NK-Zellen

verstärkt. IL-9 verstärkt das Überleben von T-Zellen im Tumormilieu. In bestimmten Tumorentitäten konnten allerdings protumorale Effekte von Th9-Zellen und IL-9 beobachtet werden. So konnte durch IL-9 ein gesteigertes Tumorwachstum sowie Metastasierung in Lungentumoren festgestellt werden, aber auch in hämatologischen Neoplasien waren erhöhte IL-9 Werte bzw. eine erhöhte Anzahl an Mastzellen mit einem gesteigerten Tumorwachstum und einem schlechteren Outcome assoziiert (126).

Durch die IL-6 und TNF- $\alpha$  Sekretion von Makrophagen oder DCs wird die Differenzierung in Th22 Zellen angeregt. Das von Th22 Zellen produzierte IL-22 hat Einfluss auf verschiedene immunologische Prozesse. IL-22 sorgt für eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Zum Beispiel reguliert IL-22 in Keratinozyten die Genexpression von antimikrobiellen Abwehrmechanismen, sorgt für die Ausbildung von epithelialen *Tight-Junctions*, regt in Schleimhäuten die Muzinbildung an und generiert somit eine stärkere Barrierefunktion der Epithelien (127, 128). In mehreren Tumorentitäten (Lungenkrebs, gastrointestinalen und gynäkologischen Tumoren) war eine Infiltration des Tumormilieus mit Th22 Zellen und die Anwesenheit von IL-22 mit einem gesteigerten Tumorwachstum und gesteigerter nodaler Metastasierung assoziiert (129).

Auch Th17 Zellen nehmen eine paradoxe Rolle in der Pathogenese und dem klinischen Outcome verschiedener Tumorentitäten ein. So ist eine erhöhte Zellinfiltration mit Th17 Zellen in Lungen-, Kolon-, Magen- und Lebertumoren mit einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert. Patientinnen mit Ovarialtumoren zeigten hingegen bei erhöhter Th17 Zellinfiltration ein besseres Gesamtüberleben. Th17 Zellen zeigen eine geringere Expression von Erschöpfungsmarkern, sind resistenter gegen tumorassoziierte Immunevasionsmechanismen und somit in der Lage, eine langanhaltende antitumorale Immunität zu vermitteln. Th17 Zellen weisen eine hohe Plastizität auf. Je nach umgebenen Bedingungen ist ein fließender Übergang bzw. eine Differenzierung in Treg oder Th1- bzw. Th2 Zellen möglich. Über das von ihnen sezernierte IL-17 kommt es zur Rekrutierung von PMN. Zudem ist IL-17 an der tumoralen Angiogenese beteiligt (130-132).

Thf Zellen gelangen über den Oberflächenrezeptor CXCR5 in die Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe, aktivieren hier die B-Zellen und fördern über IL-21 und IL-4 die Plasmazelldifferenzierung sowie die Antikörperbildung. Außerdem induzieren sie in B-Zellen den Wechsel der Antikörperklasse zu IgG. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil in der Entstehung und Aufrechterhaltung einer langanhaltenden Immunabwehr (112).

Tregs nehmen - wie ihr Name impliziert - regulatorische Funktionen im Immunsystem ein und sind für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz verantwortlich (114). Der genaue Unterschied zwischen nTregs und iTregs ist bislang nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass sie sowohl redundante, unterschiedliche und synergistische Funktionen

einnehmen (115). Beide wirken überwiegend immunsuppressiv, reduzieren überschießende Immunreaktionen oder Inflammationen und senken somit u.a. die Entstehung von autoimmunen Prozessen. Im TME entstehen iTregs durch vom Tumor sezerniertes TGF- $\beta$  und durch den Kontakt mit Tumorantigenen. Auch existiert ein funktionelles Zusammenspiel von MDSCs und Tregs. Über die Sekretion verschiedener Signalmoleküle (TGF- $\beta$ , IL-10 oder IDO) sowie über die Expression von inhibitorischen Oberflächenmolekülen induzieren MDSCs die Bildung von Tregs, während diese wiederum die Expansion von MDSCs fördern (133). Zielobjekte dieser iTregs im TME sind DCs und zytotoxische T-Zellen. Tregs supprimieren diese durch die Sekretion hemmender Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-35 und IL-10), durch die Konkurrenz mit TEFs um IL-2, durch Zytolyse über Granzyme (nTregs über Granzym A, iTregs über Granzym B) und Perforine und durch hemmende Einflüsse auf metabolische Prozesse der T-Zellen (113, 133). Diese Eigenschaften sind die Grundlage für die Erforschung der Treg-Zelltherapie für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder Transplantationstoleranz (134, 135). Auf der anderen Seite führen diese Eigenschaften der Tregs zur Suppression der antitumorale Immunantwort im TME, was die Entstehung und den Progress von Tumoren fördert. Dadurch stellt somit die Reduktion oder Elimination von Tregs ein Ziel der Tumorimmuntherapie dar (136, 137).

#### **4.1.4.4 CD8<sup>+</sup> T-Zellen im tumorimmunologischen Kontext**

Die Hauptaufgabe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Bekämpfung von Virusinfektionen, intrazellulären bakteriellen Infektionen und Tumoren. Während einer Infektion kommt es in den sekundär lymphatischen Organen zu einer Aktivierung der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sie erkennen Antigene, welche ihnen über den MHC-I-Komplex auf APCs bzw. auf nahezu allen anderen (zellkernhaltigen) Zellen des Körpers präsentiert werden. Nach diesem ersten Aktivierungsschritt kommt es zur klonalen Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zur Differenzierung in kurzlebige TEFs und langlebige Gedächtniszellen. Virusinfizierte Zellen produzieren die Typ I Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ), welche zusammen mit IL-12, gebildet von aktivierten Makrophagen oder DCs, zur Bildung und Expansion von TEFs führen. Des Weiteren werden auch IL-1, IL-33 und IL-18 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugesprochen. IL-18 induziert gemeinsam mit IL-12 die Produktion von IFN- $\gamma$ . Auch die autokrine IL-2 Produktion bzw. das von Th1 Zellen produzierte IL-2 ist an der CD8<sup>+</sup> T-Zellexpansion und Differenzierung beteiligt. Hohe Mengen an IL-2 induzieren die Produktion von Signalmolekülen, welche die TEF-Differenzierung fördern. Niedrige Mengen an IL-2 hingegen induzieren in T-Zellen die Expression von CD62L, was einen Oberflächenmarker der Gedächtniszellen darstellt. IL-21, sezerniert von Th Zellen, unterstützt die Gedächtniszellbildung. Für den Erhalt eines ausgewogenen Gleichgewichts der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind die beiden Interleukine IL-7 und IL-15 relevant. Während IL-7 für das Überleben von

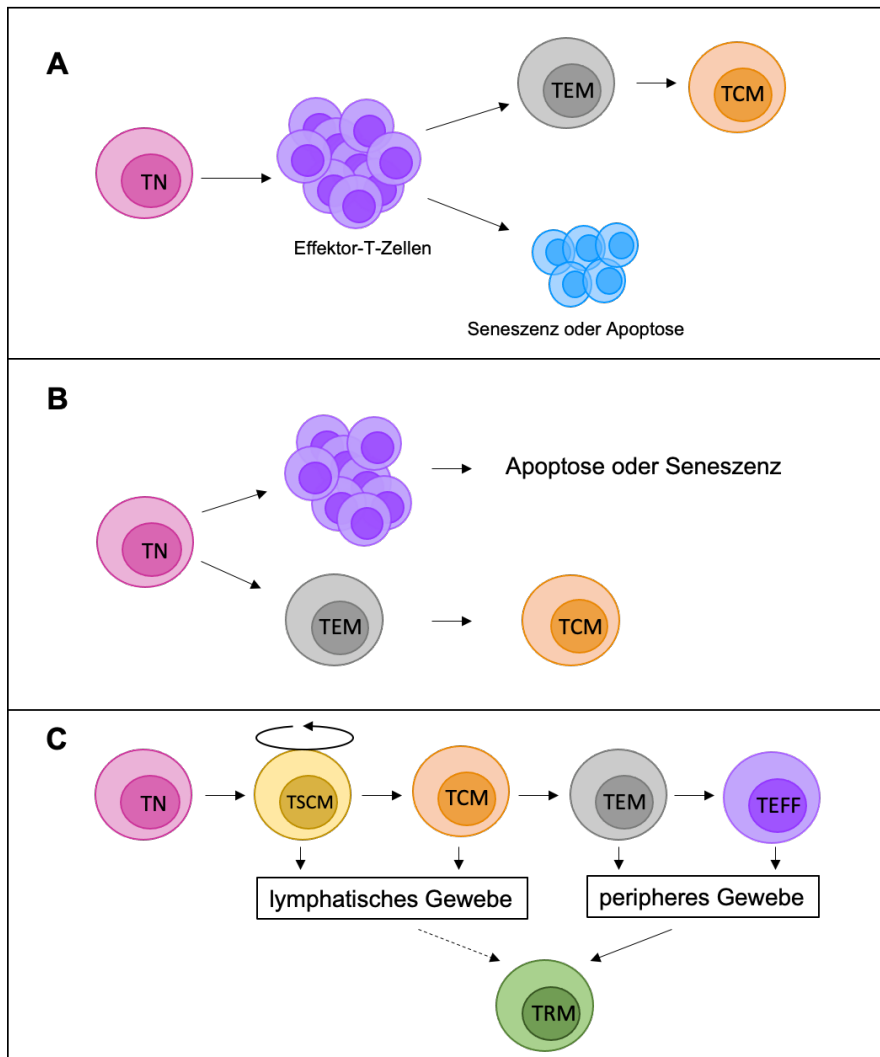
naiven und Gedächtniszellen verantwortlich ist, induziert IL-15 die antigenunabhängige Proliferation von Gedächtniszellen (138-140).

Die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen verlassen den Lymphknoten und wandern über die Blutbahn in die Peripherie bzw. zum Ort der Infektion (81). Den Namen „zytotoxische T-Zelle“ erhalten CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Fähigkeiten, maligne oder virusinfizierte Zellen direkt anzugreifen. Über Degranulierung sezernieren sie Granula, in welchen die zytotoxischen und zytolytischen Enzyme Perforin, Granulysin und Granzyme enthalten sind. Durch diese induzieren T-Zellen in ihren Zielzellen den Zelltod (141). Auch exprimieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Ihrer Oberfläche den Fas-Liganden (FasL), ein Oberflächenmolekül, welches durch Bindung an den Fas-Rezeptor auf Tumorzellen oder autoreaktiven T-Zellen in diesen die Apoptose auslöst (142).

#### **4.1.4.5 T-Zell Gedächtniszellen**

##### **4.1.4.5.1 Modelle der Gedächtniszelldifferenzierung**

Nach Kontakt mit dem Antigen und somit der Aktivierung der TN kommt es zur klonalen Expansion und zur Bildung der TEFF. Zudem bilden sich antigen-spezifische Gedächtniszellen, welche über einen langen Zeitraum persistieren und das immunologische Gedächtnis bilden. Je nach Stimulation oder Inhibition kann es auch zur Erschöpfung oder Seneszenz der T-Zellen kommen. Im Rahmen der dynamischen Gedächtniszellbildung bilden sich ein Leben lang Gedächtniszellen gegen verschiedene Pathogene und machen beispielsweise nach zwei Lebensjahrzehnten ein Drittel der zirkulierenden T-Zellen aus (143, 144). Für die Homöostase und den Erhalt der Gedächtniszellen werden vor allem IL-7 und IL-15 benötigt, welche die Proliferation dieser T-Zellen ohne antigenspezifische TCR-Stimulation induzieren können (145).



**Abbildung 3: Prozesse der Gedächtniszellbildung.** Dargestellt sind verschiedene Prozesse, die in der Entstehung von Gedächtniszellen diskutiert werden. **(A)** stellt einen linearen Prozess dar, in welchem aus TN TEFF werden, die entweder apoptotisch bzw. seneszent werden oder zu TEM bzw. TCM differenzieren. **(B)** stellt einen zweigeteilten Prozess dar, in dem TN zu TEFF werden und anschließend in Apoptose gehen, während sich TEM bzw. TCM aus einem kleinen Teil der TN entwickeln. **(C)** beschreibt eine hierarchische Abfolge, an dessen Ende die TEFFs stehen. Erstellt in Anlehnung an *Farber et al., 2014* und *Ahmed et al., 2009* (143, 146)

Die genaue Gedächtniszellbildung ist nicht abschließend geklärt, sodass mehrere Modelle existieren (siehe Abbildung 3). Je nach Genexpression bilden sich Gedächtniszelluntergruppen mit verschiedenen Funktionen. Ein Erklärungsansatz ist, dass TN nach der Antigenstimulation zu TEFF differenzieren und aus diesen TEFF die Gedächtniszellen entstehen, wobei zuerst Effektor-Gedächtniszellen (*Effector Memory T cell*, TEM) und anschließend zentrale Gedächtniszellen (*Central Memory T cell*, TCM) entstehen (Abbildung 3, A). Auch existieren Modelle, die beschreiben, dass TEFF apoptotisch werden bzw. terminal differenzieren und die Differenzierung von TCM bzw. TEM aus weniger aktivierten TN, welche nicht zu TEFF geworden sind, erfolgt (z.B. über weniger IL-2 Stimulation (140)) (Abbildung 3, B). Andere Modelle beschreiben eine hierarchisch Differenzierungsabfolge, dessen Ende die TEFF bilden (TN > TSCM > TCM > TEM > TEFF) (Abbildung 3, C). Dieses Modell inkludiert ebenfalls die stammzellähnlichen Gedächtniszellen

(*Stemcell-like Memory T cells*, TSCM). Gewebs-residente Gedächtniszellen (*Tissue-resident Memory T cell*, TRM) wiederum entstehen aus TEM oder TEFF bzw. möglicherweise im lymphatischen Gewebe auch aus TCM (Abbildung 3 C, gestrichelte Linie). Wieder andere Modelle gehen von einer komplett divergenten Entstehung der einzelnen Phänotypen aus (143, 146).

#### 4.1.4.5.2 Eigenschaften und Oberflächenmarker der Gedächtniszellen

Ein Überblick über die Oberflächenmarker der einzelnen Gedächtniszellphänotypen bietet Abbildung 4. TN sind in der Lage, zwischen der Blutbahn und den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten zu zirkulieren. Sie exprimieren somit CCR7 und CD62L (147).

TCM sind vor allem in lymphatischen Organen anzutreffen. Nach Kontakt mit einem Antigen sind TCM in der Lage, stark zu proliferieren und in TEFFs zu differenzieren (148). Eine weitere Subgruppe stellen die TEM dar, welche sich vor allem als zirkulierende Zellen im Blut bzw. in nicht lymphatischen Geweben wie Haut, Lunge oder Darm aufhalten (149, 150). TCM weisen im Vergleich zu TEM und TEFF eine erhöhte antitumorale Kapazität auf. Es konnte gezeigt werden, dass das TCM/TEFF Verhältnis als Biomarker die antitumorale Immunantwort vorhersagen kann. TCM nehmen somit eine zentrale Rolle in der Tumormimmuntherapie und zellulär basierten Tumorthherapie ein (151). TEM und auch TCM können, anders als TN, in nicht lymphatisches Gewebe migrieren und anschließend wieder zurück ins lymphatische System übergehen (152). Beide Subtypen exprimieren CD45RO und sind negativ für CD45RA. Im Gegensatz zu TEM, exprimieren TCM CD62L und CCR7. Beide Marker sind mit dem Aufenthalt in lymphatischen Geweben assoziiert. TEM sind überwiegend im peripheren Blut zu finden und somit negativ für CD62L und CCR7 (149). Die Untergruppe der terminaldifferenzierten TEM, TEMRA (*Effector Memory T cell Receptor Antagonist*, TEMRA), reexprimieren CD45RA (145).

Zudem wird die Gruppe der TRM beschrieben, welche im peripheren Gewebe wie beispielsweise dem Tumor verbleiben und dort durch lokale Immunantwort das Tumorstadium kontrollieren (153). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl an TRM im TME mit einem besseren Ansprechen auf eine Tumormimmuntherapie, sowie mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ist (153, 154). TRM verbleiben im peripheren Gewebe und zeigen somit wenig Migration. Sie weisen eine erhöhte Expression von CD69 und keine CCR7 und CD62L Expression auf (155). Zudem exprimieren sie CD49a (156), CXCR6 (155) und CXCR3. Hasan et al. beschreiben, dass vor allem der Sauerstoffmangel im TME und TGF- $\beta$ 1 bei der Differenzierung in TRM eine wichtige Rolle spielen und zur Hochregulation von CD103 und CD101 führen (157).

Eine weitere Gruppe der Gedächtniszellen stellen die TSCM dar (148). IL-7 und IL-15 oder eine Inhibition von Akt oder MEK1/2 fördern die Differenzierung von TN in TSCM (158, 159). Die erstmals von Zhang et al. beschrieben TSCM besitzen die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und alle unterschiedlichen T-Zell-Phänotypen, vor allem Gedächtniszellen wie TCM und TEM, aber auch TEFFs zu generieren (160). Obwohl sie über Jahre bis Jahrzehnte persistieren können, machen TSCM nur einen kleinen Anteil der Gedächtniszellen aus (148). Ihre lange Überlebenszeit, die Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie die schnelle Differenzierung in anderen T-Zellphänotypen machen TSCM zu einer wichtigen Subgruppe in der zellulär basierten Tumorthherapie (159). TSCM exprimieren CD45RA, CD27, CD28, CCR7, CD62L, CD95 (dient der Unterscheidung zu TN), CD122 und CD127 (148).

Phänotyp	TN	TCM	TEM	TEMRA	TRM	TSCM
<b>Oberflächenmarker</b>	CD45RA <sup>+</sup>	CD45RA <sup>-</sup>	CD45RA <sup>-</sup>	CD45RA <sup>+</sup>		CD45RA <sup>+</sup>
	CD45RO <sup>-</sup>	CD45RO <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>		CD45RO <sup>-</sup>
	CD62L <sup>+</sup>	CD62L <sup>+</sup>	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>+</sup>
	CCR7 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>-</sup>	CCR7 <sup>-</sup>	CCR7 <sup>-</sup>	CCR7 <sup>+</sup>
	CD95 <sup>-</sup>	CD95 <sup>+</sup>	CD95 <sup>+</sup>	CD95 <sup>+</sup>		CD95 <sup>+</sup>
	CD27 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-/+</sup>	CD27 <sup>-</sup>		CD27 <sup>+</sup>
	CD28 <sup>+</sup>	CD28 <sup>+</sup>	CD28 <sup>-/+</sup>	CD28 <sup>-</sup>		CD28 <sup>+</sup>
	CD57 <sup>-</sup>	CD57 <sup>-</sup>	CD57 <sup>-/+</sup>	CD57 <sup>+</sup>		
	CD31 <sup>+</sup>	CD31 <sup>-</sup>	CD31 <sup>-</sup>	CD31 <sup>-</sup>		
	CD122 <sup>-</sup>					CD122 <sup>+</sup>
	CD127 <sup>+</sup>	CD127 <sup>+</sup>	CD127 <sup>+</sup>	CD127 <sup>+</sup>		CD127 <sup>+</sup>
	CXCR3 <sup>-</sup>	CXCR3 <sup>+</sup>	CXCR3 <sup>+</sup>	CXCR3 <sup>+</sup>	CXCR3 <sup>+</sup>	CXCR3 <sup>+</sup>
					CD69 <sup>+</sup>	
				CD49a <sup>+</sup>		
				CXCR6 <sup>+</sup>		
				CD103 <sup>+</sup>		
				CD101 <sup>+</sup>		

**Abbildung 4: Oberflächenmarker der T-Zell Differenzierung.** Dargestellt sind die verschiedenen Oberflächenmarker oder Rezeptoren, welche die einzelnen T-Zell-Phänotypen charakterisieren (145, 148, 149, 155-157, 161).

Interessanterweise zeigt sich bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Phänotypen im Blut, im Lymphknoten oder im peripheren Gewebe. Während CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut sowie in Lymphknoten überwiegend als TN, TEM oder TCM vorliegen, weisen CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen deutlich geringeren Anteil an TCM auf und der Phänotyp der TN, TEMRA und TEM überwiegt (162).

#### 4.1.4.6 T-Zellen im TME: Mechanismen der Tumormimmunevasion

Die Mechanismen der Tumormimmunevasion sind vielfältig. Galassi et al. fassen in ihrer Übersichtsarbeit „*The hallmarks of cancer immune evasion*“ wie eingangs erwähnt drei Hauptmechanismen zusammen: (i) Die Tarnung von Tumorzellen und somit Umgehung der Erkennung durch Immunzellen, (ii) die Hemmung von Immuneffektorzellen, vor allem T-Zellen, oder die Induktion von immunsupprimierenden Zellen wie MDSCs (iii) und verschiedene Mechanismen, die Tumorzellen direkt vor der Zytotoxizität der Immunzellen schützen (12).

Eine hohe Anzahl an tumorinfiltrierenden T-Zellen ist mit einem reduzierten Tumorwachstum, besseren Gesamtüberleben und einer geringeren Rezidivrate assoziiert (163, 164). Im TME existieren zahlreiche Mechanismen, um diesen antitumoralen Effekt der T-Zellen zu umgehen oder zu supprimieren. Diese Strategien der Tumormimmunevasion werden durch Tumore direkt oder durch tumorinfiltrierende Zellen des TME wie Fibroblasten, Makrophagen, PMN, TAN oder MDSCs vermittelt. Unter physiologischen Konditionen gelingt es, über die Mehrheit der im Folgenden beschriebenen Mechanismen eine Balance zwischen einer regelrechten Immunantwort, der Regulation einer überschießenden Immunreaktion und der Unterdrückung autoimmuner Prozesse zu erhalten (165).

Tumore entziehen sich der antigenspezifischen TCR-Antwort über u.a. folgend Mechanismen. (i) Viele tumorassoziierte Antigene werden von T-Zellen nicht als Fremdartigene wahrgenommen, sondern als körpereigen. Eine Erkennung durch den TCR findet somit nicht statt. Zudem fördert dieser Mechanismus die Bildung der protumoralen Tregs, um eine überschießende Zytotoxizität gegen die vermeintlich „eigenen“ Körperzellen zu regulieren (166). (ii) Auf Tumorzellen kommt es zur Herabregulation von MHC-I Molekülen, sodass diese von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht erkannt werden können (12, 167). (iii) Die Funktion und Differenzierung von APCs und somit eine Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, ist im TME durch Faktoren wie VEGF oder IL-10 beeinträchtigt. Dies führt zu einer antigen-spezifischen T-Zell Toleranz (168). (iv) Im Lymphknoten aktivierte TEFs gelangen über die Blutzirkulation in den Tumor. Durch die von Tumoren induzierte systemische Inflammation sind PMN in erhöhter Anzahl im Blut zu finden. Über Arginase, Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase, NOS) und die Bildung von ROS werden T-Zellen in ihrer Aktivierung und Proliferation supprimiert (169). Erhöhte systemische Entzündungsparameter sind in vielen Tumorentitäten mit einem schlechteren Therapieansprechen und Gesamtüberleben assoziiert und induzieren zudem in Tumoren eine erhöhte Expression von inhibitorischen Signalmolekülen (166). (v) Diese inhibitorischen Signalmoleküle wie PD-L1, CTLA4, FasL, TRAIL oder RCAS1 aktivieren apoptotische Signalwege in T-Zellen. Zudem zeigen Tumorzellen nahezu keine Expression von ko-stimulatorischen Oberflächenproteinen, welche für die Aktivierung von T-Zellen essentiell sind (168, 170). Die inhibitorischen Oberflächenmoleküle werden als „Checkpoints“

des Immunsystems bezeichnet. Therapeutische Antikörper, die genau in diesen Prozess eingreifen, werden Immuncheckpointinhibitoren (ICI) genannt. Zielstrukturen der ICIs sind die PDL-1/PD-1 Rezeptoren sowie die Blockade der B7 (CD80/CD86) - CTLA-4 Interaktion. Sie blockieren die inhibitorischen Signale der Tumorzellen und verstärken somit die antitumorale T-Zellaktivität. In vielen Tumorentitäten sind ICIs inzwischen als Therapiestrategie etabliert (171). Neben der ARG1 vermittelten Arginindepletion spielen auch weitere metabolische Veränderung im TME eine bedeutende Rolle in der tumorinduzierten T-Zellsuppression. Hierzu zählen die Depletion der für T-Zellen wichtigen Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Serin, die kompetitive Degradierung von Glukose und Glutamin, die Akkumulation von Laktat sowie die Freisetzung von anderen inhibierenden Metaboliten wie bioaktive Lipide oder Kalium im TME (12).

In T-Zellen im TME kommt es je nach Stimulation, Inhibition oder Mangel an Nährstoffen zur Induktion verschiedener Zustände wie Anergie, Erschöpfung oder Seneszenz. Hierbei kommt es zur Beeinträchtigung der TCR-vermittelten Signalübertragung, zur gestörten Differenzierung in Effektor- oder Gedächtniszellen sowie zur Expression von Erschöpfungs- oder Seneszenzoberflächenmarkern.

#### **4.1.4.6.1 T-Zell-Anergie**

Aus TN, die im TME eine starke Stimulation über den TCR aber kaum ko-stimulatorische Signale jedoch viele inhibitorische Signale erhalten, werden anerge T-Zellen (172). Diese zeigen eine reduzierte Reaktionsfähigkeit, Aktivierung, Proliferation sowie IL-2 Produktion (173). Auch vom Tumor produzierte Zytokine wie IL-10, TGF- $\beta$  oder PGE2 induzieren einen anergen Zustand in T-Zellen (174). Desgleichen führt potentiell ein Mangel an Nährstoffen wie Aminosäuren, Glukose oder Sauerstoff führt zur T-Zellanergie im TME. Verschiedene Tumorentitäten exprimieren IDO, was durch konsekutive Tryptophan-Defizienz zur Störung der T-Zellaktivierung und Differenzierung führt (175). Auch die Depletion von Arginin über ARG1 oder NOS beeinträchtigt die T-Zellaktivierung. Durch den Argininabbau über NOS kommt es zusätzlich zur Akkumulation von Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO). NO führt in T-Zellen zur reduzierten IL-2 Produktion, verminderter IL-2-Rezeptor Expression und beeinträchtigt dem TCR nachgeschaltete MAPK-Signalwege (176). Tumorzellen konsumieren aufgrund der unkontrollierten Proliferationstätigkeit große Mengen an Sauerstoff und Glukose. Verschiedene Onkogene wie Myc oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 führen in Tumorzellen zur Hochregulation von glykolytischen Enzymen und so zur gesteigerten anaeroben Glykolyse und Laktatproduktion (164). Dass Tumore oder sich schnell teilende Zellen ihre Energie hauptsächlich aus anaerober Glykolyse gewinnen, wird Warburg-Effekt genannt (177). Der Glukosemangel beeinträchtigt T-Zellen in ihrer Differenzierung und somit in ihrer antitumoralen Aktivität. Auch der Laktatanstieg im TME beeinträchtigt T-Zellen in ihrer

Funktion (178) und korreliert mit einer erhöhten Inzidenz von Metastasierung und reduziertem Gesamtüberleben (179). Laktat induziert in T-Zellen die Produktion von IL-23 und IL-17, was charakteristisch für Th17 Zellen ist. Diese sind in vielen Tumorentitäten mit einem schlechten Outcome assoziiert (180). Auch der Sauerstoffmangel im TME führt zu einer reduzierten T-Zellaktivierung bzw. Proliferation (181). Hypoxie und VEGF (dieses wird induziert durch den hypoxischen Zustand vermehrt von Tumorzellen gebildet und führt so zum „angiogenetic switch“) führen in T-Zellen zu einem anergen, terminal differenzierten und erschöpften Phänotyp (182).

#### **4.1.4.6.2 T-Zell-Erschöpfung**

Die Erschöpfung von T-Zellen ist ein Zustand, in dem T-Zellen nach wiederholter Antigenaktivierung eintreten. Eines der Hauptmerkmale erschöpfter T-Zellen ist die Expression von PD-1 und TIM-3 (183). Erschöpfte T-Zellen sezernieren zudem zahlreiche proangiogenetische Faktoren, wodurch sie die Tumorangiogenese unterstützen (182). T-Zell Erschöpfung in chronischen Infektionen und in Tumoren wird durch transkriptionelle sowie epigenetische Mechanismen reguliert (184). Durch die Blockade dieser Oberflächenmoleküle mit ICI ist eine Wiederherstellung der ehemaligen Effektorfunktionen der T-Zellen wieder möglich (171, 173).

#### **4.1.4.6.3 T-Zell-Seneszenz**

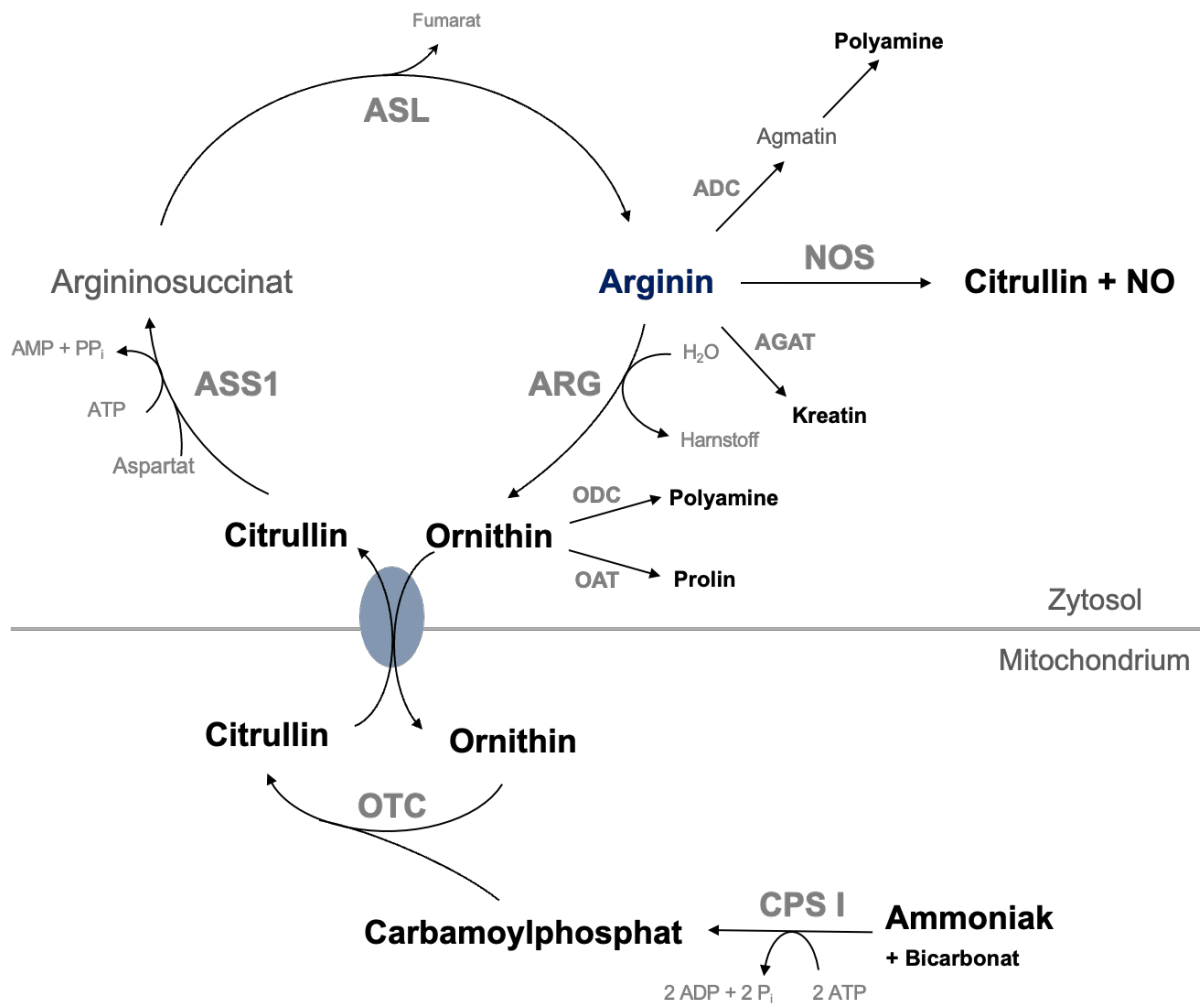
Seneszenz ist ein Prozess, der durch Telomerverkürzung und den Eintritt der Zellen in den Zellzyklusarrest gekennzeichnet ist. Sie ist Bestandteil des physiologischen Alterungsprozesses (173). Dieser Mechanismus wird überwiegend durch zellulären Stress hervorgerufen. Phänotypische Kennzeichen seneszenten T-Zellen sind der Verlust der CD28 Expression sowie eine vermehrte Expression von CD57 und TIM-3. Die Induktion von Seneszenz in T-Zellen ist ein bedeutender Immunevasionsmechanismus von Tumoren (185). Aber nicht nur der Tumor oder das TME induzieren Seneszenz in T-Zellen. Auch Tumorthérapien wie Bestrahlung, Chemotherapie oder Immuntherapeutika können in T-Zellen zu einem seneszenten Phänotyp führen (43). Es gibt Hinweise, dass die durch Chemotherapie induzierten seneszenten T-Zellen an therapieinduzierten Nebenwirkungen wie Fatigue beteiligt sind (186).

### **4.1.5 Arginase im TME**

#### **4.1.5.1 Arginin Metabolismus**

Arginin wird als semiessenzielle Aminosäure bezeichnet. Der menschliche Organismus ist in der Lage, in der Leber über den Harnstoffzyklus, der dem Abbau von Ammoniak dient, aber auch in extrahepatischen Organen wie z. B. der Niere, eigenständig Arginin zu synthetisieren, was in homöostatischen Situationen ausreichend ist. In Stresssituationen wie Trauma,

massiven Verletzungen oder Sepsis, aber auch in der Entwicklungs- und Wachstumsphase von Säuglingen und Kindern, konnte jedoch gezeigt werden, dass deutlich größere Mengen an Arginin notwendig sind, als durch den Harnstoffzyklus zur Verfügung gestellt werden. Somit wird Arginin je nach Gegebenheit zur essenziellen Aminosäure (187, 188). Arginin ist in eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen eingebunden. Die Aminosäure dient als Grundlage für die Synthese von Polyaminen, Kreatin und anderen Aminosäuren wie Prolin, Glycin oder Methionin. Über NOS wird Arginin zu NO abgebaut, welches vaskulär als wichtiger Regulator des Blutdrucks dient (189). Einen kurzen Überblick über den Argininstoffwechsel und die daran beteiligten Enzyme gibt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Arginin Metabolismus.** Dargestellt sind die verschiedenen Schritte des Arginin Metabolismus im Harnstoffzyklus und Arginin als Grundlage für die Synthese weiterer Stoffwechselprodukte. Angelehnt an Wu et al. 1998 (189), Munder et al. 2009 (190). Erläuterung siehe Text.

In der mitochondrialen Matrix von Hepatozyten reagiert Ammoniak mit Bicarbonat mithilfe der Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS I) zu Carbamoylphosphat. Die Carbamoylgruppe wird anschließend durch die Ornithin-Transcarbamylase (OTC) auf Ornithin übertragen. Es entsteht Citrullin. Das benötigte Ornithin entsteht in einem der letzten Schritte im Harnstoffzyklus und wird über den Ornithin-Citrullin-Antiporter ins Innere des Mitochondriums transportiert,

während das mitochondrial entstandene Citrullin ins Zytosol exportiert wird. Im Zytosol katalysiert die Argininosuccinat-Synthase-1 (ASS 1) die Reaktion von Citrullin und Aspartat zu Argininosuccinat. Unter Abspaltung von Fumarat wird Argininosuccinat durch die Argininosuccinat-Lyase (ASL) in Arginin umgewandelt. Arginin wird anschließend durch ARG1 in Harnstoff und Ornithin gespalten. Das entstandene Ornithin wird entweder im Harnstoffzyklus recycelt oder über die Ornithin-Decarboxylase (ODC) in der Polyaminsynthese verarbeitet bzw. dient über Ornithin-Aminotransferase (OAT) der Prolinsynthese. Unabhängig vom Harnstoffzyklus kann Arginin über NOS in NO und Citrullin umgesetzt werden. Arginin fungiert auch als Grundlage für die Synthese von Polyaminen aus Agmatin, das über die Arginindecarboxylase (ADC) aus Arginin entsteht. Über die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) ist Arginin Bestandteil der Kreatinsynthese und stellt Vorläufermetabolite für die Methioninsynthese bereit (188, 189).

#### **4.1.5.2 Arginase**

Es existieren zwei Isoenzyme der Arginase im Menschen. Arginase 1 (ARG1) ist vor allem als zytosolisches Enzym und Teil des Harnstoffzyklus (s.o.) in Hepatozyten exprimiert. Es wird zudem von myeloischen Zellen des Immunsystems sowie in Tumoren exprimiert. Arginase 2 (ARG2) ist ein mitochondriales Enzym, das in Niere, Gehirn, Mamma und auch in Makrophagen zu finden ist (189, 191). Während in diversen myeloischen Zellen im murinen Immunsystem die ARG1 Expression über Th2 Zytokine wie IL-4 und IL-10 induziert werden kann (192), ist bei humanen myeloischen Zellen ARG1 ausschließlich in PMN konstitutiv exprimiert. Munder et al. konnten zeigen, dass ARG1 in PMN nicht im Zytosol lokalisiert ist, sondern in den azurophilen Granula. ARG1 wird nach Aktivierung und Degranulation der PMN oder durch deren Zelltod freigesetzt (14).

#### **4.1.5.3 Bedeutung von Arginin für T-Zellen und Auswirkung der Arginindepletion im TME**

Für die T-Zellaktivierung, Proliferation und Funktion ist Arginin von essentieller Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Arginin die metabolische Aktivität der aktivierten T-Zellen beeinflusst und die Glykolyse sowie mitochondriale Aktivität steuert. Arginin erhöht das T-Zellüberleben, fördert die Differenzierung in TCM und verstärkt somit die antitumorale Aktivität (193).

Argininmangel führt in T-Zellen zu einer reduzierten Expression der  $\zeta$ -Kette am TCR/CD3-Komplex, welche ein wichtiges Element der TCR vermittelten Signaltransduktion darstellt. Eine reduzierte Expression der  $\zeta$ -Kette in T-Zellen konnte in Tumorpatienten, Patienten mit chronischen Infektionskrankheiten aber auch in Autoimmunerkrankungen beobachtet werden (194). T-Zellen, kultiviert in zellfreiem PMN-Überstand (PMN-ÜS), in welchem ein Arginase induzierter Argininmangel vorherrscht, werden in ihrer Aktivierung, Proliferation und

Zytokinproduktion und somit in ihren immunologischen sowie antitumoralen Funktionen supprimiert (42, 195). Es konnte gezeigt werden, dass der Argininmangel zu einem Arrest der T-Zellen in der G0-G1 Phase des Zellzyklus führt (196).

Die durch die PMN-ARG1 vermittelte Arginindepletion hat physiologisch mehrere Bedeutungen. Im entzündeten Milieu, in welchem eine Vielzahl an aktivierten PMN vorhanden sind, hat sich dieser Mechanismus der entzündungsbedingten Immunsuppression wahrscheinlich etabliert, um einer übermäßigen T-Zell vermittelten Gewebeerstörung oder Hyperinflammation entgegenzuwirken (190, 197). ARG1 ist zudem auch während der Schwangerschaft in der Plazenta und im peripheren Blut erhöht und trägt über die vorübergehende T-Zellsuppression zur feto-maternalen Immuntoleranz bei (190, 198). Diesen Mechanismus der Immunsuppression durch Arginindepletion nutzen Tumore als Strategie der Tumorummunevasion. Tumore selbst (13, 199), vor allem aber Zellen des TME wie PMN, TANs, PMN- oder M-MDSCs, DC oder Makrophagen, exprimieren ARG1 (53, 200). Die Expression von ARG1 in den myeloischen Zellen wird durch tumorassoziierte Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL10, IL-21, IL-4 und GM-CSF oder durch die im TME herrschenden Stresskonditionen wie Hypoxie und Azidose verstärkt. Zudem besitzen Tumorzellen als metabolisch stark aktive Zellen einen erhöhten Argininbedarf und weisen eine erhöhte Expression von kationischen Aminosäuretransportern (z.B. CAT-1 und CAT-2B) auf, was zusätzlich eine verstärkte Argininaufnahme zur Folge hat. Beide Mechanismen führen zur Arginindepletion und induzieren somit ein immunsuppressives TME in welchem T-Zellen in ihrer antitumoralen Funktion stark beeinträchtigt werden (58, 69, 201-203). NK-Zellen sind ebenfalls unter Argininmangel-Bedingungen in ihrer Funktion deutlich inhibiert (204, 205). Auch in Stresssituationen wie Trauma oder Sepsis konnten reduzierte Arginin-Level beobachtet werden (190). Es wird angenommen, dass auch die Arginase selbst eine protumorale Wirkung besitzt. ARG1 induziert in Tumorzellen eine erhöhte Aktivierung der PI3K/AKT- bzw. ERK-Signalwege, was zu einem erhöhten Tumorzellüberleben und einer verstärkten Proliferation führt. Darüber hinaus fördert auch ARG2 über Aktivierung von Akt und mTORc1 die Tumorzellprogression (206).

T-Zellen können über verschiedene Mechanismen flexibel auf den Argininmangel im pathologischen Milieu reagieren. Eine Strategie ist die Induktion von Autophagie, um einen Zugang zu intrazellulärem Arginin zu erlangen (207). Eine weitere Strategie beinhaltet die zelleigene de novo Synthese von Arginin aus Citrullin über ASS und ALS. Unter niedrigen Argininkonzentrationen (20  $\mu$ M) - nicht aber im kompletten Argininmangel - sowie unter Supplementation von Citrullin, zeigen T-Zellen eine erhöhte ASS-Expression sowie eine erhöhte Expression des Aminosäuretransporters LAT1 (*large neutral amino acid transporter 1*, LAT1) zur Citrullinaufnahme. Dadurch kann eine komplette Rekonstitution der Proliferation wie unter physiologischer Argininkonzentration erreicht werden (208).

## **4.2 Herausforderungen und Strategien der Tumorthherapie**

Wie in „Hallmarks of Cancer: New Dimensions“ und „The hallmarks of cancer immune evasion“ beschrieben, muss für zukünftige Tumorthapien in neuen Dimensionen gedacht werden, da immer mehr Einflüsse auf die Tumorgenese, die Tumorprogression sowie Tumorimmunevasionsmechanismen erforscht werden, die deutlich machen, dass das Tumorverständnis weitaus komplexer ist als „nur“ sich schnell teilende Zellen. Die Tumorgenese und das immunsuppressive TME umfassen viele Mechanismen, die eine Herausforderung für die Tumorthapie darstellen aber auch eine Vielzahl von Ansatzpunkten für individualisierte Interventionen bieten (11, 12).

Tumore und besonders auch das TME mit all seinen beschriebenen Faktoren induzieren nicht nur eine reduzierte antitumorale Aktivität in T-Zellen, sondern versetzen T-Zellen in einen anergen, erschöpften bzw. seneszenten Zustand, welcher überdies die Tumorgenese fördern kann (182). Die durch das TME induzierte Erschöpfung in T-Zellen führt zu einem reduzierten Ansprechen auf Tumorimmuntherapie oder gar zu einer Resistenz gegen ICI (209). Die T-Zellsuppression stellt ebenfalls eine Problematik der zellulär basierten Tumorthapien mit CAR-T-Zellen dar, da auch diese im TME erschöpfen und in ihrer antitumoralen Funktion gehemmt werden (210, 211). Eines der großen Ziele der Immuntherapie und zellulär basierten Tumorthapie ist es daher, der Erschöpfung von T-Zellen entgegenzuwirken bzw. eine Umgebung zu schaffen, die eine perfekte Grundlage für die T-Zellaktivität garantiert und diese vielleicht sogar verstärkt. Diese Herausforderung macht neue Therapiestrategien erforderlich und rückt u.a. Kombinationstherapien, neue Immuntherapeutika sowie individualisierte Therapiestrategien in den Fokus.

### **4.2.1 Immunsuppression durch MDSCs und mögliche Therapiestrategien**

Die Gruppe der MDSCs (bzw. TANs oder N2 TANs, je nach Definition) sind zu einem großen Teil für die Immunsuppression im TME verantwortlich. Peranzoni et al. beschreiben, dass das Vorhandensein von MDSCs die Wirkung von ICI stark beeinträchtigt und MDSCs womöglich auch eine Ursache für die Resistenz gegen Immuntherapeutika sind. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob MDSCs geeignet sind, als Biomarker in der Vorhersage der Wirkung von Tumorimmuntherapien fungieren (212).

Dies indiziert, dass die Elimination von MDSCs eine wichtige Rolle in der Tumor(immun)therapie einnehmen könnte. Es existieren verschiedene Ansatzpunkte und Strategien, um MDSCs bzw. ihre Wirkmechanismen zu reduzieren. Diese reichen von zielgerichteten Therapien, Tyrosinkinaseinhibitoren, Bisphosphonaten (um den Übertritt von MDSCs aus dem Knochenmark in die Peripherie zu verhindern), All-trans-Retinsäure, Peptidbodies, COX2/PGE2-Inhibitoren, Vitamin D3, bispezifischen Antikörpern, PDE5-Inhibitoren bis hin zu Chemotherapie (53, 67, 213, 214). Es konnte gezeigt werden, dass

niedrig dosiertes 5-Fluorouracil oder Gemcitabin MDSCs reduzieren und somit gleichzeitig die T-Zell spezifischen antitumoralen Effekte gesteigert werden konnten (215). Dieses Konzept ist Grundlage der so genannten metronomischen Chemotherapie. Konventionelle Chemotherapie wird in hoher Dosierung in zyklischer Form verabreicht und erzeugt über die Hemmung der Proliferation von Tumorzellen einen direkten zytotoxischen Effekt auf diese. Gleichzeitig wirkt dieser Effekt auch auf andere sich schnell teilende Zellen des Körpers wie hämatopoetische Stammzellen, Haarfollikel und gastrointestinale Schleimhaut und führt dadurch zu starken Nebenwirkungen. In der metronomischen Chemotherapie werden niedrige Dosierungen bei kontinuierlicher Gabe angewendet (216). Metronomische Chemotherapie zeigt eine direkte sowie indirekte Wirkung auf Tumorzellen. Dies geschieht direkt in Form von Tumorzelltod oder indirekt, indem u.a. durch die Reduktion von MDSCs die Immunsuppression reduziert wird und dadurch die antitumorale Immunantwort gesteigert wird. Auch die Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren wie Hypoxie-induzierter-Faktor-1 (HIF-1) oder VEGF wird gehemmt (217, 218). Vor allem bei Entitäten wie Mammakarzinom (219), Lungenkarzinom (220) und kolorektalen Tumoren (221) aber auch hämatoonkologischen Entitäten wie AML (222) finden sich klinische Studien, in welchen diese Art der Chemotherapie überprüft wird.

#### **4.2.2 Herausforderung zellulär basierter Tumormimmuntherapien und mögliche Lösungsstrategien**

Zelluläre Tumormimmuntherapie basiert auf dem Konzept, körpereigene T-Zellen des Patienten genetisch zu modifizieren, in vitro zu expandieren und anschließend zu reinfundieren. Das Prinzip der CAR-T-Zellen beruht auf dem *Chimeric Antigen Receptor* (CAR), der über die scFv-Domäne (*single-chain variable fragment*, scFv) unabhängig von MHC-I oder MHC-II Antigene auf der Zelloberfläche erkennt und das Signal über eine CD3  $\zeta$ -Domäne und weitere kostimulatorische Elemente in die T-Zelle leitet (223). Eine weitere Art der zellulären Therapie stellt die TCR-T-Zell-Therapie dar. Hierzu werden die T-Zellen mit einem TCR transduziert, der gegen ein tumor-spezifisches (nur in Tumorgewebe exprimiert) oder tumor-assoziiertes (überexprimiert in Tumorzellen, begrenztes Vorkommen in normalen Geweben) Antigen gerichtet ist. Im Gegensatz zu CAR-T-Zellen ist die Erkennung des Antigens durch TCR-T-Zellen an MHC gebunden. Dies macht es möglich, intrazelluläre Proteine oder Peptidsequenzen (welche über MHC-I auf der Tumorzelle exprimiert werden) als Zielstrukturen zu verwenden. Bislang wurden TCR-T-Zellen nur in Studien untersucht (224).

Für die CAR-T-Zell-Therapie mit dem CD19 Zielantigen erfolgte die Zulassung für hämatologische Tumorentitäten in rezidivierten oder refraktären Stadien wie dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (225) oder der Akuten Lymphatischen (B-Zell) Leukämie bei Kindern (226). Inzwischen existieren in Deutschland (Paul Ehrlich Institut, Stand 2024) sechs zugelassene CAR-T-Zellprodukte: Lisocabtagen maraleucel (Breyanzi®), Tisagenlecleucel

(Kymriah®), Brexucaptagen autoleucel (Tecartus®), Axicabtagen ciloleucel (Yescarta®), Idecabtagen vicleucel (Abecma®) und Ciltacabtagen autoleucel (Carvykti®). Die beiden letztgenannten besitzen BCMA als Zielstruktur und sind bei Patienten mit refraktären bzw. rezidiviertem Multiplen Myelom zugelassen (227, 228). Aber auch weitere CARs mit anderen Zielantigenen wie CD22, CD7, CD30, GRPC5D werden bereits getestet (229).

Auch zellulär basierte Tumorthérapien, wie CAR-T-Zell-Thérapien, können prinzipiell durch immunsuppressive Mechanismen, induziert durch den Tumor und das TME, in ihrer Funktion inhibiert werden. In bisher zugelassenen Thérapien mit CAR-T-Zellen in hämatoonkologischen Erkrankungen sind unter anderem die Herunterregulation bzw. der Verlust des Zielantigenes auf der Tumorzelle, die unzureichende Expansionsfähigkeit der CARs bzw. ihr limitierte Persistenz in vivo (230) sowie ihre funktionelle Erschöpfung (210) als mögliche Gründe für eine eingeschränkte antitumorale CAR-T-Funktion nachgewiesen worden (231). Auch der durch ARG1 vermittelte Argininmangel kann zu einer beeinträchtigten Proliferation und antitumoralen Wirkung von CAR-T-Zellen führen (232). Eine Strategie, um diesem zu entgehen, war die Modifikation des CAR-Rezeptors, welcher durch ko-stimulatorische Domänen wie CD28 und 4-1BB ergänzt wurde (229). Um den Argininmangel zu kompensieren wurden CAR-T-Zellen, welche zusätzlich mit dem Enzym ASS transduziert. Diese CAR-T Zellen waren somit in der Lage Arginin de novo zu synthetisieren, proliferierten besser und wiesen eine verstärkte antitumorale Aktivität auf (233). CAR-T Zellen, welche aus TSCM (159, 234) oder TCM T-Zellsubpopulationen generiert wurden zeigten ebenfalls eine deutlich bessere antitumorale Aktivität bei geringerem Nebenwirkungsprofil (235-237).

In soliden Tumoren konnte die Anwendung von CAR-T-Zellen bislang weniger überzeugende Ergebnisse liefern. Dies lässt sich auf multifaktorielle Umstände zurückführen. Die Migration in den soliden Tumor stellt die erste Hürde dar. Für diesen Prozess werden Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 auf der Tumorzelle vorausgesetzt (238). Aber auch die ECM und Fibroblasten im TME verstärken die Barriere und inhibieren eine suffiziente Migration von CAR-T-Zellen in den Tumor (239). Im TME stellen die Vielzahl an T-Zell supprimierenden Faktoren (Hypoxie, Glukosemangel, Laktatanstieg, ROS, ARG1, Argininmangel, inhibitorische Zytokine, inhibitorische Zellen Tregs, TANs oder MDSCs, inhibitorische Oberflächenrezeptoren) eine weitere Hürde der effizienten CAR-Therapie dar. Auch die dynamische Antigenpräsentation bzw. Expression bestimmter Oberflächenmarker solider Tumore reduziert die Wirkung einer speziell für ein bestimmtes Zielantigen entwickelten Therapie (167, 240). Bisherige CARs wurden vor allem für die Therapie von hämatoonkologischen bzw. lymphatischen Tumorentitäten entwickelt. Hauptziel der Herstellungsprotokolle ist, dass CAR-T-Zellen vor allem dem TCM-Phänotyp entsprechen und CD62L exprimieren, wodurch sie ins lymphatische Gewebe übertreten können. Für eine Therapie von soliden Tumoren hingegen wäre der Phänotyp der TEM oder TRM von Vorteil,

da diese im peripheren Blut zirkulieren bzw. im Gewebe/Tumor lokalisiert sind (239). Es wurden verschiedene Strategien untersucht, um die beschriebenen Herausforderungen zu umgehen. Zu nennen wären hier beispielsweise die direkte lokale Installation von CAR-T-Zellen in den Tumor, die Anwendung von CAR-T-Zellen unter gleichzeitiger Depletion von Tregs oder Fibroblasten bzw. eine Kombinationstherapie von CAR-T-Zellen mit ICI wie PD-1/PD-1- oder CTLA-4-Antikörpern (240-242). Um den Mangel an Tumorantigenen in soliden Tumoren zu umgehen und gleichzeitig die geringe in vivo Persistenz von CAR-T-Zellen zu verstärken wird in einer aktuellen Phase 1/2 Studie die Kombination von CAR-T-Zellen und einem mRNA-Impfstoff mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht (243). Bislang erfolgte keine klinische Zulassung von CAR-T-Zellen in der Therapie von soliden Tumoren.

TCR-T-Zellen konnten bereits vielversprechende Ergebnisse in der Therapie gegen solide Tumore zeigen. Zum einen ist die Anzahl der möglichen Zielantigene größer, zum anderen besitzen TCR-T-Zellen eine höhere Sensitivität und Avidität als CAR-T-Zellen. Auch bei TCR-T-Zellen konnte festgestellt werden, dass der Transfer von TCM oder TSCM-ähnlichen Phänotypen bessere Ergebnisse erzielen. Wie die CAR-T-Zellen sind auch TCR-T-Zellen dem immunsuppressiven TME ausgesetzt, sodass Strategien notwendig werden, diese Immunsuppression zu umgehen (244, 245).

#### **4.2.3 Herausforderungen der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren**

Auch die Therapie mit ICI steht vor Herausforderungen, die eine reduziertere Wirksamkeit oder gar Resistenz der Therapie nach sich ziehen. Die Resistenz auf Tumormimmuntherapien kann in eine primäre (initial kein Ansprechen auf ICI) und eine erworbene Resistenz (initials Ansprechen auf ICI und anschließende Tumorprogression) unterteilt werden. Eine Sonderform der primären Resistenz ist die Hyperprogression, eine Progression der Tumorerkrankung unter ICI. Gerade bei der Hyperprogression werden vor allem Einflüsse des TME als ursächlich diskutiert. Aufgeführt wird die Stimulation von Tregs durch die ICI, sowie eine kompensatorische - auf die plötzlich erhöhte T-Zellzytotoxizität reagierend - Generierung eines noch immunsuppressiveren TME (246, 247). Bei der erworbenen Resistenz werden eine veränderte Antigenpräsentation, veränderte Signalwege durch neue Mutationen, die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen, ein veränderter Metabolismus im TME, das Vorhandensein von immunsuppressiven Zellen wie Tregs oder MDSCs und deren T-Zellinhibition oder eine gesteigerte tumorale Neovaskularisation beschrieben. Aber auch patientenabhängige Faktoren, wie das Alter (assoziiert mit einer reduzierteren Immunreaktion (248)), Geschlecht, Ernährung sowie menschliche Mikrobiome (z.B. mikrobielle Darmflora) spielen eine Rolle (246, 249). Um die Wirkung der ICIs zu verbessern werden Kombinationsstrategien diskutiert und angewandt. Synergistische Effekte zeigten u.a. die Kombination mit konventioneller Chemotherapie, Radiotherapie, zielgerichteter Therapie mit Angiogeneseinhibitoren oder

Tyrosinkinaseinhibitoren oder eine Therapie mit doppelter Immuncheckpoint-Inhibition (PD-(L)1 und CTLA-4). Auch erfolgte die kombinierte Anwendung von ICIs mit bispezifischen Antikörpern, welche beispielsweise PD-L1 mit TGF- $\beta$  oder mit einem ko-stimulatorischen Molekül wie CD27 binden (250). Auch intrazellulär kommt es in T-Zellen vermittelt durch immunsuppressiven Faktoren wie TGF- $\beta$ ,IDO, PGE2 im TME zu negativen Rückkopplungsprozessen in TCR-Signalwegen und somit zur reduzierten antitumoralen Aktivität von T-Zellen (251). Diese Erkenntnisse führen dazu, dass auch intrazelluläre ICIs bereits als Therapieoptionen untersucht werden (100). Es wird deutlich, dass eine Steigerung der TCR-Aktivität in T-Zellen ein weiteres Ziel der Tumorimmuntherapie darstellt.

#### **4.2.4 Arginase-Inhibition als vielversprechender Ansatz in der Tumorimmuntherapie**

Die ARG1 vermittelte Arginindepletion im TME stellt einen bedeutenden Tumorimmunescape-Mechanismus dar. Erhöhte Expression von ARG1 in Tumoren (mit oder ohne Reduktion der systemischen Serum Arginin-Konzentration) geht mit einer schlechteren Prognose einher (200). Arginase stellt somit ein ideales Ziel für die Tumorthherapie dar. Es gibt zwei Arten von Arginaseinhibitoren, synthetische und natürliche, welche bislang entweder in klinischen Studien oder in Modellen getestet wurden. Zu den synthetischen ARG-Inhibitoren gehören die Hydroxy-Derivate von L-Arginin, NOHA (N $\omega$ -hydroxy-L-Arginin, NOHA) sowie nor-NOHA (N $\omega$ -hydroxy-nor-L-Arginin, nor-NOHA), CB-1158 (INCB001158) sowie OATD-02 (sowohl ARG1- als auch ARG2-Inhibitor). Piceatannol, Flavonoide, Gallensäuren und Chlorogensäure zählen u.a. zu den natürlichen Inhibitoren der Arginase (206, 252). Die synthetischen Arginaseinhibitoren können aktuell in vier Generationen unterteilt werden. NOHA bzw. nor-NOHA sowie 2-(S)-amino-6-borono-hexanoic acid (ABH) und ABH-Derivate zählen zur ersten Generation. Auch die zweite Generation der Arginaseinhibitoren umfasst weiterentwickelte ABH-Derivate. Zwar zeigen diese eine höhere inhibitorische Kapazität als die erste Generation, aber dafür eine geringe orale Bioverfügbarkeit. In der dritten Generation wurden die ABH-Derivate auf molekularer Ebene um Ringstrukturen ergänzt, welche sie optimal im aktiven Zentrum der Arginase fixieren. NED-3228 ist der effektivste Inhibitor dieser Generation. CB-115 gehört zu den Inhibitoren der vierten Generation, welcher vor allem die extrazelluläre Arginase inhibiert. Dies macht ihn zu einem attraktiven Arginaseinhibitor in Bezug auf die Inhibition der Arginase im TME. OATD-02 ist eine optimierte Weiterentwicklung der Viertgeneration Inhibitoren, dessen Derivate aktuell die Grundlage neuer Generationen von Arginaseinhibitoren bilden (253).

Aktuell wurden bzw. werden Studien mit OATD-02 beispielsweise in fortgeschrittenen soliden Tumorentitäten (254), sowie mit CB-1158 allein oder in Kombination mit ICI bzw.

Chemotherapie oder anderen Arginaseinhibitoren in fortgeschrittenen Tumorerkrankungen bzw. auch in nicht malignen Erkrankungen durchgeführt (siehe hierzu Abbildung 6).

<b>Studiename</b>	<b>ARG-Inhibitor</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Status</b>
<b>NCT03361228</b>	INCB001158	Plus Epcadostat ± Pembrolizumab, fortgeschrittene solide Tumore	<i>terminated</i>
<b>NCT03837509</b>	INCB001158	Plus Daratumumab in refraktären und rezidierten Multiplem Myelom	<i>terminated</i>
<b>NCT03910530</b>	INCB001158	Plus PD-1-Inhibitor in fortgeschrittenen soliden Tumoren (Japan)	<i>completed</i>
<b>NCT02903914</b>	INCB001158	± ICI in fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumoren	<i>completed</i>
<b>NCT03314935</b>	INCB001158	Plus Chemotherapie in soliden Tumoren	<i>completed</i>
<b>NCT05536934</b>	nor-NOHA	Adipositas	<i>completed</i>
<b>NCT05806502</b>	nor-NOHA	Diabetes mellitus Typ 1 und 2	<i>completed</i>
<b>NCT02009527</b>	nor-NOHA	Ischämischer Reperfusionsschaden	<i>completed</i>
<b>NCT02687152</b>	nor-NOHA	Diabetes mellitus Typ 2	<i>Completed</i>
<b>NCT04279769</b>	CB-280	Zystische Fibrose (chronische Infektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	<i>completed</i>
<b>NCT05759923</b>	OATD-02	Fortgeschrittene/metastasierte solide Tumore	<i>recruiting</i>

**Abbildung 6: Einsatz von Arginase-Inhibitoren INCB001158, nor-NOHA, CB-280 und OATD-02 in klinischen Studien.** Aus [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Stand 01/2025

Als Alternative zu Arginaseinhibitoren wurden ARG1-spezifische Impfungen entwickelt und getestet. Ziel dieser immunmodulatorischen Impfung ist es, ARG1 spezifische T-Zellen zu generieren, welche eine direkte antitumorale Wirkung auf ARG1-exprimierende Tumore zeigen, bzw. ARG1-exprimierende Zellen des TME eliminieren. Ähnliche Strategien wurden ebenfalls für IDO und PD-L1 entwickelt und werden bereits in klinischen Studien getestet (255-257).

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Arginase-Inhibitoren die myeloisch induzierte Tumormimmunevasion abschwächt, es zu einer gesteigerten T-Zellproliferation kommt und somit das Tumorwachstum reduziert wird (258). Peyaud et al. zeigten, dass erhöhte Plasma-Arginin-Konzentrationen einen prädiktiven Marker für das Ansprechen einer ICI-Therapie darstellen (258). Der orale Einsatz von OATD-02 konnte in Glioblastompatienten ein

verbessertes Ansprechen von ICI-Therapie erzielen (259). Der Einsatz von Arginase-Inhibitoren allein oder in Kombination mit einer CAR-T-Zelltherapie oder ICI stellt somit eine erfolgsversprechende zielgerichtete Therapieoption in der Tumormimmuntherapie dar.

Munder et.al konnten zeigen, dass die Proliferation von T-Zellen aktiviert in PMN-Überstand (PMN-ÜS) durch den Einsatz von Arginase-Inhibitoren rekonstituiert werden konnte (42). Unter abgewandelten Versuchsbedingungen gelang es unserer Arbeitsgruppe, eine in diesem Kontext (Aktivierung von T-Zellen in PMN-ÜS unter Arginase-Inhibition) neuartige durch PMN induzierte Hyperaktivierung in T-Zellen zu charakterisieren. Humane PMN setzen somit - durch Sekretion oder im Kontext von Zelltod - einen Faktor bzw. Faktoren frei, die bei gleichzeitiger Hemmung der Arginindepletion eine T-Zell stimulierende Aktivität entfalten können. Die Identität dieser Faktoren ist bis dato ungeklärt, es konnte lediglich eine molekulare Größe < 3 kDa bestimmt werden. Die hyperaktivierten T-Zellen zeigen im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen eine deutlich gesteigerte Aktivierung bzw. Proliferation, erhöhte Zytokinproduktion und eine verstärkte antitumorale Aktivität. Zudem war es möglich, durch die von PMN sezernierten Faktor(en) in anergen T-Zellen von Patienten mit Multiplen Myelom erneut eine Proliferation zu induzieren (260). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von Arginase im TME für T-Zellen nicht nur die erforderliche Menge an Arginin für ihre Aktivierung und antitumorale Funktion zu Verfügung stellt, sondern gleichzeitig die Möglichkeit besteht, dass T-Zellen durch die zahlreich im TME vorhandenen PMN (sei es als TANs oder PMN-MDSCs), entgegen des mehrheitlich angenommenen supprimierenden Einflusses, hyperaktiviert werden und sogar in ihrer antitumoralen Wirkung gesteigert werden.

Zentrales Ziel der tumormimmunologischen Forschung ist es, im TME und in der Therapie von Patienten mit Tumorerkrankungen die Aktivität sowie (metabolische) Flexibilität von T-Zellen zu verbessern, zelluläre Erschöpfung und Seneszenz zu verhindern sowie die Differenzierung in Gedächtniszellen zu fördern. Die Ziele der folgenden Arbeit sind es, die durch PMN unter Arginaseinhibition induzierte Hyperaktivierung in T-Zellen in diesem Kontext genauer zu charakterisieren. Dies beinhaltet eine detailliertere Untersuchung der T-Zellen hinsichtlich verschiedener Kultivierungsbedingungen, der metabolischen Aktivität, TCR-Signalinduktion, Expansion in Langzeitkultivierung und antitumoraler Aktivität, sowie eine ausführliche Charakterisierung der T-Zellphänotypen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Medien und Zelllinien

##### 5.1.1.1 Medien

**Tabelle 2: Verwendete Medien**

Basismedium	Artikelnummer	Hersteller
RPMI 1640 mit $\text{NHCO}_3$ , ohne L-Glutamin	R0883 2348955	Sigma-Aldrich Gibco™
RPMI 1640 mit L-Glutamin und $\text{NHCO}_3$ ohne L-Arginin, L-Lysin, L-Leucin und Phenolrot	R1780	Sigma-Aldrich
RPMI 1640, ohne Glucose	#2192977	Gibco™
DMEM, Glucose hochkonzentriert, ohne L-Glutamin	1190-044	Gibco™
Seahorse XF RPMI 1640, pH 7,4	103577-100	Agilent Technologies

**Tabelle 3: Verwendete Medienzusätze**

Mediumzusätze	Artikelnummer	Hersteller
D-Glucose	G7021	Sigma-Aldrich
Dialysiertes FCS, hitzeinaktiviert	F0392	Sigma-Aldrich
FCS, hitzeinaktiviert	F7524	Sigma-Aldrich
HEPES, 1 M Lösung	882120	Lonza
Humanes AB-Serum, hitzeinaktiviert		Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz
L-Arginin (Stock: 100mM)	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Citrullin	BCBQ8019V	Sigma-Aldrich
L-Glutaminlösung 200 mM	G7513	Sigma-Aldrich
L-Leucin (Stock: 100 mM)	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin (Stock: 100 mM)	L-5626	Sigma-Aldrich
Mangan (II)-chlorid Tetrahydrat (Stock: 10 mM)	A2087,01000	AppliChem
Natriumpyruvat	S8636	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	P4458	Sigma-Aldrich

**Tabelle 4: Medienzusammensetzung**

Medium zur Zellkultivierung	Verwendung	Bestandteile
DMEM	Kultivierung Phoenix Ampho	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 3 % HEPES
humanes RPMI Medium (huRPMI Medium)	Kultivierung T-Zelle	RPMI 10 % AB-Serum 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 3 % HEPES
±150 µM Arginin RPMI Medium (+/-Arg-RPMI Medium)	Medium für Versuchsbedingungen	RPMI (1640, #1780) 10 % dial. FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 20 µM MnCl <sub>2</sub> 220 µM L-Lysin 400 µM L-Leucin ± 150 µM L-Arginin
FCS-RPMI-Medium	Kultivierung K563 Zellen	RPMI (1640) 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 3 % HEPES
Seahorse Medium	Seahorse Versuche	XF RPMI Medium, pH = 7,4 10 mM D-Glukose 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin

### 5.1.1.2 Zelllinien

**Tabelle 5: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Verwendung
K562 A2 CD80 <sup>+</sup>	Restimulation transduzierter T-Zellen

K562 A2 CD80 <sup>+</sup> transduziert mit Luziferase (pBullet_luc_IRES_puro)	Zytotoxizitäts Assay
Phoenix Ampho Zellen, American Type Culture Collection	Transduktion humaner T-Zellen

## 5.1.2 Chemikalien, Puffer und Kits

### 5.1.2.1 Chemikalien

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Artikelnummer	Hersteller
1 % Osmium Tetraoxid	20816-12-0	Carl Roth
2-Isopropanol ≥ 99,8 %	6752.3	Carl Roth
2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose	N13195	Thermo Fischer Scientific
[ <sup>3</sup> H]Thymidinlösung, 5 mCi/185 MBq	NET027E005MC	Perkin Elmer
Acrylamidstammlösung 30 %	3029.1	Carl Roth
Ammonimchloride	K298.1	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	A3678	Bio-Rad
Albumin V	90604-29-8	Carl Roth
Brij O10	MKBR4100V	Sigma-Aldrich
Calcein AM (Stock: 1mg/ml in DMSO)	80011-2	Biotium
D-Luciferin (Stock: 16,67 mg/ml)	122796	Perkin Elmer
Dextransulfat Natriumsalz 500	5956.1	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	A994.2	Carl Roth
Dulbecco´s Phosphat buffered Saline (PBS)	D8357	Sigma-Aldrich
Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28	11131D	Thermo Fisher Scientific
Eisessig	3738.1	Carl Roth
Epon Resin		Agar Scientific
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	8040.3	Carl Roth
FuGene6	E2692	Promega
Geneticin, Stock 100 mg/ml	11811-031	Gibco

Giemsa	1.09204.0500	Merck
Glutaraldehyd	23116.01	Serva
Glycin	3908.2	Carl Roth
Histopaque- 1077	10771-500ML	Sigma-Aldrich
Ionomycin	I0634	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat	P748.1	Carl Roth
Laemmli 2x Probenpuffer	S3401	Sigma-Aldrich
Leupeptin (Stock: 1mg/ml)	L2884	Sigma-Aldrich
May-Grünwald-Lösung	1.01424.2500	Merck
Methanol	0082.3	Carl Roth
Milchpulver	T145.1	Carl Roth
Monensin 1000x Solution	E00020-1636	eBioscience
n-Acetylcystein (Stock: 1 M)	A7250	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	L3771	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid (Stock: 1 M)	S7920	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat (Stock: 100 mM)	S6508	Sigma-Aldrich
nor-NOHA (Stock: 125 mM)	4027934.1000	Bachem
OKT-3 (Stock: 2,7 mg/ml)		Janssen-Cilag GmbH
Para-Formaldehyd	P6148	Sigma-Aldrich
Pepstatin (Stock: 1,5 mg/ml)	P5318	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfoniumfluorid (Stock: 100 mM)	P7626	Sigma-Aldrich
Phorbol myristate acetate (PMA)	P8139	Sigma-Aldrich
Poly-D-Lysin	3439-100-1	R&D Systems
Polybrene (Stock: 5 mg/ml)	H9268	Sigma-Aldrich
Proleukin S (IL-2) (Stock 6000 U/ml)		Novartis
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	161-0374	Bio-Rad
Rotiphorese Gel 30, Acrylamidstammlösung	3029.1	Carl Roth

Salzsäure, rauchend 37 %	4625.2	Carl Roth
Szintillationslösung Rotiszint® Eco Plus	0016.3	Carl Roth
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich
Tris	4855.2	Carl Roth
Trypanblau-Lösung 0,4 %	T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA Lösung	T3934	Sigma-Aldrich
Tween 20	9127.1	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth

### 5.1.2.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 7: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen**

Puffer/Lösung	Bestandteile
0,1 % Trypanblau-Lösung	0,1 % Trypanblau in PBS steril filtriert
0,5 M Tris (pH 6,8) - Sammelgelpuffer	50 mM Tris 0,4 % SDS pH 6,8
1 % PFA-Lösung	1 % PFA in PBS bei 60 °C lösen steril filtriert
10 % SDS	10 % SDS pH 7,2
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M L-Glycin 10 % einer 10 %igen SDS-Lösung
10 x TBS	100 mM Tris 1,5 M NaCl pH 8 für 1x TBS 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnen
1,5 M Tris (pH 8,8) - Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,8
3 % Dextranlösung	3 % Dextran In PBS

	steril filtriert
50 mM Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM Tris pH 7,5
Blockierpuffer für Western Blot	5 % Milchpulver in TBST
Blottingpuffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol
Erythrozyten-Lyse-Puffer	174 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA pH 7,3 steril filtriert
MACS-Puffer	2 % FCS 1 mM EDTA In PBS steril filtriert
Protein-Lyse-Puffer	1 % Brij in 50 mM Tris/HCl (pH7,5) 2,19 µM Pepstatin 2,34 µM Leupeptin 1 mM PMSF 10 mM NaF 10 mM Na-o-van
TBST	0,1 % Tween20 in 1 x TBS
Stripping Puffer PVDF	20 ml 10 % SDS-Lösung 12,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 800 µl β-Mercaptoethanol mit dH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen

### 5.1.2.3 Kits

**Tabelle 8: Verwendete Kits**

Kits	Bestandteile	Artikelnummer	Hersteller
DC™ Protein Assay Reagents Package	Reagent A Reagent B Reagent S	5000116	Bio-Rad

EasySep™ Human CD4 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit	Human T Cell Enrichment Cocktail D Magnetic Particles	19012	Stemcell™ Technologies
EasySep™ Human CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Human T Cell Enrichment Cocktail D Magnetic Particles	17913	Stemcell™ Technologies
Human Phospho-Kinase Array Kit	Human Phospho-Kinase Array Array Buffer 1 Array Buffer 2 5x Concentrate Array Buffer 3 Lysis buffer 6 Wash buffer Concentrate Detection Cocktail A Detection Cocktail B Streptavidin-HRP Chemi Reagent 1 Chemi Reagent 2 8-well Multi-dish Transparency Overlay Template	ARY003B	R&D Systems, Inc.
EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit	Human T Cell Enrichment Cocktail D Magnetic Particals	19051	Stemcell™ Technologies
Seahorse FluxPaks	XFp Sensor Cartridges XFp Cell Culture Miniplates XFp Calibrant Solution	103022-100	Agilent Technologies
Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test Kit	Oligomycin FCCP	103275-100	Agilent Technologies
Seahorse XFp MitoStress Test Kit	Oligomycin FCCP Rotenon /Antimycin A	103010-100	Agilent Technologies
Western Lightning Plus ECL	Oxidizing Reagent Plus Enhanced Luminol Reagent Plus	NEL103001EA	Perkin Elmer

### 5.1.3 Antikörper

#### 5.1.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

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

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	Artikelnummer	Hersteller
CD3	PE	UCHT1	IgG1, κ	561809	BD Biosciences
CD4	FITC	RPA-T4	IgG1, κ	561842	BD Biosciences
CD4	PE	RPA-T4	IgG1, κ	555347	BD Biosciences
CD4	APC	RPA-T4	IgG1, κ	555349	BD Biosciences
CD8	FITC	HIT8a	IgG1, κ	555634	BD Biosciences
CD8	PE	B9.11	IgG1, κ	IM0452U	Beckman Coulter
CD8	PE-Cy 7	HIT8a	IgG1, κ	566859	BD Biosciences
CD28	PE	CD28.2	IgG1, κ	561793	BD Biosciences
CD45RA	PE	HI100	IgG2b, κ	555489	BD Biosciences
CD45RA	FITC	HI100	IgG2b, κ	555488	BD Biosciences
CD57	APC	NK-1	IgM, κ	560845	BD Biosciences
CD57	BV421	NK-1	IgM, κ	563896	BD Biosciences
CD62l	PE-Cy 5	DREG-56	IgG1, κ	555545	BD Biosciences
CD66b	FITC	G10F5	IgM, κ	555724	BD Biosciences
GLUT-1	AlexaFluor 647	202915	IgG2b, κ	566580	BD Biosciences

#### 5.1.3.2 Isotypen Antikörper für die Durchflusszytometrie

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

Isotyp	Fluorophor	Klon	Artikelnummer	Hersteller
IgG1, κ	APC	MOPC-21 (RUO)	555751	BD Biosciences
IgG1, κ	FITC	MOPC-21 (RUO)	5555748	BD Biosciences
IgG1, κ	PE	MOPC-21 (RUO)	551436	BD Biosciences
IgG1, κ	PE-Cy 7	MOPC-21 (RUO)	557872	BD Biosciences
IgG1, κ	PE-Cy 5	MOPC-21 (RUO)	555750	BD Biosciences
IgG2b, κ	AlexaFluor 647	27-35 (RUO)	558713	BD Biosciences
IgG2b, κ	FITC	27-35 (RUO)	555742	BD Biosciences
IgG2b, κ	PE	27-35 (RUO)	555743	BD Biosciences
IgM, κ	APC	G155-228	555585	BD Biosciences
IgM, κ	BV421	G155-228	562704	BD Biosciences

IgM, κ	FITC	G155-228	553474	BD Biosciences
--------	------	----------	--------	----------------

### 5.1.3.3 Antikörper für den Western Blot

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

Antikörper	Ursprung	Artikelnummer	Hersteller
Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E)	rabbit	#2965	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®	rabbit	#4370	Cell Signaling
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP®	rabbit	#4511	Cell Signaling
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP®	rabbit	#4858	Cell Signaling
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)	rabbit	#2855	Cell Signaling
Phospho-eIF4E (Ser209) Antibody	rabbit	#9741	Cell Signaling
Vinculin	rabbit	#46505	Cell Signaling
GADH (14C10)	rabbit	#2118	Cell Signaling

### 5.1.3.4 Sekundärantikörper für Western Blot

**Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot**

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody	#7074	Cell Signaling
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate 5.000x	#1610380	Bio-Rad

## 5.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

### 5.1.4.1 Materialien

**Tabelle 13: Verwendete Materialien**

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
1,5 ml Eppendorfgefäße	616-201	Greiner Bio-one
14 ml Röhrchen	352057	Falcon

15 ml Reaktionsgefäße	188271	Greiner Bio-one
2 ml Eppendorfgefäße	623201	Greiner Bio-one
24-well Platte	662160	Greiner Bio-one
5 ml FACS-Röhrchen	115101	Greiner Bio-one
50 ml Reaktionsgefäß	227261	Greiner Bio-one
6 cm Petrischale steril	353004	Falcon
96-well Platte U-Boden	650180	Greiner Bio-one
96-well Platte F-Boden schwarz	655086	Greiner Bio-one
Filterpapier, 96-well Format	1450-421	Perkin Elmer
Kryoröhrchen	122279	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen, blau 1000 µl	777350	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen, gelb 200 µl	775350	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen, farblos 10µl	771350	Greiner Bio-one
Plastikfolie für Filterpapier	1450-432	Perkin Elmer
PVDF Membran	10600023	GE Healthcare
Shandon Cytoslide	5991056	Thermo FisherScientific
Shandon Filter Cards	5991022	Thermo Fisher Scientific
Spritze 10 ml	303134	Becton Dickinson GmbH
Spritze 20 ml	302831	Becton Dickinson GmbH
Spritze 50 ml	300866	Becton Dickinson GmbH
Sterilfilter Filtopur S, 0,2 µm	83.1826.001	Sarstedt
Szintillationsröhrchen	S207	ThermoFisher Scientific
TransWell Inserts 24-well Platte 0,4 µm	353495	Falcon
Zellkulturflaschen, 550 ml	660175	Greiner Bio-one
Zellkulturflaschen, 250 ml	658175	Greiner Bio-one
Zellkulturflaschen, 50 ml	640175	Greiner Bio-one

#### 5.1.4.2 Geräte

**Tabelle 14: Verwendete Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAHD	Köttermann
Blottingkammer	Trans-Blot Cell	Bio-Rad

Counter (145 LSC & Lumineszenz)	MicroBeta TriLux	Perkin Elmer
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences
EasySep™ Magnet (The Big Easy)	18001	Stemcell Technologies
Energieversorgung SDS	PowerPAC™ 3000	Bio-Rad
Energieversorgung Western Blot	PowerPAC™ HC	Bio-Rad
EVOS Mikroskop	M5000	Invitrogen
Gelkammer SDS	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
	PerfectBlue™ Vertical Double Gel Systems L	Peqlab
Harvester 96	Mach 3	Tomtec
Heizblock	Termostat Plus 2,5 ml	Eppendorf
iBright™	CL1000	Thermo Fischer Scientific
Inkubator, CO <sub>2</sub> frei	B15	Heraeus
Inkubator	Function Line	Heraeus
Magnet (Dynabeads), 50 ml	Dynal MPC-50	Dynal Biotech
Magnet (Dynabeads), 1,5 ml		Boehringer
Magnetrührer	MR30011 K	Heidolf
Mikroskop	AE2000	Motic
Mikroskop	45402, Bj 201	Carl Zeiss
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
<i>Platereader</i>	MRXc	DYNEX Technologies
Fluoreszenz- <i>Platereader</i>	FLUOstar	Omega
Seahorse	XFp Analyzer	Agilent Technologies
Sterilbank	Hera Safe HS18	Heraeus
Transmissionselektronenmikroskop	JEM-1400	Jeol GmbH
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf
Zytozentrifuge	Shandon Cytoson 4	Thermo Fisher Scientific
Zählkammer, Neubauer	718605	Blaubrand
Zellbestrahler	Gamma Cell 2000,	Molsgard

### 5.1.5 Software und Statistik

Es wurden folgende Programme für die Auswertungen verwendet:

**Tabelle 15: Verwendete Programme/Software**

Programm	Verwendung
FlowJo 9.0	Auswertung der Durchflusszytometrie Daten
iBright Analysis Software	Auswertung der Western Blot Daten
ImageJ	Auswertung Zellzahlbestimmung Seahorse zur Ergebnismormierung Proteom Profiler Array
Prism 9, Excel	Statistische Auswertung und Erstellen der Graphiken
FACS Diva 7.0	Softwareprogramm des Durchflusszytometers BD FACS Canto II

### 5.1.6 Ethikantrag

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Teilprojekts TP06 (T-Zellimmuntherapie und Hemmung von Tumor-Immunevasionsmechanismen) des DFG Sonderforschungsbereichs 1292. Es liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vor (Antrag 14.09.2017, Bearbeitungsnummer 837.119.10 (7128)). Sowohl Blutspender, also auch Patienten bestätigten schriftlich ihre Einwilligung nach der Deklaration von Helsinki zur Verwendung von Blutprodukten oder anderem Material (z.B. Knochenmarksproben).

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Zellisolation aus Vollblut

Die Vollblut-Konserven wurden von der Blutbank der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

#### 5.2.1.1 Isolation der PBMC

Für die Isolation der humanen peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus Vollblut wird die Methode der Dichtezentrifugation mittels Ficoll® (LSM 1077 Lymphocyte, Dichte:1,077 g/ml, Hisopaque®) angewendet. Hierzu wurden 15ml Ficoll® in ein 50 ml Tube vorgelegt. Das heparinisierte Vollblut wurde im Verhältnis 5:2 mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* mit 1 mM EDTA (PBS/EDTA) verdünnt. Anschließend wurden 35 ml des verdünnten Blutes auf die 15 ml Ficoll® geschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation (1300 g, 15 min, Raumtemperatur, ohne Bremse) zur Auftrennung der verschiedene Blutbestandteile.

Die PBMC, zu denen die T-Lymphozyten gehören, befinden sich nach der Zentrifugation in einer zellreichen Interphase zwischen Ficoll® und Serum und können abpipettiert und in neue Tubes überführt werden. Anschließend erfolgte ggf. eine Erythrozytenlyse mittels 4 °C kalten Erythrozytenlysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur und drei Waschschrte mit PBS (503 g, 5 min, 4 °C).

### **5.2.1.2 Isolation der CD3<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Isolation der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus PBMCs erfolgte mittels negativer Selektion mit dem *EasySep™ T-cell Enrichment Kit* (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). Die Isolation erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers. Die PBMCs wurden in der nach Herstellerangaben spezifizierten Konzentration in einem 14 ml Tube in MACS-Puffer aufgenommen. Zu den PBMC wurde dann ein Cocktail aus monoklonalen biotinylierten Antikörpern (*Enrichment Cocktail*) mit Spezifität gegen relevante nicht T-zelluläre Antigene (d.h. B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten etc.) gegeben. Es erfolgte die Inkubation nach Herstellerangaben. Alle nicht T-zellulären mononukleären Zellen wurden so mit Antikörpern markiert. Im Folgenden erfolgte die Zugabe von Streptavidin-konjugierten magnetischen Partikeln (*Magnetic Beads*). Das Streptavidin bindet an die biotinylierten Antikörper. Durch Einbringen des Tubes mit der Zellsuspension in ein Magnetfeld wurden alle an die magnetischen Partikel via Streptavidin gebundenen Zellen an den Rand des Tubes gezogen. Die unberührten CD3<sup>+</sup> T-Zellen verblieben im Puffer und konnten dekantiert werden. Eine anschließende Reinheitskontrolle der Zellpopulation erfolgte mittels eines CD3 FACS Antikörpers.

Anschließend wurden die gewonnen T-Zellen gezählt und 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/1 ml in huRPMI (RPMI mit humanem AB-Serum) aufgenommen und bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) bis zum Ansetzen des Versuchs kultiviert.

### **5.2.1.3 Isolation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Für einige Versuche war eine reine CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation erforderlich. Hierzu wurden aus den bereits gewonnenen CD3<sup>+</sup> T-Zellen mittels *EasySep™ Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. mittels *EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Die Isolation der Zellen erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben nach dem gleichen Prinzip wie die CD3<sup>+</sup> Isolation (siehe 5.2.1.2 Isolation der CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Eine Reinheitskontrolle erfolgte jeweils mittels CD8 bzw. CD4 FACS Antikörper. Anschließend wurden die gewonnen T-Zellen gezählt und in huRPMI (2 x 10<sup>6</sup> Zellen/1 ml) aufgenommen und bei 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) bis zum Ansetzen des Versuchs kultiviert.

### **5.2.1.4 Isolation der Granulozyten**

Die Isolation der PMN erfolgte aus der nach der Ficoll® Zentrifugation verbliebenen Blutschicht, welche Erythrozyten und PMN enthält. Das restliche Ficoll® und Serum wurden verworfen und zu der verbleibenden ca. 10-15 ml Erythrozyten/PMN Suspension wurden 10 ml PBS/EDTA gegeben und anschließend 1:1 mit 3 %iger Dextran/PBS- Lösung verdünnt. Der Inhalt des Tubes wurde durch mehrfaches Invertieren gut durchmischt und für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es erfolgte eine Sedimentation der Erythrozyten und die im Überstand verblieben Granulozyten wurden abpipettiert und abzentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mittels Pipette abgenommen. Anschließend erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels 4 °C kaltem Erythrozytenlysepuffer für 5 min, diese wurde falls nötig wiederholt. Die PMN wurden anschließend dreimal mit PBS/EDTA gewaschen, gezählt und in gewünschter Zellzahl in 150 µM Arg RPMI (+Arg-RPMI-Medium) ± 1mM nor-NOHA aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Eine Reinheitskontrolle der PMN-Population erfolgte mittels CD66b FACS Antikörper.

## **5.2.2 Zellbiologische Methodik**

### **5.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Die Zellsuspensionen wurden im gewünschten Verhältnis je nach Zelldichte 1:1 oder 2:1 mit PBS verdünnt und 1:1 mit 0,1 % Trypanblaulösung vermischt. Tote Zellen wurden so unter dem Mikroskop sichtbar, diese färbten sich auf Grund ihrer durchlässigen Zellwand blau, während lebende Zellen durchsichtig blieben.

Erfolgte bei der Isolation der PBMC keine Erythrozytenlyse wurden die PBMCs mit 4 %iger Essigsäure 1:1 verdünnt, wodurch Erythrozyten, nicht aber Lymphozyten platzten und somit die Zellzählung nicht verfälschten. Es wurde ein Deckgläschen angefeuchtet und auf die Glasplatte der Neubauer Zählkammer geschoben. Zwischen Deckgläschen und Kammerglas entstand somit ein Raum von 0,1 mm Dicke, in welchen die mit Trypanblau vermischte Zellsuspension pipettiert wurde. Unter 40 x Vergrößerung erfolgte das Auszählen von 2 gegenüberliegenden 4x4 Quadraten. Die ausgezählte Zellmenge wurde, mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor und der Zählkammerkonstanten ( $10^4$ ) multipliziert, um somit die Zellanzahl pro Milliliter zu erhalten.

### **5.2.2.2 Kultivierung von T-Zellen**

Nach der Isolation der T-Zellen aus Vollblut wurden die T-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in huRPMI für drei Tage kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die T-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen in PMN-ÜS oder Medium aktiviert und inkubiert.

### 5.2.2.3 Generieren von PMN-Überständen

Die PMN-Vorinkubation war abhängig von der T-Zellkultivierung und wurde im entsprechenden Verhältnis individuell berechnet. Für Proliferationsversuche in 96-well Platten, wie sie auch in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurden, wurde, wenn nicht anders definiert,  $0,25 \times 10^6$  T-Zellen/ ml berechnet. Die Wells einer 96-well Platte fassen das Volumen von 200  $\mu$ l, was somit einer T-Zellanzahl von 50.000 T-Zellen pro Well entspricht. Hieraus folgte abhängig vom definierten PMN:T-Zell-Verhältnis in den verschiedenen Bedingungen folgende Vorinkubation der PMN in 150  $\mu$ M +Arg-RPMI-Medium:

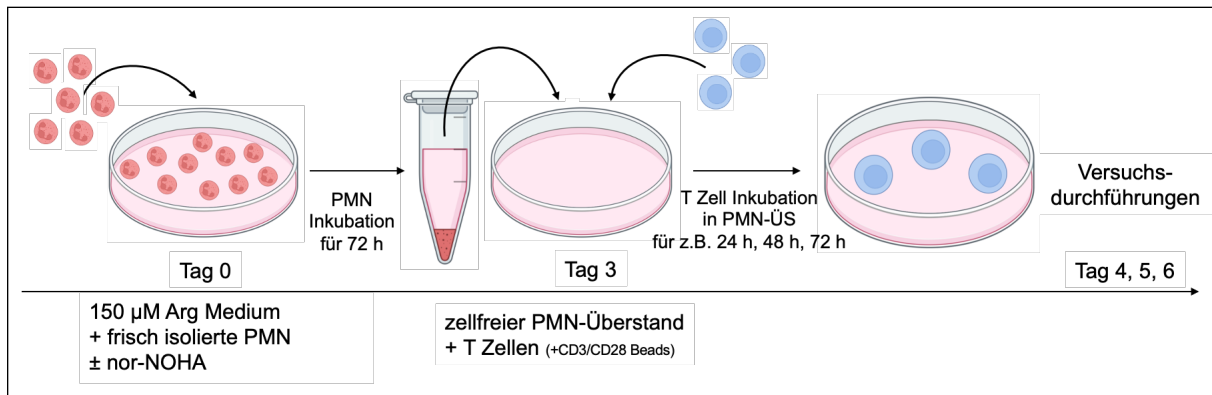
- 1:1:  $0,25 \times 10^6$  PMN/1 mL  $\pm$  1mM nor-NOHA
- 5:1:  $1,25 \times 10^6$  PMN/1 mL  $\pm$  1mM nor-NOHA
- 10:1:  $2,50 \times 10^6$  PMN/1 mL  $\pm$  1mM nor-NOHA
- 20:1:  $5,00 \times 10^6$  PMN/1 mL  $\pm$  1mM nor-NOHA

Die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zudem wurde immer auch eine Kontrollprobe mit 150  $\mu$ M +Arg-RPMI-Medium + 1 mM nor-NOHA für 72 h mitinkubiert. Für Versuche, in welchen die Inkubation der T-Zellen in einer 24-well Platte erforderlich war, da z.B eine größere Anzahl an T-Zellen benötigt wurde, erfolgte die T-Zellinkubation in einer 24-Well Platte. Ein Well einer 24-well Platte fasst das Volumen von 2 ml. Es wurde mit einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  T-Zellen/ ml gearbeitet, was einer Gesamtanzahl von  $1 \times 10^6$  T-Zellen pro Well entspricht. Die PMN-Vorinkubation war demnach in der 10:1 Bedingung mit  $5 \times 10^6$  PMN/ 1 ml  $\pm$  1 mM nor-NOHA.

### 5.2.2.4 Allgemeiner Versuchsaufbau

Nach der Zellisolation der T-Zellen und PMN aus Vollblut (siehe 5.2.1 *Zellisolation aus Vollblut*) wurden die T-Zellen für 72 h in huRPMI kultiviert und die PMN-Vorinkubation in unterschiedlichen PMN zu T-Zellverhältnissen erfolgte in diesem Zeitraum in +Arg-RPMI-Medium (5.2.2.2 *Kultivierung T-Zellen* und 5.2.2.3 *Generierung von PMN-Überständen*)  $\pm$  nor-NOHA. Nach 72 h wurden die PMN-Zellsuspension bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen. Die T-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Aufnahme der T-Zellen erfolgte in 0  $\mu$ M Arg RPMI (-Arg-RPMI-Medium). Für Versuche in 96-well Platten wurde für jedes benötigte Well je 50.000 T-Zellen in je 10  $\mu$ l aufgenommen und für Versuche in 24-well Platten wurde pro benötigtes Well je  $1 \times 10^6$  T-Zellen in je 50  $\mu$ l aufgenommen. Zuerst wurden die T-Zellen (10 oder 50  $\mu$ l) in die Wells vorgelegt, welche unstimuliert blieben. Anschließend wurden die T-Zellsuspensionen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5  $\mu$ l Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) versetzt und die entsprechende Menge der T-Zell-Dynabeads-Suspensionen (11 oder 55  $\mu$ l) in die weiteren Wells pipettiert.

Anschließend wurden die T-Zellen entweder in den PMN-ÜS  $\pm$  1mM nor-NOHA, +Arg-RPMI-Medium  $\pm$  1 mM nor-NOHA oder -Arg-RPMI-Medium versetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubation der T-Zellen für die je nach Versuchsaufbau definierte Zeit (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Allgemeiner Versuchsaufbau.** An Tag 0 erfolgt die Isolation von PMN und T-Zellen aus Vollblut wie beschrieben. Die T-Zellen werden in huRPMI-Medium aufgenommen und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die PMN werden im gewünschten Verhältnis in RPMI-Medium aufgenommen, mit und ohne Zugabe von 1 mM nor-NOHA und ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 72 h (Tag 3) werden die T-Zellen in den verschiedenen Medienbedingungen (z.B. RPMI, RPMI + nor-NOHA, -Arg-Medium) sowie im zellfreien PMN-ÜS ( $\pm$  nor-NOHA) aufgenommen und mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads versetzt. Je nach Fragestellung werden in verschiedenen Zeiträumen nach der Aktivierung unterschiedliche Versuche durchgeführt.

### 5.2.2.5 Kokultur von PMN und T-Zellen

Es wurde untersucht, ob radikale Sauerstoffspezies, die durch PMN produziert und ausgeschüttet werden, in der direkten Kokultur Einfluss auf die T-Zellproliferation haben.

Um dies zu untersuchen, wurde sowohl eine direkte Kokultur von PMN und T-Zellen ohne und eine direkte Kokultur mit N-Acetylcystein (NAC), einem Radikalfänger, angesetzt. In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nor-NOHA, frisch und direkt zu den T-Zellen gegeben, einen eher proliferations-supprimierenden Effekt auf die T-Zellen hat. Bei den Versuchen mit PMN-ÜS geht dem Kontakt von T-Zellen mit nor-NOHA eine 72-stündige Inkubation des nor-NOHAs bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> voran, in welcher die PMN-ÜS generiert werden. Erst dann werden die T-Zellen in diesen aktiviert. Um den zytotoxischen Effekt von nor-NOHA auf T-Zellen vergleichbar zu machen, wurde für die Kokulturversuche +Arg-RPMI-Medium mit 1 mM nor-NOHA für 72 h im Inkubator vor inkubiert.

T-Zellen und PMN wurden anschließend aus frischem Vollblut isoliert. In einer 96-Well Platte wurden  $0,05 \times 10^6$  T-Zellen pro Well ausgesät und mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5  $\mu$ l Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert. Die jeweiligen PMN-Verhältnisse wurden berechnet und die PMN wurden im vorinkubierten +Arg-RPMI-Medium  $\pm$  nor-NOHA zu den T-Zellen in die Wells gegeben. Zusätzlich wurden in parallelen Kontrollansätzen zu den verschiedenen Bedingungen jeweils 50  $\mu$ M N-Acetylcystein gegeben.

Es erfolgte eine Inkubation für 48 h. Anschließend wurde die Zellproliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assays gemessen (siehe 5.2.3.2 *Nachweis der Zellproliferation mittels DNA inkorporiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin*).

#### 5.2.2.6 Transwellkultur von PMN und T-Zellen

Um einen direkten Zell-Zellkontakt von T-Zellen und PMN, wie sie in der direkten Kokultur gegeben ist, zu unterbinden, können T-Zellen und PMN in einem Transwell-Kultivierungssystem angesetzt werden. Um den zytotoxischen Effekt von nor-NOHA, der in bisherigen Versuchen beobachtet werden konnte (261) auf T-Zellen abzumildern, wurde für die Transwellversuche +Arg-RPMI-Medium mit 1 mM nor-NOHA für drei Tage im Inkubator vorinkubiert. T-Zellen und PMN wurden aus frischem Vollblut isoliert. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $0,25 \times 10^6$  T-Zellen/ 800 µl in +Arg-RPMI-Medium mit und ohne 1 mM nor-NOHA in 24-well Platten vorgelegt und mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) versetzt. Anschließend wurden die Transwell-Zellkultureinsätze platziert und vorsichtig je 200 µl PMN-Suspension in den berechneten PMN zu T-Zellverhältnissen (1:1, 5:1, 10:1, 20:1) hinein pipettiert. Somit war in einem finalen Volumen von 1 ml eine T-Zellkonzentration von  $0,25 \times 10^6$  T-Zellen/ml gegeben.

Nach 48 h Inkubation im Transwellsystem wurden die Zellkultureinsätze mit den PMN aus den wells entfernt, die T-Zellen in den wells durch mehrmaliges Pipettieren durchmischt und 200 µl der Suspension in 96-well Platten überführt. Anschließend wurde die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation gemessen (siehe 5.2.3.2 *Nachweis der Zellproliferation mittels DNA inkorporiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin*).

#### 5.2.2.7 Einfrieren von PMN-Überständen

Um die Kältestabilität der hyperaktivierenden Faktoren im PMN-ÜS zu untersuchen, wurden aus frisch isolierten Granulozyten Überstände im PMN:T-Zellverhältnis von 20:1 für 72 h vorinkubiert. Nach 72 h Vorinkubation wurden die Überstände aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Zu diesem Zeitpunkt wurden T-Zellen in den zellfreien Überständen und zum Vergleich in +Arg-RPMI-Medium aktiviert und deren Proliferation nach 48 h mittels [<sup>3</sup>H]Thymidininkorporation untersucht. Somit wurde ermittelt, wie stark die Hyperaktivierung durch die PMN-ÜS auf die T-Zellen vor dem Einfrieren war. Alle zwei Wochen wurde ein PMN-ÜS Aliquot aufgetaut und drei Tage in huRPMI-Medium vorkultivierte T-Zellen wurden darin mit anti-CD3/anti-CD28-Beads versetzt. Die Proliferation wurde im Vergleich zu konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen nach 48 h mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation untersucht (siehe 5.2.3.2 *Nachweis der Zellproliferation mittels DNA inkorporiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin*).

Die Proliferation in +Arg-RPMI-Medium zu jedem Zeitpunkt wurde auf 100 % gesetzt und die Proliferation im PMN-ÜS hierzu ins Verhältnis gesetzt.

### 5.2.2.8 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurde die gewünschte Zellzahl ( $2-7 \times 10^6$  Zellen) in 1 ml FCS + 10 % DMSO aufgenommen und in ein 1,5 ml Kryokonservierungsröhrchen gegeben. Zum Einfrieren wurden die Kryokonservierungsröhrchen in einen Mr. Frosty™ Gefrierbehälter in den  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  Gefrierschrank gestellt. Nach dem Einfrieren im  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  Gefrierschrank konnten die Zellen dann in einen Stickstofftank bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  überführt werden.

### 5.2.2.9 Kultivierung von K562-A2 (CD80<sup>+</sup>)

K562-A2 Zellen wurden aufgetaut und in 10 ml FCS-RPMI mit Zugabe von 200 µg/ml Neomycin (Konzentration 50 mg/ml) aufgenommen. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 gesplittet und weiterhin unter Neomycin Selektion kultiviert.

### 5.2.2.10 Retrovirale Transduktion von T-Zellen mit dem Einzelketten-TCR spezifisch für p53<sub>264-272</sub>

#### 5.2.2.10.1 Transfektion von Phoenix Ampho Zellen

$5 \times 10^6$  eingefrorene Phoenix Ampho Zellen wurden im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und auf vier Zellkulturflaschen mit je 15 ml DMEM-Medium verteilt. Es erfolgte eine Kultivierung ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) für drei Tage, in denen die Zellen adhärent an den Flaschenboden anwachsen. Anschließend wurden  $1,2 \times 10^6$  Phoenix Ampho Zellen in 6 ml DMEM-Medium in einer sterilen Petrischale mit 10 cm Durchmesser kultiviert. Am folgenden Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums auf ein höheres Volumen von 8 ml DMEM-Medium. 4 h nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen transfiziert. Hierzu wurden in 800 µl DMEM-Medium (ohne Zusätze) 35 µl FuGENE® 6 pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurden 10 µg Plasmid des TCR Vectors pBullet\_p53TCR\_neo und je 5 µl der Helferplasmide pHit60 und pColt-Galv hinzugefügt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min. Anschließend wurde der Plasmid-Mix vorsichtig auf die Phoenix Zellen pipettiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel auf 8 ml huRPMI. Einen Tag nach diesem Mediumwechsel konnte der Virusüberstand für die Transduktion verwendet werden.

#### 5.2.2.10.2 Transduktion von PBMCs

Zwei Tage vor der Transduktion wurden PBMC entweder frisch isoliert oder eingefrorene PBMC aufgetaut. Es erfolgte eine Kultivierung von  $2 \times 10^6$  PBMC/well in 1 ml huRPMI. Die PBMCs wurden mit 30 ng/ml OKT-3 und 600 U/ml IL-2 stimuliert.

Am Tag der Transduktion wurde der Virusüberstand geerntet und zentrifugiert (872 g, 10 min,  $32\text{ }^\circ\text{C}$ ). Die PBMCs wurden ebenfalls geerntet und abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT). Anschließend wurden die PBMCs in Virusüberstand in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und 5 µg/ml Polybrene hinzugegeben. Es wurden je 0,5 ml der PBMC

Zellsuspension pro *well* in eine 24-*well* Platte ausgesät und zentrifugiert (872g, 90 min ohne Bremse, 32°C). Anschließend wurden die Zellen über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Am nächsten Tag erfolgte die erste Stimulation. Hierzu wurden die PBMCs in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in huRPMI aufgenommen und mit 600 U/ml IL-2 und 5 µl anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads pro  $1 \times 10^6$  PBMC stimuliert. Zur Selektion der transduzierten Zellen wurde 200 µg/ml Neomycin (Stock-Konzentration 50 mg/ml). Pro *well* einer 24-*well* Platte wurden 2 ml Zellsuspension ausgesät.

#### **5.2.2.10.3 Restimulation transduzierter T-Zellen**

Die transduzierten T-Zellen wurden anschließend wöchentlich einmal restimuliert. Die Restimulation erfolgte peptidspezifisch. Hierzu wurden  $0,3 \times 10^6$  K562-A2 CD80<sup>+</sup> Zellen pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen verwendet. Die gewünschte Anzahl an K562-A2 Zellen wurde zentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und der Überstand dekantiert. Für die Beladung der K562 wurde 1 µl p53<sub>264-272</sub>Peptid (c = 10 mg/ml) auf das Zellpellet gegeben und es erfolgte eine zweistündige Inkubation im Wasserbad im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die K562-A2 Zellen in 10 ml FCS-RPMI aufgenommen und im Zellbestrahler (Gammacell 2000, Molsgard) bei 10.000 rad bestrahlt. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die K562-A2 Zellen pelletiert und in gewünschter Zellzahl in der Konzentration  $0,3 \times 10^6$ /ml in dem gewünschten Medium oder PMN-ÜS aufgenommen und 1 ml pro *well* ausgesät. Die T-Zellen wurden geerntet und in der Konzentration  $1 \times 10^6$ /ml in dem gewünschten Medium oder PMN-ÜS resuspendiert und je 1 ml zu den bereits vorgelegten K562 pipettiert. Zusätzlich wurde 600 U/ml IL-2 zugegeben. Somit ergab sich eine T-Zellkonzentration von  $0,5 \times 10^6$ /ml.

### **5.2.3 Biochemische Methodik**

#### **5.2.3.1 Durchflusszytometrie**

Mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) können oberflächliche sowie intrazelluläre Zellbestandteile mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper oder Farbstoffe nachgewiesen werden.

Hierzu wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen der gewünschten Kultivierungsbedingung oder Reinheitskontrollen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml PBS gewaschen (503 g, 3 min, RT). Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit dekantiert und in den im Röhrchen verbliebenen ca. 50 µl Zellsuspension wurden die gewünschten FACS-Antikörper für 15 min im Dunkeln inkubiert. In der Regel wurde 1 µl eines Antikörpers verwendet. Bei nicht ausreichender Trennung einer deutlich positiven und negativen Population in der nachfolgenden durchflusszytometrischen Analyse wurde die Konzentration des Antikörpers in den Folgeversuchen ggf. erhöht.

Es wurde immer eine zusätzliche Probe jeder Bedingung mit dem jeweiligen Isotypen des verwendeten Antikörpers gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen (503 g, 3 min, RT) und in 200 µl 1 % PFA aufgenommen.

Bei Mehrfachfärbungen war darauf zu achten, dass sich die Absorptionsspektren der verwendeten Fluorochrome nicht relevant überlappen. Bei teilweiser Überschneidung erfolgte eine anschließende Kompensation in der Auswertung.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Ausgewertet wurden alle FACS-Messungen mit FlowJo Version 9.0.

### **5.2.3.2 Nachweis der Zellproliferation mittels DNA inkorporiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin**

Das Prinzip des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assays beruht auf dem Einbau des mit [<sup>3</sup>H] markierten Thymidins in die DNA der proliferierenden Zelle.

Je nach Versuchsaufbau wurde eine bestimmte Anzahl T-Zellen (zwischen 0,05-0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen) in 200 µl Medium bzw. PMN-ÜS in einer 96-well Rundbodenplatte mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro 1 x 10<sup>6</sup> T-Zellen) aktiviert und inkubiert. Hierzu wurden für alle unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen jeweils Triplets angesetzt. Nach gewünschter Inkubationszeit (in der Regel 48 h) wurde pro well 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben. Die Vorverdünnung des [<sup>3</sup>H]-Thymidin erfolgte in -Arg-RPMI-Medium. Anschließend erfolgt eine 16 - 18-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellkulturplatten wurden anschließend bei -20 °C vollständig eingefroren. Anschließend wurden die Platten wieder aufgetaut. Nun wurden die dadurch lysierten Zellsuspensionen aus den Zellplatten mittels Harvester 96 (Mach 3, Tomtec) auf eine Filtermatte übertragen. Diese Filtermatte wurde in eine Folie gegeben, mit 4 ml Rotiszint® Lösung vollständig benetzt und eingeschweißt. In einem Zellcounter (Counter (145 LSC & Lumineszenz), Perkin Elmer) wurden die einzelnen wells der Filterplatten ausgezählt. Aus den Triplets der jeweiligen Kultivierungsbedingungen wurde jeweils der Mittelwert incl. Standardabweichung berechnet.

### **5.2.3.3 Mikroskopische Darstellung der T-Zellmorphologie**

#### **5.2.3.3.1 Lichtmikroskopie**

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in (wie in 5.2.2.2 *Kultivierung von T-Zellen* und 5.2.2.3 *Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro 1 x 10<sup>6</sup> T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*).

Es wurden 0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Bedingung ausgesät.

#### **5.2.3.3.1.1 Erstellen von Cytospin Präparaten**

Nach 48 h Inkubation wurden die T-Zellen geerntet. Die Beads wurden mittels eines Magneten entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden alle Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und in die nach Herstellerangaben zusammengebaute Cytospin-Apparaturen pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (300 g, 5 min, RT). In dieser wurden die Zellen auf einen Objektträger übertragen.

#### **5.2.3.3.1.2 Färbung der Präparate und Mikroskopie**

Die Objektträger wurden im Zytologischen Labor der III. Medizinischen Klinik nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) gefärbt.

Die Objektträger wurden hierzu 4 min in unverdünnte May-Grünwald-Lösung gegeben und anschließend zweimal in destilliertes Wasser transferiert. Daraufhin folgte eine 20-minütige Inkubation in verdünnter Giemsa-Lösung mit ebenfalls einem zweimaligen kurzen Transfer in destilliertes Wasser. Danach wurden die Objektträger an der Luft getrocknet. In den Präparaten färben sich die Zellkerne rotviolett, während das Zytoplasma blauviolett erscheint. Anschließend wurden die Präparate in 100 x Vergrößerung mikroskopiert.

#### **5.2.3.3.2 Elektronenmikroskopie**

Die Darstellung der T-Zellen mittels Elektronenmikroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Porubsky, Pathologisches Institut der Universitätsmedizin Mainz.

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*). Nach 48 h Inkubation wurden die T-Zellen geerntet, die Dynabeads mittels Magnet entfernt und die Zellen in ihrem jeweiligen Medium ohne Beads belassen. Anschließend wurden sie auf Eis gelagert der Pathologie übergeben. Hier erfolgte eine weitere Aufbereitung für die elektronenmikroskopische Färbung nach dem institutsinternen Protokoll zur Aufbereitung für elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen. Die Zellen wurden nach mehreren Waschschritten pelletiert und in 2,5 % Glutaraldehyd für 3 h und anschließend in 1% Osmiumtetroxid für 2 h fixiert. Dann wurden die Zellen in Epon Resin eingebettet. Die Zellblöcke wurden in 80 nm dünne Scheiben geschnitten und die Bilder mit dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400 aufgenommen.

#### **5.2.3.4 Zytotoxizität**

Dieser Assay erforderte die Verwendung von mit dem Einzelketten T-Zellrezeptor spezifisch gegen p53<sub>264-272</sub> transduzierten T-Zellen (siehe 5.2.2.10 *Retrovirale Transduktion von T-Zellen mit dem für p53<sub>264-272</sub> spezifischen Einzelketten T-Zellrezeptor*). Die transduzierten T-Zellen

wurden über einen längeren Zeitraum wöchentlich peptidspezifisch restimuliert (siehe 5.2.2.10.3 *Restimulation transduzierter T-Zellen*). Als Tumor-Target-Zellen dienten Luciferase exprimierende K562-A2-Zellen (CD80<sup>+</sup>), die 4h vor Beginn des Assay mit 1 µl p53<sub>264-272</sub> (c = 10 µg/µl) beladen wurden.

Die T-Zellen der verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurden am 3. Tag nach Restimulation geerntet, gezählt und im gewünschten Effektor-zu-Zielzell Verhältnis (1:1 (1 x 10<sup>4</sup> T-Zellen), 5:1 (5 x 10<sup>4</sup> T-Zellen) oder 10:1 (10 x 10<sup>4</sup> T-Zellen)) in je 50 µl in Triplets in einer schwarzen 96-well Platte ausgesät. T-Zellen, die zuvor in +Arg-RPMI-Medium kultiviert worden waren, wurden in 50 µl +Arg-RPMI-Medium ausgesät, während T-Zellen, die zuvor in PMN-ÜS inkubiert wurden, auch in diesem PMS-ÜS wieder ausgesät wurden. Zudem wurde 18 µl Luciferin (Stock: 16,67 mg/ml) pro ml zugegeben. Anschließend wurden die Ziel-Zellen, d.h. die mit Peptid beladenen K562-Zellen in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS so verdünnt, dass sich pro 50 µl Zellsuspension insgesamt 1 x 10<sup>4</sup> Zellen befanden. Pro well der jeweiligen Kultivierungsbedingung wurden 50 µl der Zellsuspension pipettiert. Zudem wurden die K562-Target-Zellen in +Arg-RPMI-Medium und in PMN-ÜS je als Triplett ohne T-Zellen angesetzt und Luziferin - wie oben beschrieben - zugegeben. Dieses Triplett diente jeweils als Hintergrund-Messwert. Die Platte wurde 1 min bei 106 g zentrifugiert und anschließend inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die Messung der Platte erfolgte nach 3, 6 und 24 h am Fluoreszenz-Plattenreader (FLUOstar, Omega).

Durch die Luziferase der K562-Target-Zellen wird Luziferin zu Oxyluziferin abgebaut. Bei dieser Reaktion entsteht Licht, welches mittels Fluoreszenz-Plattenreader detektiert werden kann. Durch peptidspezifisches Abtöten der K562-Tumor-Zellen durch T-Zellen reduziert sich die zellgebundene Luziferaseaktivität umso mehr, je stärker die zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen die K562 ist. Dementsprechend reduziert sich die gemessene Fluoreszenz. Die Fluoreszenz der Kontrollwells mit viablen K562 Tumorzellen ohne T-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Je stärker die Zytotoxizität der T-Zellen, desto weniger viable K562 waren in den wells vorhanden, desto schwächer war demnach die gemessene Fluoreszenz der Luciferase-Reaktion.

### 5.2.3.5 Degranulation

CD107a ist ein Antigen, welches sich auf der Innenseite der Granulamembran befindet. Kommt es zur Degranulation wird CD107a auf der Zelloberfläche sichtbar, da die Membran der Granula mit der Membran der Zelle fusioniert. Somit kann die CD107a Expression als Maß für die Degranulation von zytotoxischen T-Zellen herangezogen werden. CD107a ist nur transient an der Zelloberfläche exprimiert und wird von der Zelle auch wieder internalisiert. Monensin führt zu einer Ausstülpung aller an der Zellmembran gebundenen Vesikel und blockiert gleichzeitig den weiteren Transport vom Golgiapparat an die Zelloberfläche, sodass

die gemessene CD107a Expression, die der aktuell an die Zellmembran mobilisierten Vesikel entspricht.

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgten für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*). Pro Bedingung wurden je  $1 \times 10^6$  T-Zellen in 2 ml Medium oder PMN-ÜS ± nor-NOHA je *well* in einer 24-*well* Platte ausgesät. Für die +Arg-RPMI-Bedingung wurden zwei Wells angesetzt. Nach 48 h wurden in ein *well* der +Arg-RPMI-Medium Bedingung 50 ng/ml *phorbol myristate acetate* (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin gegeben. Dieses *well* diente als Positivkontrolle, da hier die T-Zellen zur maximalen Degranulation angeregt wurden. In jedes *well* wurden dann 5 µl des Antikörpers CD107a (PE-Cy5) gegeben und die Platte für 1 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurde in jedes *well* 2 µl Monensin gegeben (nach Herstellerangaben 1000 x konzentriert und somit 1:1000 verdünnt). Es folgte eine weitere Inkubation für 5 h. Im Anschluss wurden je  $0,2 \times 10^6$  T-Zellen pro Bedingung in 200 µl 1 % PFA aufgenommen und direkt am FACS Canto™ II gemessen.

Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD107a in der Positivkontrolle (also konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen, die mit PMA und Ionomycin zur maximalen Degranulation angeregt wurden) wurde in der Auswertung auf 100 % gesetzt.

### 5.2.3.6 Glukoseaufnahme

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*). Pro Bedingung wurden je  $2 \times 10^6$  T-Zellen in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ausgesät. Nach 48 h wurden die T-Zellen geerntet, die Beads mittels Magnet entfernt, einmal mit PBS gewaschen und gezählt. Pro Bedingung wurden  $0,5 \times 10^6$  T-Zellen in FACS-Röhrchen gegeben und noch einmal parallel  $0,5 \times 10^6$  Zellen je Bedingung als Isotyp-Kontrolle. Die T-Zellen wurden zunächst mit den Oberflächenantikörpern für CD4 (APC) und CD8 (PE-Cy7) bzw. mit dem jeweiligen Isotypen gefärbt (siehe 5.2.3.1 *Durchflusszytometrie*). Nach der Färbung wurden die T-Zellen in je 150 µl glukosefreiem Medium in den FACS-Röhrchen aufgenommen und im Wasserbad im Inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) für 15 min inkubiert.

Anschließend wurde zu den Zellen je 1 µl der 1:10 in glukosefreiem Medium vorverdünnter 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose (2-NBDG) hinzugegeben. 2-

NBDG ist in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Stock: 10 mg/ml). DMSO kann in bestimmten Konzentrationen zytotoxisch wirken. Falls dies in diesem Versuch der Fall sein sollte, wäre dieser Effekt nur in den Bedingungen mit der Zugabe von 2-NBDG zu beobachten, nicht aber in den Kontrollbedingungen. Um diesen Effekt auch in der Isotypenkontrolle zu simulieren, wurde zu den Isotypen je 1 µl einer 1:100 vorverdünnten DMSO-Lösung gegeben.

Nach 30 min wurde die T-Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 1 % PFA-Lösung aufgenommen und am FACS-Gerät direkt gemessen. 2-NBDG ist im FITC-A Kanal des BD FACS Canto™ II sichtbar (siehe 5.2.3.1 *Durchflusszytometrie*).

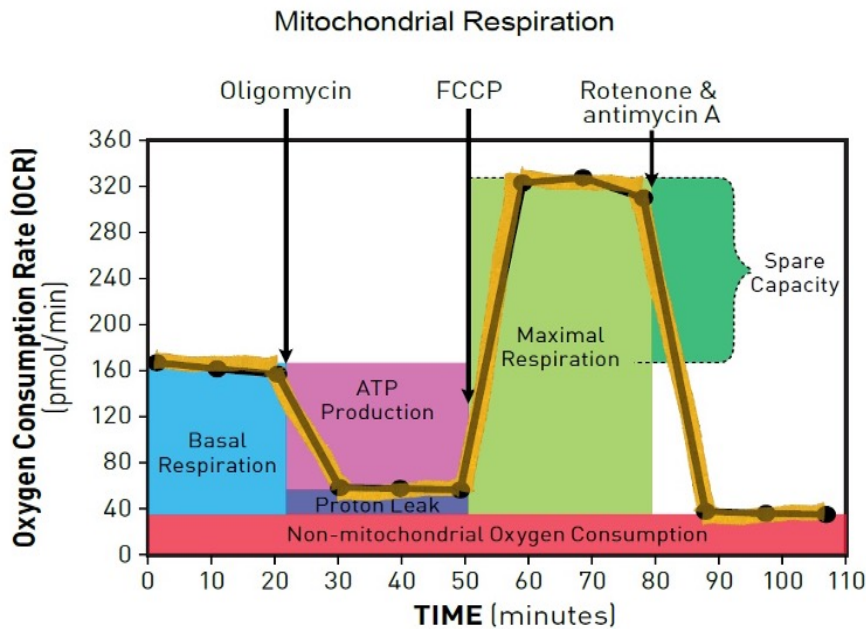
### **5.2.3.7 Messung des Energiemetabolismus mittels Agilent Seahorse**

#### **5.2.3.7.1 Mito Stress Test**

Mit Hilfe des Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, Agilent) kann der Energie-Metabolismus von Zellen untersucht werden. Hierbei liegen der Fokus auf Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) als zwei metabolische ATP-generierende Hauptmechanismen einer Zelle. Es wird gleichzeitig über einen bestimmten Zeitraum die extrazelluläre Ansäuerungsrate (extracellular acidification rate = ECAR) und der mitochondriale Sauerstoffverbrauch (mitochondrial oxygen consumption rate = OCR) unter bestimmten Stressbedingungen gemessen. Der ECAR korrespondiert zur glykolytischen Aktivität der Zellen, während der OCR der OXPHOS zuzuordnen ist.

Der Mito Stress Test arbeitet mit drei verschiedenen Stresskomponenten (Oligomycin, FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon) und Antimycin A/Rotenon), die nacheinander mit zeitlichem Abstand zu den Zellen gegeben werden, um in Veränderung des OCRs und ECARs abzulesen, wie die Zellen auf die Stressoren reagieren (für einen exemplarischen Verlauf einer OCR-Kurve siehe Abbildung 8).

## Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile



**Abbildung 8: Mito Stress Test Schema** Schematische Darstellung sowie Kennzeichnung der gemessenen Parameter einer OCR-Kurve im Rahmen eines Versuchsdurchlaufs bei einem Mito Stress Test. Quelle: <https://www.agilent.com/en/support/cell-analysis/mitochondrial-respiration-xf-cell-mito-stress-test>

Zu Beginn werden die basalen Werte für OCR und ECAR ermittelt. Die einzelnen Stressoren interagieren alle mit unterschiedlichen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette und blockieren diese somit auf unterschiedlichen Ebenen.

Zuerst erfolgt die Zugabe von Oligomycin. Oligomycin ist ein Hemmstoff der ATP-Synthase, dem letzten Komplex der mitochondrialen Atmungskette. Wird dieser blockiert, kommt es zu einem Abfall der OCR, und zwar genau um den Wert, welcher Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch zur ATP-Gewinnung liefert. Daraufhin wird FCCP zugegeben. FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette, welcher für einen unkontrollierten Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran sorgt und somit das mitochondriale Membranpotential abbaut. Durch Zugabe von FCCP werden die Zellen zum maximalen Sauerstoffverbrauch gezwungen, um das zerstörte Membranpotential wieder aufzubauen. Zwar kann kein ATP mehr gebildet werden, aber die OCR steigt an und erreicht ihr Maximum. Die maximal gemessene OCR gibt die maximal mögliche Respiration wieder, während die Differenz zwischen basaler OCR und FCCP-induzierter OCR die respiratorische Reservekapazität wiedergibt. Durch die finale Zugabe von Rotenon (Hemmung des Komplex I) und Antimycin A (Hemmung des Komplex III) wird die gesamte mitochondriale Atmungskette gehemmt, wodurch der mitochondriale Sauerstoffverbrauch komplett supprimiert wird. Der durch Rotenon und Antimycin geblockte OCR gibt die nicht-mitochondriale Respiration wieder. Die Kupplungs-Effizienz (Coupling Efficiency) gibt den Anteil an der gesamten mitochondrialen Atmung an, der für die ATP-Produktion genutzt wird. Je niedriger das Protonen Leck ist, desto näher ist dieser Wert an 100 %. Das Protonen Leck gibt die verbliebene Basalatmung an, die nicht zur ATP-Produktion verwendet wird (262).

**Tabelle 16: Bedeutung der Seahorse Messwerte**

Messwerte	Berechnung/Zusammensetzung
Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch	Niedrigster OCR-Wert nach Zugabe von Antimycin A und Rotenon
Basale Respiration	OCR vor der ersten Zugabe der Stresskomponenten <i>abzüglich</i> Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch
Maximale Respiration	Höchster OCR-Wert nach FCCP-Injektion <i>abzüglich</i> Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch
H <sup>+</sup> (Protonen) Leck	Niedrigster OCR-Wert vor Oligomycin-Injektion <i>abzüglich</i> Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch
ATP-Produktion	Letzter OCR-Wert vor Oligomycin-Injektion <i>abzüglich</i> Kleinster OCR-Wert nach Oligomycin-Injektion
Respiratorische Reservekapazität (Spare Respiratory Capacity)	Maximale Respiration <i>abzüglich</i> Basale Respiration
Kupplungs-Effizienz (Coupling Efficiency)	$\frac{\text{ATP-Produktion}}{\text{Basale mitochondriale Respiration}} \times 100$

Der XF Cell Mito Stress Test wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Am Tag vor dem Assay wurde das Seahorse XF Sensor Cartridge mit Seahorse XF Calibrant hydriert, sodass die Sensoren in die Kalibrierlösung getaucht werden konnten. Das hydrierte Cartridge wurde über Nacht bei 37 °C in einen CO<sub>2</sub> freien Inkubator inkubiert. Hierzu wurden zusätzlich Bechergläser mit Wasser und feuchte Tücher in den Inkubator gelegt, um ein Austrocknen der Sensoren zu verhindern.

Am Tag des Assays wurden die einzelnen *wells* der Seahorse XF Cell Culture Miniplatte mit Poly-D-Lysin beschichtet, um die löslichen T-Zellen adhärenz zu machen. Poly-D-Lysin als Polykation bindet anionische Bestandteile der Zellmembran und ermöglicht somit eine Adhäsion der T-Zellen auf den Plattengrund. Hierzu wurden 50 µl Poly-D-Lysin (c = 0,1 mg/ml) in die Wells pipettiert. Die Zellplatte wurde mit dem Poly-D-Lysin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und für 1 h mit geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde die Platte mit 80 µl Assay Medium für 1 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub> freien Inkubator vorinkubiert.

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden getrennt untersucht. Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach 5.2.1.3 (*Isolation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen*) aus CD3<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (1x10<sup>6</sup> Zellen in 2 ml Medium oder PMN-ÜS je Well

in einer 24-Well Platte) mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*).

Die T-Zellen wurden 48 h nach Aktivierung geerntet, die anti-CD3/anti-CD28-Dynabeads mittels eines Magneten entfernt und in 1 ml Assay Medium gewaschen (503 g, 5 min, RT). Anschließend wurden pro *well* 135.000 Zellen in 40 µl Assay Medium ausgesät. Pro Bedingung wurden Dubletten angesetzt. Die Platte wurde für 1 min bei 300 g zentrifugiert und anschließend in jedes *well* 140 µl Assay Medium pipettiert, um ein Endvolumen von 180 µl pro Well zu erhalten. Die randständigen *wells* wurden mit 320 µl XFp Calibrant Lösung beladen und die Platte für eine Stunde bei 37°C im CO<sub>2</sub> freien Inkubator inkubiert.

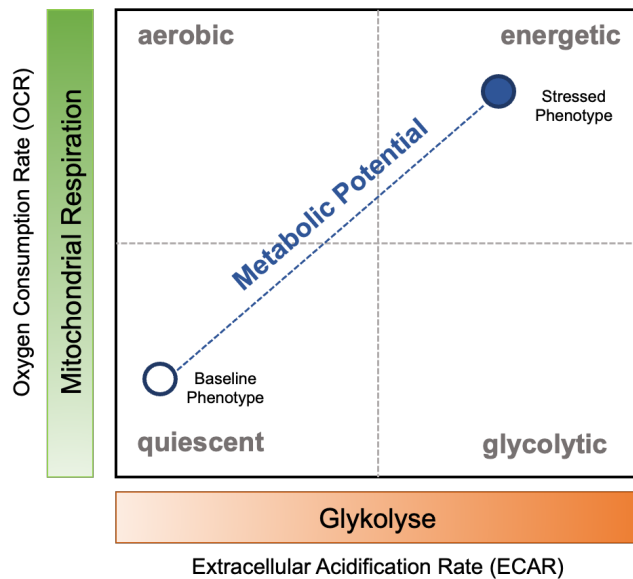
Die Stressreagenzien wurden so vorbereitet, dass sich nach deren Injektion eine Endkonzentration von 2 µM Oligomycin, 1 µM FCCP und 1 µM Antimycin A/Rotenon in den *wells* befand. Die einzelnen Substanzen wurden in jeweils drei verschiedene Ports des Sensor Cartridges pipettiert, damit diese im Verlauf des Assays einzeln in die *wells* injiziert werden konnten.

Der Seahorse XF HS Mini Analyzer (Agilent Technologies) wurde mit dem beladenen Cartridge für den Mito Stress Test kalibriert, anschließend wurde die Zellkulturplatte in das Gerät eingelegt und der Assay analog des Protokolls Seahorse Mito Stress Test gestartet.

Um die gemessenen Werte zu normieren, wurden die Zellen nach Beenden des Assays mit 1 µl einer verdünnten Calceinlösung (1:10 Verdünnung mit Medium, Stockkonzentration: 1 mg/ml) gefärbt. Nach 15-minütiger Dunkelinkubation konnten die Zellen in den einzelnen *wells* im GFP-Filter des EVOS Mikroskops (M5000, Invitrogen) in 40 x Vergrößerung aufgenommen werden. Die Zellen wurden anhand dieser Mikroskopiebilder mit Hilfe der Software ImageJ gezählt und anschließend auf die für OCR und ECAR gemessenen Werte normiert.

#### **5.2.3.7.2 Energie Phänotyp Test**

Während der Mito Stress Test auf einer detaillierten Analyse verschiedener metabolischer Parameter einer Zelle beruht, kann mittels Energie Phänotyp Test gleichzeitig die mitochondriale Zellatmung sowie die glykolytische Aktivität der Zellen unter basalen und gestressten Bedingungen gemessen werden und die Zellen somit in eine von vier bioenergetischen Phänotypen eingeordnet werden: *quiescent* (ruhend), *aerobic* (aerob), *energetic* (energetisch), *glycolytic* (glykolytisch) (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Energiephänotyp** Schematische Darstellung des *Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test*. Anhand der mitochondrialen Zellatmung (gemessen über den Sauerstoffverbrauch, OCR) und der glykolytischen Aktivität (gemessen über die extrazelluläre Ansäuerungsrate, ECAR) lassen sich Zellen in folgende Energiephänotypen einteilen: *quiescent* (ruhend) – geringe Zellatmung, *aerobic* (aerob) - Zellen nutzen überwiegend mitochondriale Zellatmung, *energetic* (energetisch - Zellen nutzen mitochondriale Zellatmung und Glykolyse), *glycolytic* (glykolytisch - Zellen nutzen überwiegend Glykolyse). In Anlehnung an: [https://www.agilent.com/cs/library/training/public/5991-8695EN\\_XF\\_Phenotype\\_Test\\_factsheet.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/training/public/5991-8695EN_XF_Phenotype_Test_factsheet.pdf). Stand 01/2025

Die Versuchsvorbereitungen verliefen analog wie in 5.2.3.7.2 (*Mito Stress Test*) beschrieben. Als Stressreagenzien fungierten hier 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin und 1  $\mu\text{M}$  FCCP, welche im Verlauf des Versuchs nach Protokoll des Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test gleichzeitig in die *wells* zu den T-Zellen injiziert wurden. Die anschließende Auswertung und Normierung erfolgten wie oben beschrieben.

### 5.2.3.8 Kinase Profiler Array

Für die Analyse der T-Zellen mittels Proteom Profiler Array wurde das Human Phospho-Kinase Array Kit (#ARY003B, R&D Systems) verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip des Assays baut auf einem klassischen Sandwich-ELISA auf.

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5  $\mu\text{l}$  Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*). Pro Bedingung wurden  $30 \times 10^6$  T-Zellen in 24-*well* Platten ausgesät. Nach 48 h wurden die T-Zellen geerntet und in 1,5 ml des gemäß des Herstellerprotokolls zur Zelllyse vorgesehenen Lysis Buffer Nr. 6 (Name laut Hersteller) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte auf Eis für 30 min. Die Proben wurden in dieser Zeit alle 5 min gevortext. Nach einer Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration

bestimmt (siehe 5.2.3.9.2 *Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford*). Pro Assay Membran wurde 100 µg Protein eingesetzt. Die Array-Membranen wurden in Array Buffer 1 für eine Stunde geblockt. Anschließend wurden die Proteinproben mit Array Buffer 1 auf 2 ml aufgefüllt und je 1 ml zu Membran A und B gegeben. Die Membranen inkubierten bei 4 °C über Nacht auf einer Schüttelplatte.

Am Folgetag wurden die korrespondierenden Membranen A und B einer Bedingung gemeinsam dreimal in 20 ml 1 x Wash Buffer für 10 min gewaschen. Die lyophilisierten biotinylierten Detection-Antibody-Cocktails A und B wurden mit 20 µl destilliertem Wasser rekonstituiert und in je 2 ml 1 x Array Buffer 2/3 gelöst. Die Membranen wurden einzeln in eine 8-well-Multiplatte gelegt und je 1 ml der jeweiligen Antikörperlösung zu den Membranen A oder B gegeben. Die Membranen wurden 2 h bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurden alle Membranen in separaten Waschboxen mit 1 x Wash Buffer für 10 min dreimal gewaschen. Streptavidin-HRP wurde 1:200 in Array Buffer 2/3 gelöst und je 1 ml zu den Membranen in der 8-well-Multiplatte gegeben. Streptavidin ist ein Molekül, das an das Biotin der biotinylierten gebundenen Antikörper bindet. Die daran gebundene HRP (HRP = horseradish peroxidase) katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion mit Luminol, durch die Licht emittiert wird. Die Membranen inkubierten mit Streptavidin-HRP 30 min auf der Schüttelplatte und wurden anschließend dreimal für 10 min mit 1 x Wash Buffer gewaschen. Die Membranen wurden anschließend mit je 1 ml ECL-Lösung (ECL = enhanced chemiluminescence) vollständig benetzt, für 1 Minute im Dunkeln inkubiert und anschließend die Chemilumineszenz mit einem *Imaging*-System (iBright™) in verschiedenen Zeiträumen gemessen. Für die anschließende Auswertung wurden die Zeiträume gewählt, welche in den Kontrollpunkten keine Überbelichtung zeigten.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Intensität der einzelnen Spots mittels ImageJ bestimmt und mit den Kontrollspots der jeweiligen Membran verrechnet.

### **5.2.3.9 Western Blot**

Zum semiquantitativen Nachweis der von Zellen exprimierten Proteine wurde die Methode des Western Blots gewählt.

#### **5.2.3.9.1 Proteingewinnung aus Zelllysaten**

T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die T-Zellkultivierung und die PMN-Vorinkubation erfolgte für 72 h wie in 5.2.2.2 (*Kultivierung von T-Zellen*) und 5.2.2.3 (*Generieren von PMN-Überständen*) beschrieben. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (5 µl Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*). Zellpellets von je  $5-6 \times 10^6$  Zellen pro Kultivierungsbedingung wurden nach 48 h Inkubationszeit geerntet, 2 x mit PBS gewaschen und mit 50 µl Protein-Lysepuffer versetzt

und für mindestens 12 h bei -20 °C eingefroren. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt vor der Aktivierung 5-6 x 10<sup>6</sup> T-Zellen in Lysepuffer eingefroren. Diese Probe (t<sub>0</sub>) dient der Bestimmung der Protein-Expression zum Zeitpunkt vor der Aktivierung und Inkubation in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Anschließend erfolgte das Auftauen der Zelllysate auf Eis für 30 min. Die Proben wurden in dieser Zeit alle 5-10 min gevortext und danach bei 13.000 rpm für 10 min bei -4 °C zentrifugiert. Der nun entstandene proteinreiche Überstand wurde abgenommen.

#### **5.2.3.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Es wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau eingesetzt, dessen Absorptionsmaximum sich durch die Bildung von Proteinkomplexen in höhere Wellenlängen verschiebt.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerprotokoll (DC™ Protein Assay Reagents Package, Bio-Rad). Hierzu wurden in einer ELISA-Platte 25 µl von Substanz S und A (verdünnt 1:50) vorgelegt und in Dubletten je 5 µl Proteinüberstand zugegeben. Ebenso wurde eine Verdünnungsreihe einer bekannten Proteinkonzentration (4000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,6 µg/ml und 0 µg/ml) mit Lysepuffer erstellt und in Triplets ebenfalls in 25 µl von Substanz S und A wie der Proteinüberstand angesetzt. Anschließend wurde in jedes *well* vorsichtig 200 µl Substanz B mittels einer Multipipette pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion bei 690 nm gemessen (Platereader, MRXc, DYNEX Technologies). Anhand der Extinktionswerte der Verdünnungsreihe, die als Regressionsgerade aufgetragen wurde, kann die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Es wurde jeweils ein Blankwert (reiner Lysepuffer) von allen gemessenen Probenwerten abgezogen.

#### **5.2.3.9.3 Proteinprobenaufbereitung**

Der Proteinüberstand wurde 1:1 mit 2 x SDS-Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Es erfolgte so eine Denaturierung der Proteine. Der Puffer enthält Harnstoff, β-Mercaptoethanol und SDS (SDS = Natrium Dodecylsulfat). Somit wurden innerhalb der Proteinstrukturen Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen gelöst. Das Detergens SDS ist negativ geladen und verleiht durch seine Bindung an die denaturierten Proteine allen Proteinen eine negative Ladung, sodass deren Trennung im Gel dann ladungsunabhängig im Wesentlichen auf der unterschiedlichen molekularen Größe der Proteine beruht.

#### 5.2.3.9.4 SDS-Gel Herstellung und Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Gel Elektrophorese. Die denaturierten und negativ geladenen Proteine trennten sich in einem Polyacrylamidgel, an welchem eine elektrische Spannung angebracht wurde, nach ihrem Molekulargewicht auf. Dabei konnte die Dichte des Gels je nach Polyacrylamidgehalt variiert werden. Für kleinere Proteine (10-30 kDa) eignete sich ein 15 %-iges Gel, während größere Proteine (ab 50 kDa) in einem 12 oder 10 %-igen Gel aufgetrennt wurden.

Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele erfolgte, wie im Folgenden (Tabelle 17) beschrieben.

**Tabelle 17: Zusammensetzung Trenngel für SDS-PAGE**

Trenngel (50 ml)	
10 % Gel	20 ml dH <sub>2</sub> O 13 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 16,5 ml 30 % Acrylamid-bisacrylamid 0,5 ml 10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS) 0,02 ml N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
12 % Gel	17,5 ml dH <sub>2</sub> O 12,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 20 ml 30 % Acrylamid-bisacrylamid 0,5 ml 10 % APS 0,035 ml TEMED
15 % Gel	11,5 ml dH <sub>2</sub> O 13ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 25 ml 30 % Acrylamid-bisacrylamid 0,5 ml 10 % APS 0,02 ml TEMED

**Tabelle 18: Zusammensetzung Sammelgel für SDS-PAGE**

Sammelgel (15 ml)	
Sammelgel	9,15 ml dH <sub>2</sub> O 3,75 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) 1,95 ml 30 % Acrylamid-bisacrylamid 0,075 ml 10 % APS

0,015 ml TEMED
----------------

Zum Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,5 cm in eine Vorrichtung eingespannt. Zuerst wurde das Trenngel blasenfrei zwischen die beiden Platten gegossen. Nachdem dieses getrocknet war, wurde darauf das Sammelgel gegossen, in welches noch im flüssigen Zustand ein Kamm geschoben wurde. Nach der vollständigen Aushärtung des Gels konnte dieses in eine Elektrophoresekammer eingespannt werden, welche mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Der Kamm aus dem Sammelgel wurde vorsichtig entfernt und die Taschen des Gels konnten mit den einzelnen Proteinproben beladen werden. Hierzu wurden je 25 µg Protein pro Bedingung verwendet. Zusätzlich wurde ein kalibrierter Protein-Größenstandard als Referenz in eine der Taschen pipettiert.

An das Gel wurde anschließend eine kontinuierliche Spannung von 130 V angelegt, bis eine vollständige Auftrennung aller Proteine nach Ihrer Größe erfolgt war.

#### **5.2.3.9.5 Western Blot (Wet-Blot)**

Die Proteine im Gel wurden mittels Wet-Blot auf eine PVDF (PVDF = Polyvinylidenfluorid) Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne luftfrei mit der PVDF-Membran zwischen mehreren Filterpapieren in ein „Sandwich“ eingespannt und gepresst. Die ganze Apparatur wurde anschließend in die Transfervorrichtung in Transferpuffer eingetaucht. Der Blot erfolgte bei einer angelegten Spannung von 40 V und 4 °C für 16 h. Die Anode befand sich auf der Seite der Membran, während sich die Kathode auf der Seite des Gels befand. Die Proteine wurden so vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

Nach dem Blot wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST-Puffer (TBST = tris-buffered saline with tween) gewaschen und dann für 1 h in 5 % Milchpulver-TBST-Puffer geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen an der Membran zu minimieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper (Verdünnung: 1:1000 in 5 % BSA TBST-Puffer) über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss an die Primärantikörperinkubation wurde die Membran erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:2000 in 5 % Milchpulver TBST-Puffer) und einem speziellen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper zur Visualisierung des Proteinstandards (Verdünnung 1:5000 in 5 % Milchpulver TBST) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran mit ECL-Lösung vollständig benetzt und für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Chemilumineszenz mittels iBright™ (Thermo Fischer Scientific) im ChemiBlot Modus dargestellt. Die Belichtungszeit richtete sich je nach Intensität der Signalstärke der Proteinbanden.

Um auf einer Membran mehrere Proteine mit ähnlicher Größe nachweisen zu können, wurde die Membran gestripped. Hierzu inkubierte die Membran für 20 min im Stripping-Puffer im Wasserbad bei 50 °C. Anschließend wurde sie mindestens 5-mal mit TBST-Puffer für 10 min gewaschen. Es erfolgte ein erneuter Blockierschritt für 30 min in 5 % Milchpulver TBST-Puffer und dreimaliges Waschen in TBST-Puffer für 10 min. Die Membran konnte über Nacht mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden und wie oben beschrieben erneut entwickelt werden.

#### 5.2.3.9.6 Auswertung der Western Blot Daten

Die am iBright entwickelten Blots wurden mit der iBright Analysis Software ausgewertet. Dafür wurde die mittlere Intensität der einzelnen Banden bestimmt. Hintergrundverschmutzung oder unregelmäßige Membransignale wurden durch die Background-Korrektur von der Bandenintensität subtrahiert. Anschließend wurden die Banden der einzelnen Bedingungen mit den jeweiligen Banden der Ladekontrollen normalisiert. Als Ladekontrolle wurde auf jeder Membran die Expression des Proteins Vinculin bestimmt. Somit konnten die gemessenen Banden auf einer Membran normiert werden. Analog zur Darstellung aller anderen Experimente, wurde die Expression der einzelnen Proteine der konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen auf 100 % gesetzt und die anderen Bedingungen jeweils in Bezug dazu verrechnet.

#### 5.2.4 Statistik und Signifikanzen

Die statistische Auswertung dieser Arbeit erfolgte mit GraphPad Prism 9. Je nach Versuchsaufbau erfolgte die statistische Auswertung mittels one-way- oder two-way-ANOVA und anschließendem Turkey's-Test. Die Sterne in den Abbildungen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf folgende angegebene Signifikanzen bzw. p-Werte (siehe Tabelle xx). Die individuell für jeden Versuch verwendeten statistischen Methoden und Signifikanzbezeichnungen sind in den jeweiligen Abbildungsunterschriften der Versuche beschrieben.

**Tabelle 19: Signifikanzen**

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

## 6 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln wird der Einfluss des PMN-Überstandes mit und ohne Arginaseinhibition (mittels nor-NOHA) auf verschiedene phänotypische und funktionelle Aspekte von T-Zellen beschrieben.

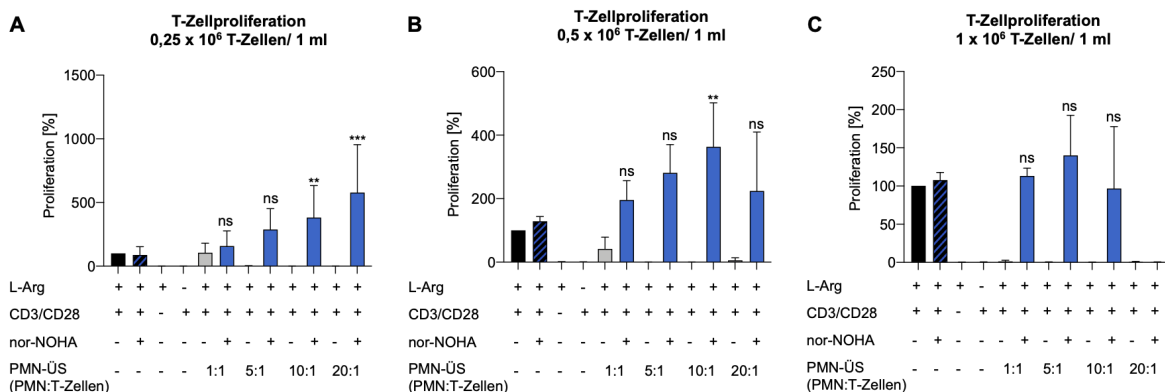
Nach der Isolation der Zellen aus Vollblut lag die Reinheitskontrolle der T-Zellen durchschnittlich bei  $98,5 \pm 1,8 \%$  (bei  $n = 40$  unabhängigen Versuchen, gemessen in der Durchflusszytometrie als CD3 exprimierende Zellen) und die Reinheitskontrolle der PMN durchschnittlich bei  $99,3 \pm 1,1 \%$  (gemessen in der Durchflusszytometrie als CD66b Expression,  $n = 40$ ).

Wenn nicht anders angegeben, wurde in den Versuchen die Proliferation oder andere untersuchte Parameter auf die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen genormt, um den Einfluss der individuellen Spendervariabilität zu minimieren. Diese Bedingung wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

### 6.1 Auswirkung verschiedener T-Zell- und PMN-Kulturbedingungen auf die T-Zellproliferation

#### 6.1.1 Vergleich unterschiedlicher T-Zellzahlen bei Aktivierung in PMN-Überständen

Bisherige Versuche wurden mit einer T-Zell Konzentration von  $0,05 \times 10^6$  Zellen/ 200  $\mu$ l ( $0,25 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml) und den entsprechenden PMN-Überständen im PMN zu T-Zellverhältnis von 1:1, 5:1, 10:1 und 20:1 durchgeführt (260). T-Zellen und PMN wurden, wie in 4.2.1 (*Zellisolation aus Vollblut*) beschrieben, isoliert und die PMN-Vorinkubationen nach dem entsprechenden PMN:T-Zell Verhältnis angesetzt. Nach 72 h wurden die T-Zellen in den zellfreien PMN-Überständen mit anti-CD3/anti-CD28-Dynabeads (5  $\mu$ l Beads pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert und die Proliferation nach 48 h mittels [ $^3$ H]-Thymidininkorporation untersucht.



**Abbildung 10: T-Zellproliferation.** T-Zellen wurden in RPMI Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert, für 48 h inkubiert und die Proliferation mittels [ $^3$ H]-Thymidininkorporation bestimmt. Die T-Zellen wurden in eine Zellkonzentration von (A)  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml, (B)  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml und (C)  $1 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml angesetzt, die PMN-Überstände wurden der entsprechenden T-Zellkonzentration angepasst. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die

Proliferation von konventionell in RPMI-Medium aktivierten T-Zellen wurde auf 100% gesetzt. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

Abbildung 10 A zeigt die normierten Proliferationswerte der T-Zellen in einer T-Zell Konzentration von  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml. Im Mittel war durch den PMN-ÜS mit Arginaseinhibition durch nor-NOHA eine signifikant gesteigerte T-Zellproliferation (10:1:  $453,7 \pm 450$  % und 20:1:  $668,4 \pm 405,1$  %) im Vergleich zu den T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium, zu beobachten. Ohne Arginaseinhibition war die T-Zellproliferation in den PMN-Überständen komplett supprimiert (10:1  $0,9 \pm 1,2$  % und 20:1  $1 \pm 0,8$  %).

Für größer angelegte Versuche, in denen mehr T-Zellen (z.B. zur Generierung von Proteinlysaten zur Proteinanalyse im Western Blot) benötigt werden, wurden weitere Versuchsbedingungen untersucht. Die T-Zellanzahl wurde auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml (Abbildung 10 B) bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen/ 1ml (Abbildung 10 C) erhöht, was gleichzeitig auch mit einer Erhöhung der PMN-Anzahl während der Generierung der PMN-ÜS einherging, um weiterhin die PMN:T-Zell-Verhältnisse von 1:1, 5:1, 10:1 und 20:1 beizubehalten.

In Abbildung 10 B dargestellt sind die normierten Proliferationswerte der T-Zellen in einem Zellverhältnis von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml. Es war eine ansteigende Mehrproliferation in den PMN-Überständen mit nor-NOHA bei PMN:T-Zell Verhältnissen von 1:1 bis 10:1 zu erkennen. Im 10:1 PMN:T-Zell-Verhältnis war die T-Zellproliferation signifikant zur +Arg-RPMI-Medium Kontrollgruppe erhöht ( $363,3 \pm 138,3$  %). In den PMN-Überständen ohne nor-NOHA war auch hier eine absolute Suppression der T-Zellproliferation zu erkennen.

Wurde die T-Zellanzahl allerdings auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml erhöht - wie in Abbildung 10 C dargestellt-, konnte in keinem der PMN-Überstände mit nor-NOHA eine signifikante Hyperaktivierung der T-Zellproliferation gezeigt werden. Die T-Zellproliferation in den PMN-Überständen ohne nor-NOHA blieb weiterhin supprimiert.

Zu beobachten war außerdem, dass mit steigender T-Zellzahl die absoluten *counts per minute* (cpm) zunahmen. So lagen die cpm in dem Versuch mit  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml in der +Arg-RPMI-Medium Bedingung bei  $8702 \pm 4710$  cpm, in dem Versuch mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ 1 ml bei  $24059 \pm 19771$  cpm und in dem Versuch mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ 1ml bei  $51357 \pm 29003$  cpm (siehe Anhang Abbildung 1).

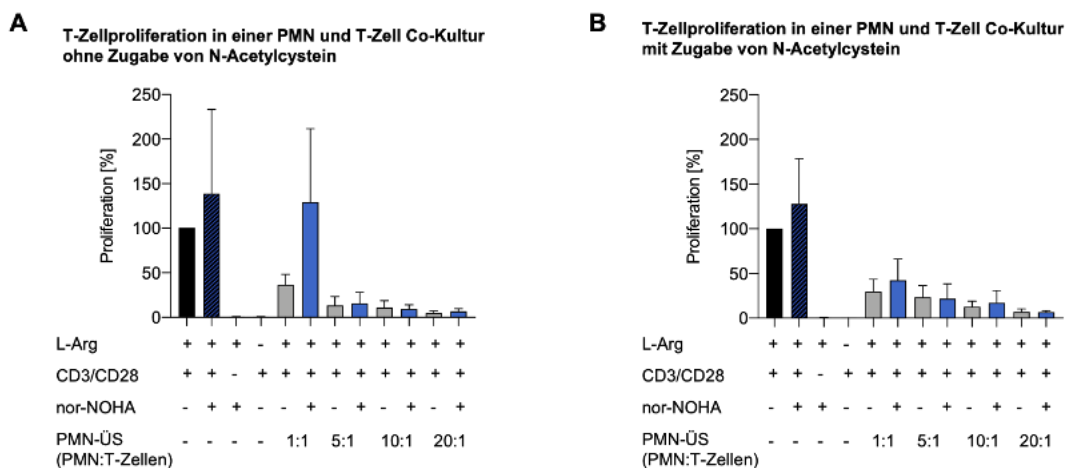
Für die Kultivierung von T-Zellen in 24-well Platten wurde im Folgenden die Bedingung mit  $0,5 \times 10^6$  T-Zellen/ 1 ml gewählt. Hier konnte im 10:1 PMN:T-Zell-Verhältnis eine signifikant erhöhte Hyperproliferation nachgewiesen werden und die Menge des zu verwendenden PMN Mediums war in dieser Kultivierungsbedingung deutlich geringer als in der Kultivierungsbedingung mit  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ 1ml.

## 6.1.2 Untersuchung der Auswirkung von radikalen Sauerstoffspezies in T-Zell-PMN-Kokultur

In direkten Kokultivierungsversuchen konnte bereits gezeigt werden (261), dass die Proliferation der T-Zellen supprimiert und eine Hyperaktivierung gar nicht möglich ist. Ursache hierfür könnten zum einen direkte Zell-Zellkontakte sein oder der Einfluss von löslichen Faktoren. Es ist bekannt, dass PMN ROS produzieren. Radikale sind sehr reaktiv und zytotoxisch und dienen der Suppression der Zellproliferation dem Eindämmen einer überschießenden Immunantwort (32).

Es wurde untersucht, ob ROS, die durch PMN produziert und sekretiert werden, in der direkten Kokultur Einfluss auf die T-Zellproliferation haben.

Um dies zu untersuchen, wurde sowohl eine direkte Kokultur von PMN und T-Zellen und eine direkte Kokultur mit NAC, einem ROS Radikalfänger, angesetzt.



**Abbildung 11: T-Zellproliferation in PMN/T-Zell Kokultur mit und ohne Zugabe des Radikalfängers N-Acetylcystein.** T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und mit frischen PMN mit und ohne die Zugabe von 1mM nor-NOHA für 48 h kokultiviert. Die Kokultur erfolgte ohne (A) und mit (B) Zugabe des Radikalfängers N-Acetylcystein. Nach 48 h wurde die Zellproliferation mittels  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Proliferation von konventionell in RPMI-Medium aktivierten T-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen.

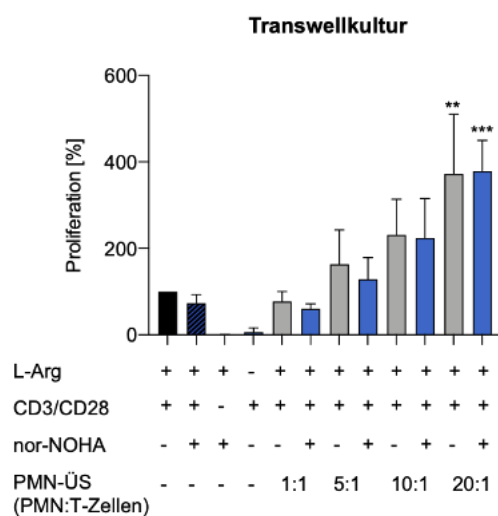
T-Zellen und PMN wurden, wie in 5.2.2.5 (*Kokultur von PMN und T-Zellen*) beschrieben, angesetzt. Die Messung der Proliferation erfolgte nach 48 h Ko-Inkubation mittels  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation. Die Proliferation der in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen wurde auf 100 % normiert. Wie zu erwarten, war keine Hyperaktivierung der T-Zellen in der Kokultur mit PMN trotz Arginasehemmung erkennbar (siehe Abbildung 11, A). Die Proliferation der T-Zellen in 10:1 PMN-ÜS + nor-NOHA lag bei  $9,6 \pm 4,6$  %. Auch konnte die Zugabe des Radikalfängers N-Acetylcystein die Proliferation der T-Zellen in direkter Kokultur mit PMN und Arginasehemmung weder wiederherstellen noch eine T-Zell Hyperaktivierung induzieren (siehe Abbildung 11, B). Zwar war die Proliferation von T-Zellen in PMN-ÜS (PMN:T-Zell Verhältnis 10:1) mit nor-NOHA mit  $17,2 \pm 13,8$  % etwas höher als ohne die Zugabe von NAC, aber dennoch weit unter der Proliferation in der +Arg-RPMI-Medium Bedingung und somit

supprimiert. Das Abfangen von neugebildeten Radikalen in der direkten Kokultivierung von PMN und T-Zellen mittels N-Acetylcystein hat somit keinen Einfluss auf die supprimierte T-Zellproliferation.

### 6.1.3 Kultivierung von T-Zellen mit PMN in Transwell-Kultur

Um den Einfluss direkten Zell-Zellkontakts auf die T-Zellproliferation auszuschalten, wurden T-Zell- und PMN-Kultivierungsversuche in einem Transwellsystem untersucht.

Der Versuch wurde, wie in 5.2.2.6 (*Transwellkultur von PMN und T-Zellen*) beschrieben, angesetzt und die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation gemessen.



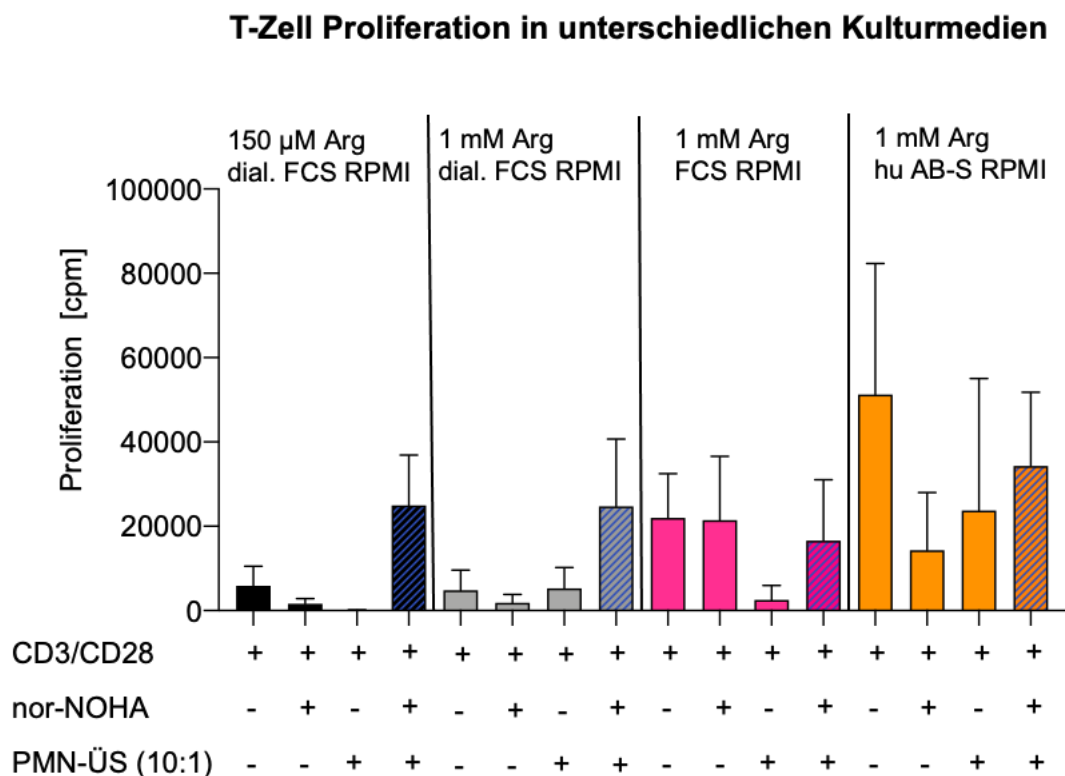
**Abbildung 12: T-Zellproliferation in Transwellkultur mit PMN.** T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und in 24-well Platten ausgesät. Frisch isolierte PMN wurden im entsprechenden Verhältnis in Zellkultureinsätze in die Wells gegeben, sodass kein direkter Zell-Zell-Kontakt entstand. Nach 48 h Inkubation wurden die T-Zellen geerntet, in 96-well Platten überführt und ihre Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Proliferation von konventionell in RPMI-Medium aktivierten T-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05)

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, waren in allen Bedingungen, in denen PMN anwesend waren, mit ansteigenden Verhältnissen von PMN zu T-Zellen, steigende T-Zell Proliferationswerte zu messen. Die höchsten Werte wurden in der PMN:T-Zell 20:1 Bedingung (+ nor-NOHA) mit 372,1 ± 138,0 % erreicht und unterschieden sich somit signifikant von der Proliferation in +Arg-RPMI-Medium. Mit 378,6 ± 71,4 % war auch die Proliferation in der 20:1 Bedingung ohne nor-NOHA ebenfalls signifikant zur Proliferation in +Arg-RPMI-Medium erhöht.

### 6.1.4 Einfluss verschiedener Kulturmedien zur PMN-Überstand-Generierung auf die T-Zellproliferation und Hyperaktivierung

Bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit konnte noch nicht geklärt werden, worum es sich bei dem von Granulozyten sezernierten Faktor(en) handelt, welche(r) zur Hyperaktivierung von T-Zellen führte(n).

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, inwieweit die Art des Kulturmediums, in welchem der PMN-ÜS generiert wurde, Auswirkung auf die T-Zellproliferation hat. Frisch isolierte PMN wurden mit und ohne Zugabe von nor-NOHA im Verhältnis 10:1 in 150 µM Arginin RPMI (+Arg-RPMI-Medium) (10 % dialysiertes FCS), in 1 mM Arginin RPMI (10 % dialysiertes FCS) in FCS-RPMI (10 % FCS, 1 mM Arginin) und in huRPMI (10 % humanes AB-Serum, 1 mM Arginin) für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Medien und PMN-Überständen der verschiedenen Medien mit anti-CD3/anti-CD28-Beads (5 µl pro 1x10<sup>6</sup> T-Zellen) aktiviert und für 48 h inkubiert. Die Proliferation als Zeichen der T-Zellaktivierung wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation ermittelt. In der hier dargestellten Auswertung wurden die Balken nicht auf eine bestimmte Kultivierungsbedingung normiert. Um die Proliferationswerte der T-Zellen in den unterschiedlichen Medienbedingungen besser vergleichen zu können, sind hier die Rohwerte (counts per minute) dargestellt (Abbildung 13)



**Abbildung 13: Auswirkung unterschiedlicher Medienbedingungen auf die T-Zellproliferation.** T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die frisch isolierten PMN wurden mit und ohne Zugabe von nor-NOHA im PMN- zu T-Zell-Verhältnis 10:1 in 150 µM Arginin RPMI (+Arg-RPMI-Medium) (10 % dialysiertes FCS), in 1 mM Arginin RPMI (10 % dialysiertes FCS) in FCS-RPMI (10 % FCS, 1 mM Arginin) und in huRPMI (10 % humanes AB-Serum, 1 mM Arginin) für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen in den verschiedenen Medien und PMN-

Überständen der verschiedenen Medien mit anti-CD3/anti-CD28-Beads (5 µl pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) für 48 h aktiviert. Die Proliferation wurde mittels [ $^3$ H]-Thymidininkorporation ermittelt. Dargestellt sind die Proliferationsrohwerte ohne Normierung in counts per minute aus  $n = 3$  unabhängig Experimenten. Die einzelnen Medienbedingungen sind mittels senkrechter Striche voneinander getrennt.

Es ist zu erkennen, dass es auf Proliferationsebene keinen Unterschied macht, ob T-Zellen 150 µM Arginin (Abbildung 13, schwarze Balken) oder 1 mM Arginin (Abbildung 13, hellgraue Balken) im RPMI-Medium mit 10 % dialysierten FCS zu Verfügung standen. So waren in 150 µM Arginin Medium counts von  $5919 \pm 4576,9$  messbar und in 1 mM Arginin Medium counts von  $4849 \pm 4797$ . In PMN-ÜS mit nor-NOHA konnten in 150 µM Arginin Medium counts von  $24992 \pm 11886$  und in 1 mM Arginin Medium counts von  $24737 \pm 15978$  detektiert werden.

Es war zudem zu erkennen, dass die Proliferation von T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA, welcher in 1 mM Arginin Medium generiert wurde, nicht messbar supprimiert wurde. Wurde der PMN-ÜS allerdings in einem Medium generiert, welches nicht mit 10 % dialysierten FCS angesetzt war, sondern mit undialysiertem FCS oder mit humanem AB-Serum, so konnte in den T-Zellen, die in diesen Überständen aktiviert wurden, keine Hyperaktivierung festgestellt werden. Bereits bei konventioneller Aktivierung (ohne PMN-ÜS) zeigte sich eine deutlich stärkere Proliferation: die cpm von T-Zellen in undialysiertem FCS-Medium waren mit  $22010 \pm 10512$  bereits höher als in 150 µM Arginin RPMI (10 % dialysiertes FCS). Ebenfalls höhere counts konnten im huRPMI (10% humanes AB-Serum) mit  $51241 \pm 31098$  gemessen werden. Eine Hyperaktivierung in PMN-ÜS in diesen Medien blieb aus: T-Zellproliferation in PMN-ÜS mit FCS RPMI  $16629 \pm 14411$ , in PMN-ÜS mit huRPMI  $34277,9 \pm 17507$  cpm.

## **6.2 Keine T-Zell Hyperaktivierung in PMN-Überstand durch Zugabe von Citrullin**

T-Zellen können in Argininmangelbedingungen Citrullin über den L-Type Aminosäure Transporter 1 (L-Type amino acid transporter 1, LAT1) aufzunehmen. Aus diesem Citrullin regenerieren sie über das bei Argininmangel v.a. hochregulierte Enzym Argininosuccinatsynthase 1 (ASS1) und das im Wesentlichen konstant exprimierte Enzym Argininsuccinatyase (ASL) endogen Arginin. Zur der de novo oder vermehrten Expression der ASS1 benötigen die T-Zellen optimal eine moderate Argininmangelkonzentration von 20 µM. Dies stellt eine Argininkonzentration dar, bei der die Proliferation der T-Zellen initial gehemmt ist. Durch die Zugabe von 1 mM Citrullin ist es möglich, die T-Zellproliferation komplett zu rekonstituieren (208).

In vorangegangenen Versuchen wurde die Argininkonzentration in den verschiedenen PMN-Vorinkubationen nach 72 h bestimmt (261). Diese reduzierte sich von 150 µM Anfangskonzentration in dem 10:1 PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition auf  $15,6 \pm 16,9$  µM. Dies entspricht einer Argininkonzentration in einem Rahmen, in dem eine Hochregulation der Expression von ASS1 zu erwarten wäre und somit eine Rekonstitution der T-Zellproliferation



weiterhin keine T-Zellproliferation ( $2,9 \pm 0,4$  %). Zudem gab es weiterhin eine Suppression der T-Zellproliferation im PMN-ÜS ohne nor-NOHA ( $6,5 \pm 5,9$  %). Durch die Zugabe von  $20 \mu\text{M}$  Arginin und  $1 \text{ mM}$  Citrullin konnte in der -Arg-RPMI-Medium (jetzt  $20 \mu\text{M}$  Arginin) Bedingung eine fast vollständige Rekonstitution der T-Zellproliferation, wie in der +Arg-RPMI-Medium Kontrollbedingung, beobachtet werden ( $89,4 \pm 15,6$  %), welche im PMN-ÜS ohne nor-NOHA nicht erreicht wurde ( $21,1 \pm 28,5$  %). Ähnliches zeigte sich auch, nach der Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  Arginin und  $1 \text{ mM}$  Citrullin. Erst durch die Zugabe von  $150 \mu\text{M}$  Arginin und  $1 \text{ mM}$  Citrullin konnte die T-Zellproliferation im PMN-ÜS ohne nor-NOHA auf +Arg-RPMI-Medium mit  $126,3 \pm 50,5$  % rekonstituiert werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach der Zugabe von  $300 \mu\text{M}$  Arginin und  $1 \text{ mM}$  Citrullin. Hier erfolgte eine Rekonstitution der Proliferation im PMN-ÜS ohne nor-NOHA auf  $148,6 \pm 42,7$  %. Die Proliferation der T-Zellen überstieg aber in keiner dieser beiden Bedingungen deutlich oder gar signifikant die Proliferation der T-Zellen in der Kontrollbedingung in +Arg-RPMI-Medium. Somit konnte durch die Zugabe von Citrullin in den PMN-ÜS ohne nor-NOHA keine Hyperaktivierung der T-Zellen festgestellt werden.

In den PMN-Überständen mit nor-NOHA zeigte sich dagegen weiterhin in allen Bedingungen eine Hyperaktivierung der T-Zellproliferation, die nicht durch die Zugabe von Arginin oder Citrullin verstärkt wurde. Die Hyperaktivierung blieb in allen Bedingungen ungefähr gleich hoch. Der hyperaktivierende Effekt des PMN-Überstands unter Arginasehemmung auf T-Zellen konnte somit in dem PMN-ÜS ohne Arginasehemmung durch Citrullin nicht erreicht bzw. ermöglicht werden.

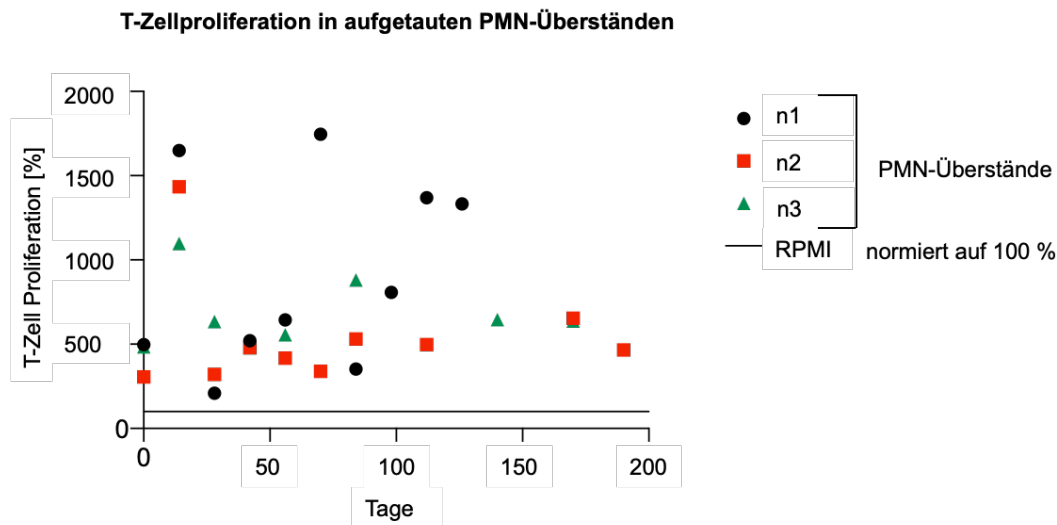
Bisher (260) konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe eines Überschusses an Arginin ( $1 \text{ mM}$ ) zum PMN-ÜS ohne nor-NOHA der hyperaktivierende Effekt wieder hergestellt werden konnte, eine Erhöhung der Argininkonzentration aber keine generelle Proliferationssteigerung in den reinen Mediumkontrollen zur Folge hatte.

### **6.3 Kältestabilität der immunstimulatorischen Faktoren der PMN**

In allen bisher durchgeführten Versuchen wurde mit frischem PMN-ÜS gearbeitet, das heißt PMN-ÜS nach  $72 \text{ h}$  Vorinkubation. Im Folgenden wurde die Kältestabilität der hyperaktivierenden Faktoren im PMN-ÜS untersucht. Die Kältestabilität kann auf der einen Seite ein Hinweis zur Identifizierung der von PMN sezernierten hyperaktivierenden Faktor(en) sein. Auf der anderen Seite ermöglicht das Einfrieren von PMN-ÜS flexibleres Arbeiten, unabhängig von der Verfügbarkeit von Blutprodukten sowie Inkubationszeiten, aber auch die Möglichkeit des gekühlten Transports, was die Kooperation mit anderen Forschungsgruppen vereinfachen und fördern kann.

Der Versuch wurde wie in 5.2.2.7 (*Einfrieren von PMN-Überständen*) beschrieben durchgeführt. In einem Zeitraum von 200 Tagen wurden die PMN-Überstände von drei

verschiedenen Spendern ca. alle zwei Wochen aufgetaut und T-Zellen in den Überständen und im +Arg-RPMI-Medium zur Kontrolle aktiviert.



**Abbildung 15: T-Zellproliferation in eingefrorenen und wieder aufgetauten PMN-Überständen.** Die PMN-Überstände (n = 3 Spender) wurden bei -80°C eingefroren und einzelne Aliquots der PMN-ÜS über einen Zeitraum von 200 Tagen wieder aufgetaut. T-Zellen (andere Spender) wurden nach der üblichen 72 h Vorinkubation in den PMN-ÜS mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation. Dargestellt sind die Proliferationswerte von T-Zellen unterschiedlicher gesunder Spender in den jeweiligen PMN-ÜS (n1-n3) + nor-NOHA, jeweils im Vergleich zu den auf 100% normierten Proliferationswerten der T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium an den entsprechenden Versuchstagen. Der schwarze Strich bei 100 % stellt jeweils die normierte Proliferation in +Arg-RPMI-Medium dar.

In einem Zeitraum von 200 Tagen konnten PMN-Überstände bei -80 °C eingefroren sein, ohne dass deren T-Zell hyperaktivierende Potenz verloren ging. Es konnte ferner klar gezeigt werden, dass T-Zellen unterschiedlicher Spender in dem gleichen eingefrorenen PMN-ÜS unterschiedlich starke Hyperaktivierungen zeigten (Abbildung 15).

## 6.4 Einfluss der PMN-bedingten Hyperaktivierung auf die Morphologie der T-Zellen

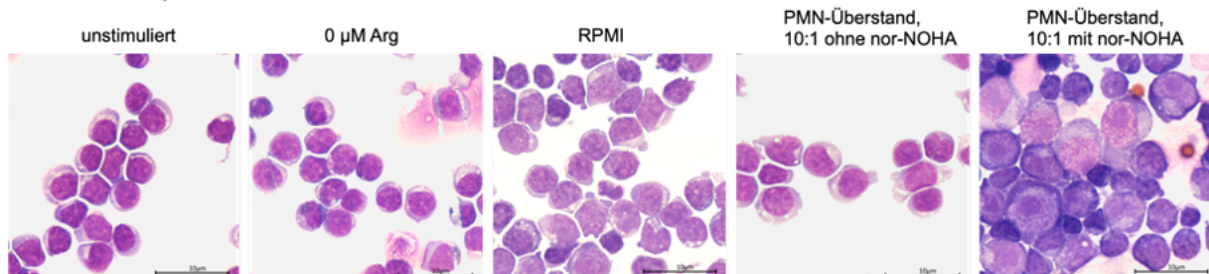
### 6.4.1 Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen mittels Lichtmikroskopie

Die T-Zellen wurden bereits konventionell zytologisch untersucht (261). Die dort angewendete Methode zeigte keine ideale Färbung. Es erfolgte keine suffiziente Färbung der Zellkerne und auch die zytoplasmatischen Strukturen ließen sich nicht eindeutig abgrenzen. Zudem schien für eine intensivere Färbung eine höhere Zelldichte notwendig zu sein. Aus diesen Gründen wurde in dem hier gewählten und beschriebenen Versuchsaufbau mit einer höheren Zelldichte gearbeitet und das Färbeprotokoll angepasst.

Die Zellen wurden, wie in 5.2.3.3.1 (*Lichtmikroskopie*) beschrieben, angesetzt und wie in 5.2.3.3.1.1 (*Erstellen von Cytospin Präparaten*) beschrieben mittels Cytospin-Zentrifugation auf Objektträgern fixiert, luftgetrocknet und nach Protokoll gefärbt (siehe 5.2.3.3.1.2 *Färben der Präparate und Mikroskopie*).

Durch die panoptische Färbung nach Pappenheim werden diverse intrazelluläre Strukturen sichtbar. Methylenblau bindet als basischer Farbstoff die Nukleinsäure der DNA und färbt die Zellkerne, während Eosin als saurer Farbstoff zum Beispiel positiv geladene Eiweißstrukturen färbt. Die Objektträger wurden in 100-facher Vergrößerung mikroskopiert.

#### Lichtmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen



**Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.** T-Zellen wurden in RPMI-Medium und Argininmangelmedium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert, mittels Cytospin auf Objektträger übertragen und nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) gefärbt. Die hier dargestellten repräsentativen Bilder wurden in der 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Unstimulierte T-Zellen bzw. T-Zellen im -Arg-RPMI-Medium zeigten dichte Zellkerne, die von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben wurden. Auch T-Zellen aktiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA zeigten diese Morphologie, wobei vereinzelt zusätzlich Ausstülpungen der Plasmamembran zu erkennen waren. Auch waren in allen diesen drei Bedingungen nur wenige Zellen im Präparat sichtbar.

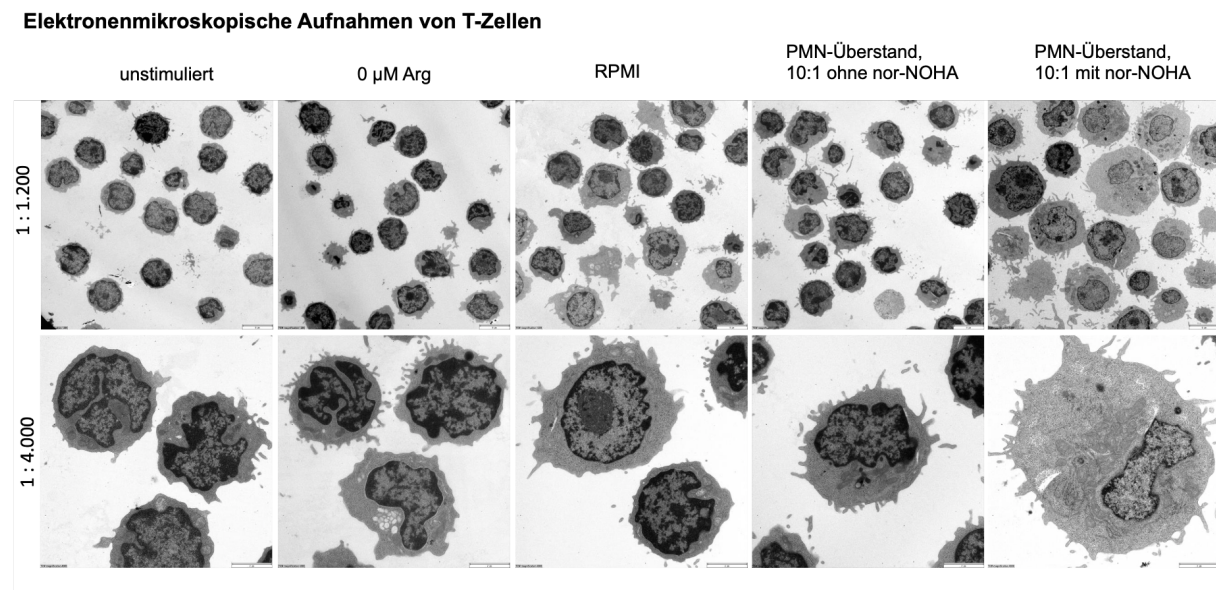
Konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen zeigten aufgelockertere Zellkerne mit vereinzelt Nukleoli sowie immer wieder auch Ausstülpungen der Plasmamembran, alles zytomorphologische Korrelate von Zellaktivierung. In dieser Kultivierungsbedingung waren auch deutlich mehr Zellen im Präparat sichtbar.

Die in PMN-ÜS + nor-NOHA aktivierten T-Zellen unterschieden sich in ihrer Morphologie sehr eindrücklich von den zuvor beschriebenen konventionell aktivierten T-Zellen. Hyperaktivierte T-Zellen waren insgesamt deutlich größer, zeigten sehr stark aufgelockerte Zellkerne mit ausgeprägten Nukleoli und einem prominenten perinukleären Golgi-Apparat, jeweils Korrelate für sehr aktive und stark proliferierende T-Zellen (Abbildung 16).

#### 6.4.2 Untersuchung der Morphologie hyperaktivierter T-Zellen mittels Elektronenmikroskopie

Um subzelluläre Strukturen sowie die Morphologie der T-Zellen noch genauer darstellen zu können, wurden in Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Porubsky, Pathologisches Institut der Universitätsmedizin Mainz, elektronenmikroskopische Bilder der unterschiedlich aktivierten T-Zellen aufgenommen. Die T-Zellen wurden hierzu wie in 5.2.3.3.2 (*Elektronenmikroskopie*) beschrieben angesetzt, geerntet und im Pathologischen Institut der Universitätsmedizin Mainz aufgearbeitet.

Abbildung 17 zeigt die elektronenmikroskopischen Bilder der T-Zellen der verschiedenen Kultivierungsbedingungen in 1:1200 Vergrößerung als Übersichtsbilder in der ersten Zeile und in 1:4000 Vergrößerung als Detailbilder in der zweiten Zeile.

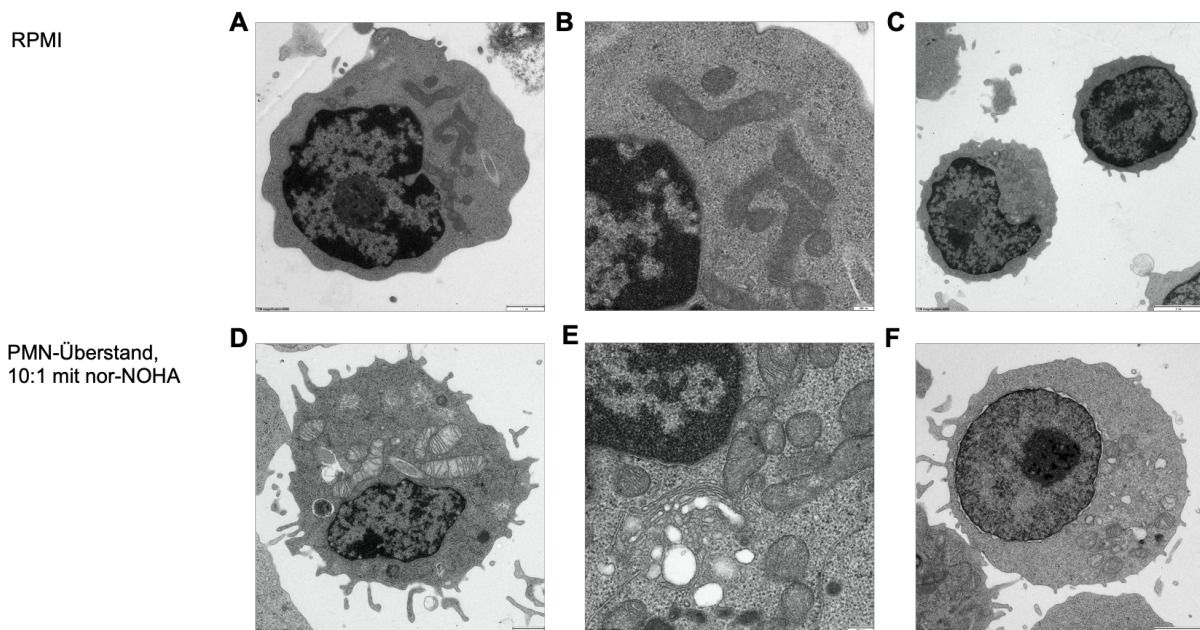


**Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.** T-Zellen eines gesunden Normalspenders ( $n = 1$ ) wurden in RPMI-Medium und Argininmangelmedium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Zellen wurden fixiert und in Epon Resin eingebettet, geschnitten und Bilder mit dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400 aufgenommen. Die obere Reihe zeigt Zellübersichtsbilder in der Vergrößerung 1: 1200, während in der unteren Reihe detailliertere Zellaufnahmen in der Vergrößerung 1:4000 zu sehen sind. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ausschnitte aller Bilder.

In den Übersichtsaufnahmen war bereits zu erkennen, dass die T-Zellen, die unstimuliert blieben oder im -Arg-RPMI-Medium aktiviert wurden, im Vergleich zu den anderen Kultivierungsbedingungen deutlich kleiner waren. Auch zeigten sich in der Detailaufnahme dieser beiden Bedingungen deutlich kleinere Zellen mit einem dichtgepackten Kern und einem sehr schmalen Zytoplasmasaum (analog zu den entsprechenden Zellen in den lichtmikroskopischen Aufnahmen). Die T-Zellen, die im -Arg-RPMI-Medium aktiviert wurden, zeigten allerdings sehr viele Zellausläufer im Vergleich zu den unstimulierten T-Zellen. T-Zellen, die im PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition aktiviert worden waren, imponierten im Übersichtsbild mit einem vergrößerten Zellkorpus und einem breiteren Zytoplasmasaum als die unstimulierten oder im -Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Trotzdem wirkte die Morphologie nicht so aktiviert wie T-Zellen, die im +Arg-RPMI-Medium aktiviert wurden, da auch viele Zellen im Übersichtsbild von der Morphologie her eher dem unstimulierten Typ entsprachen. Die konventionell aktivierten T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium hingegen zeigten in vielen Zellen des Übersichtsbildes eine große aktivierte Zellmorphologie mit aufgelockerten Zellkernen und deutlichen Nukleoli, was auch sehr gut in dem Detailbild dieser Kultivierungsbedingung zu entnehmen ist. Hyperaktivierte, d.h. in PMN-ÜS mit nor-NOHA aktivierte T-Zellen imponierten im Vergleich zu den konventionell aktivierten T-Zellen aber mit einer deutlichen Größenzunahme. Nahezu alle Zellen des Übersichtsbildes zeigten stark

aufgelockerte und helle Zellkerne, sehr prominente Nukleoli und viele Zellfortsätze. In dem breiten Zytoplasmasaum waren zudem große und deutlich strukturierte Mitochondrien zu erkennen. Im Detailbild der hyperaktivierten T-Zellen waren zudem ein sehr stark ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat auszumachen. In diesem waren nicht nur die Zisternen detailliert darstellbar, auch zeigten sich bemerkenswert große Vesikel. All diese Faktoren deuten auf eine deutlich verstärkte Proteinsynthese am endoplasmatischen Retikulum und einen Transport der synthetisierten Proteine über den Golgi-Apparat hin (Abbildung 17).

#### Elektronenmikroskopische Aufnahmen, T-Zellen inkubiert in RPMI und PMN-Überstand im Detail



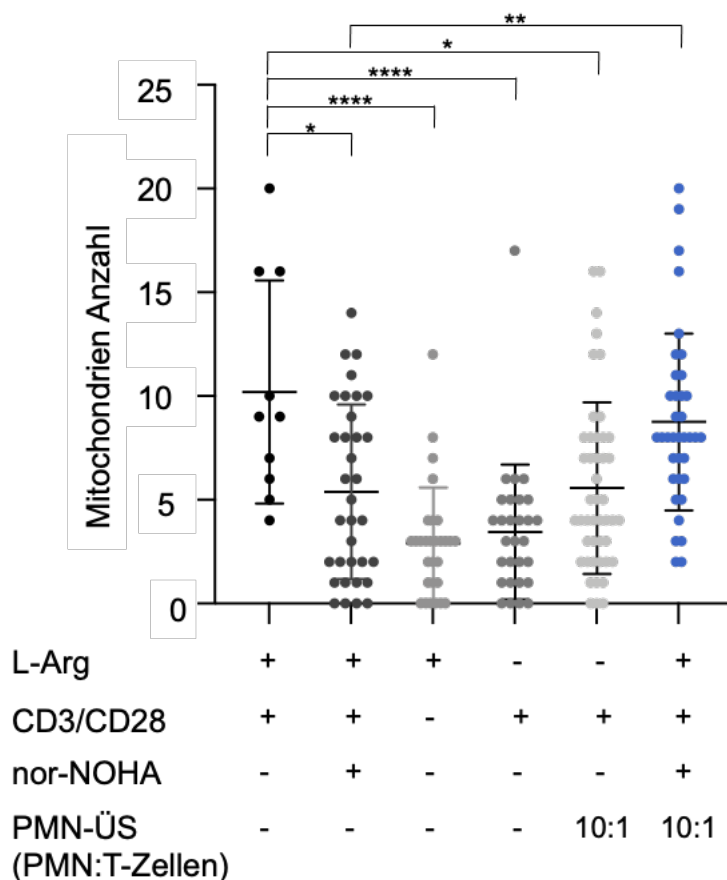
**Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von konventionell aktivierten bzw. hyperaktivierten T-Zellen.** T-Zellen eines gesunden Normalspenders ( $n = 1$ ) wurden in RPMI-Medium oder PMN-Überstand mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Zellen wurden fixiert und in Epon Resin eingebettet, geschnitten und Bilder mit dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400 aufgenommen. Die Bilder (A) und (D) zeigen Aufnahmen in einer Vergrößerung von 1:6000 (A) bzw. 1:5000 (D), die Bilder (B) und (E) zeigen Aufnahmen in einer Auflösung von 1:15.000 (B) bzw. 1:20.000 (E) und die Bilder (C) und (F) zeigen Aufnahmen in einer Auflösung von 1:4000.

In Abbildung 18 sind repräsentativ weitere und stärkere Vergrößerungen der in den beiden Bedingungen (i) konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen (Abbildung 18, A, B, C) und (ii) in PMN-Überstand mit nor-NOHA hyperaktivierte T-Zellen (Abbildung 18 D, E, F) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist in diesen Vergrößerungen die Mitochondrienstruktur. Während die Mitochondrien der konventionell aktivierten T-Zellen wie in Abbildung 18 A und B dargestellt eher klein, flach und weniger strukturiert waren, waren die Mitochondrien in den hyperaktivierten T-Zellen wie in Abbildung 18 D und E zu erkennen, deutlich vergrößert, hell und strukturiert, sodass die einzelnen Zisternen zu erkennen waren. Auch war in den hyperaktivierten T-Zellen deutlich die Abschnürung von Vesikeln zu erkennen, was gut in Abbildung 18 E und F sichtbar ist. Der aufgelockerte Zellkern und der deutlich prominente und dunkle Nukleolus, sowie der breite Zytoplasmasaum der hyperaktivierten T-Zellen wird in

Abbildung 18 F im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen in Abbildung 18 C deutlich dargestellt.

Um zu untersuchen, ob sich nicht nur die Morphologie der Mitochondrien, sondern auch deren absolute Anzahl pro Zelle in hyperaktivierten versus konventionell aktivierten T-Zellen unterscheidet, wurden in einer repräsentativen Anzahl an T-Zellen die Mitochondrien pro Schnittebene pro Zelle ausgezählt (Abbildung 19).

### Mitochondrienanzahl pro Schnittebene in T-Zellen



**Abbildung 19: Mitochondrienanzahl pro Schnittebene in T-Zellen unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen.** T-Zellen eines gesunden Normalspenders (n = 1) wurden in +Arg-RPMI-Medium mit und ohne 1 mM nor-NOHA, sowie in -Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Zellen wurden fixiert und in Epon Resin eingebettet, geschnitten und Bilder mit dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400 aufgenommen. Anschließend wurde in einer repräsentativen Anzahl von T-Zellen die Mitochondrienanzahl pro Schnittebene ermittelt. Hier dargestellt sind die einzelnen Zählergebnisse unterschiedlicher Schnitte sowie die Mittelwerte incl. Standardabweichungen der ausgezählten Mitochondrien-Zahlen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05)

Unstimulierte, d.h. ruhende T-Zellen, wiesen durchschnittlich ca. 3 Mitochondrien pro Schnittebene auf ( $2,9 \pm 1,5$ ). Somit unterschieden sich diese nicht signifikant von in -Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen mit ebenfalls durchschnittlich 3 Mitochondrien ( $3,4 \pm 1,5$ ) oder T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden mit durchschnittlich 6 Mitochondrien ( $5,6 \pm 2,6$ ).

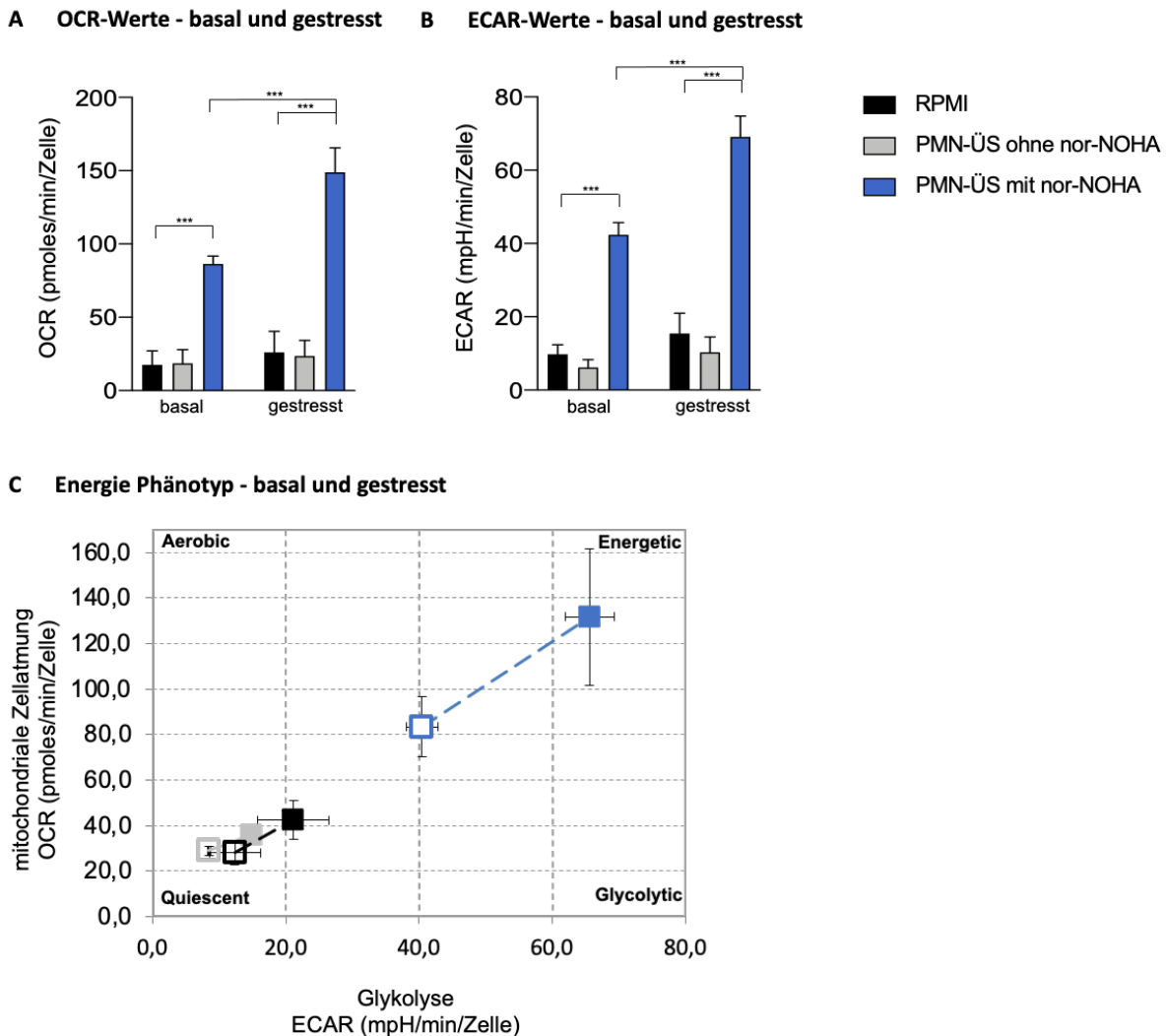
Signifikant mehr Mitochondrien im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen wiesen T-Zellen auf, die in +Arg-RPMI-Medium aktiviert wurden. Hier war eine durchschnittliche Anzahl von 10 Mitochondrien ( $10,2 \pm 5,4$ ) pro Schnittebene auszählbar. Hyperaktivierte T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA wiesen durchschnittlich eine Anzahl von 9 Mitochondrien pro Schnittebene ( $8,8 \pm 5,3$ ) auf. Somit unterschieden sie sich zwar signifikant von unstimulierten T-Zellen und in - Arg-RPMI-Medium inkubierten T-Zellen, nicht aber von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Bei T-Zellen, die in +Arg-RPMI-Medium mit nor-NOHA inkubiert wurden, sank die Anzahl der Mitochondrien auf 5 pro Schnittebene ( $5,5 \pm 5,2$ ) und war signifikant niedriger als bei hyperaktivierten T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA.

## **6.5 Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf den Metabolismus der T-Zellen**

### **6.5.1 Untersuchung des Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen mittels Seahorse Energiephänotyp Test und Mito Stress Test**

#### **6.5.1.1 Energiemetabolismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen – Energie Phänotyp**

Nachdem insbesondere die ultrastrukturelle Mitochondrienmorphologie in hyperaktivierten T-Zellen so prominent war, wurde in der Folge untersucht, inwieweit sich der Metabolismus dieser T-Zellen von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten Zellen unterscheidet. In vorangegangenen Arbeiten konnte mittels *Agilent Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test* bereits für CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden, dass hyperaktivierte T-Zellen einen deutlich gesteigerten Sauerstoffverbrauch, mit sowohl gesteigerter glykolytischer Aktivität wie auch oxidativer Phosphorylierung im Vergleich zu konventionell aktivierten Zellen aufweisen (261). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit für die CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation ebenso bestätigt werden. Der Assay wurde, wie in 5.2.3.7.2 (*Phänotyp Test*) beschrieben, durchgeführt. Die CD4<sup>+</sup> Subpopulationen wurden aus CD3<sup>+</sup> T-Zellen, wie in 5.2.1.3 (*Isolation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen*) beschrieben, gewonnen. Für den Assay wurden die drei Kultivierungsbedingungen (i) Konventionell aktivierte T-Zellen (in +Arg-RPMI-Medium), (ii) T-Zellen kultiviert in 10:1 PMN-ÜS ohne nor-NOHA und (iii) hyperaktivierte T-Zellen in 10:1 PMN-ÜS mit nor-NOHA 48 h nach Aktivierung der T-Zellen miteinander verglichen



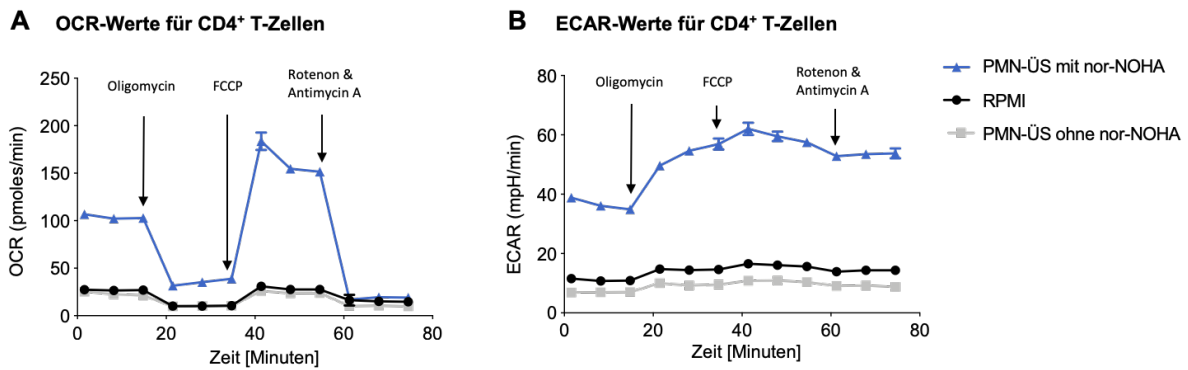
**Abbildung 20: Energie Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert und anschließend die metabolische Aktivität mittels Agilent Seahorse XF Energy Phenotype Test gemessen. In (A) sind OCR-Werte basal und nach Zugabe der Stresssubstanzen und in (B) die basalen und gestressten ECAR-Werte abgebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Diagramm (C) zeigt zusammenfassend die Einteilung in die verschiedenen Energiephänotypen, indem die Glykolyse gegen die mitochondriale Zellatmung aufgetragen wird, repräsentativ von n = 1 Experiment für alle durchgeführten Experimente. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

Abbildung 20 A zeigt die basalen und die nach Zugabe der Stressoren (Oligomycin und FCCP) zur Induktion von metabolischem Stress gemessenen Werte des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (*oxygen consumption rate* = OCR), welche der oxidativen Phosphorylierung zuzuordnen sind. In PMN-ÜS mit nor-NOHA hyperaktivierte T-Zellen wiesen mit  $86,5 \pm 5,3$  pmol/min/Zelle sowohl im basalen als auch im gestressten Zustand ( $148,9 \pm 16,7$  pmol/min/Zelle) signifikant höhere Werte als konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen (basal:  $17,6 \pm 9,4$  pmol/min/Zelle, gestresst:  $26,16 \pm 14,2$  pmol/min/Zelle). T-Zellen, aktiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA, zeigten mit  $18,6 \pm 9,3$  pmol/min/Zelle leicht höhere OCR-Werte als konventionell aktivierte T-Zellen. Nach Zugabe der Stresssubstanzen war ein Anstieg der OCR auf  $23,56 \pm 10,6$  pmol/min/Zelle zu messen, welcher geringer als bei konventionell aktivierten T-Zellen ausfiel.

Ein ähnliches Bild zeigten die Messwerte für die Glykolyse mittels extrazellulärer Ansäuerungsrate (*extracellular acidification rate* = ECAR). Auch hier waren bei hyperaktivierten T-Zellen im basalen ( $42,4 \pm 3,3$  mpH/min/Zelle) sowie im gestressten Zustand ( $69,1 \pm 5,6$  mpH/min/Zelle) signifikant höhere Werte als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen (basal:  $9,75 \pm 2,6$  mpH/min/Zelle, gestresst:  $15,4 \pm 5,5$  mpH/min/Zelle) messbar. T-Zellen, aktiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA, wiesen basale ECAR-Werte von  $6,2 \pm 2,1$  mpH/min/Zelle und Werte von  $10,3 \pm 4,2$  mpH/min/Zelle nach der Zugabe der Stresssubstanzen auf, somit in beiden Zuständen niedriger als konventionell aktivierte T-Zellen (Abbildung 20 B). Bei Betrachtung des Energiephänotyp zeigte sich, dass hyperaktivierte T-Zellen im basalen Zustand bereits einen energetischeren Phänotyp als konventionell aktivierte T-Zellen aufweisen. Nach metabolischem Stress zeigten hyperaktivierte T-Zellen eindeutig einen Phänotyp im energetischen Bereich, bei welchem sowohl für die mitochondriale Zellatmung als auch die Glykolyse stark erhöhte Werte messbar waren. Konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen zeigten im Vergleich einen deutlich ruhenderen Energiephänotyp, mit geringerem Anstieg der OCR- und ECAR-Werte nach Induktion von metabolischem Stress durch Zugabe der Stresssubstanzen (siehe Abbildung 20 C).

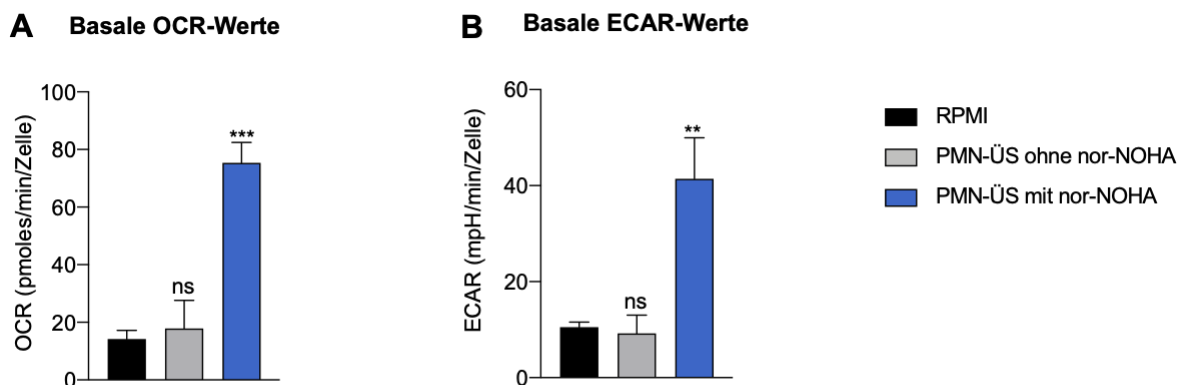
#### **6.5.1.2 Energiemetabolismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen – Mito Stress Test**

Mittels *Agilent Seahorse XF Mito Stress Test* kann die metabolische Aktivität, und hier insbesondere die mitochondriale Funktion der T-Zellen in CD8<sup>+</sup> wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation untersucht werden. Der Assay untersucht detailliert die basale Atmung, die ATP-abhängige Atmung, die maximale und die Reservekapazität sowie die nicht-mitochondriale Atmung der T-Zellen und bietet die Möglichkeit, funktionelle Unterschiede zwischen den T-Zellen der verschiedenen Kultivierungsbedingungen nachzuweisen. Durchgeführt wurde der Assay wie in 5.2.3.7.1 (*Messung des Energiemetabolismus mittels Agilent Seahorse*) beschrieben. Für den Assay wurden die drei Kultivierungsbedingungen (i) konventionell aktivierte T-Zellen (in +Arg-RPMI-Medium), (ii) T-Zellen kultiviert in 10:1 PMN-ÜS ohne nor-NOHA und (iii) hyperaktivierte T-Zellen in 10:1 PMN-ÜS mit nor-NOHA nach 48 h Aktivierung miteinander verglichen. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen wurden zunächst separat aufgereinigt und in getrennten Assays untersucht, da davon auszugehen war, dass die unterschiedlichen Zellpopulationen unterschiedliche Ausgangswerte in den Bereichen OXPHOS und Glykolyse zeigen würden und auch die Reaktion auf die Stressoren unterschiedlich ausfallen könnte. Die einzelnen Subpopulationen wurden aus CD3<sup>+</sup> T-Zellen wie in 5.2.1.3 (*Isolation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen*) beschrieben gewonnen.



**Abbildung 21: OCR- und ECAR-Werte von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die Messwerte des Agilent Seahorse XF Mito Stress Test im Zeitverlauf. Jeweils markiert sind die Zugaben von Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A. **(A)** Zeigt die OCR-Werte, **(B)** die ECAR-Werte. Dargestellt sind jeweils die Kurven von n = 1 Experiment, repräsentativ für alle durchgeführten Experimente (n = 3).

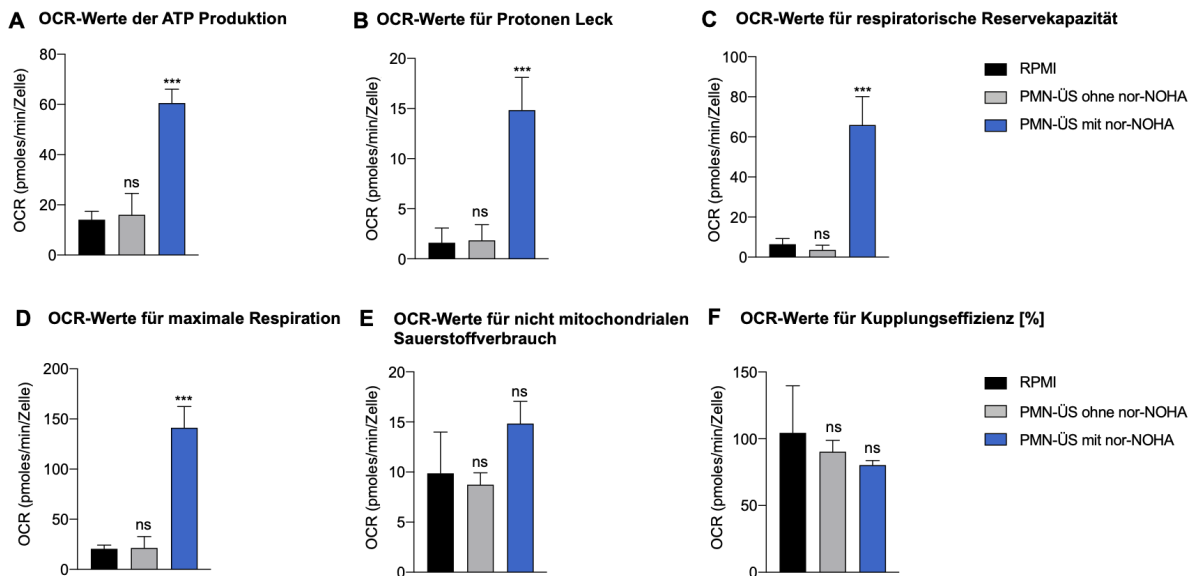
In Abbildung 21 ist repräsentativ für alle Versuche eine Kurve des mitochondrialen OCR, welche der OXPHOS zuzuordnen ist, und eine Kurve der ECAR, welche mit der glykolytischen Aktivität der Zelle korrespondiert, eines Versuchsdurchlaufes für CD4<sup>+</sup> T-Zellen abgebildet.



**Abbildung 22: Basale OCR- und ECAR-Werte der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert und anschließend die metabolische Aktivität mittels Agilent Seahorse XF Mito Stress Test gemessen. In **(A)** sind die basalen OCR-Werte für die CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation abgebildet, in **(B)** die basalen ECAR-Werte. Dargestellt sind die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

Bereits in den basal gemessenen Werten für oxidative Phosphorylierung wurde eine signifikant höhere Aktivität der hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit OCR-Werten von  $75,4 \pm 7,1$  pmol/min/Zelle gegenüber konventionell aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit OCR-Werten von  $14,2 \pm 3,0$  pmol/min/Zelle nachgewiesen. Der basale OCR-Wert von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden, lag bei  $17,8 \pm 9,8$  pmol/min/Zelle (Abbildung 22, A). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in den basalen Werten für die glykolytische Aktivität, mit einem signifikant höheren ECAR von  $41,4 \pm 8,6$  mpH/min/Zelle der hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich zu  $10,5 \pm 1,1$  mpH/min/Zelle bei den konventionell aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Der basale ECAR-Wert von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden, lag bei  $9,2 \pm 3,8$  mpH/min/Zelle (Abbildung 22, B).

Abbildung 23 zeigt die OCR-Werte der unterschiedlichen metabolischen Messparameter (Das Zustandekommen der einzelnen Werte ist der Tabelle 16 in 5.2.3.7 *Messung des Energiemetabolismus mittels Agilent Seahorse* zu entnehmen).



**Abbildung 23: Hyperaktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen stark erhöhte metabolische Aktivität.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert, für 48 h inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität mittels *Agilent Seahorse XF Mito Stress Test* gemessen. In (A) sind die OCR-Werte für ATP-Produktion, in (B) die OCR-Werte für das Protonen Leck (*Proton Leak*), in (C) die OCR-Werte für die respiratorische Reservekapazität (*Spare Respiratory Capacity*), in (D) die OCR-Werte für die Maximale Respiration, in (E) die OCR-Werte für den nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und in (F) die OCR-Werte für die Kupplungseffizienz (*Coupling Efficiency*) dargestellt. Dargestellt sind jeweils die zusammengefassten Ergebnisse (Mittelwert + Standardabweichung) von n = 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzbeziehungen beziehen sich jeweils auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05)

Hyperaktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen eine verstärkte ATP-Produktion auf (Abbildung 23, A). Mit einem OCR-Wert von 60,5 ± 5,6 pmol/min/Zelle lag diese signifikant über konventionell aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen 14,1 ± 3,4 pmol/min/Zelle. Das Protonen Leck (*Proton Leak*) stellt die verbliebene Basalatmung dar, die nicht an die ATP-Produktion gekoppelt ist. Sie dient als Mechanismus zur Regulation der mitochondrialen ATP-Produktion. Auch hier waren die OCR-Werte der hyperaktivierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen signifikant höher als die der konventionell aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 23, B). Die respiratorische Reservekapazität (*Spare Respiratory Capacity*) gibt an, inwieweit die Zellen auf Stressoren oder einen erhöhten Energiebedarf reagieren können. Dieser Wert ist somit ein Indikator für Zellfitness und metabolische Flexibilität. Auch hier zeigten die hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 65,9 ± 14,1 pmol/min/Zelle signifikant höhere Werte als konventionell aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 6,5 ± 2,8 pmol/min/Zelle (siehe Abbildung 23, C). Die maximale Respiration ist die maximale Atmungsrate, welche die Zellen nach der Zugabe von FCCP erreichen können. Die maximale Atmungsrate war bei hyperaktivierten T-Zellen mit 141,3 ± 21,2 pmol/min/Zelle signifikant höher als bei konventionell aktivierten T-Zellen (20,6 ± 3,7 pmol/min/Zelle) (Abbildung 23, D). Mit dem

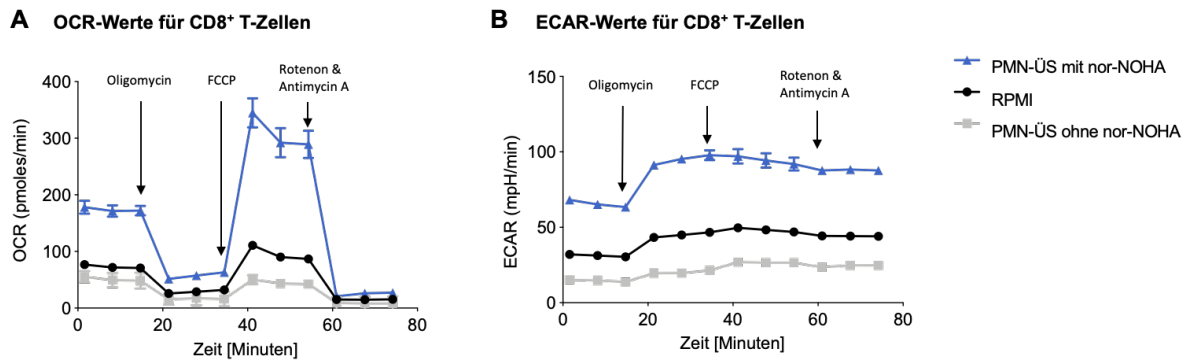
nichtmitochondrialen Sauerstoffverbrauch wird der Verbrauch an Sauerstoff angegeben, der auch nach der Zugabe von Rotenon und Antimycin A von der Zelle verbraucht wird, also nachdem die mitochondriale Atmungskette bereits komplett blockiert wurde. Bei diesem Parameter gab es bei allen drei Kultivierungsbedingungen keine signifikanten Unterschiede. Ebenso konnten keine Unterschiede in der Kupplungseffizienz (*Coupling Efficiency*) nachgewiesen werden. Die Kupplungseffizienz gibt den Anteil an der gesamten mitochondrialen Atmung an, der für die ATP-Produktion genutzt wird. Je niedriger das Protonen Leck ist, desto näher ist dieser Wert an 100 %. Das Protonen Leck gibt die verblieben Basalatmung an, die nicht zur ATP-Produktion verwendet wird (262).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA, unterscheiden sich nicht deutlich von konventionell in +Arg-RPMI-Medium kultivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren gemäß Standardprotokoll (siehe 5.2.2.4 *Allgemeiner Versuchsaufbau*) nach der Zellisolation ohne Aktivierung in huRPMI kultiviert worden, bevor sie in PMN-ÜS oder Medium mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert wurden. Um zu überprüfen, ob die 72-stündige Ruhezeit einen Effekt auf die metabolische Aktivität der T-Zellen haben könnte, wurde ebenfalls ein *Seahorse Mito Stress Test* mit frisch isolierten T-Zellen durchgeführt. Diese wurden am Tag der Isolation direkt in PMN-ÜS ± nor-NOHA eines anderen Spenders und in +Arg-RPMI-Medium mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Anschließend wurde der Versuch wie in 5.2.3.7 (*Messung des Energiemetabolismus mittels Agilent Seahorse*) durchgeführt.

Es zeigte sich bei den frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein vergleichbares Bild wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit den zunächst für 72 h inkubierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Lediglich die die Werte für die basalen ECAR-Werte waren jeweils in der Bedingung der konventionell aktivierten und in der Bedingung der hyperaktivierten T-Zellen etwas höher (Anhang Abbildung 2).

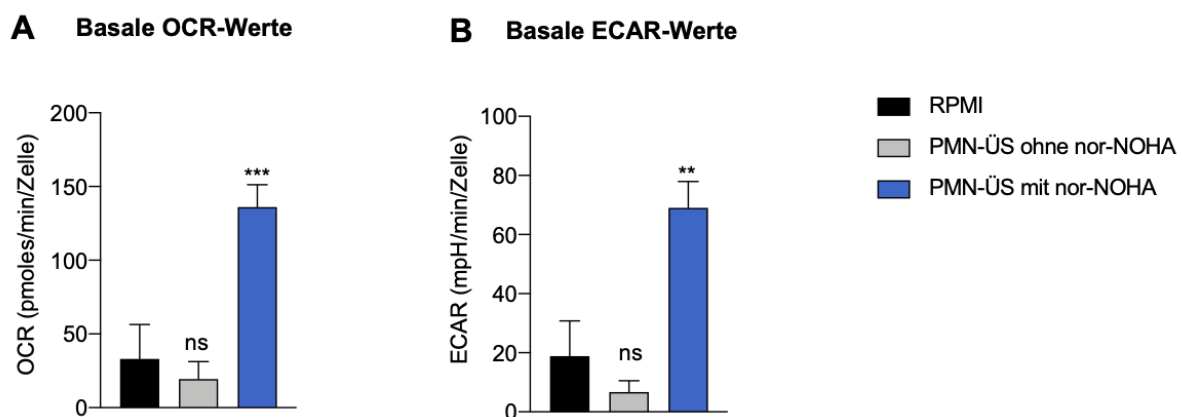
### **6.5.1.3 Energiemetabolismus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen – Mito Stress Test**

Auffallend war, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allen gemessenen Parametern deutlich höherer Werte aufwiesen. Die Endergebnisse unterschieden sich in Relation betrachtet in ihrer Aussage aber nicht stark von den der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen.



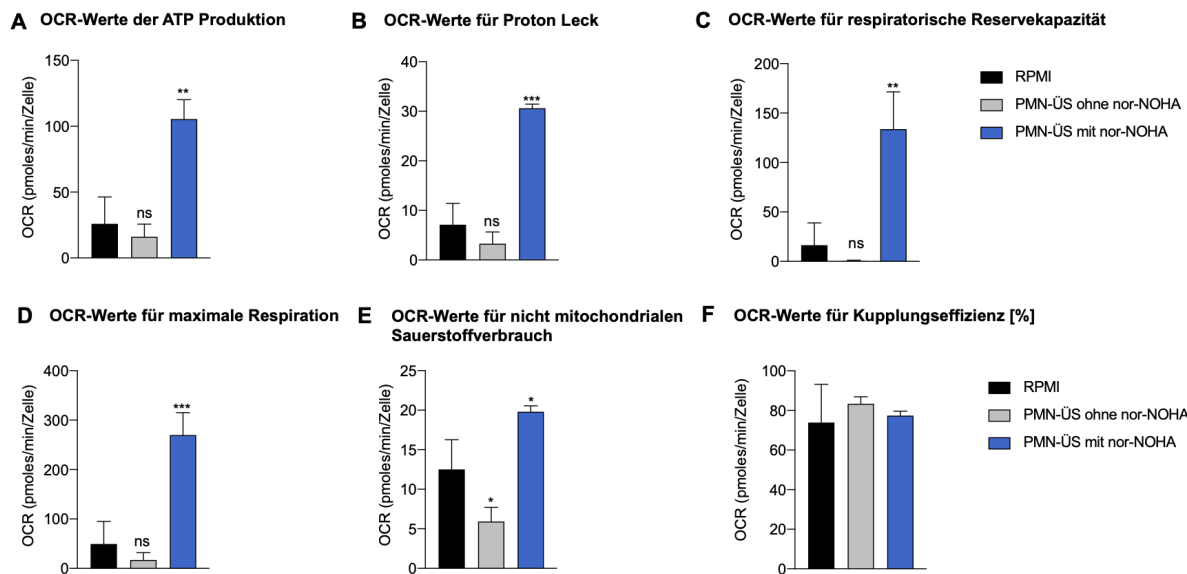
**Abbildung 24: OCR- und ECAR-Werte von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die (A) OCR-Werte und die (B) ECAR-Werte des *Agilent Seahorse XF Mito Stress Test* im Zeitverlauf. Jeweils markiert sind die Zugaben von Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A. (A) Zeigt die OCR-Werte, (B) die ECAR-Werte. Dargestellt sind jeweils die Kurven von n = 1 Experiment, repräsentativ für alle durchgeführten Experimente (n = 3).

In Abbildung 24 ist repräsentativ für alle Versuche eine OCR und ECAR-Kurve eines Versuchsdurchlaufes für CD8<sup>+</sup> T-Zellen abgebildet.



**Abbildung 25: Basale OCR- und ECAR-Werte der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Aufgereinigte CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert und anschließend die metabolische Aktivität mittels *Agilent Seahorse XF Mito Stress Test* gemessen. In (A) sind die basalen OCR-Werte für die CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation abgebildet, in (B) die basalen ECAR-Werte. Dargestellt sind die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollbedingung von konventionell in RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

In den basal gemessenen OCR-Werten für oxidative Phosphorylierung wurde eine signifikant höhere Aktivität der hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit  $136,1 \pm 15,2$  pmol/min/Zelle gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen mit  $33,0 \pm 23,4$  pmol/min/Zelle nachgewiesen. Der basale OCR-Wert von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden, lag bei  $19,3 \pm 11,9$  pmol/min/Zelle (Abbildung 25, A). Dies zeigte sich auch in den basalen Werten für die glykolytische Aktivität, mit einem signifikant höheren ECAR von  $69,0 \pm 9,0$  mpH/min/Zelle der hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu  $18,8 \pm 11,9$  mpH/min/Zelle bei den konventionell aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der basale ECAR-Wert von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden, lag bei  $6,7 \pm 3,9$  mpH/min/Zelle (Abbildung 25, B).



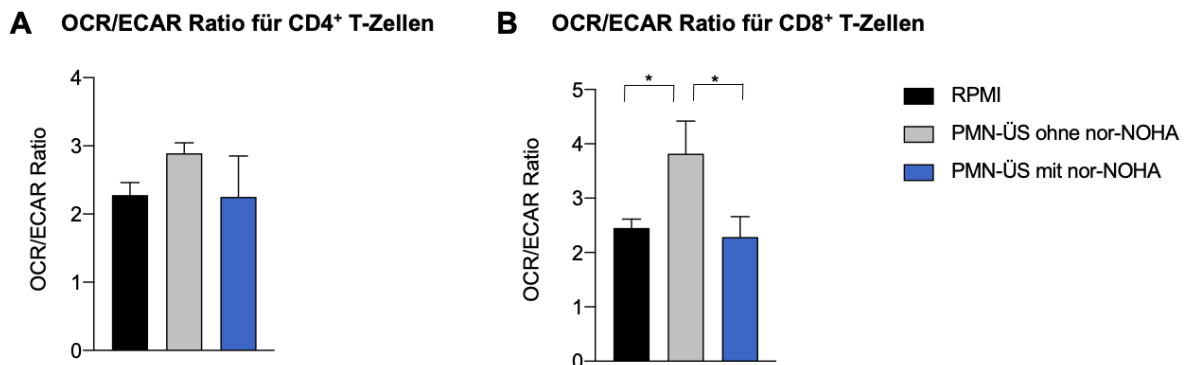
**Abbildung 26: Hyperaktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen stark erhöhte metabolische Aktivität.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert, für 48 h inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität mittels *Agilent Seahorse XF Mito Stress Test* gemessen. In (A) sind die OCR-Werte für ATP-Produktion, in (B) die OCR-Werte für das Protonen Leck (*Proton Leak*), in (C) die OCR-Werte für die respiratorische Reservekapazität (*Spare Respiratory Capacity*), in (D) die OCR-Werte für die Maximale Respiration, in (E) die OCR-Werte für den nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und in (F) die OCR-Werte für die Kupplungseffizienz (*Coupling Efficiency*) dargestellt. Dargestellt sind jeweils die zusammengefassten Ergebnisse (Mittelwert + Standardabweichung) von n = 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollbedingung von konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels *one-way ANOVA* (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

Signifikant höhere OCR-Werte der hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten auch in der ATP-Produktion (hyperaktiviert: 105,5 ± 14,8 pmol/min/Zelle, konventionell aktiviert: 25,9 ± 10,3 pmol/min/Zelle) (Abbildung 26, A), sowie bei der *Spare Respiratory Capacity* (133,7 ± 37,6 pmol/min/Zelle, konventionell aktiviert: 16,3 ± 22,6 pmol/min/Zelle) (Abbildung 26, C) und der maximalen Respiration (hyperaktiviert: 269,8 ± 45,4 pmol/min/Zelle, konventionell aktiviert: 49,3 ± 45,7 pmol/min/Zelle) (Abbildung 26, D) beobachtet werden. Der nichtmitochondriale Sauerstoffverbrauch hyperaktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen war mit 19,8 ± 0,8 pmol/min/Zelle ebenfalls signifikant höher als der von konventionell aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit 12,5 ± 3,8 pmol/min/Zelle. Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden, zeigten sich mit 5,9 ± 1,77 pmol/min/Zelle signifikant niedrigere Werte des nichtmitochondrialen Sauerstoffverbrauch als bei konventionell aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe 6.5.1.2 *Energiemetabolismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen - Mito Stress Test*) zeigten sich auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen in allen drei untersuchten Bedingungen vergleichbare Werte für die Kupplungseffizienz.

#### 6.5.1.4 Untersuchung der Präferenz der Art der Energiegewinnung mittels OCR/ECAR-Ratio

Werden die basalen Werte für OCR und ECAR ins Verhältnis gesetzt, und somit eine sogenannte OCR/ECAR-Ratio gebildet, kann bestimmt werden, welche Art der

Energiegewinnung bei einer Zelle präferentiell vorliegt. Je höher die OCR/ECAR-Ratio, desto eher wird die Energie der Zelle über oxidative Phosphorylierung bereitgestellt und je niedriger die Ratio, desto eher deckt die Zelle ihren Energiebedarf über Glykolyse.



**Abbildung 27: OCR/ECAR-Ratio für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Dargestellt ist der Quotient aus den basalen OCR-Werten und basalen ECAR-Werten für (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von n = 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*p<0,01; \*p<0,05).

Es konnten zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine relevanten Unterschiede in den OCR/ECAR-Ratios festgestellt werden. Was die Art der Energiegewinnung angeht, verhielten sich somit beide Subpopulationen gleich (Abbildung 27, A für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B für CD8<sup>+</sup> T-Zellen).

Auffallend war, wie zuvor beschrieben, dass hyperaktivierte T-Zellen beider Subpopulationen zwar in den basal gemessenen Werten sowohl bei den OCR-Werten als auch bei den ECAR-Werten jeweils signifikant höhere Werte aufwiesen als konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen. Im Verhältnis zwischen OXPHOS und Glykolyse verhielten sich hyperaktivierte T-Zellen nahezu gleich wie konventionell aktivierte T-Zellen. Konventionell aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen eine OCR/ECAR-Ratio von  $2,28 \pm 0,19$  auf, während die der hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei  $2,25 \pm 0,6$  lag. Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag die OCR/ECAR-Ratio der konventionell aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei  $2,45 \pm 0,16$  und die OCR/ECAR-Ratio der hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei  $2,28 \pm 0,38$ .

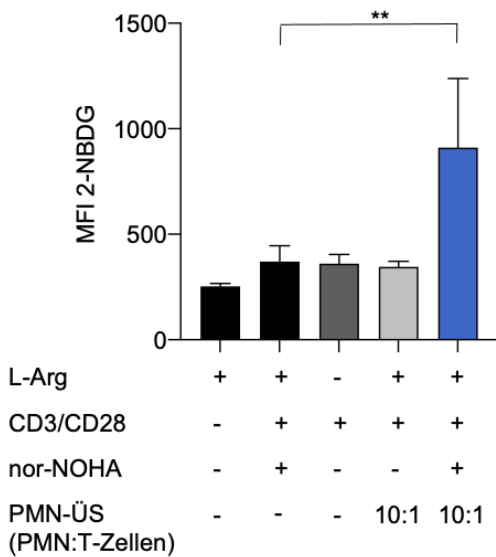
In der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation konnten tendenziell höhere Werte für die OCR/ECAR-Ratio mit  $2,89 \pm 0,15$  bei den T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA kultiviert wurden, gemessen werden. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen war der Wert der in PMN-ÜS ohne nor-NOHA kultivierten T-Zellen mit  $3,82 \pm 0,6$  sogar signifikant höher als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten und in PMN-ÜS mit nor-NOHA hyperaktivierten T-Zellen.

## 6.5.2 Untersuchung der Glukoseaufnahme hyperaktivierter T-Zellen

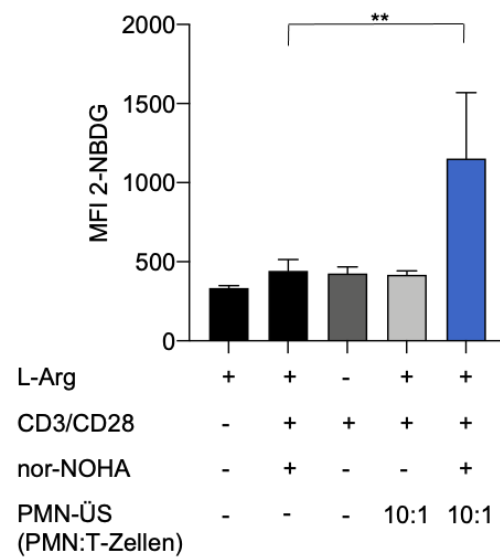
Als weiterer Parameter zur Darstellung metabolischer Aktivität von Zellen wurde die Glukoseaufnahme der T-Zellen nach der Inkubation in den unterschiedlichen Bedingungen untersucht.

Der Assay wurde wie in 5.2.3.6 (*Glukoseaufnahme*) beschrieben durchgeführt.

### A Glukoseaufnahmen CD4<sup>+</sup> T-Zellen



### B Glukoseaufnahmen CD8<sup>+</sup> T-Zellen



**Abbildung 28: Glukoseaufnahme in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert, für 48 h inkubiert, mit den Oberflächenantikörpern für CD4 und CD8 gefärbt und anschließend die Glukoseaufnahme mittels 2-NBDG durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind jeweils die 2-NBDG MFI Mittelwerte incl. Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Experimenten für (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,01; \*p<0,05).

Die in Abbildung 28 gezeigten Graphen zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des FITC-A Kanals, der gleichbedeutend mit der Aufnahme der 2-NBD-Glukose ist.

Die Glukoseaufnahme wurde 48 h nach Beginn der Aktivierung der Zellen mit anti-CD3/anti-CD28-Beads in den verschiedenen Bedingungen untersucht. In den einzelnen Bedingungen wurden aufgereinigte CD3<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert. In der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung wurden T-Zellen mittels CD4- und CD8-Oberflächenantikörper markiert und somit die beiden T-Zellsubpopulationen in der Durchflusszytometrie getrennt untersucht und separat ausgewertet.

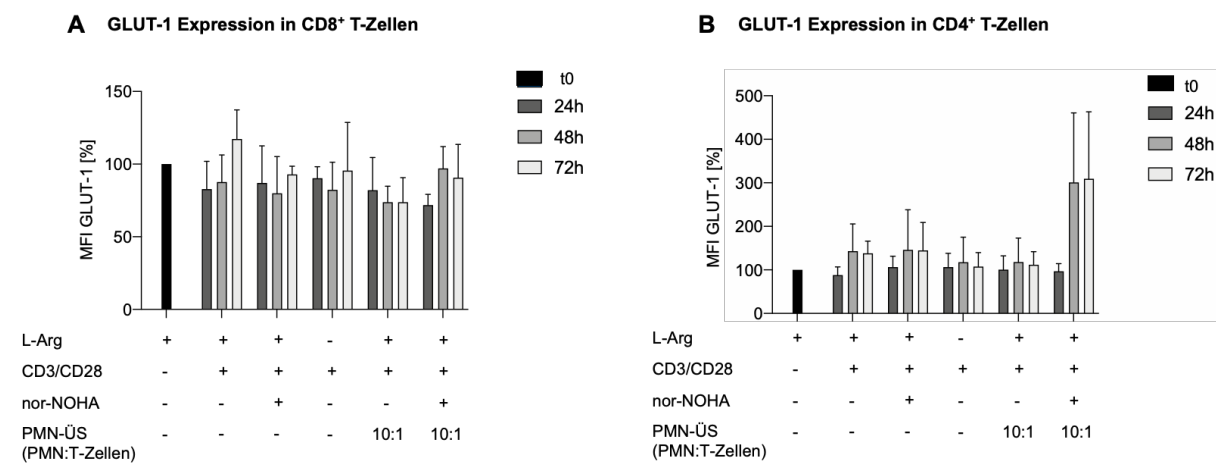
Unstimulierte T-Zellen zeigten mit einer MFI von 253,7 ± 13,3 (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 334,3 ± 15,0 (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) im Schnitt eine geringere Glukoseaufnahme als aktivierte T-Zellen. Die Glukoseaufnahme der T-Zellen in den Argininmangelbedingungen -Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS ohne nor-NOHA unterschieden sich mit 360,7 ± 44,3 (-Arg-RPMI-Medium CD4<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 426,3 ± 41,4 (-Arg-RPMI-Medium CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und 345,3 ± 27,2 (PMN-ÜS ohne nor-NOHA CD4<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 416,7 ± 25,7 (PMN-ÜS ohne nor-NOHA CD8<sup>+</sup> T-Zellen) innerhalb der einzelnen Subpopulationen nahezu nicht voneinander. Eine verstärkte Glukoseaufnahme im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen war bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen mit einem MFI von 370,3 ± 74,9 (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 410,8 ± 88,3 (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) zu erkennen. Signifikant erhöht zu konventionell aktivierten T-Zellen war die Glukose Aufnahme von in PMN-ÜS + nor-NOHA hyperaktivierten T-Zellen in beiden

Subpopulationen mit einer MFI von  $911 \pm 326,6$  bei  $CD4^+$  T-Zellen bzw. einer MFI von  $1152 \pm 416,6$  bei  $CD8^+$  T-Zellen.

### 6.5.3 Untersuchung der Expression von GLUT-1 auf T-Zellen

In diesem Versuch wurde als ein möglicher Parameter der Glukose-Aufnahme die GLUT-1 Expression auf T-Zellen in verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht.

Der Versuch wurde wie in 5.2.2.4 (*Allgemeiner Versuchsaufbau*) beschrieben angesetzt. Die Expression des GLUT-1 Transporters wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Aktivierung der T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (wie in 5.2.3.1 *Durchflusszytometrie* beschrieben). Die in den einzelnen Versuchen gemessene Expression von GLUT-1 (MFI) wurde jeweils auf die Expression des GLUT-1 Transporters zum Zeitpunkt vor der T-Zellaktivierung genormt. Die T-Zellen wurden mittels CD4- und CD8-Oberflächenantikörper markiert und somit konnten die beiden T-Zellsubpopulationen in der Durchflusszytometrie getrennt untersucht und separat ausgewertet werden.



**Abbildung 29: GLUT-1 Transporter Expression auf  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 24 h, 48 h und 72 h aktiviert und dann mit den Oberflächenantikörpern für CD8 (A), CD4 (B) und GLUT-1 gefärbt. Die Expression von GLUT-1 wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Die GLUT-1 Expressionen zum Ausgangszeitpunktzeitpunkt  $t = 0$  h (vor der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads) der einzelnen Versuche wurden jeweils auf 100 % gesetzt. Alle anderen MFI-Werte wurden darauf normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichungen der genormten GLUT-1 Expressionen von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels 2way ANOVA (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

In keiner der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, sowohl bei  $CD4^+$  als bei  $CD8^+$  T-Zellen, war über den betrachteten Zeitraum eine signifikante Hochregulation der GLUT-1 Expression gegenüber unaktivierten T-Zellen erkennbar (Abbildung 29, A und B).

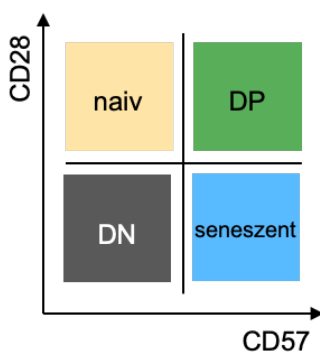
Bei  $CD4^+$  T-Zellen konnte im PMN-ÜS mit nor-NOHA 48 h bzw. 72 h nach Aktivierung eine tendenziell erhöhte GLUT-1 Expression nachgewiesen werden. Bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen war 48 h nach Aktivierung eine Expression von  $143,1 \pm 62,7$  % ( $p = 0,69$ ) des Ausgangswertes und 72 h nach Aktivierung eine Expression von  $137,9 \pm 28,1$  % ( $p = 0,33$ ) des Ausgangswertes messbar. Hyperaktivierte  $CD4^+$  T-Zellen im PMN-ÜS mit nor-NOHA zeigten zu diesen Zeitpunkten eine noch höhere GLUT-1 Expressionen als vor

der Aktivierung (nach 48 h:  $300,9 \pm 159,8$  % des Ausgangswertes ( $p = 0,36$ ) und nach 72 h:  $309,3 \pm 14,0$  % des Ausgangswertes ( $p = 0,33$ )).

## 6.6 Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf den Phänotyp der T-Zellen

### 6.6.1 Untersuchung der CD28/CD57 Expression auf T-Zellen

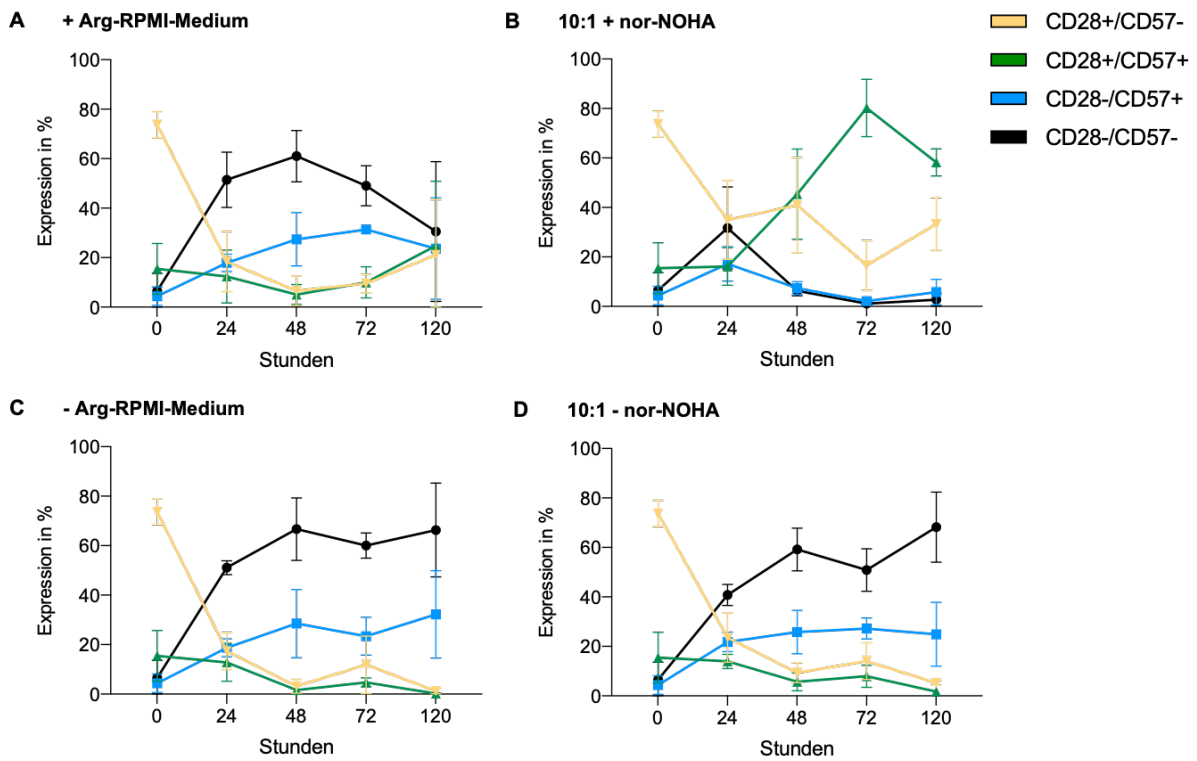
Anhand der Expression von CD28 und CD57 auf der Zelloberfläche können T-Zellen in die gut charakterisierten Subgruppen der naiven T-Zellen oder seneszenten T-Zellen unterteilt werden. CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen (in Abbildung 30 gelb) entsprechen dem naiven T-Zell Phänotyp, während CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen (in Abbildung 30 blau) dem seneszenten Phänotyp zuzuordnen sind. Zudem werden durch die Expression von CD28 und CD57 die CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> doppelt negativen T-Zellen (in Abbildung 30 schwarz, DN) und CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> doppelt positiven T-Zellen (in Abbildung 30 grün, DP) definiert, über deren detailliertere Charakterisierung und Abgrenzung zu den andern beiden Subpopulationen in der Literatur bislang weniger bekannt ist (263).



**Abbildung 30: Einteilung der T-Zellpopulation anhand der Expression von CD28 und CD57.** Hier dargestellt ist die Einteilung der T-Zellsubtypen anhand der Expression von CD28 und CD57. Demnach wird in naive T-Zellen CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> (gelb), in seneszenz T-Zellen CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (blau), in doppelt positive CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen (grün) und in doppelt negative CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen (schwarz) unterschieden.

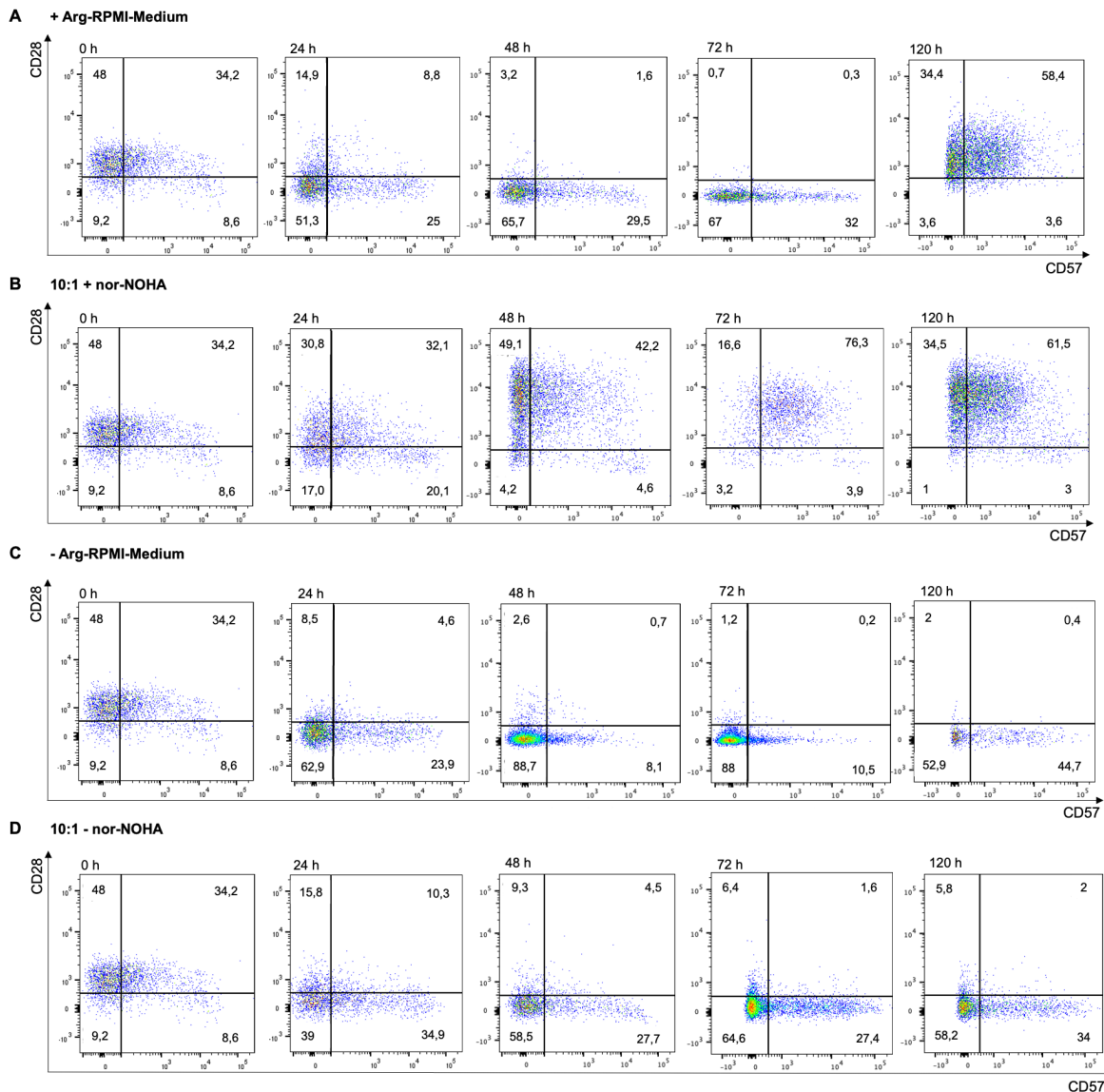
Der Versuchsaufbau wurde wie in 5.2.2.4. (*Allgemeiner Versuchsaufbau*) beschrieben durchgeführt. Die T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-Medium und PMN-ÜS mit und ohne nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28-Beads (5 µl pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach der Aktivierung wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe 5.2.3.1 *Durchflusszytometrie*) die Expression von CD28 und CD57 ermittelt. Die CD28/CD57 Expression wurde sowohl auf CD8<sup>+</sup> als auch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

### CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD28/CD57 Expression



**Abbildung 31: CD28/CD57 Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD28 und CD57. Dargestellt ist die CD28/CD57 Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 (für alle Bedingungen bei t0 -72 h), n = 4 (für +Arg-RPMI und 10:1 + nor-NOHA bei 120 h) und n = 2 (für -Arg-RPMI und 10:1 - nor-NOHA bei 120 h) unabhängigen Experimenten.

### CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD28/CD57 Expression



**Abbildung 32: CD28/CD57 Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD28 und CD57. Dargestellt ist die CD28 (x-Achse) und CD57 (y-Achse) Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme der Durchflusszytometrie zeigen die original Dotplots eines für dieses Experiments repräsentativen Spenders (n = 1).

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wiesen an Tag 0 einen überwiegend naiven Phänotyp auf:  $74,0 \pm 5,3\%$  der T-Zellen waren CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>. Nach der Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium verloren die CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Aktivierungsmarker CD28 und blieben zu einem großen Anteil doppelt negativ für CD28 und CD57. Der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen lag 24 h nach Aktivierung bei  $17,9 \pm 3,5\%$  und stieg nach 48 h auf  $27,4 \pm 10,8\%$  und nach 72 h auf  $31,4 \pm 1,9\%$  an. Erst 120 h nach der Aktivierung und Inkubation der T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium wiesen erneut über 40 % der T-Zellen eine Expression des Aktivierungsmarkers CD28 auf, wovon

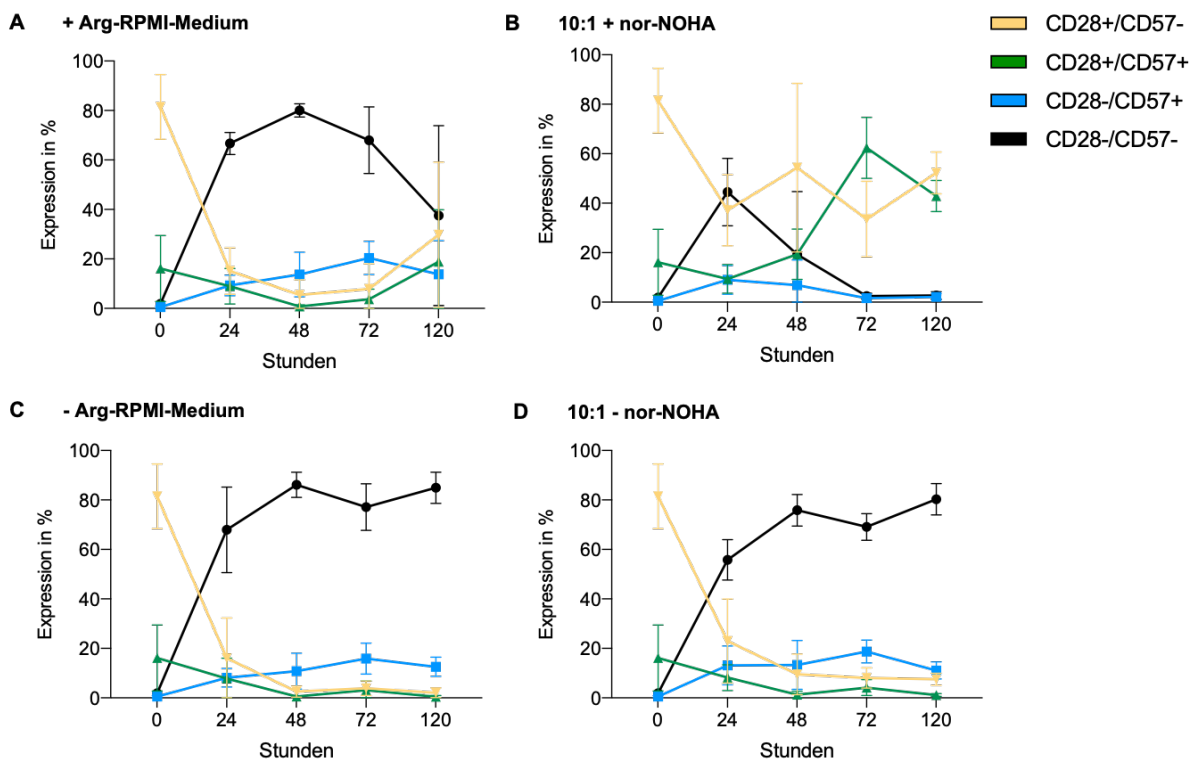
21,1 ± 22,3 % CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen entsprachen und 24,8 ± 26,1 % CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen waren. Der Anteil der seneszenten T-Zellen blieb bei 23,6 ± 20,5 % (Abbildung 31/32, A).

Die CD28/CD57 Expression von hyperaktivierten T-Zellen unterschied sich deutlich von T-Zellen, die in konventionellen +Arg-RPMI-Medium inkubiert wurden. 24 h nach der Aktivierung in PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA zeigte sich wie bei konventionell aktivierten T-Zellen, eine Reduktion der Expression des Aktivierungsmarker CD28. Bei der Messung 48 h nach Aktivierung konnte ein deutlicher Unterschied zu konventionell aktivierten T-Zellen gezeigt werden. Der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen lag bei 31,5 ± 27,1 %, der der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen bei 31,5 ± 16,5 % und der der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen bei 19,2 ± 16,32 %. Nach 72 h exprimierten über 90 % den Aktivierungsmarker CD28, zum Großteil mit Koexpression von CD57 (72,1 ± 12,0 %). Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen auf 5,3 ± 5,3 % gesunken. Zum Zeitpunkt 120 h nach Aktivierung lag die Expression von CD28 immer noch bei über 90 % der Zellen. Einen Anteil von 33,3 ± 10,6 % der Gesamtpopulation machten die CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen aus und ein Anteil von 58,2 ± 5,5 % entfiel auf die CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 31/32, B).

Erfolgte die Aktivierung der T-Zellen im - Arg-RPMI-Medium, war über den beobachteten Zeitraum keine erneute Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD28 zu erkennen. Die T-Zellen blieben überwiegend doppelt negativ für CD28 und CD57. Der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen nahm mit 28,5 ± 13,8 % 48 h nach Aktivierung auf 32,2 ± 17,7 % 120 h nach Aktivierung zu. Über die untersuchte Zeit war vor allem ein Anstieg der früh seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen auf 66,3 ± 19,0 % 120 h nach Aktivierung zu erkennen (Abbildung 31/32, C).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei T-Zellen, die in PMN-ÜS ohne 1 mM nor-NOHA aktiviert und inkubiert wurden. 24 h nach der Aktivierung zeigte sich hier allerdings noch ein ähnliches Expressionsmuster wie bei in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit nor-NOHA aktivierten T-Zellen. Im weiteren zeitlichen Verlauf blieben die T-Zellen aber weitgehend CD28 negativ. Auch der Anteil der seneszenten T-Zellen lag im zeitlichen Verlauf wie bei in -Arg-Medium kultivierten T-Zellen zwischen 20 und 30 %. Der Anteil der früh seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen stieg nach 48 h auf über 60 % an. (Abbildung 31/32, D).

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD28/CD57 Expression

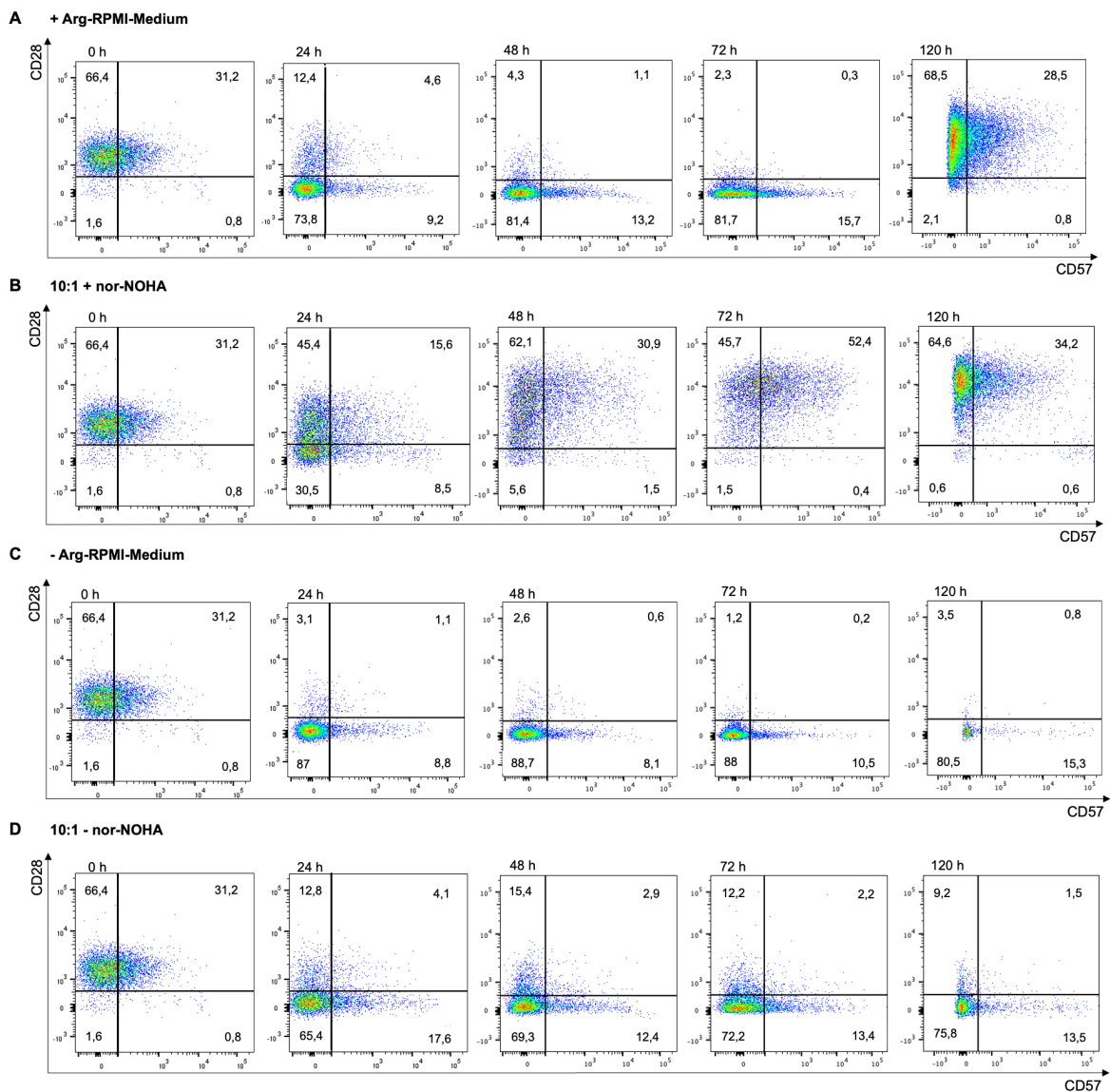


**Abbildung 33: CD28/CD57 Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD4, CD28 und CD57. Dargestellt ist die CD28/CD57 Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 (für alle Bedingungen bei t0 -72 h), n = 4 (für +Arg-RPMI und 10:1 + nor-NOHA bei 120 h) und n = 2 (für -Arg-RPMI und 10:1 - nor-NOHA bei 120 h) unabhängigen Experimenten.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vor der Aktivierung lag der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen bei  $81,5 \pm 13,1$  %. Auch hier konnten bei den konventionell in +Arg-RPMI-Medium kultivierten T-Zellen erst 120 h nach der Aktivierung nach passagerem Verlust eine erneute Hochregulation von CD28 beobachtet werden. Der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen lag nach 120 h bei  $29,8 \pm 29,4$  %, die CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen machten  $18,9 \pm 21,0$  % aus (Abbildung 33/34, A).

Auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA inkubiert wurden, verhielten sich ähnlich wie die CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül CD28 ging über den beobachteten Zeitraum nicht verloren. Nach 72 h war vor allem der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen hoch ( $62,4 \pm 12,4$  %). Nach 120 h lag der Anteil der CD28 positiven Zellen ebenfalls bei über 90 % (CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen:  $52,3 \pm 8,5$  %, CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen:  $42,9 \pm 6,3$  %) (Abbildung 33/34, B).

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD28/CD57 Expression

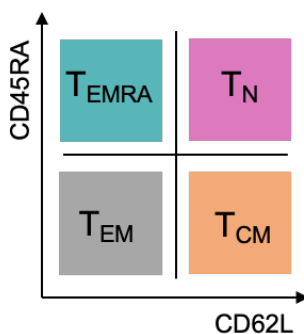


**Abbildung 34: CD28/CD57 Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD4, CD28 und CD57. Dargestellt ist die CD28 (x-Achse) und CD57 (y-Achse) Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme der Durchflusszytometrie zeigen die original Dotplots eines für dieses Experiments repräsentativen Spenders (n = 1).

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in - Arg-RPMI-Medium (Abbildung 33/34, C) oder PMN-ÜS ohne nor-NOHA (Abbildung 33/34, D) aktiviert wurden, zeigten nach der Aktivierung und dem Verlust von CD28 nahezu keine Re-Expression von CD28. Während nach 24 h der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen noch bei  $18,9 \pm 22,0$  % (-Arg-RPMI-Medium) sowie bei  $28,4 \pm 19,9$  % (PMN-ÜS ohne 1 mM nor-NOHA) lag, konnte im weiteren Verlauf keine Expression von CD28 mehr beobachtet werden. Der Anteil der seneszenten T-Zellen belief sich in beiden Kultivierungsbedingungen auf 10 und 20 %.

## 6.6.2 Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen

Die T-Zellpopulation, sowohl  $CD8^+$  als auch  $CD4^+$ , kann anhand ihres Phänotyps, das heißt durch die Expression verschiedener Zelloberflächenrezeptoren, in verschiedene Untergruppen unterteilt werden. Nach der Aktivierung der T-Zellen findet mit der darauffolgenden Proliferation eine Differenzierung der T-Zellen in diese unterschiedlichen phänotypischen Subpopulationen statt. Anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CD62L lassen sich folgende Untergruppen einteilen: Naive T-Zellen (TN)  $CD45RA^+CD62L^+$  (in Abbildung 35 lila), zentrale Gedächtniszellen (TCM)  $CD45RA^-CD62L^+$  (in Abbildung 35 orange), Effektorgedächtniszellen (TEM)  $CD45RA^-CD62L^-$  (in Abbildung 35 grau) und spät differenzierte Effektorgedächtniszellen (TEMRA)  $CD45RA^+CD62L^-$  (in Abbildung 35 türkis).

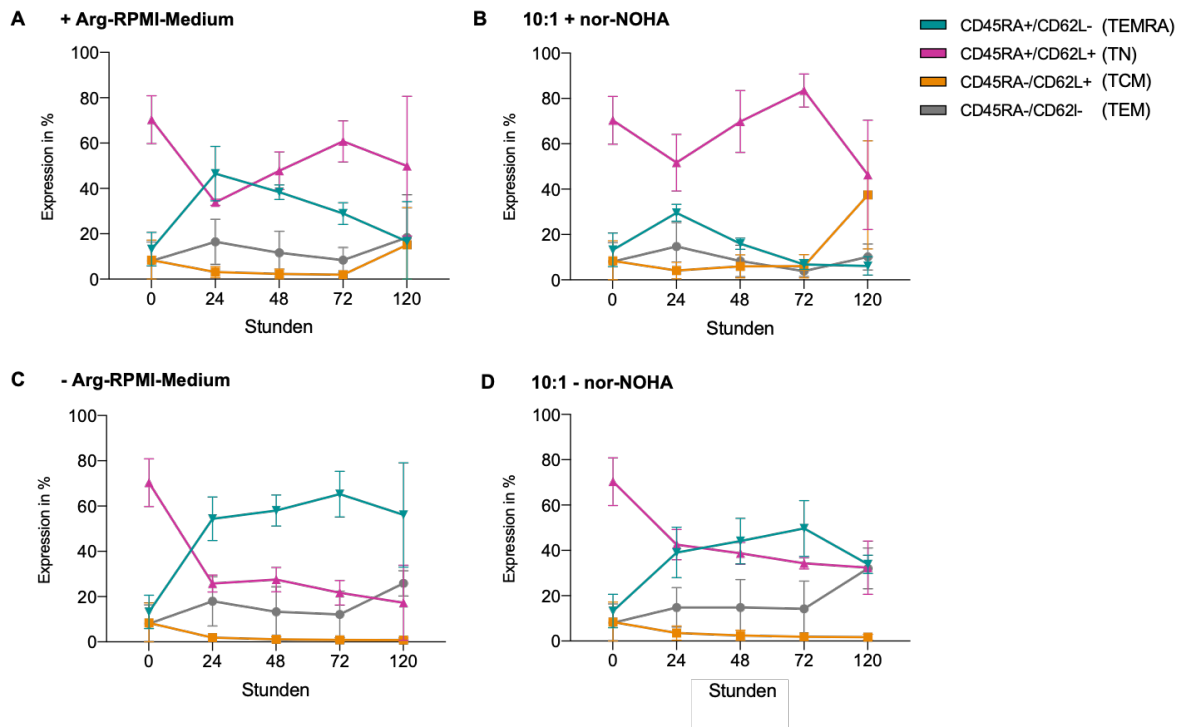


**Abbildung 35: Einteilung der T-Zellphänotypen in Subtypen anhand der Expression von CD45RA und CD62L.** Hier dargestellt ist die Einteilung der T-Zell Subtypen anhand der Expression von CD45RA und CD62L. Demnach wird in naive T-Zellen (TN)  $CD45RA^+CD62L^+$  (lila), zentrale Gedächtniszellen (TCM)  $CD45RA^-CD62L^+$  (orange), Effektorgedächtniszellen (TEM)  $CD45RA^-CD62L^-$  (grau) und spät differenzierte Effektorgedächtniszellen (TEMRA)  $CD45RA^+CD62L^-$  (türkis) unterschieden.

Die T-Zellen wurden wieder in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS mit und ohne nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28-Beads (5  $\mu$ l pro  $1 \times 10^6$  T-Zellen) aktiviert. An Tag 0 vor der Aktivierung sowie 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression von CD45RA und CD62L ermittelt. Die CD45RA/CD62L Expression wurde sowohl in  $CD8^+$  als auch in  $CD4^+$  T-Zellen untersucht.

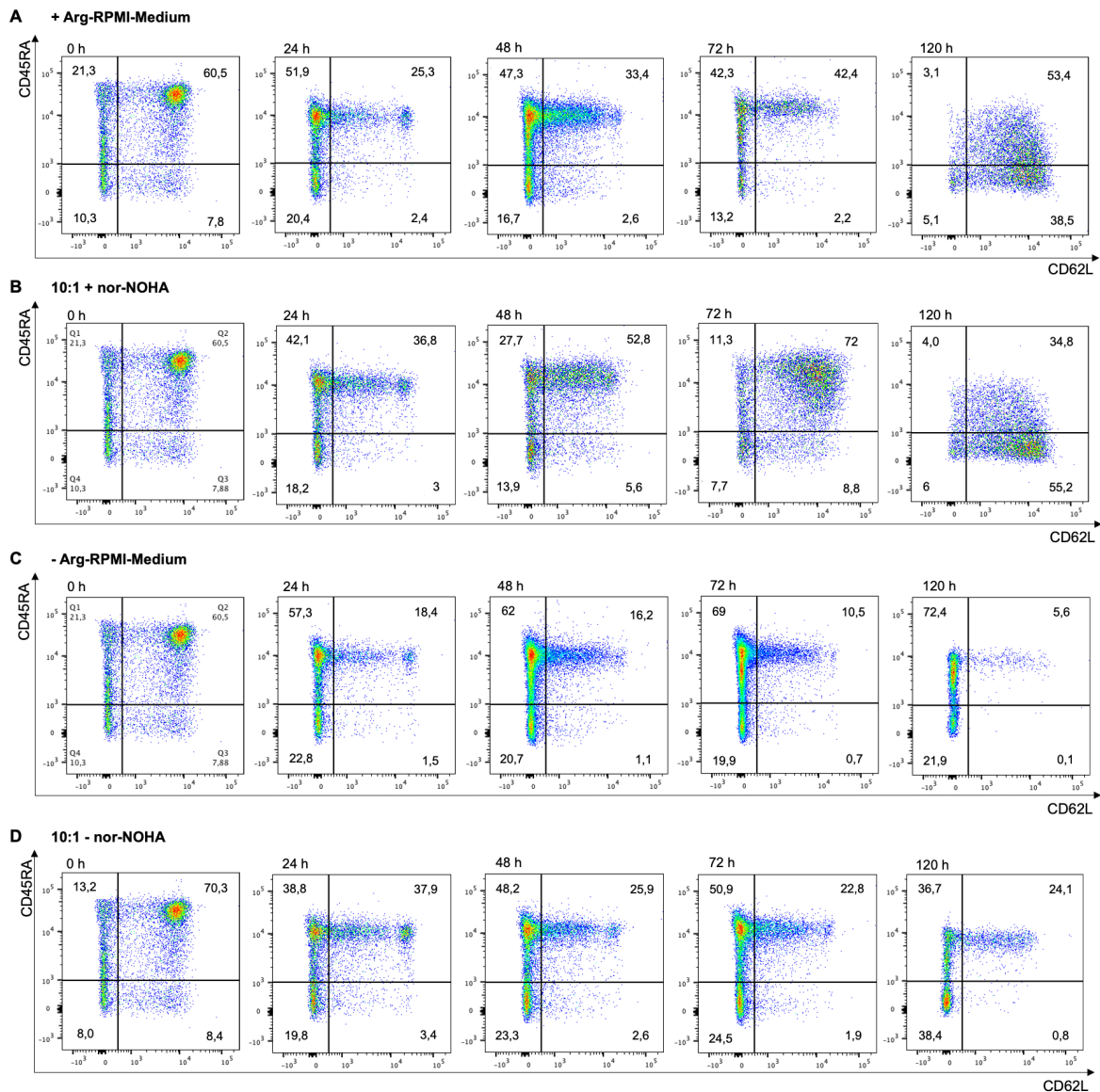
$CD8^+$  T-Zellen wiesen mit  $70,3 \pm 10,5$  % an Tag 0 einen überwiegend naiven Phänotyp auf. 24 h nach Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium lag der Anteil von TN bei  $33,9 \pm 1,3$  % und der Anteil von TEMRA bei  $46,5 \pm 12,0$  %. Im Verlauf bis 72 h nach Aktivierung stieg der Anteil der TN auf  $60,8 \pm 9,0$  %. Der Anteil an TCM blieb bis 72 h nach Aktivierung bei 1-3 %. 120 h nach der Aktivierung stieg der Anteil der TCM auf  $15,2 \pm 16,4$  % an, der Anteil an TN blieb bei  $49,8 \pm 30,8$  %, der Anteil der TEM stieg auf  $18,4 \pm 19,0$  % an und der Anteil der TEMRA blieb bei  $16,6 \pm 17,6$  % (Abbildung 36/37, A).

### CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD45RA/CD62L Expression



**Abbildung 36: CD45RA/CD62L Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in ± Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1) ± nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD62L und CD45RA. Dargestellt ist die CD45RA/CD62L Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 (für alle Bedingungen bei t0 -72 h), n = 4 (für +Arg-RPMI und 10:1 + nor-NOHA bei 120 h) und n = 2 (für -Arg-RPMI und 10:1 - nor-NOHA bei 120 h) unabhängigen Experimenten.

### CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD45RA/CD62L Expression



**Abbildung 37: CD45RA/CD62L Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD62L und CD45RA. Dargestellt ist die CD45RA (x-Achse) und CD62L (y-Achse) Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme der Durchflusszytometrie zeigen die original Dotplots eines für dieses Experiments repräsentativen Spenders (n = 1).

Bei der Hyperaktivierung der T-Zellen in PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA war eine deutlich andere Verteilung der Differenzierung in die verschiedenen Phänotypen festzustellen. Bereits nach 48 h Inkubation erreichten die hyperaktivierten T-Zellen mit  $69,8 \pm 13,6$  % einen nahezu identischen Anteil an TN wie am Ausgangstag 0 h. Nach 72 h war der Anteil der TEMRA bei knapp 10 %, wohingegen die TN  $83,5 \pm 7,3$  % ausmachten. Nach 120 h war der Anteil der TCM nicht nur viermal so hoch wie vor der Aktivierung, sondern mit  $37,5 \pm 23,8$  % sogar doppelt so hoch als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Der Anteil

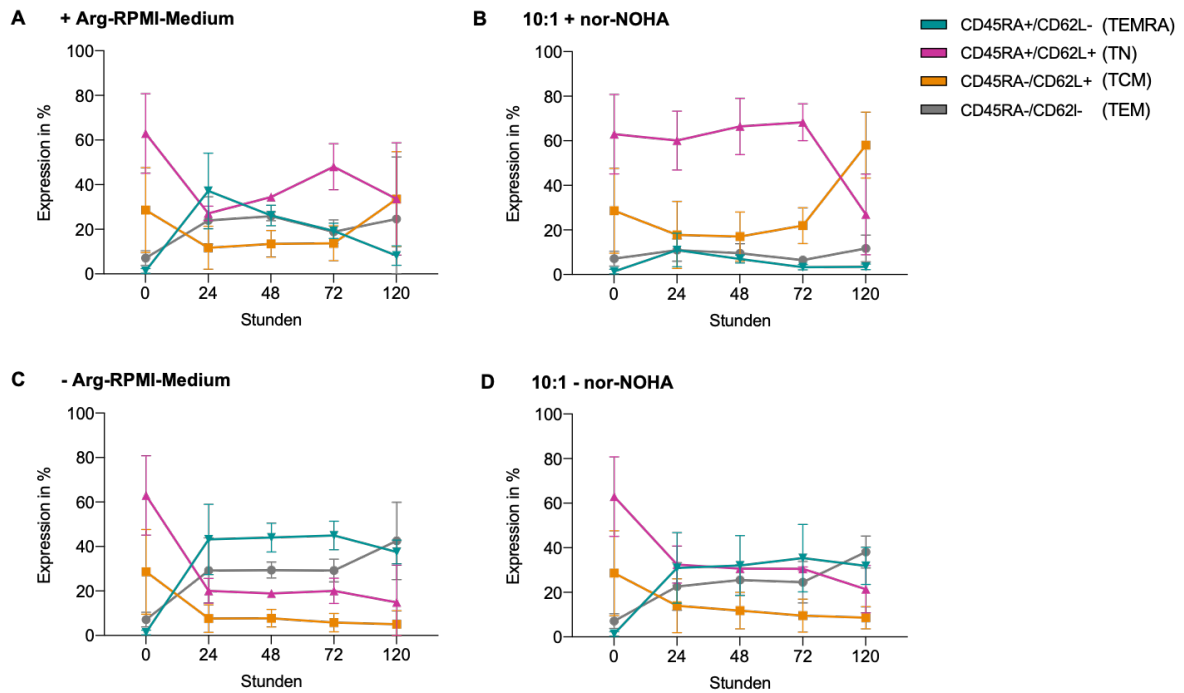
der TN blieb mit  $46,8 \pm 24,0$  % in etwa ähnlich zu konventionell aktivierten T-Zellen (Abbildung 36/37, B).

Die CD8<sup>+</sup>-Zellen aktiviert in -Arg-RPMI-Medium zeigten über die Zeit eine Abnahme der naiven T-Zellen auf  $17,3 \pm 16,6$  % nach 120 h. Eine Differenzierung zu TCM war im -Arg-RPMI-Medium nicht zu beobachten. Ein großer Anteil der T-Zellen blieb CD62L negativ (nach 120 h TEM:  $25,9 \pm 5,6$  %, TEMRA:  $56,1 \pm 23,1$  %) (Abbildung 36/37, C).

Bei der Aktivierung der CD8<sup>+</sup> Zellen in PMN-ÜS ohne nor-NOHA fiel der Anteil der TN auf  $32,4 \pm 11,7$  % nach 120 h ab. Wie bereits im - Arg-RPMI-Medium war der Anteil der TCM im PMN-ÜS ohne nor-NOHA mit  $1,7 \pm 1,3$  % sehr gering. Auch hier war eine deutliche Zunahme der CD62L negativen Subgruppen zu beobachten (nach 120 h TEM:  $32,1 \pm 9,0$  %, TEMRA:  $33,9 \pm 4,0$  %) (Abbildung 36/37, D).

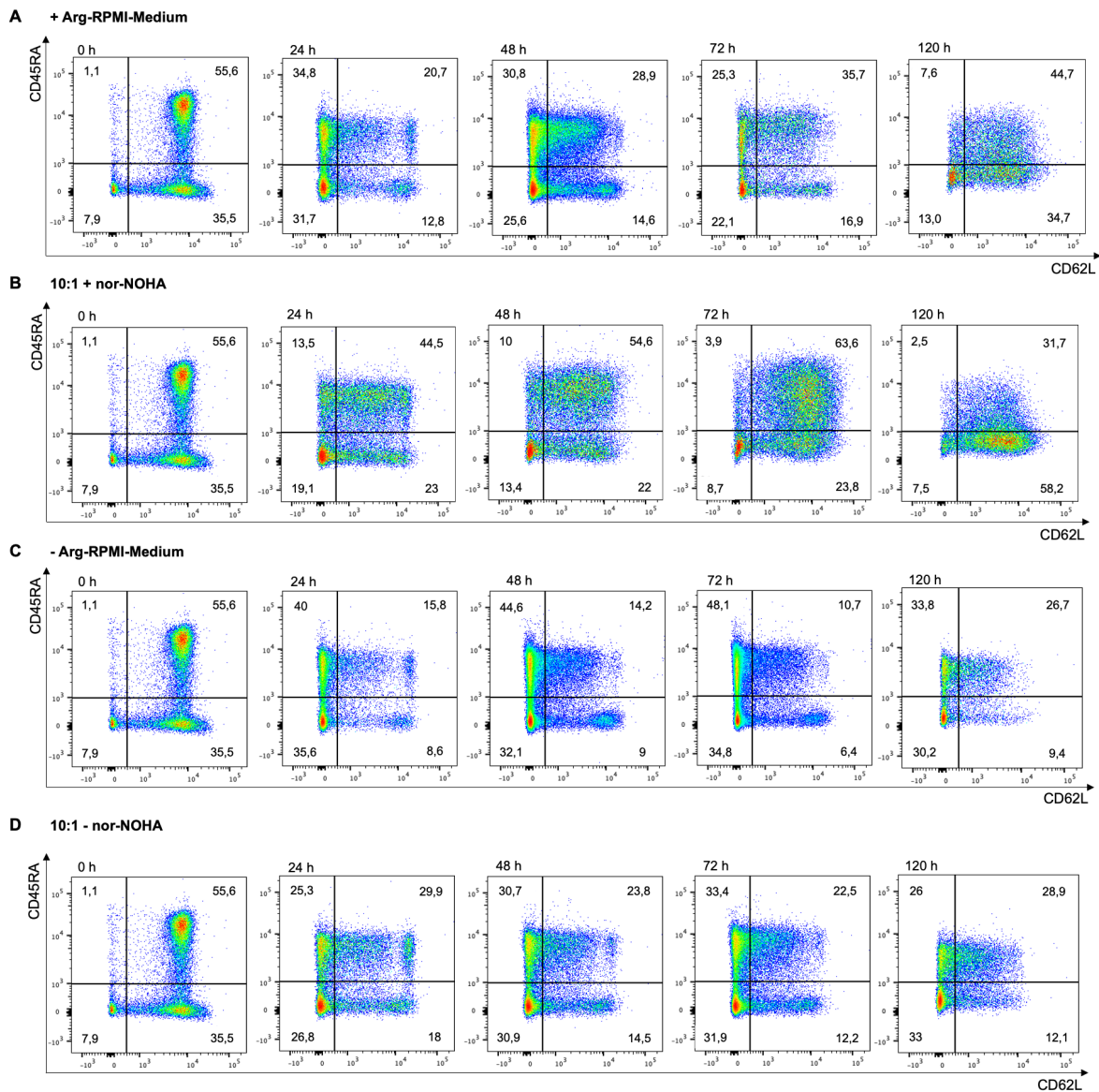
Bei der Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen fiel auf, dass in dieser Subgruppe zum Zeitpunkt vor der Aktivierung der Anteil der TCM bereits höher war als bei CD8<sup>+</sup> ( $28,6 \pm 19,1$  %). Der Anteil der TN lag bei  $66,0 \pm 17,8$  %. Nach der konventionellen Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium erreichte der Anteil der TN nach 24 h  $27,2 \pm 3,3$  % und nach 72 h mit  $48,0 \pm 10,3$  % seinen höchsten Wert, welcher aber unter dem Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t = 0$  h blieb. Nach 120 h war der Anteil der TN bei  $33,6 \pm 25,2$  % und somit gleich dem Anteil der TCM, der bei  $33,5 \pm 21,3$  % lag. Der Anteil von TEM blieb nach der Aktivierung mit ca. 20 % nahezu konstant, während der Anteil der TEMRA von  $37,2 \pm 17,0$  % nach 24 h auf  $8,2 \pm 4,3$  % nach 120 h abnahm (Abbildung 38/39, A).

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD45RA/CD62L Expression



**Abbildung 38: CD45RA/CD62L Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD62L und CD45RA. Dargestellt ist die CD45RA/CD62L Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 (für alle Bedingungen bei t0 -72 h), n = 4 (für +Arg-RPMI und 10:1 + nor-NOHA bei 120 h) und n = 2 (für -Arg-RPMI und 10:1 - nor-NOHA bei 120 h) unabhängigen Experimenten.

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD45RA/CD62L Expression



**Abbildung 39: CD45RA/CD62L Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Aktivierung in  $\pm$  Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (PMN:T Ratio 10:1)  $\pm$  nor-NOHA.** T-Zellen wurden isoliert und in (A) + Arg-RPMI-Medium, (B) PMN-ÜS (10:1) mit 1 mM nor-NOHA, (C) - Arg-RPMI-Medium sowie (D) PMN-ÜS (10:1) ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD4, CD62L und CD45RA. Dargestellt ist die CD45RA (x-Achse) und CD62L (y-Achse) Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in den unterschiedlichen Bedingungen, in zeitlicher Abfolge. Die Diagramme der Durchflusszytometrie zeigen die original Dotplots eines für dieses Experiments repräsentativen Spenders (n = 1).

Bei hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition war bereits 24 h nach der Aktivierung und somit deutlich früher als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen, ein ähnliches Verteilungsmuster der T-Zell Phänotypen wie zum Zeitpunkt t = 0 h vor der Aktivierung zu erkennen. Dieses hielt sich konstant auch bei den beobachteten Zeitpunkten 48 h und 72 h nach Aktivierung. 120 h nach der Aktivierung machten TCM einen Anteil von 58,1  $\pm$  14,8 % aus. Der Anteil der TCM war somit bei in PMN-ÜS hyperaktivierten T-Zellen um 25 % höher als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen (Abbildung 38/39, B).

Bei der Inkubation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in -Arg-RPMI-Medium konnte wie auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen nahezu keine Differenzierung in TCM beobachtet werden. Nach der Aktivierung lag der Anteil der TN bei ca. 20 %, der Anteil der TEMRA bei rund 40 % und der Anteil der TEM zwischen 30 und 40 %. Diese Verteilung der Phänotypen blieb über den beobachteten Zeitraum von 120 h nahezu konstant (Abbildung 38/39, C).

Bei der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PMN-ÜS ohne nor-NOHA war der Anteil an TN mit ca. 30 % 72 h nach Aktivierung und ca. 20 % 120 h nach Aktivierung etwas höher als bei T-Zellen, die in -Arg-RPMI-Medium aktiviert wurden. Der Anteil an TCM blieb hier aber ebenfalls niedrig und fiel von  $13,8 \pm 12,1$  % 24 h nach der Aktivierung auf  $8,6 \pm 4,9$  % 120 h nach der Aktivierung ab. Auch in dieser Kultivierungsbedingung war somit keine Differenzierung in den TCM-Phänotypen zu erkennen (Abbildung 38/39, D).

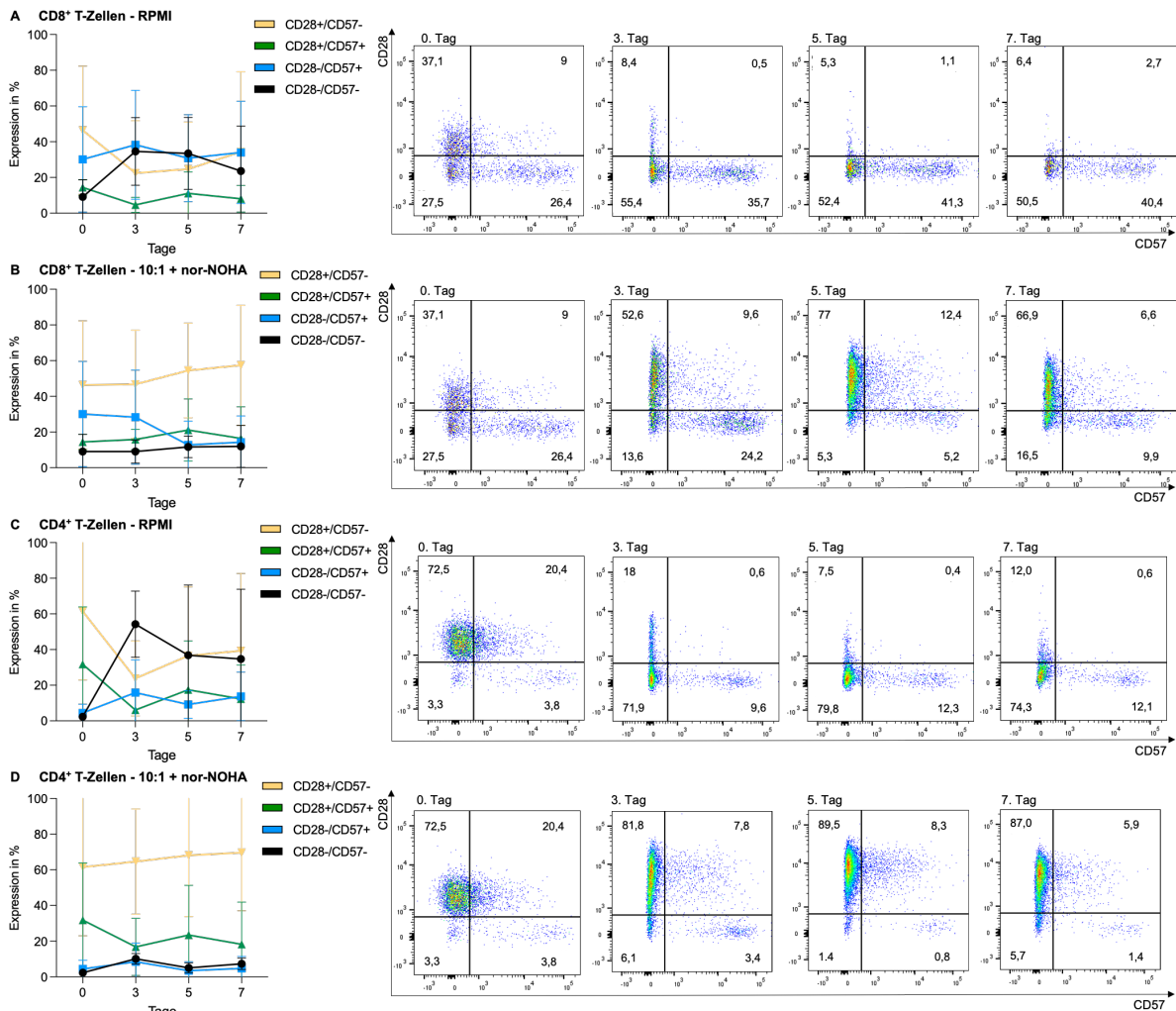
### **6.6.3 Untersuchung der T-Zellphänotypen von Patienten mit Multiplem Myelom**

#### **6.6.3.1 Untersuchung der CD28/CD57 Expression auf T-Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark**

Die Expression der Oberflächenmarker CD28 und CD57 wurde ebenfalls in T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom untersucht. In diesen Experimenten wurde im zeitlichen Verlauf beobachtet, wie sich die Anteile der seneszenten und naiven T-Zellen bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen von T-Zellen unterscheiden, die in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition hyperaktiviert wurden. Bereits bei T-Zellen von gesunden Spendern konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden (siehe 6.6 *Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf den Phänotypen der T-Zellen*). Es ist bekannt, dass T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom im Vergleich zu T-Zellen von gesunden Blutspendern verstärkt Erschöpfungs- und Seneszenzmarker exprimieren und sich nach der Aktivierung weniger stark vermehren (264). Es konnte bereits gezeigt werden, dass T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom durch Aktivierung in PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA deutlich stärker proliferieren als die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen, welche nahezu keine Proliferation zeigten (260).

Es wurden T-Zellen sowohl aus dem peripheren Blut, sowie dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert und nach Standardprotokoll in huRPMI für 72 kultiviert. Die T-Zellen wurden anschließend in +Arg-RPMI-Medium und in dem jeweiligen PMN-ÜS + 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28-Beads aktiviert. An Tag 0 vor der Aktivierung sowie an Tag 3, an Tag 5 und 7 Tage nach Beginn der Aktivierung wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression von CD28 und CD57 jeweils in CD8<sup>+</sup> und in CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt.

### Periphere Blut T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom: CD28/CD57 Expression



**Abbildung 40: T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom: CD28/CD57 Expression auf CD8<sup>+</sup> (A, B) und CD4<sup>+</sup> (C, D) T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert und anschließend in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, am 3. Tag, am 5. Tag und am 7. Tag nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD4, CD28 und CD57. (A) CD28/CD57-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, (B) CD28/CD57-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA, (C) CD28/CD57-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge und (D) CD28/CD57-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Durchflusszytometrie zeigt die Original Dotplots eines für dieses Experiment repräsentativen Spenders (n = 1).

An Tag 0 lag der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> naiven T-Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut bei  $46,4 \pm 35,9$  %. Der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen lag bei  $30,1 \pm 29,5$  %. Nach der Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium sank der Anteil der naiven CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen auf  $22,4 \pm 29,3$  % am 3. Tag und  $34,3 \pm 44,8$  % am 7. Tag ab. Der Anteil der seneszenten T-Zellen blieb über die sieben Tage nach Aktivierung wie zu Beginn bei rund 30 % (Abbildung 40, A). Wurden die T-Zellen der Myelom-Patienten jedoch in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition hyperaktiviert und inkubiert, war bereits am 3. Tag nach der Aktivierung ein Anteil der naiven T-Zellen von  $46,8 \pm 30,4$  % wie an Tag 0 vorhanden. Dieser stieg bis an Tag 7 auf  $57,4 \pm 33,6$  % an. Der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen sank im zeitlichen

Verlauf ab und betrug am 7. Tag nur noch  $14,6 \pm 14,7$  %. Der Anteil von  $CD28^+CD57^+$  T-Zellen lag bei  $15,8 \pm 5,8$  % an Tag 3, bei  $21,1 \pm 17,4$  % an Tag 5 und bei  $16,4 \pm 17,8$  % an Tag 7 und somit zu allen Zeitpunkten fast doppelt so hoch wie bei konventionell aktivierten T-Zellen (Abbildung 40, B). Ähnliches konnte bei  $CD4^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom festgestellt werden. Der Anteil der naiven  $CD28^+CD57^-$  T-Zellen lag an Tag 0 bei  $61,5 \pm 38,5$  % und der der seneszenten  $CD28^-CD57^+$  T-Zellen bei  $4,4 \pm 4,9$  %. Bei der Aktivierung der  $CD4^+$  T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium war der Anteil der seneszenten  $CD28^-CD57^+$  T-Zellen nach sieben Tagen auf  $13,7 \pm 13,7$  % gestiegen, während der Anteil der naiven  $CD28^+CD57^-$  T-Zellen über die sieben Tage auf  $39,3 \pm 43,4$  % absank (Abbildung 40, C). T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA hyperaktiviert und über sieben Tage inkubiert wurden, erreichten wie die  $CD8^+$  T-Zellen, nach drei Tagen einen Anteil naiver  $CD28^+CD57^-$  T-Zellen wie zu Beginn zum Zeitpunkt  $t = 0$  h. Der Anteil der seneszenten  $CD28^-CD57^+$  T-Zellen stieg nicht wie bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen an, sondern blieb im Verlauf nach sieben Tagen konstant niedrig bei  $4,8 \pm 6,7$  % (Abbildung 40, D).

#### Knochenmark T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom: CD28/CD57 Expression

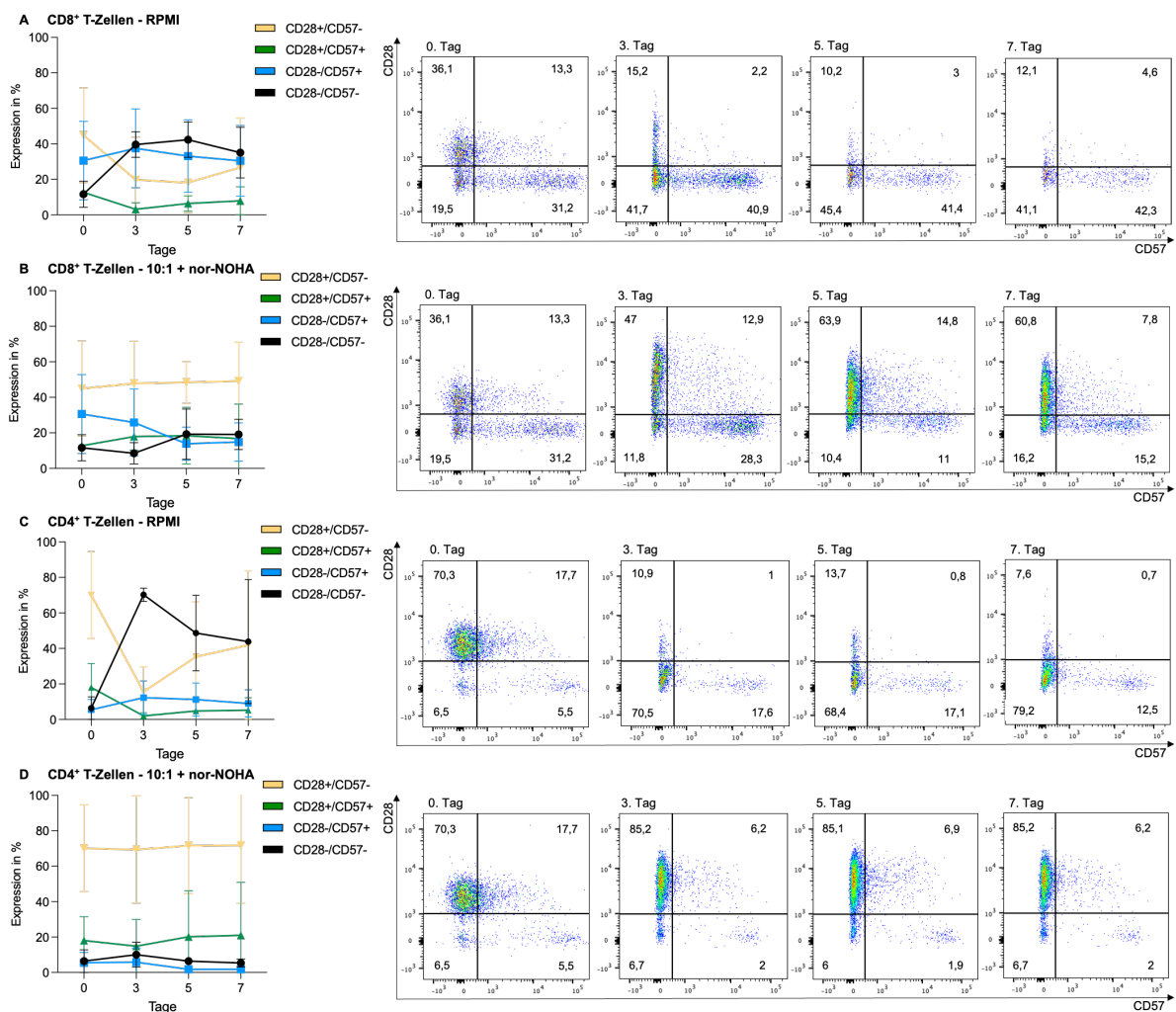


Abbildung 41: T-Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiple Myelom: CD28/CD57 Expression auf  $CD8^+$  (A, B) und  $CD4^+$  (C, D) T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA.

T-Zellen wurden aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert und anschließend in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, am 3. Tag, am 5. Tag und am 7. Tag nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD4, CD28 und CD57. **(A)** CD28/CD57-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, **(B)** CD28/CD57-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA, **(C)** CD28/CD57-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge und **(D)** CD28/CD57-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Durchflusszytometrie zeigt die Original Dotplots eines für dieses Experiment repräsentativen Spenders (n = 1).

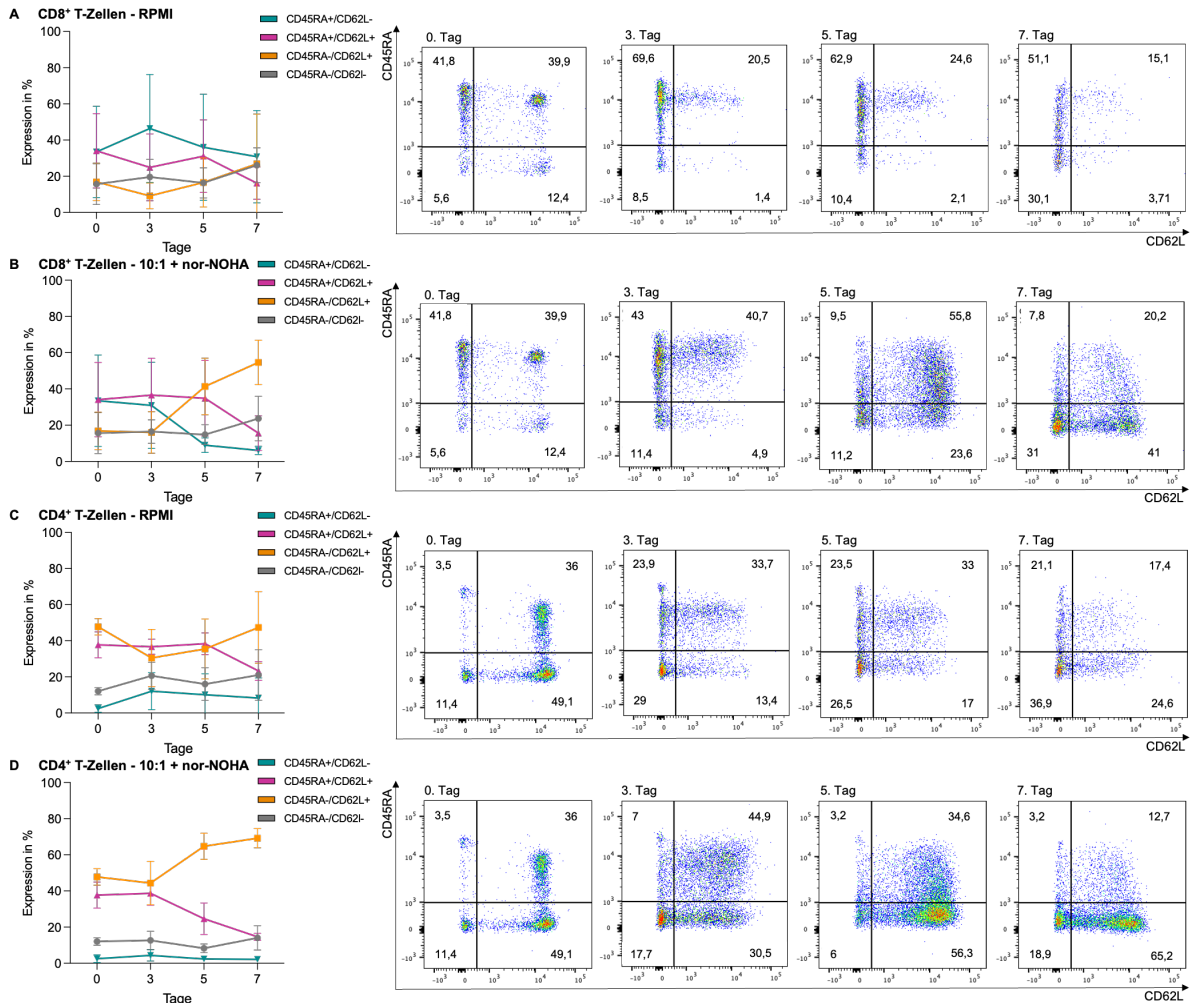
Die T-Zellen, die direkt aus dem Knochenmark der Myelom-Patienten isoliert wurden, zeigten zum Ausgangszeitpunkt ähnliche Anteile an CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> und CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen, wie Zellen aus dem peripheren Blut. Auch hier blieb bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen über die sieben Tage nach der konventionellen Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium bei rund 30 %, während der Anteil der naiven CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen von 44,9 ± 26,7 % auf 26,7 ± 27,8 % sank (Abbildung 41, A). Bei der Aktivierung der Knochenmark T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA waren bereits drei Tage nach der Aktivierung ähnliche CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> und CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellanteile wie an Tag 0 messbar. Der Anteil an naiven CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen blieb mit 49,2 ± 21,06 % sieben Tage nach Aktivierung nahezu unverändert zum Ausgangswert und der Anteil an seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen halbierte sich und lag an Tag 7 nur noch bei 14,9 ± 10,7 % (Abbildung 41, B).

Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Knochenmark zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Anteil der naiven T-Zellen lag zu Beginn bei 70,1 ± 24,6 %. Bei der konventionellen Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium stieg der zuvor abgefallene Anteil der naiven CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen an Tag sieben wieder auf 41,9 ± 41,9 %. Der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen lag zu diesem Zeitpunkt bei 9,0 ± 7,6 % (Abbildung 41, C). Bei der Hyperaktivierung in PMN-ÜS mit nor-NOHA zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls bereits nach drei Tagen eine Phänotypverteilung wie zu Beginn. Diese blieb bis Tag 7 nach der Aktivierung erhalten. Der Anteil der naiven T-Zellen blieb bei 71,8 ± 32,8 %, der Anteil der seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen fiel auf 1,8 ± 1,6 %, und der Anteil der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen stieg auf 21,0 ± 30,0 % (Abbildung 41, D).

### **6.6.3.2 Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark**

Im Folgenden wurde die Auswirkung des PMN-ÜS auf die Verteilung der T-Zellphänotypen in T-Zellen (aus dem peripheren Blut und Knochenmark) von Myelom-Patienten untersucht. Durch die Expression von CD45RA und CD62L können T-Zellen phänotypisch in verschiedene Subgruppen unterteilt werden. Bereits bei T-Zellen von gesunden Spendern konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden (siehe 6.6.2 *Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen*).

### Periphere Blut T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression



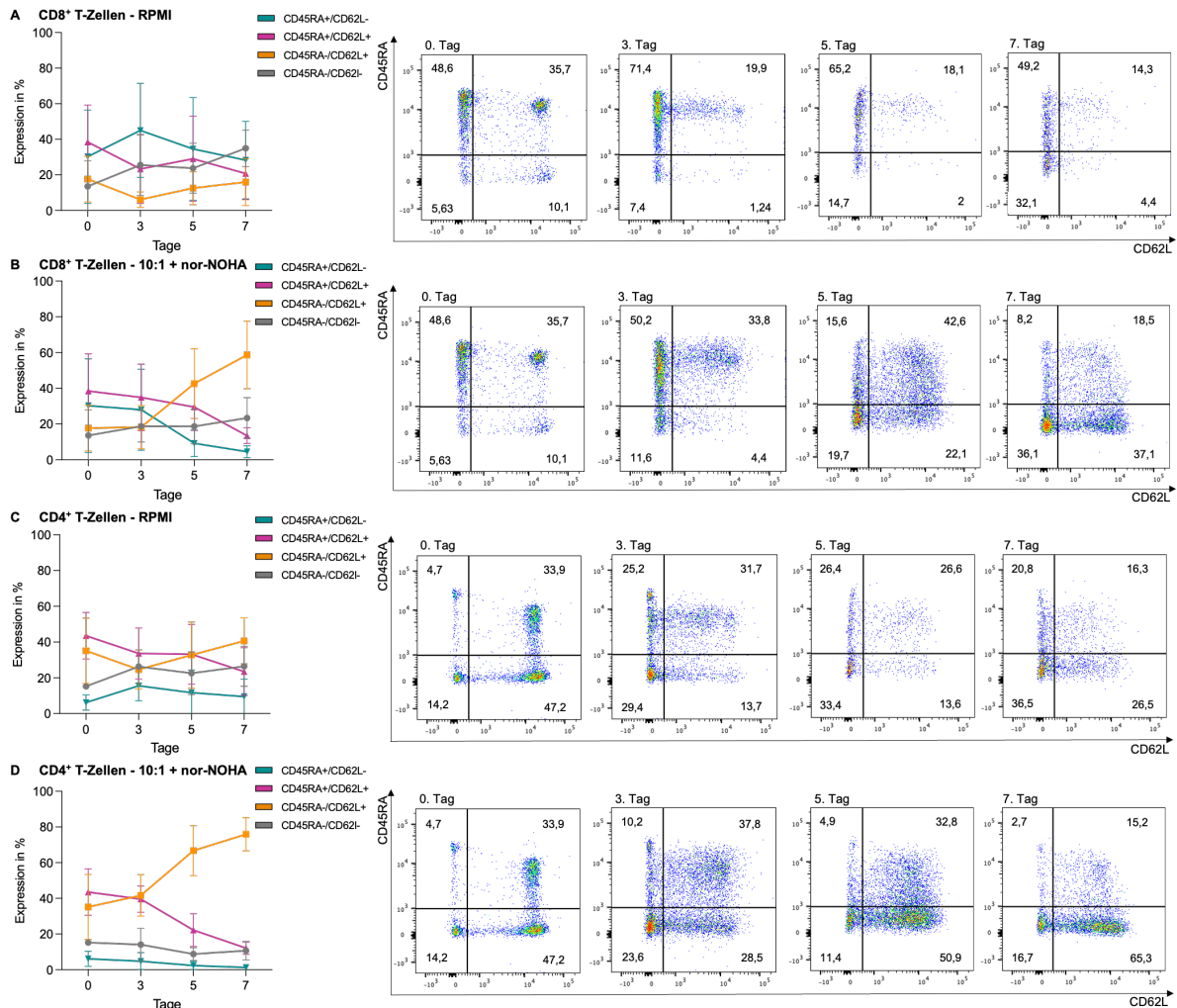
**Abbildung 42: T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression auf CD8<sup>+</sup> (A, B) und CD4<sup>+</sup> (C, D) T-Zellen aktiviert in in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert und anschließend in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, am 3. Tag, am 5. Tag und am 7. Tag nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD4, CD45RA und CD62L. (A) CD45RA/CD62L-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, (B) CD45RA/CD62L-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA, (C) CD45RA/CD62L-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, (D) CD45RA/CD62L-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Durchflusszytometrie zeigt die Original Dotplots eines für dieses Experiment repräsentativen Spenders (n = 1).

CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom zeigten vor der Aktivierung eine deutlich andere Verteilung der Phänotypen in Bezug auf die Expression von CD45RA und CD62L als T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender. Der Anteil der TN war mit  $34,1 \pm 20,6$  % deutlich geringer. Mit  $33,5 \pm 25,2$  % war der Anteil der TEMRA höher und auch der Anteil der TCM war mit  $16,8 \pm 10,4$  % etwas größer. Bei der Aktivierung in + Arg-RPMI-Medium veränderte sich dieses Verteilungsmuster über die Zeit kaum. Nach Tag 7 war ein Rückgang des Anteils der TN auf  $16,2 \pm 8,9$  %, ein geringer Anstieg der TCM auf  $26,9 \pm 27,5$  % und ein Anstieg der TEM auf  $26,1 \pm 9,7$  % zu beobachten (Abbildung 42, A). Bei der Hyperaktivierung in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition konnte hingegen im zeitlichen Verlauf ein

deutlicher Anstieg des Anteils der TCM beobachtet werden. Dieser stieg über  $41,4 \pm 15,6$  % an Tag 5 auf  $54,6 \pm 12,3$  % an Tag 7 an. Der Anteil war damit doppelt so hoch wie bei konventionell aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen und über dreimal so hoch im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt vor der Aktivierung. Auch reduzierten sich der Anteil der TEMRA auf  $6,1 \pm 2,3$  % sowie der Anteil der TN auf  $15,6 \pm 9,5$  % (Abbildung 42, B).

Bei den  $CD4^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multiplem Myelom lag vor der Aktivierung der Anteil der TCM bei  $47,7 \pm 4,6$  %, der Anteil der TN bei  $37,7 \pm 7,2$  %, der Anteil der TEMRA bei  $2,5 \pm 2,0$  % und der Anteil der TEM bei  $12,1 \pm 2,0$  %. Bei der Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium blieb diese Verteilung über den Zeitraum von 7 Tagen nach der Aktivierung nahezu erhalten. Es war ein Absinken des Anteils der TN auf  $23,3 \pm 5,2$  % und ein Anstieg des Anteils der TEM auf  $21,0 \pm 14,0$  % zu beobachten. Nach Aktivierung konnte kein Anstieg der TCM beobachtet werden (Abbildung 42, C). Wurden die  $CD4^+$  T-Zellen allerdings hyperaktiviert, konnte bereits ab dem 5. Tag nach der Aktivierung ein deutlicher Anstieg der TCM auf  $64,7 \pm 7,3$  % bis hin zu  $69,2 \pm 5,3$  % nach sieben Tagen gemessen werden. Der Anteil der TN verringerte sich auf  $14,6 \pm 2,0$  % (Abbildung 42, D).

### Knochenmark T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression



**Abbildung 43: T-Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom: CD45RA/CD62L Expression auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS (10:1) mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert und anschließend in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert und inkubiert. An Tag 0 vor der Aktivierung, am 3. Tag, am 5. Tag und am 7. Tag nach Beginn der Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der Expression von CD8, CD4, CD45RA und CD62L. (A) CD45RA/CD62L-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, (B) CD45RA/CD62L-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA, (C) CD45RA/CD62L-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in +Arg-RPMI-Medium, in zeitlicher Abfolge, (D) CD45RA/CD62L-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kultiviert in PMN-ÜS mit 1mM nor-NOHA. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Durchflusszytometrie zeigt die Original Dotplots eines für dieses Experiment repräsentativen Spenders (n = 1).

Auch bei den T-Zellen, die direkt aus dem Knochenmark der Myelom-Patienten isoliert wurden, zeigten sich ähnliche Ausgangswerte und Entwicklungen der Phänotypenverteilung nach Aktivierung. Zum Zeitpunkt Tag 0 war bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Anteil der TN bei  $38,5 \pm 20,8$  %, ähnlich dem Anteil der TEMRA mit  $30,2 \pm 26,2$  %. Der Anteil der TCM lag bei  $17,7 \pm 12,8$  %, ähnlich dem Anteil TEM mit  $13,6 \pm 14,3$  %. Nach Aktivierung in +Arg-RPMI-Medium konnte keine Differenzierung in TCM beobachtet werden. Der Anteil blieb mit  $16,0 \pm 13,1$  % konstant. Messbar war ein Anstieg der TEM auf  $35,0 \pm 10,3$  % (Abbildung 43, A). Hingegen war bei Hyperaktivierung über den beobachteten Zeitraum ein kontinuierlicher Anstieg der TCM auf

58,7 ± 18,9 % an Tag 7 zu erkennen. Eine deutliche Reduktion war bei dem Anteil der TEMRA auf 4,5 ± 3,4 % messbar (Abbildung 43, B).

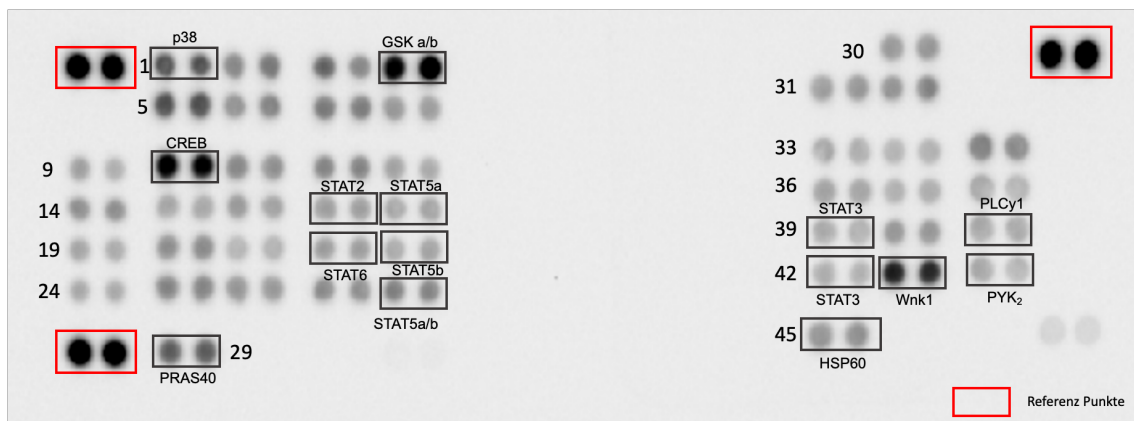
Vergleichbares zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Knochenmark. Auch hier war bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten Zellen über den Zeitraum kein deutlicher Anstieg der TCM zu erkennen. Der Anteil der TN sank sieben Tage der Aktivierung von beginnend bei 43,5 ± 13,1 % auf 23,5 ± 13,4 % ab, während der Anteil der TEM von 15,2 ± 1,6 % auf 23,1 ± 7,6 % zunahm (Abbildung 43, C). Bei der Hyperaktivierung konnte hingegen ein deutlicher Anstieg der TCM von beginnend bei 35,1 ± 18,2 % auf 75,9 ± 9,3 % über die Zeit gemessen werden. Der Anteil der TN nahm auf 12,1 ± 3,4 % ab und auch der Anteil der TEM reduzierte sich auf 10,7 ± 5,2 % (Abbildung 43, D).

### **6.7 Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf das phosphorylierte Proteom der T-Zellen gemessen mittels Proteom Profiler™ Array**

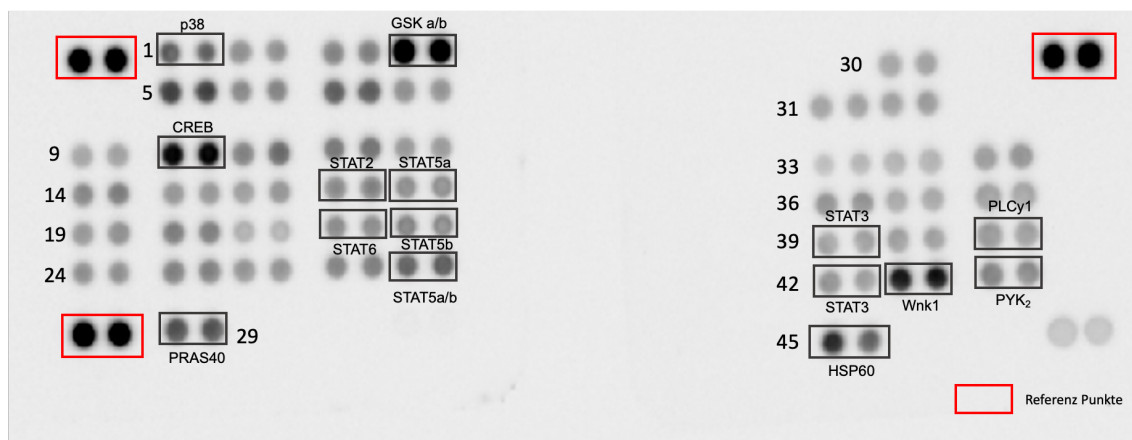
Die bisherigen Ergebnisse hatten erhebliche Unterschiede in Phänotyp und Funktionalität zwischen hyperaktivierten und konventionell aktivierten T-Zellen gezeigt. Es sollte anschließend erstmals ein Einblick in die bei Hyperaktivierung alterierten intrazellulären T-Zell Signalwege, im Speziellen wichtiger Kinasen, erhalten werden. Hierfür wurde ein Proteom Profiler™ Array mittels Human Phosphokinase Array Kits durchgeführt. Durch diesen Phospho-Array war es möglich, parallel den relativen Phosphorylierungsstatus von 43 Kinasen nachzuweisen.

Das Prinzip des Assays basiert auf einem klassischen Sandwich-ELISA. Auf der Nitrocellulose Assay-Membran sind punktförmig in Dubletten die Capture-Antikörper angeordnet. Die T-Zellen wurden - wie in 5.2.3.8 (*Proteom Profiler Array*) beschrieben - isoliert, inkubiert und nach 48 h geerntet und lysiert. Der Versuchsablauf erfolgte nach Herstellerangaben (siehe 5.2.3.8 *Proteom Profiler Array*). Anschließend wurde mittels ImageJ die maximale Pixel Dichte der einzelnen Punkte berechnet und auf die Referenzpunkte der jeweiligen Membranen genormt, um die Mengen an gebundenem phosphorylierten Protein zu quantifizieren (alle genormten Werte siehe Anhang Abbildung 3). Die Werte stellen einen Prozentsatz der maximalen Pixeldichte in [%] dar.

**A** T-Zellen in RPMI-Medium, 48 h



**B** T-Zellen in PMN-Überstand 10:1 mit nor-NOHA, 48 h



**Abbildung 44: Proteom Profiler™ Array (Human Phospho-Kinase Assay) von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen.** T-Zellen wurden in (A) +Arg-RPMI-Medium oder (B) PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Assay Membranen mit dem Proteinlysat inkubiert. Vorhandene Phospho-Kinasen konnten so an die Capture-Antikörper der Membran binden. Anschließend wurden die auf der Membran gebundenen Kinasen mit Sekundär-Antikörpern markiert und diese mit Streptavidin-HRP nachgewiesen. Das durch Chemilumineszenz gemessene Signal entsprach der Menge an gebundenem phosphoryliertem Protein. Dargestellt sind die Membranen von n = 1 Experiment.

Zu erkennen ist, dass sich das Phospho-Proteom hyperaktivierter T-Zellen in diesem Versuchsmodell in keinem der hier abgebildeten Proteine relevant von konventionell in Medium aktivierten T-Zellen unterscheidet (Abbildung 44).

Bestimmte Signalproteine - wie p-CREB, p-GSK a/b, p-p38, p-WNK1 oder p-PRAS40 - waren in beiden Kultivierungsbedingungen relativ stark phosphoryliert.

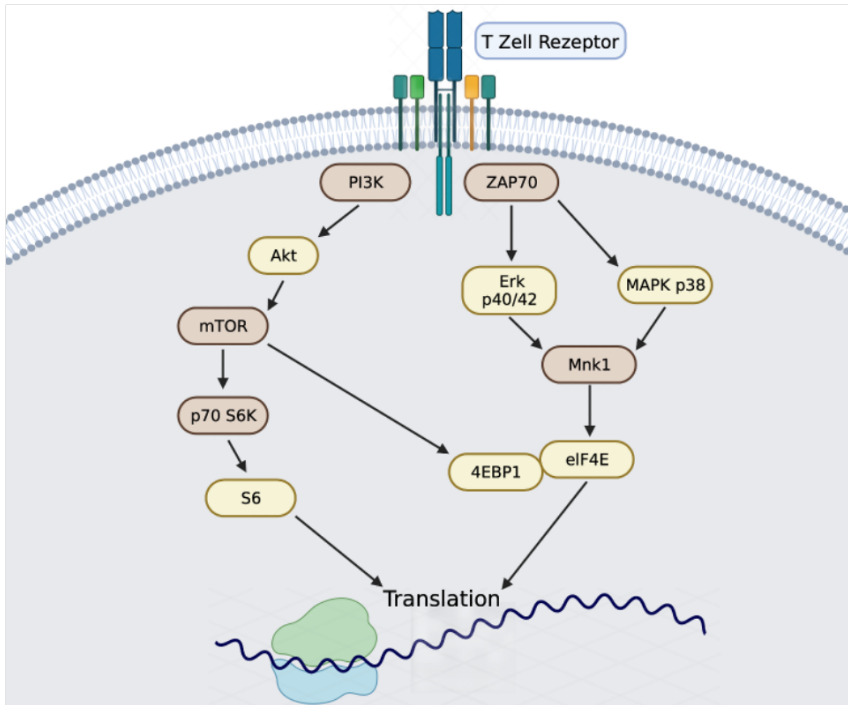
In hyperaktivierten T-Zellen (Abbildung 44, B) zeigte sich eine etwas stärkere Phosphorylierung der STAT-Proteine (Signal Transducers and activators of Transcription): STAT 2 mit 33,4 % bei hyperaktivierten und 23,7 %, bei konventionell aktivierten T-Zellen; STAT 3 mit 25,1 % bei hyperaktivierten und 17,1 %, bei konventionell aktivierten T-Zellen und STAT5a/b mit 29,8 % bei hyperaktivierten und 21,1 % bei konventionell aktivierten T-Zellen. Bei hyperaktivierten T-Zellen konnte auch eine verstärkte Phosphorylierung von HSP60 detektiert werden (50,2 %, konventionelle T-Zellen 27,7 %). Phospholipase C (p-PLCy1) zeigte mit 30,4 % in hyperaktivierten T-Zellen ebenfalls eine tendenziell höhere Phosphorylierung als

bei konventionell aktivierten T-Zellen (22,2 %). PYK<sub>2</sub> (Protein Tyrosin Kinase 2), welche mit Fyn assoziiert ist, wies mit 33 % ebenso wie Fyn (29,1 %) in hyperaktivierten T-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung auf (konventionell aktivierte T-Zellen PYK<sub>2</sub> 19,0%, Fyn 18,8 %).

### **6.8 Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf Proteine der T-Zellrezeptorsignalkaskade**

Ziel des folgenden Abschnitts war es den Einfluss des PMN-ÜS auf verschiedene Proteine in der Signalkaskade des T-Zellrezeptors noch einmal zielgenauer zu untersuchen. Hierzu wurden unterschiedliche Proteine, die vor allem in die Regulierung der Protein-Translation involviert sind, untersucht. Es wurde mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern gearbeitet, um die in der Signalkaskade phosphorylierten und somit aktivierten Proteine darzustellen.

Die T-Zellen wurden, wie in 5.2.2.4 (*Allgemeiner Versuchsaufbau*) beschrieben, isoliert und angesetzt. Die Zellen wurden in 24-well Platten ausgesät ( $1 \times 10^6$  T-Zellen/ 2 ml) und für 48 h in den verschiedenen Versuchsbedingungen inkubiert, anschließend geerntet und in Lysepuffer bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung weggefroren. Pro Versuch wurde eine unstimulierte T-Zellprobe (t0) vor der 48-stündigen Inkubation in Lysepuffer weggefroren. Die Proteinlysate der Zellen wurden - wie in 5.2.3.9.1 (*Proteingewinnung aus Zelllysaten*), 5.2.3.9.2 (*Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford*) und 5.2.3.9.3 (*Proteinprobenaufbereitung*) beschrieben - gewonnen. Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte wie in 5.2.3.9.4 (*SDS-Gel Herstellung und Gelelektrophorese*) und der Western Blot wie in 5.2.3.9.5 (*Western Blot (Wet-Blot)*). Die Auswertung erfolgte wie in 5.2.3.9.6 (*Auswertung der Western Blot Daten*) beschrieben. Die Phosphorylierung der T-Zellen, die in konventionellen +Arg-RPMI Medium aktiviert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Bedingungen dazu ins Verhältnis gesetzt.

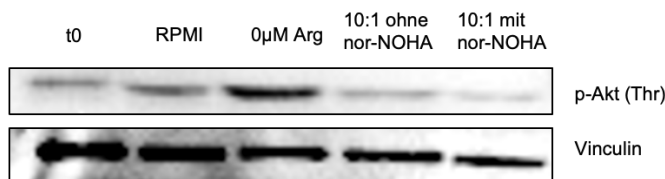


**Abbildung 45: Darstellung der untersuchten Proteine im TCR-Signalweg.** Hier dargestellt sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine des T-Zellrezeptorsignalwegs (hellgelb) sowie zwischengeschaltete Proteine (hellbraun). Erstellt mit Biorender in Anlehnung an *Hwang, 2020 (84)*.

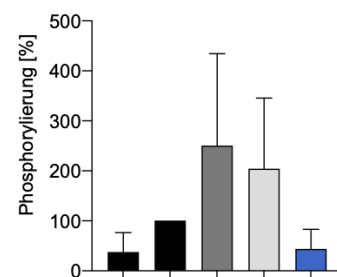
Mit der Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor wird eine Vielzahl von Signalwegen innerhalb der T-Zellen aktiviert (Abbildung 45). Diese umfassen unter anderem das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Zytokinbildung und die Zellproliferation. Distales Ziel wichtiger Signalwege innerhalb von proliferierenden und aktivierten T-Zellen ist die Aktivierung und Initiation der Proteintranslation.

### 6.8.1 Akt

#### A Phosphorylierung von Akt



#### B normierte Phosphorylierung von Akt



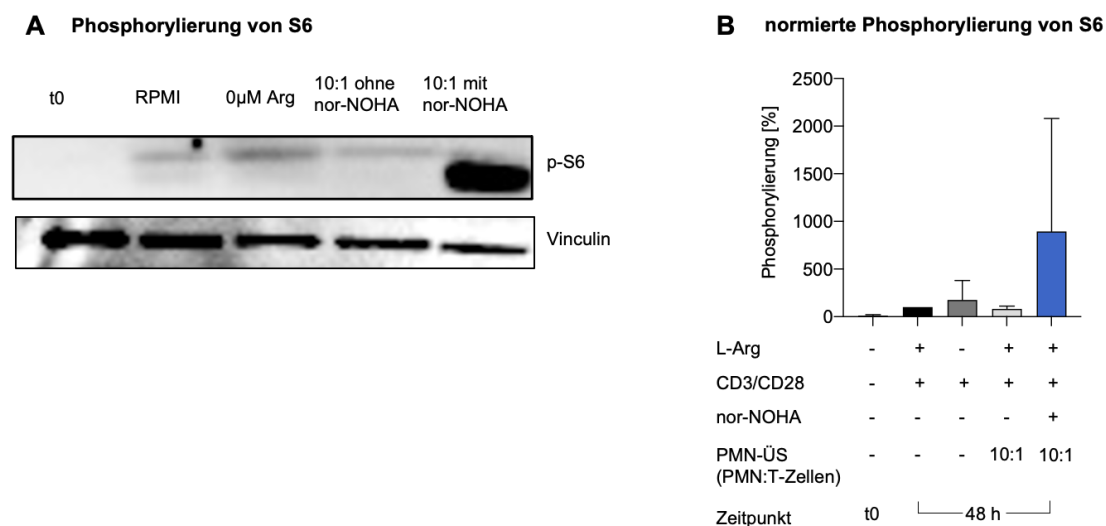
L-Arg	-	+	-	+	+
CD3/CD28	-	+	+	+	+
nor-NOHA	-	-	-	-	+
PMN-ÜS (PMN:T-Zellen)	-	-	-	10:1	10:1
Zeitpunkt	t0	48 h			

**Abbildung 46: Phosphorylierung von Akt in T-Zellen.** T-Zellen wurden in + Arg-RPMI-Medium, - Arg-RPMI-Medium oder PMN-Überstand mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der ÜS Kultivierungsbedingungen wurden lysiert, die Proteinextraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung des Akt Proteins mittels p-Akt-Thr308 Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-Akt -Thr308 und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von Akt aus n = 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die

Expression von p-Akt wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*p<0,01; \*p<0,05).

In nicht aktivierten T-Zellen (t0) war Akt nur mäßig an Thr308 phosphoryliert (37,8 ± 38,5 % der Phosphorylierung konventionell in + Arg-RPMI-Medium aktivierter T-Zellen). In hyperaktivierten T-Zellen war keine relevante Induktion einer Phosphorylierung von Akt Thr308 messbar. Bei T-Zellen in - Arg-RPMI-Medium stieg die Phosphorylierung auf 250,5 ± 183,9 %. Eine ähnlich hohe Phosphorylierungsinduktion (204,5 ± 141,0 %) wurde bei T-Zellen gemessen, die in PMN-ÜS ohne nor-NOHA aktiviert wurden. Somit zeigten T-Zellen in beiden Argininmangelbedingungen 48 h nach Beginn der Aktivierung eine erhöhte Phosphorylierung des Akt-Proteins an der Thr308-Stelle (Abbildung 46).

## 6.8.2 S6



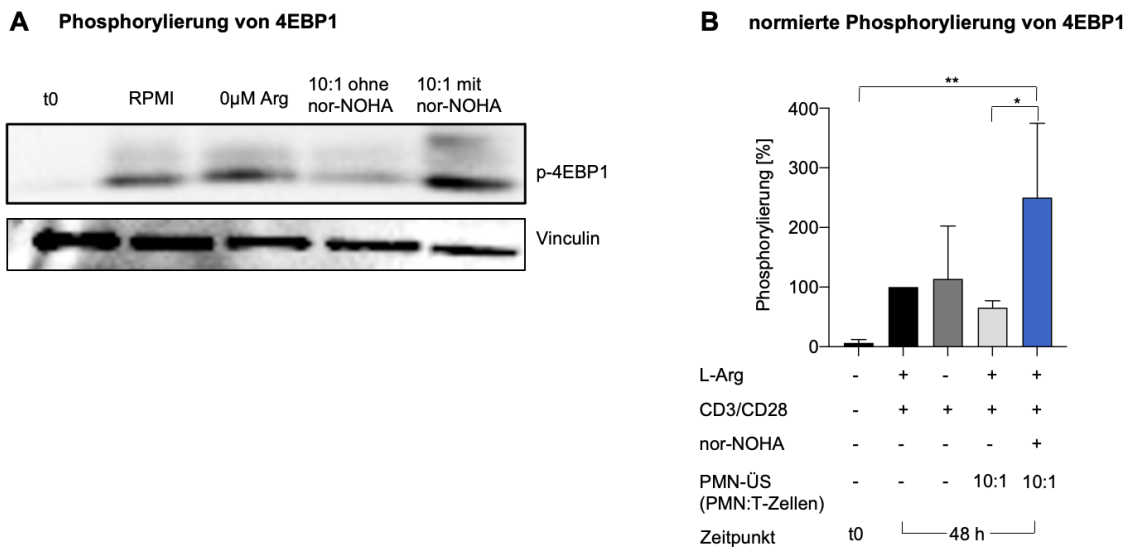
**Abbildung 47: Phosphorylierung von S6 in T-Zellen.** T-Zellen wurden in + Arg-RPMI-Medium, - Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der einzelnen Kultivierungsbedingungen wurden lysiert, die Proteinextraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung des S6 Proteins mittels p-S6-Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-S6 und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von S6 aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von p-S6 wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*p<0,01; \*p<0,05).

Zum Zeitpunkt t0 liegt das ribosomale Protein S6 nahezu vollständig unphosphoryliert vor (12,1 ± 10,0 %). Die Aktivierung der T-Zellen führte zu einer Phosphorylierung von S6. In hyperaktivierten T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA stieg die Phosphorylierung von S6 auf das fast 9-fache an und war mit 895,1 ± 1184,0 % deutlich höher als bei konventionellen T-Zellen. Aufgrund einer hohen Standardabweichung ist hier kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

T-Zellen, kultiviert in -Arg-RPMI-Medium, wiesen mit 176,5 ± 202,9 % eine leicht höhere Phosphorylierung als konventionell aktivierte T-Zellen auf. T-Zellen, aktiviert in PMN-ÜS ohne

nor-NOHA, wiesen  $82,8 \pm 27,9$  % der S6-Phosphorylierung konventionell aktivierter T-Zellen auf (Abbildung 47).

### 6.8.3 4EBP1

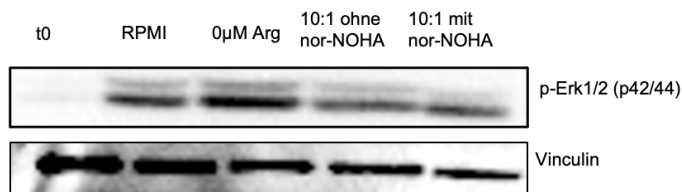


**Abbildung 48: Abbildung 52: Phosphorylierung von 4EBP1 in T-Zellen.** T-Zellen wurden in + Arg-RPMI-Medium, - Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der einzelnen Kultivierungsbedingungen wurden lysiert, die Proteinextraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung des 4EBP1 Proteins mittels p-4EBP1-Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-4EBP1 und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von 4EBP1 aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von p-4EBP1 wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

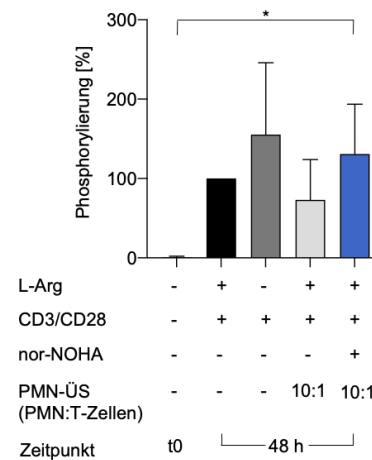
Zum Zeitpunkt t0 wies 4EBP1 keine relevant detektierbare Phosphorylierung auf. Bei allen Aktivierungsbedingungen war eine induzierbare Phosphorylierung (und damit Inhibition) des Translationsrepressorproteins detektierbar. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 in hyperaktivierten T-Zellen stieg hierbei besonders stark an, nämlich im Vergleich zu konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen (= 100%) auf  $250,0 \pm 124,7$  %. T-Zellen in -Arg-RPMI-Medium unterscheiden sich nicht stark von konventionell aktivierten T-Zellen ( $113,9 \pm 88,6$  %). Die Phosphorylierung in T-Zellen, aktiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA, sank auf  $65,5 \pm 11,8$  % und war somit signifikant niedriger als bei hyperaktivierten T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA (Abbildung 48).

## 6.8.4 Erk1/2 (p42/44)

### A Phosphorylierung von Erk1/2



### B normierte Phosphorylierung von Erk1/2



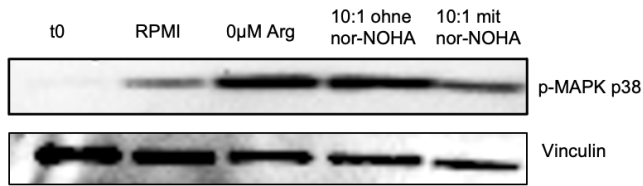
**Abbildung 49: Phosphorylierung von Erk1/2.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der einzelnen Kultivierungsbedingungen wurden lysiert und die Proteinextraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung des Erk1/2 Proteins mittels p-Erk1/2-Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-Erk1/2 und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von Erk1/2 aus n = 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von p-Erk1/2 wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

Erk1/2 wies zum Zeitpunkt t0 keine detektierbare Phosphorylierung auf. Nach der Aktivierung war bei allen Bedingungen eine induzierbare Phosphorylierung feststellbar. Die Phosphorylierung bei Hyperaktivierung war mit  $131,0 \pm 62,6$  % nur mäßig gegenüber konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen erhöht. Im Argininmangelmedium zeigte sich mit  $155,4 \pm 90,4$  % eine tendenziell höhere Phosphorylierung von Erk1/2 als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Im PMN-ÜS ohne nor-NOHA sank die Phosphorylierung auf  $73,2 \pm 50,8$  % ab (Abbildung 49).

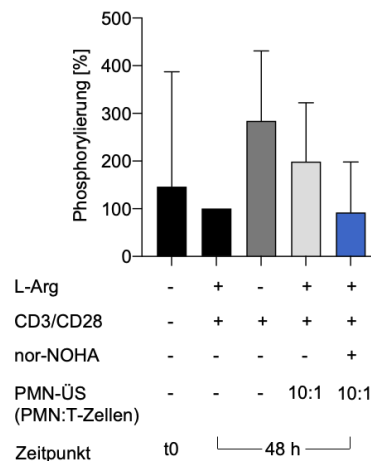
## 6.8.5 p38 MAPK

Im Vergleich zu konventioneller Aktivierung hatte der PMN-ÜS mit nor-NOHA keinen signifikant modifizierenden Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 MAPK.

### A Phosphorylierung von p38 MAPK



### B normierte Phosphorylierung von p38 MAPK

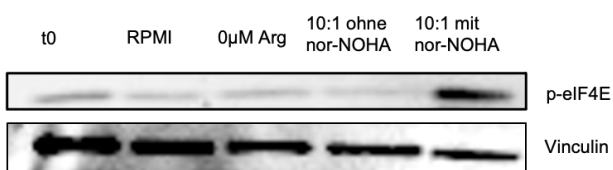


**Abbildung 50: Phosphorylierung von p38 MAPK in T-Zellen.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der einzelnen Kultivierungsbedingungen wurden lysiert und die Proteinextraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphorylierung des MAPK p38 Proteins mittels p-p38 MAPK-Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-p38 MAPK und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von p38 MAPK aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von p-p38 MAPK wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

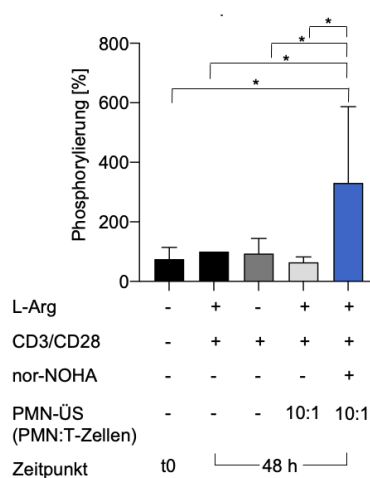
Es konnte kein Unterschied in der Phosphorylierung von p38 MAPK zwischen T-Zellen aktiviert in PMN-ÜS mit nor-NOHA ( $92,5 \pm 105,8$  %) und konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen (genormt auf 100 %) beobachtet werden. Im Argininmangelmedium zeigte sich mit  $284,5 \pm 146,6$  % eine tendenziell höhere Phosphorylierung von p38 MAPK gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen. Im PMN-ÜS ohne nor-NOHA stieg die Phosphorylierung auf  $198,9 \pm 123,3$  % an (Abbildung 50).

## 6.8.6 eIF4E

### A Phosphorylierung von eIF4E



### B normierte Phosphorylierung von eIF4E



**Abbildung 51: Phosphorylierung von eIF4E in T-Zellen.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die T-Zellen der einzelnen Kultivierungsbedingungen wurden lysiert und die Proteinextraktionen elektrophoretisch

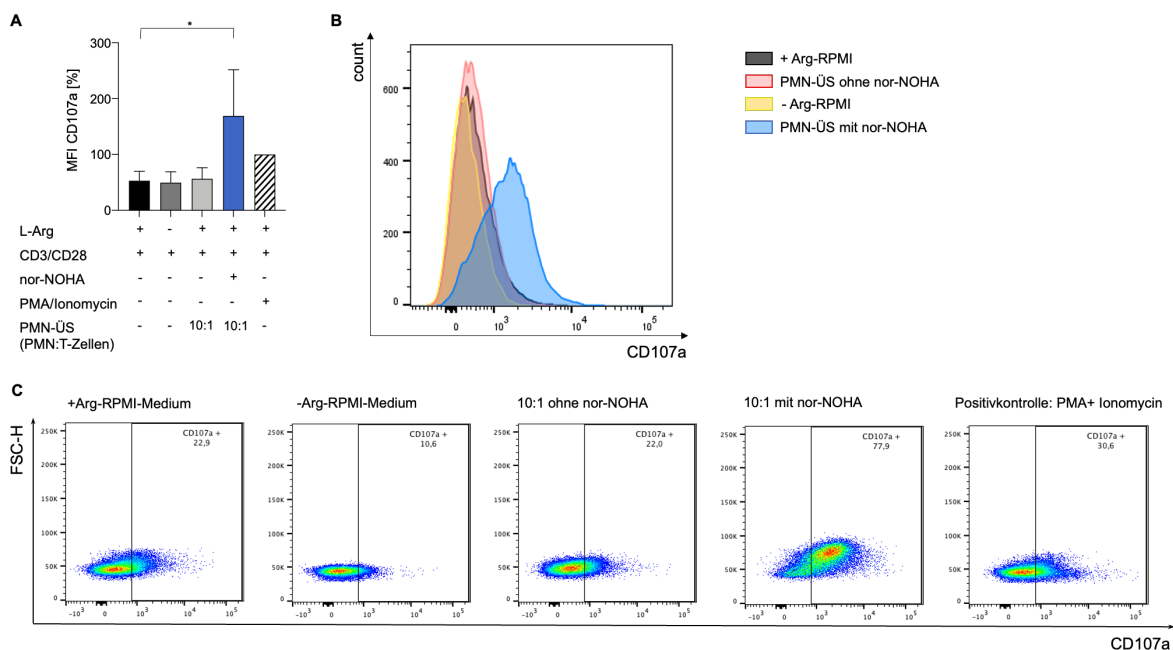
aufgetrennt und die Phosphorylierung des eIF4E Proteins mittels p-eIF4E -Antikörper im Western Blot analysiert. In (A) dargestellt sind aus einem repräsentativen Experiment die Banden für p-eIF4E und die Ladekontrolle Vinculin. In (B) ist die normierte Phosphorylierung von eIF4E aus n = 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von p-eIF4E wurde auf die Expression der Ladekontrolle normiert und anschließend die konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

In Bezug auf den Transkriptionsfaktor eIF4E konnte keine relevante Induktion der Phosphorylierung unter allen Aktivierungsbedingungen gezeigt werden, außer bei hyperaktivierten T-Zellen. Es zeigte sich, dass der PMN-ÜS mit nor-NOHA einen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E hat. Die Phosphorylierung von eIF4E war in hyperaktivierten T-Zellen mit  $331,0 \pm 255,9$  % signifikant höher als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen. Im -Arg-RPMI-Medium zeigte sich mit  $93,9 \pm 50,0$  % kein Unterschied in der Phosphorylierung von eIF4E gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen. Im PMN-ÜS ohne nor-NOHA sank die Phosphorylierung auf  $64,4 \pm 17,9$  % ab (Abbildung 51).

## 6.9 Einfluss der PMN bedingten Hyperaktivierung auf die T-Zelldegranulation

Im folgenden Versuch wurde die aktivierungsabhängige Degranulation von hyperaktivierten T-Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen untersucht. Der Versuch wurde wie in 5.2.3.5 (Degranulations-Assay) beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung der Degranulierung wurden die MFI-Werte der CD107a Expression herangezogen. Die MFI-Werte der mit PMA und Ionomycin maximal stimulierten T-Zellen (hier ist eine maximale Zell-Degranulation zu erwarten) wurden als Positiv-Kontrolle auf 100 % gesetzt.

### T-Zell Degranulation



**Abbildung 52: T-Zell Degranulation.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium, -Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Degranulation wurde anschließend mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung des CD107a Oberflächenantigens bestimmt. In der Positivkontrolle (gestreift) wurden konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen zusätzlich mit PMA und

Ionomycin stimuliert, um eine maximale Degranulation zu erreichen. In (A) dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die MFI-Werte der Positivkontrollen der einzelnen Versuche wurden auf 100 % gesetzt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*p<0,001; \*p<0,01; \*p<0,05). (B) zeigt die MFI der CD107a Expression in Histogrammdarstellung für (n = 1) repräsentativen Spender. In (C) dargestellt sind die Original Dotplots der Durchflusszytometrie eines für dieses Experiment repräsentativen Spenders (n = 1), die Zahlenwerte in den Diagrammen stellen für diesen Spender die prozentuale CD107a-Expression dar.

Konventionell aktivierte T-Zellen erreichten durchschnittlich  $53,1 \pm 16,8$  % CD107a Expression im Vergleich zur Positivkontrolle. T-Zellen im Argininmangelmedium erreichten  $49,7 \pm 19,3$  % und T-Zellen in PMN-ÜS ohne nor-NOHA erreichten  $56,7 \pm 19,7$  %. Hyperaktivierte T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA erreichten hingegen eine CD107a Expression von  $169,0 \pm 83,0$  % im Vergleich zur Positivkontrolle und somit eine signifikant höhere Degranulation als konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierte T-Zellen (Abbildung 52).

## **6.10 Auswirkung der PMN bedingten Hyperaktivierung auf T-Zellen in Langzeitkultur**

### **6.10.1 Untersuchung der Langzeitproliferation hyperaktivierter T-Zellen**

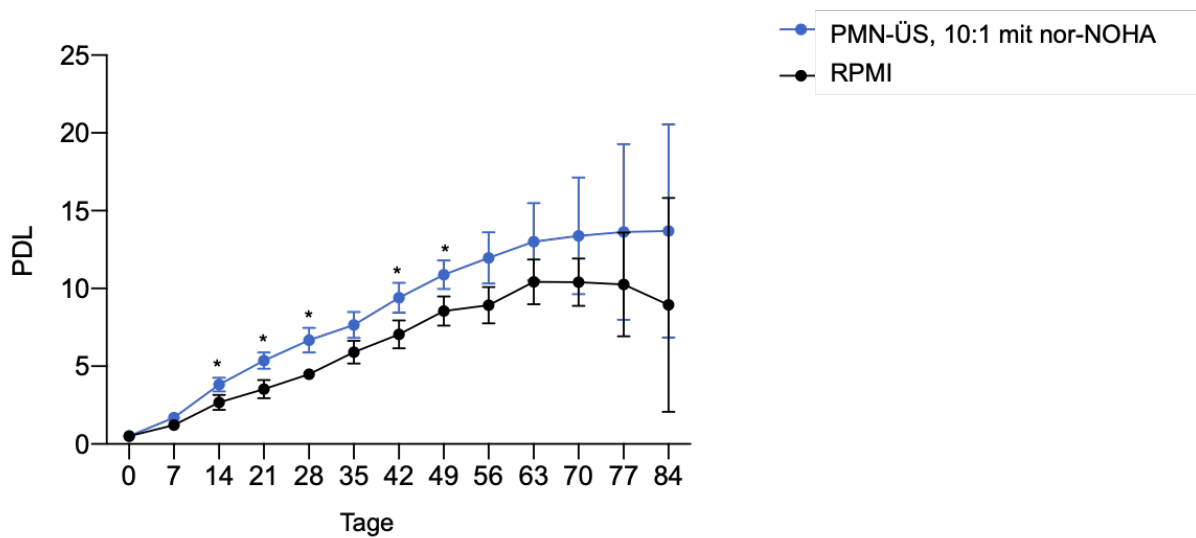
Bisherige Versuche wurden ausschließlich mit frisch isolierten T-Zellen durchgeführt. In den 72 Stunden, in denen die PMN-Überstände vorinkubiert wurden, ruhten die T-Zellen unaktiviert in huRPMI Medium. Anschließend wurden die T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28-Beads in den verschiedenen Versuchsbedingungen aktiviert. Sowohl die Proliferationsmessung mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation als auch alle weiteren Versuche wurden in der Regel 48 h nach Aktivierung durchgeführt (Ausnahme war die Bestimmung der Phänotypen, die zu mehreren Zeitpunkten nach der Aktivierung durchgeführt wurde).

In folgenden Versuchen wurde überprüft, inwieweit die von PMN sezernierten Faktor(en) im PMN-ÜS mit paralleler Arginaseinhibition Auswirkungen auf die Langzeitkultivierung von T-Zellen haben. Um T-Zellen für einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten und wiederholt restimulieren zu können, wurden die T-Zellen mit einem antigenspezifischen TCR (Einzelketten-Zell Rezeptor, spezifisch für p53<sub>264-272</sub>) transduziert. Die T-Zellen wurden wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen K562-Tumorzellen in +Arg-RPMI-Medium oder frisch aufgetautem PMN-ÜS (PMN:T-Zell-Verhältnis 10:1) unter Ko-Applikation von nor-NOHA restimuliert (siehe 5.2.2.10 *Retrovirale Transduktion von T-Zellen mit dem Einzelketten-TCR spezifisch für p53<sub>264-272</sub>*).

Die Zellzahl vor jeder Restimulation wurde wöchentlich bestimmt, die Verdopplungszeit (*Population Doubling Time*, PDL) mittels folgender Formel berechnet, mit der PDL der vorherigen Woche verrechnet und graphisch anschließend dargestellt.

$$\frac{\log_{10}(\text{Zellzahl}) - \log_{10}(0,5)}{\log_{10}(2)} + PDL (\text{Woche zuvor})$$

## Langzeit Proliferation von T-Zellen in RPMI und PMN-Überstand mit nor-NOHA



**Abbildung 53: Langzeitproliferation von transduzierten T-Zellen in +Arg-RPMI-Medium und PMN-ÜS mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden mit einem gegen p53<sub>264-272</sub> spezifischen Einzelketten TZR transduziert und über einen Zeitraum von 84 Tagen wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen und bestrahlten K562-Zellen in RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA restimuliert. Die Zellzahl wurde zu jedem Restimulationszeitpunkt bestimmt und daraus die Proliferation Double Time ermittelt, die gegen die Zeit in Kultur aufgetragen wurde. Hier dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnungen erfolgten mittels two-way ANOVA Fishers's LSD-Test (\*\*\*p<0,0002; \*\*p<0,0021; \*p<0,0332).

T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA restimuliert wurden, wiesen ab Tag 56 (8. Restimulation) eine signifikant höhere PDL auf als T-Zellen die konventionell in +Arg-RPMI-Medium restimuliert wurden. Hyperaktivierte T-Zellen, wöchentlich in PMN-ÜS mit nor-NOHA restimuliert, zeigten im allgemeinen höhere PDL-Werte, welche sich nach der 2., 3., 4., 6. und 7. Restimulation signifikant von den PDL-Werten der konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen unterschieden. Nach der 12. Restimulation (d.h. nach 84 Tagen) wiesen hyperaktivierte T-Zellen weiterhin eine deutlich erhöhte PDL von  $13,7 \pm 6,9$  auf (Tendenz konstant), während T-Zellen, die in +Arg-RPMI Medium restimuliert wurden, zum selben Zeitpunkt eine PDL von  $9,0 \pm 7,0$  aufwiesen (Tendenz sinkend) (Abbildung 53).

### 6.10.2 Untersuchung der Zytotoxizität hyperaktivierter T-Zellen in Langzeitkultur

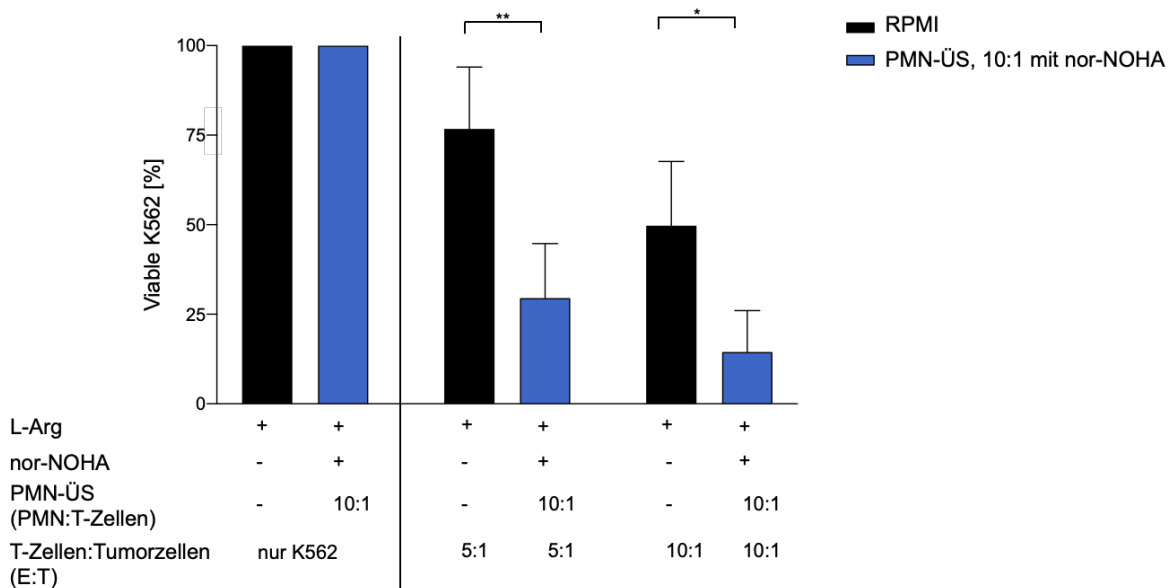
In bisherigen Versuchen konnte eine erhöhte Zytotoxizität der in PMN-ÜS mit nor-NOHA aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden (260). Auch hierfür wurden die T-Zellen mit einem Einzelketten-TCR spezifisch für p53<sub>264-272</sub> transduziert und peptidspezifisch restimuliert. Die Zytotoxizitätsversuche erfolgten nach den ersten peptidspezifischen Stimulationen.

Mit folgendem Versuch sollte gezeigt werden, ob auch nach wiederholter Restimulation in PMN-ÜS mit nor-NOHA die T-Zellen eine bessere zelluläre Zytotoxizität aufweisen als konventionell in +Arg-RPMI-Medium restimulierte T-Zellen.

Der Versuch wurde wie in 5.2.3.4 (*Zytotoxizität*) beschrieben durchgeführt. Als Target-Zellen für die transduzierten T-Zellen dienten in diesem Versuch K562 Tumorzellen, die das Enzym Luziferase exprimieren. Diese K562 wurden mit dem Peptid p53<sub>264-272</sub> beladen und gemeinsam mit den zuvor in PMN-ÜS oder in +Arg-RPMI-Medium restimulierten T-Zellen für sechs Stunden kokultiviert.

Die Zytotoxizität wurde in zwei verschiedenen T-Zell (Effektor, E) zu Tumorzellverhältnissen (Target, T) getestet (5:1 und 10:1) (Abbildung 54).

#### Zytotoxizität von T-Zellen in Langzeitkultur



**Abbildung 54: Zytotoxizität von T-Zellen aus Langzeitkultur in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden mit einem gegen p53<sub>264-272</sub> spezifischen TZR transduziert repetitiv wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen und bestrahlten K562-Zellen in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA restimuliert. Nach sieben Restimulationen wurde ein p53<sub>264-272</sub> spezifischer Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Als Target-Zellen wurden p53<sub>264-272</sub> beladene K562-Tumorzellen eingesetzt, die Luziferase exprimieren. Der Zytotoxizitäts-Assay basiert auf der Umsetzung von zugesetztem Luziferin in viablen Tumorzellen. T-Zellen und K562-Tumorzellen wurden mit Luziferinzugabe ko-inkubiert und nach 6 h die verbliebene Emission mittels Fluoreszenzreader bestimmt. Die Fluoreszenz der K562-Tumorzellen mit Luziferinzugabe ohne T-Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnungen erfolgten mittels one-way ANOVA (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05).

T-Zellen, die repetitiv in PMN-ÜS mit nor-NOHA restimuliert wurden, zeigten in beiden T-Zell zu Tumorverhältnissen signifikant bessere Zytotoxizitätswerte. Die Viabilität der K562-Tumorzellen sank im T-Zell zu Target Verhältnis 5:1 auf 29,5 ± 15 % und im 10:1 Verhältnis auf 14,5 ± 11,5 %. Bei konventionell in +Arg- RPMI-Medium restimulierten T-Zellen war die Zytotoxizität signifikant geringer. Die Viabilität der K562-Tumorzellen sank hier im T-Zell zu Target Verhältnis von 5:1 auf nur 76,8 ± 17,2 % und im 10:1 Verhältnis auf 49,7 ± 17,94 %.

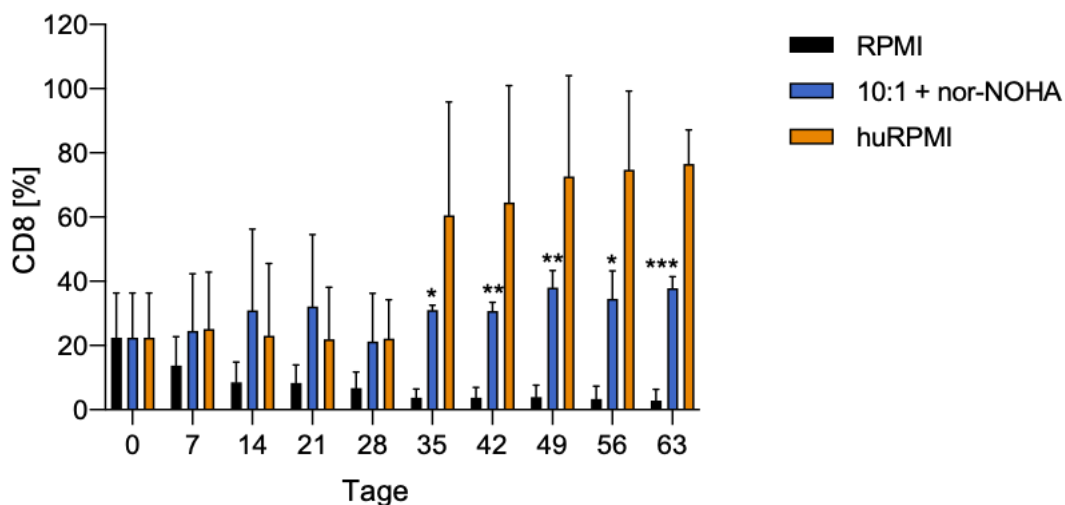
#### 6.10.3 Untersuchung des CD4/CD8 Verhältnisses von T-Zellen in Langzeitkultur

Etablierte Protokolle der Arbeitsgruppe (AG) von Univ.-Prof. Dr. med. M. Theobald zeigen, dass über einen längeren Restimulationszeitraum und Expansion der T-Zellen, welche mit

einem Einzelketten-TCR spezifisch für p53<sub>264-272</sub> transduziert wurden, der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der Zeit zunimmt. Bei dem in der AG Theobald verwendeten Medium für die T-Zellkultur handelt es sich um huRPMI. Dieses Medium enthält 10 % humanes AB-Serum (huABS) und 1 mM Arginin, während das +Arg-RPMI-Medium, welches in bisherigen oben genannten Versuchen verwendet wurde, 10 % dialysiertes FCS und eine physiologische Konzentration von 150 µM Arginin enthält. In diesem +Arg-RPMI-Medium wurde auch der PMN-ÜS generiert.

Um den CD8<sup>+</sup> Zellanteil nach längerer Kultur und mehrfacher Restimulation zu untersuchen, wurden die T-Zellen in der Mitte eines Restimulationszyklus am vierten Tag mittels Durchflusszytometrie untersucht. In diesem Versuch wurden T-Zellen mit einem Einzelketten-TCR spezifisch für p53<sub>264-272</sub> transduziert und wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen und bestrahlten K562-Zellen restimuliert. Die Restimulation erfolgte in huRPMI (mit 10 % humanem AB-Serum), in +Arg-RPMI-Medium (10 % dialysiertes FCS) und in PMN-ÜS mit nor-NOHA (generiert in +Arg-RPMI-Medium mit 10 % dialysiertem FCS). Die PDL-Kurven dieses Versuchs befinden sich im Anhang (siehe Anhang, Abbildung 4)

#### CD8<sup>+</sup> T-Zellanteil in Langzeitkultur



**Abbildung 55: CD8 T-Zellanteil in +Arg-RPMI-Medium, huRPMI-Medium und PMN-ÜS mit nor-NOHA Langzeitkultur.** T-Zellen wurden mit einem gegen p53<sub>264-272</sub> spezifischen Einzelketten-TCR transduziert und über einen längeren Zeitraum wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen und bestrahlten K562-Zellen in +Arg-RPMI-Medium (enthält 10 % dialysiertes FCS), huRPMI-Medium (enthält 10 % AB-Serum) oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA restimuliert. In der Mitte des Restimulationszyklus wurde jeweils mittels Durchflusszytometrie der CD8<sup>+</sup> T-Zellanteil der T-Zellen in den drei Kulturbedingungen ermittelt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen beziehen sich auf in +Arg-RPMI-Medium kultivierte T-Zellen. Statistische Berechnungen erfolgten mittels two-way ANOVA (\*\*p<0,0002; \*\*p<0,0021; \*p<0,0332) und beziehen sich auf hyperaktivierten im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen (blau im Bezug zu schwarz).

Zum Startpunkt der Kultur wiesen die T-Zellen einen durchschnittlichen CD8<sup>+</sup> T-Zellanteil von 28,8 ± 12,2 % auf. Wie zu erwarten, stieg über einen Zeitraum von neun Wochen der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in huRPMI Medium (Abbildung 55, orange) auf 73,5 ± 13 % an. Der Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in +Arg-RPMI Medium (Abbildung 55, schwarz) sank auf 3,51 ± 4,62 %.

Bei T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA restimuliert wurden, blieb über den Kultivierungszeitraum der Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit  $38,9 \pm 4,4$  % im Vergleich zum Anteil am Startzeitpunkt ( $28,8 \pm 12,2$  %) nahezu konstant erhalten (Abbildung 55, blau).

## 7 Diskussion

### 7.1 T-Zellhyperaktivierung abhängig von spezifischen Kultivierungsbedingungen

#### 7.1.1 Hyperaktivierung abhängig von PMN:T-Zell-Verhältnis und Kultivierungskonzentration

Die Versuche in 5.1.1 (*Vergleich unterschiedlicher T-Zellzahlen bei Aktivierung in PMN-Überständen*) zu den unterschiedlichen Kultivierungsarten konnten zeigen, dass der hyperaktivierende Effekt des PMN-ÜS mit Arginaseinhibition auf die T-Zellproliferation nur in bestimmten Kultivierungsverhältnissen eindeutig war. Wurden die T-Zellen in einer höheren Zelldichte kultiviert, war die Proliferation von T-Zellen in PMN-ÜS nicht mehr signifikant höher als bei konventionell in +Arg-RPMI-Medium oder sogar supprimiert (siehe 20:1 Bedingung bei  $10^6$  T-Zellen/ 1 ml in Abbildung 10). In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass der hyperaktivierende Effekt mit steigender PMN-Konzentration bis zu einem Verhältnis von 20:1 zunahm und ab einem Verhältnis von 50:1 nicht mehr nachzuweisen war (265). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die Wahl der T-Zellkonzentration und mit steigender T-Zellanzahl auch eine vermehrte Anzahl von PMN einen Effekt auf die Hyperaktivierung hat. Die höhere T-Zellkonzentration alleine schien keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten zu haben. So konnten in den absoluten Daten mit steigender T-Zelldichte in der konventionellen +Arg-RPMI-Medium-Bedingung steigende cpm-Werte festgestellt werden (Anhang, Abbildung 1). Somit ist in der Bedingung PMN-ÜS mit nor-NOHA die reduziertere Aktivierung der T-Zellen auf den steigenden PMN-Anteil zurückzuführen. Ein Grund hierbei könnte eine mit steigender PMN-Anzahl zunehmende Arginaseaktivität sein, die durch die eingesetzte Konzentration von 1 mM nor-NOHA nicht ausreichend gehemmt wird und somit durch eine verstärkte Arginindepletion zu einer supprimierten T-Zellproliferation führt. Es ist bekannt, dass PMN bzw. PMN-MDSCs im Speziellen inhibierend auf die T-Zellaktivierung und Proliferation wirken. Hierzu zählen neben der Arginase vermittelten Depletion von Arginin noch weitere immunsuppressive Mechanismen wie TGF- $\beta$ , Indolamin-2,3-dioxygenase und eine konsekutiv reduzierte Tryptophankonzentration sowie anfallende Abbauprodukte, IL-10 oder ROS (211, 266, 267). Im inflammatorischen Kontext sorgen PMN auch durch den *Respiratory Burst*, aber auch durch vermehrte Glykolyse und somit Laktatanstieg für eine azidotische Umgebung (268). Der niedrige pH und das anfallende Laktat beeinträchtigen womöglich die Hyperaktivierung bei steigender PMN-Zahl. Baumann et. al. beschrieben in diesem Zusammenhang auch den Einfluss des Dicarbonylradikals Methylglyoxal, welches v.a. von MDSCs sezerniert wird und die Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst (269). Durch die vermehrte Anzahl an PMN käme es somit zu einer Zunahme der T-Zell supprimierenden Substanzen oder Metaboliten im PMN-ÜS, welche womöglich gegenüber den hyperaktivierenden Faktoren überwiegen. Es wurde in

dem hier untersuchten in vitro System allerdings nicht untersucht, inwiefern diese potentiell hoch relevanten immunsuppressiven Mechanismen involviert sind bzw. sein können.

Eine interessante physiologische Korrelation in vivo besteht jedoch darin, dass eine erhöhte Anzahl von PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten in zahlreichen Tumorentitäten mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (16). Ein weiterer Parameter, der in diesem Zusammenhang bestimmt werden kann, ist das Neutrophilen-zu-Lymphozyten Verhältnis, welches in fortgeschrittenen Erkrankungen erhöht ist und in vielen Krebsentitäten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (270).

### **7.1.2 Hyperaktivierung womöglich abhängig von Aktivierungsstatus der PMN und T-Zellen?**

Das Zusammenspiel von PMN und T-Zellen im TME und auch bei akuten oder chronischen Infektionen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Hierzu zählt auch die Frage, inwieweit PMN, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, eine regulatorische Rolle in der spezifischen, adaptiven Immunantwort durch T-Zellen einnehmen (271, 272). Es sind z.B. stimulierende Zytokine (wie IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$ ) bekannt, die von PMN sezerniert werden, und T-Zellen aktivieren oder zum Ort der Infektion rekrutieren können. Aber auch umgekehrt haben T-Zell assoziierte Zytokine Einfluss auf die Aktivierung, Regulation, Differenzierung und Lebensspanne der PMN (169). Während einer Infektion, aber auch im Gesunden koexistieren PMN und T-Zellen im Lymphknoten, am Ort der Entzündung oder im TME.

Minns et al. untersuchten ebenfalls in vitro die Interaktion zwischen T-Zellen und PMN. Sie entwickelten Kultivierungssysteme um die Interaktion zwischen T-Zellen und PMN in den verschiedenen Stadien der Entzündung zu simulieren: (i) Die Interaktion zwischen naiven T-Zellen und ruhenden PMN, wie sie auch im peripheren Blut anzutreffen wäre, (ii) die Interaktion zwischen früh aktivierten T-Zellen und PMN im Lymphknoten und (iii) die Interaktion zwischen spät aktivierten T-Zellen und aktivierten PMN, wie sie zum Beispiel im entzündeten Gewebe zu finden wären. Sie gingen mit diesen Modellen der Frage nach, in welchem Zustand die Interaktion zwischen PMN und T-Zellen eher supprimierend und in welcher Konstellation diese Interaktion eher stimulierend auf die T-Zellproliferation wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die in Anwesenheit von ruhenden PMN initial aktiviert wurden, eine stark suppressierte Proliferation zeigten. Diese Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen der Ko-Kultivierung von frisch isolierten PMN und früh CD3/CD28-aktivierten T-Zellen trotz Arginaseinhibition. Minns et al. entdeckten, dass bereits für 24 h aktivierte T-Zellen, welche somit erst zu einem späteren Zeitpunkt mit PMN ko-kultiviert oder T-Zellen die mit aktivierten PMN (mittels LPS, Cytochalasin B oder fMLF) ko-kultiviert wurden, eine starke Aktivierung, Proliferation und Zytokinbildung zeigten. Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass in der frühen initialen Aktivierung von T-Zellen zusätzliche inhibitorische Faktoren

vorhanden sind, die bei Kontakt zu PMN eine suppressive Wirkung auf die T-Zellaktivierung haben (273).

Die Untersuchung genau dieser beiden Ko-Kultivierungssysteme, bereits aktivierte T-Zellen in Ko-Kultur mit PMN oder T-Zellen in Ko-Kultur mit aktivierten PMN, in dem von unserer Arbeitsgruppe etablierten System unter Arginasehemmung wäre eine interessante Ergänzung in Hinblick auf die direkte Interaktion von T-Zellen und PMN unter Arginaseinhibition. Auch könnte dies tiefere Einblicke in die Frage liefern, in welchem Stadium der T-Zellaktivierung (initiale Aktivierung durch APC im Lymphknoten oder erst im späteren Verlauf nach Aktivierung und Migration der T-Zelle ins TME) bzw. ebenso in welchem Stadium der PMN (ruhend oder aktiviert) die sezernierten Faktoren hyperaktivierenden Einfluss auf die T-Zellen haben.

### **7.1.3 Arginase und direkter Zell-Zellkontakt (und nicht ROS) als Hauptmechanismen der PMN induzierten T-Zellsuppression**

Es existieren neben der Arginase weitere Mechanismen wie ROS oder die Expression von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren, über die T-Zellen supprimiert werden. ROS führen in T-Zellen zu oxidativem Stress, beeinflussen T-Zell-Rezeptorsignalwege auf unterschiedliche Weise. Sie induzieren eine Herabregulation der TCR/CD3- $\zeta$ -Kette (194), führen zu einer veränderten Phosphorylierung in der T-Zellrezeptorsignalkaskade und in hohen Konzentrationen zur Apoptose der T-Zellen (267). Um den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die supprimierte T-Zellproliferation in der Ko-Kultivierung auszuschließen, wurden Ko-Kulturversuche mit dem Radikalfänger NAC durchgeführt. Aber auch in Anwesenheit von diesem war keine Verbesserung der proliferativen Eigenschaften der T-Zellen zu beobachten (Abbildung 11). Somit konnten reaktive Sauerstoffspezies als mögliche Ursache der gehemmten Proliferation in Ko-Kultivierung ausgeschlossen werden.

Diese Erkenntnis macht den direkten Zell-Zellkontakt zwischen PMN und T-Zellen vermutlich hauptverantwortlich für die supprimierte T-Zellproliferation. Um dies zu untersuchen wurden Experimente in Transwellkultivierungssystemen durchgeführt, um den Zell-Zellkontakt aufzuheben. Erst durch die Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte zwischen T-Zellen und PMN konnte die Proliferation der T-Zellen wieder hergestellt und der hyperaktivierende Effekt der PMN unter Arginaseinhibition auf die T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 12). Grund für die nahezu identischen Proliferationswerte von T-Zellen in der Transwellkultur mit PMN mit oder ohne Arginaseinhibition mittels nor-NOHA stellt vermutlich die Inkubationszeiten dar. Während in den Versuchen mit PMN-ÜS der Überstand mit und ohne nor-NOHA über 72 h generiert wurde und die T-Zellen erst nach diesen 72 h in diesem für 48 h aktiviert werden, so wurden in der Transwellkultur die T-Zellen mit den PMN direkt nach ihrer Zellisolation im Transwell-System für 48 h aktiviert und inkubiert. Es fehlt somit die 72-stündige PMN-Vorinkubation, in denen die PMN im +Arg-RPMI-Medium angesetzt werden, sterben und

Faktoren wie z.B. Arginase freisetzen. Wie bereits Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, sinkt die Argininkonzentration erst innerhalb der 72-stündigen PMN-Vorinkubation ohne Arginaseinhibition auf ungefähr 20  $\mu\text{M}$  ab (261). Diese niedrige Argininkonzentration sorgt für die komplette Suppression der T-Zellproliferation im PMN-ÜS ohne nor-NOHA. Die alleinige 48-stündige Transwellkultur von PMN und T-Zellen ist vermutlich nicht ausreichend, um durch die freigesetzte Arginase eine derartige Arginindepletion zu erreichen bzw. es steht zu Beginn der T-Zellaktivierung noch ausreichend Arginin zu Verfügung und es kommt nicht bzw. erst später zur Herunterregulation der TCR/CD3- $\zeta$ -Kette.

Es ist bekannt, dass nicht nur Tumore, sondern auch Zellen des eigenen Immunsystems wie PMN über die PD-1/PDL-1-Achse T-Zellen supprimieren. Im TME wird diese Suppression vor allem über MDSCs vermittelt (274-278). Auch konnte gezeigt werden, dass der über Zelltransfer zwischen T-Zellen und (M-)MDSCs übertragene Metabolit Methylglyoxal T-Zellen über eine Reduktion des intrazellulären Arginins supprimiert (269). Die durchgeführten Versuche in 5.1.2 (*Untersuchung der Auswirkung von radikalen Sauerstoffspezies in T-Zell-PMN-Kokultur*) und 5.1.3 (*Kultivierung von T-Zellen mit PMN in Transwell-Kultur*) zeigen deutlich, dass die Arginase-vermittelte Arginindepletion und der direkte Zell-Zellkontakt und nicht ROS (66) die beiden stärksten Mechanismen der durch PMN induzierten T-Zellsuppression darstellen.

In diesem Zusammenhang wären weitere Ko-Kultivierungsversuche von PMNs und T-Zellen mit einer PD-1/PD-L1-Blockade mittels Checkpoint-Inhibitoren zusätzlich zur Arginaseinhibition mittels nor-NOHA interessant. Neben einem möglichen Einfluss der PD-1/PDL-1-Achse auf die gehemmte T-Zellproliferation in der direkten PMN/T-Zell Ko-Kultur existieren ggf. ähnlich zu M-MDSCs Metabolite, die in einem direkten Zellkontakt von PMN auf T-Zellen transferiert werden. Dass PD-(L)1 womöglich einen Einfluss hat, zeigt dass die Anwendung von Kombinationstherapien von PD-1/PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren und Arginaseinhibitoren oder L-Arginin Applikation in murinen Tumormodellen eine deutlich stärkere Kontrolle auf das Tumorwachstum hat als die jeweils singulären Therapiestrategien (279, 280). Durch eine Kombinationstherapie wäre somit nicht nur die Immuncheckpointblockade durch den Tumor aufgehoben, sondern gleichzeitig stünde die benötigte Menge an Arginin für die T-Zellproliferation zur Verfügung. Falls im direkten Zell-Zell-Kontakt mit PMN(-MDSCs) die Inhibition über PD-1/PD-L1 für die T-Zellsuppression verantwortlich ist, wäre diese ebenfalls aufgehoben und den T-Zellen stünden überwiegend die hyperaktivierenden Faktoren der PMN zur Verfügung.

#### **7.1.4 Beeinflussung der Hyperaktivierung durch Mediumzusätze**

Für in vitro T-Zellkulturen sind fetales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) oder fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) ein vielfach verwendetes Supplement. FCS/FBS

enthalten Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, Proteine und Vitamine etc., die für Viabilität und Funktionalität von T-Zellen unerlässlich sind. Die Verwendung von humanem Serum (huABS) wiederum schafft eine noch physiologischere, den humanen Bedingungen angepasste Umgebung, um T-Zellwachstum und Differenzierung *in vitro* zu untersuchen. Das Grundlagenmedium enthält allerdings teilweise supraphysiologische Konzentrationen von Aminosäuren oder anderen Nährstoffen. Zusätzlich werden dem Medium teilweise weitere Faktoren wie verschiedene Interleukine (z.B. IL-2) zur T-Zellstimulation supplementiert (281).

Die Versuche mit unterschiedlichen Mediumzusammensetzungen zeigen, wie stark der Einfluss der verschiedenen Mediumkomponenten auf die T-Zellproliferation ist (Abbildung 13). In dem von uns etablierten Modell zur Analyse der hyperaktivierenden Effekte von PMN auf T-Zellen unter Arginaseinhibition wurde bewusst das +Arg-RPMI-Medium verwendet, um genau den hyperaktivierenden Effekt sichtbar werden zu lassen. Um externe Faktoren und Einflüsse auf die T-Zellaktivierung so gering wie möglich zu halten, diente als FCS-Komponente dialysiertes FCS und alle für die T-Zellaktivierung und Proliferation bedeutenden Aminosäuren, insbesondere Arginin, wurden in physiologischer Konzentration zugesetzt.

#### **7.1.4.1 Kein Einfluss der Argininkonzentration auf T-Zellhyperaktivierung**

Als Grundlagenmedium diente in diesen Versuchen ein spezielles Depletionsmedium, in welches alle für die T-Zellproliferation nötigen Aminosäuren in physiologischen Konzentrationen zugesetzt wurden. Für die Argininkonzentration wurde 150  $\mu\text{M}$  verwendet, ähnlich der physiologischen Serum-Konzentration mit 60-140  $\mu\text{M}$  Arginin (282). Die meisten RPMI-Medien weisen meist eine supraphysiologische Argininkonzentration von 1 mM auf, sowie weitere essenzielle Aminosäuren in hohen Konzentrationen auf. Eine Reduktion der Argininkonzentration auf einen physiologischen Spiegel zur Untersuchung der T-Zellen *in vitro* ist aus mehreren Gründen sinnvoll. (i) Im menschlichen Körper werden Konzentrationen von 1 mM Arginin im Plasma nicht erreicht, weswegen Studien an T-Zellen *in vitro* in der Anwesenheit von so hohen Argininkonzentrationen möglicherweise verfälschte Ergebnisse liefern könnten. Auch ist noch wichtiger die Tatsache zu bedenken, dass in Mikroumgebungen wie dem TME in der Regel weit geringere Argininkonzentrationen vorliegen als im Blut. Das *in vitro* Studium von zellulären Interaktionen sollte also soweit möglich hier die physiologischen Bedingungen nachbilden. (ii) Geiger et. al. konnten zum Beispiel zeigen, dass die Erhöhung der Argininkonzentration bei der T-Zellkultivierung einen Einfluss auf Proliferation, Metabolismus und Phänotyp der T-Zellen hat (193). Unterschiedliche Konzentrationen von Arginin nehmen demnach direkt Einfluss auf die T-Zellaktivität. In 5.1.4 (*Einfluss verschiedener Kulturmedien zur PMN-ÜS-Generierung auf die T-Zellproliferation und Hyperaktivierung*) konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Erhöhung der Argininkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  auf 1 mM in dem sonst mit dialysierten FCS versetzten Depletionsmedium in unserem

Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Proliferation und Hyperaktivierung der T-Zellen hat (Abbildung 13).

#### **7.1.4.2 Sichtbarkeit der Hyperaktivierung nur unter Verwendung von dialysiertem FCS**

Als Serumkomponente wird in unseren Versuchen dialysiertes FCS verwendet. Die Dialysegrenze liegt bei 10 kDa, so dass dialysiertes FCS frei von kleinen Molekülen wie Aminosäuren, Nukleotiden oder Metaboliten ist.

Bei der Verwendung von herkömmlichen RPMI-Medien sowie der Supplementierung verschiedener nicht dialysierter Serumformen werden Unterschiede in der T-Zellproliferation deutlich. Sowohl bei der Verwendung von Medium mit FCS als auch mit huABS zeigten die T-Zellen bereits in der reinen Mediumbedingung eine gesteigerte Proliferation im Vergleich mit den Bedingungen, in denen dialysiertes FCS dem Medium zugegeben wurde. Interessant war, dass in den PMN-ÜS, die in diesen beiden Medien (mit FCS und huABS) generiert wurden, durch die Arginaseinhibition zwar eine Rekonstitution der T-Zellproliferation erreicht werden konnte, aber keine Hyperaktivierung der T-Zellen sichtbar war. Dies könnte auch ein Grund sein, warum in früheren Versuchen von Munder et al., welche gewöhnliches FCS für das Medium des PMN-ÜS verwendeten, unter Arginaseinhibition nur die Proliferationsrekonstruktion der T-Zellen zu beobachten war, nicht aber eine durch PMN ausgelöste Hyperaktivierung (42).

Der immunstimulatorische Effekt der PMN scheint somit durch die Verwendung von FCS oder huAB-Serum maskiert zu sein. Sowohl FCS als auch huABS enthalten zahlreiche Wachstumsfaktoren, Interleukine oder Proteine, die unmittelbar Einfluss auf die T-Zellproliferation haben, sodass die von PMN sezernierten Faktor(en) in diesen Bedingungen keinen hyperaktivierenden Effekt induzieren. Erst durch die Verwendung von dialysiertem FCS und 150  $\mu$ M Arginin wird der hyperaktivierende Einfluss des PMN-ÜS unter Arginase-Inhibition auf die T-Zellen sichtbar. Der Versuch zeigt ebenfalls, dass die Proliferation von hyperaktivierten T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA ähnlich der Proliferation wie FCS- oder huABS-Medium ist. Dies wirft die Frage auf, ob undialysiertes FCS oder huABS womöglich genau die von PMN-sezernierten Faktor(en) enthalten, welche unter eher physiologischer „Mangelbedingung“ zur Hyperaktivierung der T-Zellen führen. Da gezeigt werden konnte, dass es sich bei den immunstimulatorischen Faktor(en) der PMN um einen Faktor mit einem Molekulargewicht  $< 3$  kDa handelt (260), wären vergleichende Versuche mit dialysiertem huABS, welches dem Medium zur PMN-ÜS Generierung zugesetzt wird aufschlussreich. Dies könnte zeigen, ob kleine Moleküle im huABS für die stärkere T-Zellproliferation (als in dial. FCS) verantwortlich sind. Ebenfalls stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob der PMN-ÜS (mit nor-NOHA) allein - ohne die Zugabe von dialysiertem FCS - ausreicht, um T-

Zellen zu aktivieren/hyperaktivieren. Hier konnte aber gezeigt werden, dass im PMN-ÜS mit nor-NOHA und 0 % dial. FCS keine T-Zellproliferation detektierbar war (Anhang, Abbildung 5). Die Metabolite > 10 kDa im FCS sind somit weiterhin für eine suffiziente T-Zellaktivierung notwendig.

Diese Versuche zeigen deutlich, wie sensitiv T-Zellen in vitro auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen reagieren und somit heterogene Daten mit T-Zellkulturen erzielt werden, je nachdem, welches Medium, Aminosäurekonzentration, Serum o.a. verwendet wird (Abbildung 13). Ähnliches wird auch bei Pipkin et al. in Bezug auf extern zum Medium zugesetzte Zytokine deutlich. Die Supplementierung von IL-2 in unterschiedlichen Konzentrationen zeigt starke Auswirkung auf die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Je nach IL-2 Konzentration im Kulturmedium zeigten T-Zellen eine unterschiedliche Expression der Enzyme Perforin oder Granzym B und somit unterschiedliche zytotoxische Aktivität, aber auch unterschiedliche Proliferationseigenschaften und unterschiedliche Differenzierung in Effektor- oder Gedächtniszellen (283). Zudem aktiviert IL-2 in T-Zellen Signalwege wie STAT5, PI3K oder MAPK (284). Um diese Effekte des von extern zugegeben IL-2 zu vermeiden, werden, wenn nicht ausdrücklich beschrieben, in unserer Kultivierungsmethode keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren oder Interleukine supplementiert. Somit eignet sich das von uns etablierte Kultivierungssystem hervorragend, um gezielt nur den Einfluss der von PMN sezernierten Faktor(en) auf die T-Zellaktivierung, Proliferation, Signalwege und weitere untersuchte Aspekte sichtbar zu machen. Aber auch die Art der Aktivierung hat Einfluss auf die T-Zellaktivierung und Differenzierung. So konnte z.B. gezeigt werden, dass T-Zellen, welche mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert wurden, länger überleben und deutlich verstärkter in TCM differenzieren als nach der Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern wie OKT-3 (285).

Selbst möglichst optimale in vitro Bedingungen können eine in vivo Situation wie im TME niemals korrekt simulieren. So können viele Ergebnisse, die durch Grundlagenforschung in vitro erlangt werden, nicht 1:1 in vivo repliziert werden. Durch die neuen adaptiven T-Zelltherapien wird jedoch deutlich, wie wichtig auch die in vitro Kultivierung von T-Zellen für die Tumorthherapie ist, da der Herstellungsprozess der Zellprodukte in vitro Stimulation und Expansion beinhaltet. Ziel ist es, die besten in vitro Kultivierungsbedingungen, die effektivste Stimulationsmethode oder den besten Zeitraum zu erforschen, um T-Zellen für eine effektive Tumorthherapie zu generieren (237, 286). Der immunstimulatorische Effekt der PMN, der T-Zellen auf die hier gezeigte Art hyperaktiviert, in ihrer Funktion verstärkt und die Differenzierung in TCM fördert, hat somit nicht nur in vivo Einfluss auf die antitumorale Funktion der T-Zellen im TME, sondern kann somit auch in vitro möglicherweise für die Generierung von potenten T-Zellen für die zelluläre Tumorthherapie eingesetzt werden.

### **7.1.5 Hyperaktivierung erhält natürliches CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellverhältnis in Langzeitkultur**

Der Einfluss unterschiedlicher Medien auf die T-Zellproliferation wurde auch in den Langzeitkulturen sichtbar. Hier wurden T-Zellen sowohl in Medium mit huABS, in +Arg-RPMI-Medium (mit dial. FCS) als auch in PMN-ÜS mit nor-NOHA expandiert. Im Vergleich dieser Konditionen konnte eine bessere Proliferation der T-Zellen in Medium mit huABS beobachtet werden, da dieses womöglich die für T-Zellen in vitro besten Bedingungen liefert (siehe Abbildung 53). Im zeitlichen Verlauf konnte allerdings deutlich ein unterschiedliches Verhältnis der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen nachgewiesen werden. Während in huABS-Medium eine deutliche Selektion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Zeit erfolgte und im +Arg-RPMI-Medium eher die CD4<sup>+</sup> T-Zellen selektiert wurden, blieb im PMN-ÜS das CD8<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> Verhältnis über den beobachteten Zeitraum nahezu konstant (Abbildung 55).

Im Allgemeinen werden vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben. Aus diesem Grund lag auch in der zellulären Tumorimmuntherapie lange Zeit der Fokus auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass gerade die unterstützende Wirkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie in 3.1.4.3 (*CD4<sup>+</sup> T-Zellen im tumorimmunologischen Kontext*) beschrieben, wichtig ist, um (i) die zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu etablieren, (ii) diese auch für einen länger andauernden Zeitspanne aufrecht zu erhalten und (iii) eine adäquate CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellbildung zu gewährleisten (119, 122, 287). Das Vorhandensein von CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im TME erhöht die Rekrutierung, Proliferation und Funktion von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (288). Auch in der CAR-T-Zelltherapie sind die synergistischen Effekte von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unerlässlich. Sommermeyer et al. konnten zeigen, dass die Proliferation von TCM CD8-CAR-T-Zellen in Anwesenheit von TCM und TN CD4-CAR-T-Zellen deutlich gesteigert ist und in vivo ein deutlich stärkerer antitumoraler Effekt beobachtet werden konnte (235). Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass der Erhalt eines natürlichen CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> Verhältnisses, welches in der Langzeitkultivierung von T-Zellen in PMN-ÜS unter Arginaseinhibition erhalten blieb, für die Generierung einer effektiveren antitumoralen T-Zelltherapie potentiell einen bedeutenden Stellenwert einnimmt.

### **7.2 T-Zellhyperaktivierung ist argininabhängig - keine Hyperaktivierung durch Citrullin-Supplementierung möglich**

Arginase wird von verschiedenen Zelltypen im inflammatorischen Milieu oder im TME exprimiert. MDSC (58, 69) oder auch konventionelle PMN (14) exprimieren Arginase und depletieren die Aminosäure Arginin. Aber auch Tumorzellen selbst sind in der Lage, Arginase zu exprimieren und eine immunsuppressive Umgebung zu fördern (13, 199). Der Mangel an Arginin, sei er systemisch oder im TME, inhibiert T-Zellen in ihrer Aktivierung, Proliferation und somit in ihrer antitumoralen Funktion. Die Depletion von Arginin im TME und die dadurch entstandene immunsuppressive Umgebung stellt in vielen Tumorentitäten einen bekannten

Tumorevasionsmechanismus dar. Unter bestimmten Argininmangelbedingungen (hierzu ist aber eine Konzentration von ca. 20  $\mu\text{M}$  Arginin nötig) können T-Zellen die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin aufnehmen und diese über die Enzyme ASS und ASL zu Arginin metabolisieren. Bei ausreichend vorhandenem Citrullin kann somit die Proliferation der T-Zellen vollständig rekonstituiert werden (208). In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Arginkonzentration im PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition je nach PMN-Konzentration abfällt. Hier wurden Werte zwischen 41,6  $\mu\text{M}$  und 15,6  $\mu\text{M}$  Arginin ermittelt (261). Dies wäre somit ein Bereich, in welchem durch die Zugabe von Citrullin eine Rekonstitution der T-Zellproliferation erreicht werden müsste. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch die Zugabe von Citrullin nicht nur eine Rekonstitution der T-Zellproliferation erreicht wird, sondern ob auch durch Citrullin eine Hyperaktivierung der T-Zellen wie in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition beobachtet werden kann.

Es zeigte sich, dass durch die Zugabe von Citrullin in den PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition (auch mit Zugabe von Arginin) zwar eine Rekonstitution der Proliferation wie in konventionell aktivierten T-Zellen erzielt werden konnte, nicht aber eine Hyperaktivierung wie in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition (Abbildung 14). Hieraus kann abgeleitet werden, dass die PMN-induzierte Hyperaktivierung von T-Zellen von einer initial vorhandenen und ausreichenden Argininmenge abhängig ist bzw. Arginin eventuell als Co-Faktor für die Hyperaktivierung induzierenden Faktor(en) dient.

Die Herstellung von Arginin aus Citrullin erfolgt in T-Zellen über einen zweistufigen enzymatischen Prozess, der die Hochregulation des Enzyms ASS bei im Wesentlichen konstitutiver Expression von ASL beinhaltet. Werner et al. konnten zeigen, dass vor allem ASS in T-Zellen erst nach einem Zeitraum von 96 h nach der T-Zellaktivierung unter Argininmangel (20  $\mu\text{M}$ ) und Citrullinverfügbarkeit präsent war (208). Es ist gut möglich, dass in den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen, in denen die Proliferation der T-Zellen 48 h nach der Aktivierung untersucht wurde, noch nicht ausreichend Zeit vergangen war, um die für die Hyperaktivierung in PMN-ÜS benötigte Argininmenge aus Citrullin de novo zu synthetisieren. Ein weiterer denkbarer Erklärungsansatz wäre, dass die immunstimulatorischen Faktor(en) des PMN-ÜS in Kombination mit Arginin zu einem sehr frühen Punkt der T-Zellaktivierung eingreifen, wie zum Beispiel direkt bei der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. Arginin selbst ist im Rahmen der TCR-Signalübertragung verantwortlich für die regelrechte Expression der CD3  $\zeta$ -Kette (194). Die Phosphorylierung der ITAMs, welche an der  $\zeta$ -Kette assoziiert sind, und die anschließende Rekrutierung von ZAP70 sind die ersten Schlüsselschritte im Rahmen der TCR-Signalübertragung (84). Es ist möglich, dass die von PMN-Sezernierten Faktor(en) in Kombination mit ausreichend Arginin eventuell in diese ersten Aktivierungsschritte eingreifen und diese womöglich verstärken oder potenzieren. Eine verzögerte de novo Synthese von

Arginin aus Citrullin zeigt somit nicht den gewünschten Effekt und erzielt keine T-Zell-Hyperaktivierung.

Versuche, welche die Proliferation zu späteren Zeitpunkten untersuchen wären hier hilfreich, um zu ermitteln, ob auch in PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition unter Citrullinsupplementation eine Hyperaktivierung der T-Zellen möglich wäre. Auch eine detaillierte Untersuchung der Expression von Enzymen und Transportern des Argininstoffwechsels wie ASS, ASL oder LAT1 könnte Aufschluss über den Arginin-Citrullin-Metabolismus von T-Zellen aktiviert in PMN-ÜS  $\pm$  Arginaseinhibition geben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die von PMN sezernierten Faktoren nur in Kombination mit Arginin zu einer Hyperaktivierung der T-Zellen 48 h nach Aktivierung führen.

### **7.3 Verstärkte Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der Proteintranslation, Aktivierung und Metabolismus in hyperaktivierten T-Zellen**

#### **7.3.1 Gesteigerte Phosphorylierung von STAT-Proteinen**

In hyperaktivierten T-Zellen zeigte sich tendenziell eine erhöhte Phosphorylierung der STAT-Proteine (Abbildung 44 und im Anhang Abbildung 3). Der STAT-Signalweg wird über Janus-Kinasen (JAK) durch extrazelluläre Signale (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone etc.) aktiviert. STAT-Proteine dimerisieren, translozieren in den Zellkern und binden an bestimmte Regulationssegmente der DNA. Sie sind maßgeblich an der Transkriptionsaktivierung beteiligt und regulieren hierüber Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und den Zellmetabolismus. Durch die Aktivierung über verschiedene Zytokine sind STAT-Proteine in T-Zellen an der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt. So ist STAT1 an der Differenzierung in Th1, STAT3 in Th17-, STAT4 in Th1- und Tfh-, STAT5 in Th1 und Th2 sowie STAT6 in Th2-Zellen beteiligt (289, 290). Besonders STAT3 und STAT5 sind in hyperaktivierten T-Zellen verstärkt phosphoryliert. Beide sind vor allem an der Regulation von Zellwachstum und Zellmetabolismus beteiligt (290). STAT5 wird vor allem über die *common  $\gamma$ -chain* Zytokine (*yc-cytokine*) IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 aktiviert, welche im Allgemeinen eine wichtige Rolle in der Aktivierung, Differenzierung und Viabilität von T-Zellen einnehmen (291). Über STAT5 nachgeschaltete Signalwege kommt es zur gesteigerten Transkription von GLUT-1 und Enzymen, welche an Glykolyse, oxidativer Phosphorylierung sowie Fettsäuremetabolismus beteiligt sind (290). Zudem ist STAT5 in die mTOR-Signalübertragung eingebunden. Über IL-2 wird in T-Zellen der PI3K-AKT-Signalweg aktiviert, welcher mTOR aktiviert. Unabhängig davon wird mTOR ebenfalls durch das Vorhandensein von ausreichend Nährstoffen aktiviert. Ein Schlüsselprotein hierbei ist der Aminosäuretransporter SLC7A5, welcher als Aminosäuresensor der mTOR-Aktivierung dient (83). STAT5 ist u.a. ein wichtiger Aktivator der Transkription dieser Schlüsselproteine (292).

Bitar et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von STAT5 eine positive Korrelation zur T-Zellproliferation aufweist (293), welche gut mit den stark proliferierenden hyperaktivierten T-Zellen vereinbar ist.

### **7.3.2 Vermehrte Expression von HSP60 in hyperaktivierten T-Zellen**

HSP60 ist sowohl ein mitochondriales als auch zytosolisches Protein, welches bei vermehrter zellulärer Aktivierung und auch zellulärem Stress hochreguliert wird. Es dient als Chaperon der Faltung von Proteinen in ihre Tertiärstruktur. Zusätzlich wirkt HSP60, wenn es sezerniert oder durch Zelltod frei wird, auch als Signalmolekül und stimuliert in Zellen des Immunsystems die proinflammatorische Zytokinproduktion (294). In hyperaktivierten T-Zellen ist HSP60 vermehrt exprimiert (siehe Abbildung 44 und im Anhang Abbildung 3). Es ist nachvollziehbar, dass diese stark aktivierten und proliferierenden Zellen mit gesteigerter Proteintranslation sowie gesteigerter mitochondrialer Aktivität eine vermehrte HSP60 Expression aufweisen, die dafür sorgt, dass frisch translatierte Proteine richtig gefaltet und somit funktionsfähig gemacht werden.

### **7.3.3 Verstärkte Phosphorylierung von PYK2 in hyperaktivierten T-Zellen**

Auch die Prolin-reiche Tyrosinkinase 2 (PYK2) ist in hyperaktivierten T-Zellen stärker phosphoryliert. PYK2 spielt vor allem eine entscheidende Rolle in der Zellmigration und als Regulator des Aktin-Zytoskeletts (295). In diesem Zusammenhang ist vor allem die Zellmorphologie der hyperaktivierten T-Zellen hervorzuheben, in der deutliche Ausstülpungen der Zellmembran zu erkennen sind und demnach im Rahmen der Hyperaktivierung eine deutliche Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zu beobachten ist.

### **7.3.4 TCR-Signaltransduktion: Verstärkte Phosphorylierung der Schlüsselproteine der Proteintranslation in hyperaktivierten T-Zellen**

Um die TCR-Signalkaskade detaillierter zu untersuchen, wurde ein besonderer Fokus auf die beiden Hauptsignaltransduktionswege, den PI3K/Akt/mTORc1-Signalweg und den MAPK-Signalweg, gelegt. Beide Wege führen in ihren distal aktivierten Proteinen zusammen und sind somit Schlüsselfaktoren für die Initiierung der Proteintranslation. Um die Auswirkung auf die gesamte Signalkaskade zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit proximale und distale Proteine ausgewählt und die Expression der phosphorylierten und somit aktivierten Varianten im Western Blot untersucht. Die Aktivität von mTOR kann über die Phosphorylierung der beiden Endsubstrate S6 und 4EBP-1 ermittelt werden. Sowohl 4EBP1 als auch S6 zeigten in den hyperaktivierten T-Zellen eine deutlich stärkere Phosphorylierung als in konventionell in Medium aktivierten T-Zellen (Abbildung 48 und 47). Akt hingegen als einer der Aktivatoren von mTOR wies in hyperaktivierten T-Zellen an der T308 Stelle eine deutlich schwächere Phosphorylierung auf und zeigte somit keinen Unterschied zu unaktivierten T-Zellen

(Abbildung 46). Die Aktivierung über Akt ist aber nicht der einzige Weg, über den es innerhalb einer Zelle zur Aktivierung des mTOR-Komplexes kommt. Als hochkonserviertes Protein reagiert mTOR über vorgeschaltete Sensoren auf die metabolische Aktivität der Zelle. Zu nennen wäre hier das Vorhandensein von ausreichend ATP, aber auch das Vorhandensein von Nährstoffen in der unmittelbaren Zellumgebung sowie genügend Nährstoffe wie Aminosäuren innerhalb der Zelle. Ist in einer Zelle z.B. ausreichend Arginin vorhanden, wird dies über die vorgeschalteten Sensorproteine SLC38A9 (im Lysosom) und CASTOR1 (im Zytosol) registriert, welche dann zur Aktivierung des mTOR-Signalwegs führen (296, 297). Ein ähnliches Prinzip existiert auch für die Aminosäure Leucin. Hier dient Sestrin2 bei ausreichender Verfügbarkeit von Leucin als Sensor und aktiviert anschließend mTOR (298). Auch aktivierende Zytokine wie IL-2, IL-12 oder IFN- $\gamma$  führen zu einer Aktivierung von mTOR. Die Aktivierung von mTOR und nachgeschalteten Signalwegen ist somit eng an die Aufnahme von Nährstoffen und mit dem Metabolismus der T-Zellen gekoppelt. Die Aktivierung von mTOR trägt anschließend entscheidend zur Regulierung von Zellgröße, Wachstum, Proliferation, Überleben und Stoffwechsel der Zelle bei (97-99, 299-301).

Es ist bekannt, dass die Proteinbiosynthese ein für die Zelle sehr Energie konsumierender Vorgang ist, weswegen ihre Initiation komplex und strikt reguliert ist. Durch die immunstimulierenden Faktor(en) der PMN wird die Proteintranslation in T-Zellen deutlich aktiviert. Die Initiierung der Translation folgt hauptsächlich über zwei Mechanismen. Die beiden Proteine 4EBP1 und eIF4E nehmen hierbei eine Schlüsselfunktion ein. An 4EBP1 gebunden ist eIF4E in seiner Funktion zunächst inhibiert. Erst durch die Phosphorylierung von 4EBP1, welche in hyperaktivierten T-Zellen sehr stark zu beobachten war (Abbildung 48), wird eIF4E freigegeben. eIF4E ist zudem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und hemmt, wenn überexprimiert, die Apoptose (302). Es konnte gezeigt werden, dass hyperaktivierte T-Zellen deutlich weniger in Apoptose gehen (261). Eine Aktivierung von eIF4E kann ebenfalls über den MAPK-Signalweg über Mnk1, ein Substrat von Erk1/2 oder MAPK p38, erfolgen. Anschließend kann eIF4E an die mRNA binden, diese zum Ribosom rekrutieren und die Translation initiieren (93, 303). Obwohl in hyperaktivierten T-Zellen die MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 keine stärkere Phosphorylierung als in konventionell aktivierten T-Zellen aufweisen (Abbildung 49 und 50), ist ihr Substrat, der eukaryotische Initiierungsfaktor eIF4E, in hyperaktivierten T-Zellen dennoch stark phosphoryliert. Auch die deutlich vergrößerte Zellmorphologie (Abbildung 51), das verbesserte Wachstum und Proliferation in Kurz- und Langzeitkultivering (Abbildung 53), die größere Viabilität (261) sowie der deutlich gesteigerte Stoffwechsel in hyperaktivierten T-Zellen (Abbildung 21, 22, 23, 24, 25, 26) sind ein starkes Indiz dafür, dass der/die immunstimulierende(n) Faktor(en) der PMN, unabhängig von der Akt-Aktivierung, Einfluss auf die mTOR-Aktivierung hat/haben und die Proteinsynthese in

hyperaktivierten T-Zellen deutlich verstärkt ist. Möglich wäre hier vielleicht eine mTOR-Aktivierung über STAT5.

In den phänotypischen Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hyperaktivierte T-Zellen deutlich mehr zu CD62L positiven TCM differenzieren (Abbildung 36, 38). Araki et al. konnten bereits den Einfluss von mTOR auf die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu T-Gedächtniszellen identifizieren (304). Macintyre et al. liefern mit ihren Untersuchungen zudem einen möglichen Erklärungsansatz für die geringere Phosphorylierung von Akt in hyperaktivierten T-Zellen. Ein Verlust der Phosphorylierung oder eine Inhibition von Akt hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (95). Eine bewusste Inhibition von Akt führt dazu, dass deutlich mehr T-Zellen bei der Expansion zu TCM differenzieren und den Oberflächenmarker CD62L exprimieren (305, 306). Hier stellt sich die Frage, ob es durch die von PMN sezernierten Faktoren womöglich zu einer Akt-Inhibition kommt und somit in hyperaktivierten T-Zellen die Differenzierung zu TCM verstärkt wird.

Wegweisend wäre eine weiterführende detaillierte Untersuchung des Proteoms bzw. Transkriptoms der hyperaktivierten T-Zellen im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen, um ein noch besseres Verständnis darüber zu erlangen, wie der immunstimulierende Effekt der PMN Einfluss auf bestimmte Signalwege der T-Zellen nimmt.

## **7.4 Gesteigerter Metabolismus in hyperaktivierten T-Zellen**

### **7.4.1 Hyperaktivierte T-Zellen zeigen sowohl gesteigerte Glykolyse als auch OXPHOS**

T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA hyperaktiviert wurden, wiesen eine signifikant gesteigerte metabolische Aktivität im Vergleich zu konventionell aktivierten T-Zellen auf. Die detaillierte Analyse der T-Zellen im Agilent Seahorse Cell Mito Stress-Test zeigte bei hyperaktivierten T-Zellen bereits in den basalen Werten stark erhöhte glykolytische Aktivität sowie eine deutlich stärkere OXPHOS (Abbildung 22, 25). Es ist bekannt, dass bei aktivierten T-Zellen vor allem die glykolytische Aktivität stark ansteigt, während ruhende TN eher OXPHOS betreiben (193). Trotz ausreichend vorhandenem Sauerstoff betreiben aktive und proliferierende T-Zellen aerobe Glykolyse. Diese dient der schnellen ATP-Gewinnung über die Glykolyse unter Bildung von Laktat (307). Diesen Warburg Effekt nutzen somit nicht nur, wie einleitend beschrieben, Tumorzellen, sondern auch stark proliferierende T-Zellen zur Energiebereitstellung (308). Hierüber wird zwar im Vergleich zu OXPHOS deutlich ineffizienter ATP generiert, welches aber dafür schneller zur Verfügung steht. Über die Glykolyse werden zudem auch verschiedene metabolische Zwischenprodukte in den Zellen bereitgestellt, welche im Rahmen weiterer Stoffwechselwege für Zellwachstum und Proliferation verarbeitet werden können (309, 310).

Hyperaktivierte T-Zellen zeigen zwar erhöhte basale Werte für Glykolyse und OXPHOS, scheinen aber im Allgemeinen gegenüber konventionell aktivierten T-Zellen keine Art der Energiegewinnung zu bevorzugen, wie durch die OCR/ECAR-Ratio ermittelt wurde (siehe Abbildung 27). Geiger et al. konnte zeigen, dass T-Zellen, die in Medium mit supplementiertem Arginin aktiviert wurden, ihren Metabolismus von Glykolyse hin zu OXPHOS verschoben haben. Auch eine reduzierte Glukoseaufnahme konnte festgestellt werden (193). Der immunstimulierende Effekt von Granulozyten hingegen erhöhte in T-Zellen sowohl die Glykolyse als auch die oxidative Phosphorylierung sowie die Glukoseaufnahme (siehe Abbildung 21, 24, 28). Bei T-Zellen kultiviert in PMN-ÜS ohne nor-NOHA ist aber zu erkennen, dass sie im Verhältnis mehr OXPHOS betreiben, was mit ihrem ruhenden und nicht proliferierenden Status einhergeht (Abbildung 27).

#### **7.4.2 Gesteigerter Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen vereinbar mit der Differenzierung in TCM**

In hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine stark erhöhte *Spare Respiratory Capacity* (SRC) detektiert werden (Abbildung 23, C; 26, C). SRC als zusätzliche mitochondriale Kapazität steht Zellen zu Verfügung, um beispielsweise unter erhöhten Stressbedingungen Energie zu produzieren. Es wird angenommen, dass diese zusätzliche Kapazität für das Langzeitüberleben von Zellen eine große Rolle spielt und dies einen Überlebensvorteil darstellt, der in der Tumorbekämpfung unabdingbar ist (311, 312). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die SRC ein Regulator in CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Differenzierung zu TCM-Zellen darstellt (313). Jones et al. zeigten, dass TCM (und auch TEM) sowohl eine gesteigerte glykolytische Aktivität als auch OXPHOS aufweisen (314). Die gesteigerte metabolische Aktivität deckt sich somit mit der Feststellung, dass CD8<sup>+</sup> wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in PMN-ÜS hyperaktiviert wurden, zu einem großen Anteil zu TCMs differenzieren (siehe 6.6.2 *Untersuchung der CD45RA/CD62L Expression auf T-Zellen*, Abbildung 36, 38).

#### **7.4.3 Gesteigerter Metabolismus hyperaktivierter T-Zellen als Überlebensvorteil im TME**

Im TME herrschen teilweise extreme Mangelbedingungen: Durch den Tumor kommt es zur Depletion von Nährstoffen, Sauerstoff, Aminosäuren und Glucose. Das TME ist ein Milieu, in dem es für Immunzellen - wie etwa T-Zellen - von deutlichem Vorteil ist, flexibel auf die eingeschränkten Möglichkeiten reagieren zu können, um ihre antitumorale Funktion aufrecht zu erhalten. Die Steigerung dieser metabolischen Flexibilität bzw. die metabolische Umprogrammierung ist immer mehr Bestandteil der aktuellen Forschung im immuntherapeutischen Kontext. Erschöpfte, metabolisch insuffiziente T-Zellen zeigen ein deutlich schlechteres Ansprechen auf die Therapie mit ICI (315). Der PMN-ÜS induziert in T-Zellen nicht nur eine vermehrte Glykolyse, wie es im Allgemeinen bei aktivierten T-Zellen der Fall wäre, durch den PMN-ÜS wird zudem die oxidative Phosphorylierung in T-Zellen, sowie

die *Spare Respiratory Capacity* deutlich verstärkt. All dies sind Hinweise darauf, dass T-Zellen durch die immunstimulatorischen Faktoren der PMN metabolisch deutlich flexibler werden, sich besser anpassen können und somit einen deutlichen Überlebensvorteil im TME erlangen könnten. Die Flexibilität wird zusätzlich durch die Tatsache verstärkt, dass hyperaktivierte T-Zellen nicht nur eine Art der Energiegewinnung präferieren und somit metabolisch deutlich anpassungsfähiger sind.

Bei der Betrachtung metabolischer Vorgänge in Zellen ist es zudem wichtig die Mitochondrien zu analysieren, da sie essentiell für die zelluläre Energiegewinnung sind. Sie spielen zudem eine entscheidende Rolle in Apoptosesignalwegen (316). Es konnte bereits gezeigt werden, dass T-Zellen, die Tumore direkt infiltrieren, eine deutlich reduzierte mitochondriale Funktion und auch Masse aufweisen (317). Hyperaktivierte T-Zellen zeigen in den Funktionstests eine deutlich gesteigerte mitochondriale Aktivität, die über die gesteigerte OXPHOS gemessen werden kann (Abbildung 21, 24). In den morphologischen Untersuchungen der T-Zellen mittels Elektronenmikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass die Mitochondrien der in PMN-ÜS hyperaktivierten T-Zellen deutlich größer erscheinen (Abbildung 18). Somit zeigt sich auch hier die Möglichkeit, mit Hilfe der stimulierenden Faktor(en) des PMN-ÜS dem immunsuppressiven Einfluss des Tumormilieus, in welchem T-Zellen eher an mitochondrialer Masse verlieren (317), entgegenzuwirken.

#### **7.4.4 Verstärkte Glukoseaufnahme in hyperaktivierten T-Zellen ohne erhöhte GLUT-1 Expression**

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutlich verstärkte Glukoseaufnahme von hyperaktivierten T-Zellen gezeigt werden (Abbildung 28). Auffallend in diesem Kontext ist jedoch, dass hyperaktivierte T-Zellen keine signifikante Hochregulation des Glukosetransporters GLUT-1 zeigten. Eine tendenziell vermehrte Expression ist bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennbar (Abbildung 29). Es ist bekannt, dass T-Zellen ihre Glukoseaufnahme hauptsächlich über GLUT-1 regulieren und nach der Aktivierung in T-Zellen vermehrt GLUT-1 an die Zelloberfläche mobilisiert wird (300). Da aber in konventionell aktivierten und in hyperaktivierten T-Zellen sowohl eine Glukoseaufnahme als auch glykolytische Aktivität festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass der Glukosebedarf eventuell durch die bereits vorhandenen GLUT-1 Transporter gedeckt werden konnte. Die Synthese des GLUT-1 Transporters und seine Mobilisation an die Zelloberfläche wird unter anderem durch den PI3K/Akt-Signalweg, aber auch durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren oder Zytokine wie IL-3 und IL-7 reguliert (318, 319). Die T-Zellen wurden in allen Bedingungen ohne Zugabe von Zytokinen kultiviert. Es ist vorstellbar, dass durch das Fehlen von Zytokinen oder bestimmten Wachstumsfaktoren in allen Bedingungen keine vermehrte Expression von GLUT-1 möglich ist. Hyperaktivierte T-Zellen zeigen nicht nur bei gleichbleibender bzw. leicht erhöhter Expression von GLUT-1 eine gesteigerte Glukoseaufnahme, es konnte auch

festgestellt werden, dass bei einer nicht erhöhten Anzahl an Mitochondrien pro Zellquerschnitt die mitochondriale Aktivität in hyperaktivierten T-Zellen deutlich gesteigert ist. Es scheint so, als würde der PMN-ÜS in T-Zellen den Metabolismus steigern und dafür gegebene Bedingungen nutzen. Es ist keine vermehrte Expression von GLUT-1 oder eine Erhöhung der Mitochondrienanzahl notwendig. Dies ist ein Indikator dafür, dass durch die PMN induzierte Hyperaktivierung eine starke und schnell reagible metabolische Flexibilität in T-Zellen erreicht werden kann, ohne dass im Vorfeld eine Hochregulation von GLUT-1 oder eine Vermehrung der Mitochondrien notwendig ist.

Doch nicht nur die Aufnahme von Glukose ist für proliferierende T-Zellen von Bedeutung. Stark proliferierende T-Zellen weisen einen deutlich anabolen Metabolismus auf. Über verschiedene Stoffwechselwege werden Metabolite generiert, beziehungsweise werden verschiedene Nährstoffe von extern aufgenommen, um das immense Zellwachstum zu gewährleisten (320). Da der Metabolismus von T-Zellen nicht nur in der Aktivierung und Proliferation, sondern auch in der Differenzierung der T-Zellen und in ihrer antitumoralen Funktion eine zentrale Rolle spielt (321), wären zusätzlich detailliertere Kenntnisse der Energiegewinnung hyperaktivierter T-Zellen im Hinblick auf die Aufnahme und den Metabolismus von Fettsäuren oder Aminosäuren von großem Interesse.

### ***7.5 Phänotypische Merkmale hyperaktivierter T-Zellen vereinbar mit gesteigerter Translation und Metabolismus***

Phänotypisch lassen sich bei hyperaktivierten T-Zellen eindeutige Unterschiede zu konventionell aktivierten T-Zellen nachweisen. Zu nennen sind hier die vergrößerten und klar strukturierten Mitochondrien in hyperaktivierten Zellen, welche für die deutlich erhöhte mitochondriale Aktivität in hyperaktivierten T-Zellen verantwortlich sind. Eine regelrechte Funktion des mitochondrialen Metabolismus ist essenziell für die T-Zellaktivierung, Proliferation, Funktion und Differenzierung. Eine gesteigerte OXPHOS sowie Fettsäureoxidation sind metabolische Schlüsselfaktoren der Gedächtniszellbildung. Zudem weisen Gedächtniszellen eine erhöhte mitochondriale Masse und somit folglich eine erhöhte *Spare Respiratory Capacity* auf (322). Im TME führen Metabolite wie Laktat, ROS oder Kynurenine zur mitochondrialen Dysfunktion in T-Zellen, welche wiederum in T-Zellerschöpfung resultiert (317, 322, 323). In hyperaktivierten T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Faktor(en) des PMN-ÜS zu einer Vergrößerung der Mitochondrien (Abbildung 18) und einer gesteigerten mitochondrialen Funktion führen (Abbildung 21, 24), was somit auch die Reduktion der Sensenz (Abbildung 31, 33) und die Differenzierung in TCM (siehe Abbildung 36, 38) erklärt.

Bereits die lichtmikroskopischen Bilder lassen erkennen, dass hyperaktivierte T-Zellen eine gesteigerte Proteintranslation aufweisen (Abbildung 16). Zu nennen wäre hier die

aufgelockerte Chromatinstruktur des Nukleus, die prominenten Nukleoli sowie die helle Struktur neben dem Zellkern, die das aktivierte endoplasmatische Retikulum (ER) darstellt. Das ER fungiert in der Proteinhomöostase als qualitätssichernde Organelle. Nur korrekt in Chaperonen gefaltete Proteine verlassen das ER über Vesikel. Fehlgefaltete Proteine werden über Proteasome im Zytosol abgebaut. Kommt es unter Stresssituationen zu einer vermehrten Proteinsynthese und zur Überschreitung der Aktivität der Chaperone bzw. Proteasomen, akkumulieren fehlgefaltete Proteine im ER. Dieser ER-Stress führt zur so genannten ungefalteten Proteinreaktion (*unfolded protein response*, UPR), welche zur Induktion von regulatorischen Gegenmaßnahmen führt, um die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten. Diese beinhaltet u.a. die Hochregulation von Chaperon- und Proteasomaktivität, die Hemmung der Proteinsynthese und ggf. die Apoptose der Zelle (324, 325). In hyperaktivierten T-Zellen sind die Initiatorproteine der Proteintranslation deutlich aktiviert. Für eine kompensierte Proteinhomöostase spricht die in den elektronenmikroskopischen Bildern eindeutig erkennbare Vesikelbildung im ER (Abbildung 18, E), die gesteigerte Degranulation (gebildete Proteine sind somit korrekt gefaltet, werden sezerniert und nicht im Zytosol abgebaut) (siehe Abbildung 52) und die Hochregulation der HSP60 Expression (ggf. als regulatorische Maßnahme zur vermehrten Proteinsynthese) (Abbildung 44), welche eine korrekte Faltung der synthetisierten Proteine gewährleistet. Auch die reduzierte Apoptose (261) spricht gegen ER-Stress in hyperaktivierten T-Zellen. T-Zellen im TME zeigen vermehrt ER-Stress und werden so in ihrer antitumoralen Funktion gehemmt (326). Möglicherweise sind die von PMN sezernierten Faktoren in der Lage, eine balancierte Proteinsynthese in T-Zellen zu gewährleisten. T-Zellen könnten sich hierdurch besser an die Stresssituation im TME adaptieren und ihre antitumoralen Funktionen aufrechterhalten.

Allgemein sind in den elektronenmikroskopischen Bildern in allen Konditionen, in denen T-Zellen mit CD3/CD28-Beads aktiviert wurden, deutliche Zellausläufer/Pseudopodien erkennbar (Abbildung 17, 18). Es ist bekannt, dass das Aktinzytoskelett und die Regulation der Aktinpolymerisation wichtig für die T-Zellaktivierung, Differenzierung und vor allem Migration sind. Im Rahmen der TCR-Aktivierung sorgt das Zytoskelett für die Internalisierung des TCR-Komplexes und leitet hierüber das Ende der Aktivierung ein. Allerdings spielt das Zytoskelett auch nach der Aktivierung eine Rolle in der Extravasation und anschließenden Gewebemigration der T-Zellen. Bislang ist noch wenig darüber bekannt, wie und ob sich das Zytoskelett in den verschiedenen Zellsubtypen verändert und welchen Einfluss unterschiedliche Signalproteine genau haben (327, 328). In den hier durchgeführten Versuchen ist zu erkennen, dass T-Zellen unabhängig vom umgebenden Milieu (Argininmangel, konventionell oder PMN-ÜS ± nor-NOHA) deutliche Zellausläufer aufweisen, welche somit allgemein als Korrelat von Zellaktivierung gedeutet werden können.

## **7.6 PMN sezernierte Faktor(en) induzieren TCM-Differenzierung und reduzieren Seneszenz**

### **7.6.1 Reduktion der Seneszenz und Induktion eines aktivierten T-Zellphänotypen**

Die Fähigkeit von T-Zellen, in die verschiedenen Subpopulationen zu differenzieren, spielt eine entscheidende Rolle in der Funktion des menschlichen Immunsystems. Sie ermöglicht es, Krankheitserreger akut und gezielt zu bekämpfen und ein langanhaltendes immunologisches Gedächtnis zu formen. Die T-Zellerschöpfung und die Differenzierung hin zu seneszenten und anergen T-Zell Phänotypen im immunsuppressiven Umfeld eines Tumors ist umfassend beschrieben (329). Diese zellulären Prozesse stellen eine große Herausforderung im Bereich der Tumorimmuntherapie dar (230).

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die von PMN sezernierten Faktor(en) in den hyperaktivierten T-Zellen einen aktivierungsabhängigen Verlust von CD28 entweder komplett verhindern bzw. zu einer sehr schnellen Reexpression von CD28 führen. Dabei stellen ungefähr die Hälfte CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> und die anderen Hälfte CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen dar (Abbildung 31, 33). CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> definieren eine früh-aktivierte und stark proliferierende T-Zellsubpopulation aus TN, TCM, TEM und TEMRA (263). Die Subpopulation der CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ist noch unzureichend untersucht. Auch sie stellen einen aktivierten T-Zelltypen da, welcher sich aus TN, TEM, TCM und TEMRA zusammensetzt. Interessanterweise zeigen diese für CD28 und CD57 positiven T-Zellen eine hohe Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 (263). Eine verstärkte Expression von genau diesen Oberflächenmarkern konnte auch auf durch PMN-ÜS hyperaktivierten T-Zellen nachgewiesen werden (260). Sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte in allen Kultivierungsbedingungen nach 24 h ein Anteil von früh seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen und spät seneszenten CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen demonstriert werden, welcher in der -Arg Bedingung bzw. im PMN-ÜS ohne Arginaseinhibition deutlich größer war und über den Beobachtungszeitraum von 120 h bei ungefähr 70 % bleibt (Abbildung 31, 32, 33, 34). Offenbar führt ein Argininmangel zu T-Zell Seneszenz und dies kann auch nicht durch einen/die Faktor(en) im PMN-ÜS verhindert werden. CD28 ist einer der wichtigsten ko-stimulatorischen Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen, dessen Präsenz für die T-Zellaktivierung entscheidend ist. Eine optimale T-Zellaktivierung besteht immer aus zwei Signalen, einem Signal 1, welches über den TCR vermittelt wird und einem Signal 2, dem ko-stimulatorischen Signal (330). Erhalten T-Zellen keine ko-stimulatorischen Signale bei der TCR-Aktivierung werden sie anerg (172). Zudem ist die CD28 Expression auf Gedächtniszellen wichtig, da diese Ko-stimulation zu einer maximalen Expansion und somit zur stärkeren Pathogenbekämpfung führt (331). Die von PMN freigesetzten Faktor(en) des PMN-ÜS erhalten einen CD28 positiven T-Zell Subtypen und ermöglichen, die T-Zellenergie im TME zu umgehen, da durch die erhaltene

CD28 Expression eine ausreichende Ko-stimulation vorhanden ist. Gleichzeitig wird der Anteil der seneszenten T-Zellen stark reduziert.

Auffallend bei CD8<sup>+</sup> wie auch bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren die hohen Standardabweichungen, die sich bei den Messungen zum Zeitpunkt 120 h bei T-Zellen der +Arg-RPMI-Kultivierungsbedingung zeigten. Teilweise wurde nur ein sehr geringer Anteil an CD28 positiven T-Zellen erreicht. Dies zeugt von sehr hohen Abweichungen der Anteile der Phänotypen bei unterschiedlichen T-Zell-Spendern nach der Aktivierung, welche vermutlich auch mit Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen zusammenhängen, die hier nicht bekannt sind. Die Standardabweichung der gemessenen Expressionen von CD28 und CD57 bei den T-Zellen, die in PMN-ÜS mit nor-NOHA, hyperaktiviert wurden, waren sehr niedrig. Dies spricht dafür, dass eine Aktivierung der verschiedenen untersuchten Spender-T-Zellen unter den immunstimulatorischen PMN-Faktor(en) unabhängig von ihrer Ausgangslage zu einer homogenen und einheitlichen Verteilung der Phänotypen führt.

### **7.6.2 Vermehrte Differenzierung zu TCM**

Hyperaktivierte T-Zellen differenzieren zu einem deutlich größeren Anteil in TCM. Der Anteil an TCM war sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen ungefähr doppelt so groß wie bei konventionell aktivierten T-Zellen (Abbildung 36, 38). TCM sind ein wichtiger Zelltyp des immunologischen Gedächtnisses. Sie befinden sich in den sekundären lymphatischen Organen, um auf einen erneuten spezifischen Antigenkontakt schnell zu reagieren und zu proliferieren (149, 332). Aufgrund dieser Eigenschaften nehmen TCM beim Schutz gegen virale und bakterielle Infektionen und vor allem in der Vermittlung antitumorale Immunität eine wichtige Rolle ein (305). Im Rahmen der Immunantwort kommt es unweigerlich zu einem Kontakt zwischen T-Zellen und PMN, sei es direkt am Ort der Infektion oder in den sekundären lymphatischen Organen (271, 333). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Differenzierung von T-Zellen in PMN-ÜS mit Arginasehemmung zeigen, dass PMN Faktor(en) sezernieren, welche die Gedächtniszellbildung in T-Zellen fördern.

Wie Sathaliyawala et al. bereits zeigen konnten, ist auch in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit der Anteil der TCM im peripheren Blut unter den CD4<sup>+</sup> höher als unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Anteil an hyperaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, der in TCM differenziert, ist mit knapp 60 % deutlich größer als bei hyperaktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ca. 40 %. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Umgebungen, Zytokine und Signalmoleküle eine T-Zelldifferenzierung in verschiedene funktionelle Subtypen steuern. Somit ist auch für die Differenzierung in Gedächtniszellen eine bestimmte Umgebung notwendig (334). Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Gedächtniszellen scheint unter Beachtung der verschiedenen funktionellen Subtypen weitaus komplexer zu sein als die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zudem sind auch andere Zytokine notwendig, um CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen zu erhalten (335). Der PMN-ÜS scheint auch

auf die Proliferationsfähigkeit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen größeren Einfluss zu besitzen als auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (260). Bislang wurde angenommen, dass sich vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung früher und auch schneller teilen als CD4<sup>+</sup> T-Zellen (335). Der PMN-ÜS scheint vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Expansion direkt nach der Aktivierung zu verstärken, als auch in ihrer Differenzierung zu TCMs. An dieser Stelle wäre eine detailliertere Untersuchung der funktionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtypen (Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg) nach der Aktivierung in PMN-ÜS mit Arginaseinhibition interessant. Dies könnte Aufschluss darüber geben, um was es sich bei den hyperaktivierenden Faktoren der PMN handelt, falls ein bestimmter CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtyp vermehrt entstehen sollte. Es ist bekannt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gedächtniszellen eine zentrale Rolle spielen (335). Die Untersuchung der T-Zellphänotypen erfolgte in dieser Arbeit aus einer CD3<sup>+</sup> T-Zellgesamtpopulation, welche in der durchflusszytometrischen Untersuchung durch die Verwendung von Oberflächenmarkern für CD4 und CD8 für die Auswertung getrennt wurden. Hier stellt sich die Frage, ob ein ähnliches Ergebnis erzielt werden würde, wenn man CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bereits vorher aus einer CD3 T-Zellpopulation separieren und anschließend getrennt in PMN-ÜS aktivieren würde. Dies beschreibt einen Versuchsaufbau, der bereits bei der Untersuchung des Metabolismus mittels Mito Stress Test angewendet wurde. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden hier getrennt in den verschiedenen Inkubationsbedingungen für 48 h aktiviert und anschließend untersucht. Für beide Populationen zeigte sich in den hyperaktivierten T-Zellen ein deutlich gesteigerter Metabolismus (Abbildung 21, 24). Es wäre interessant, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch ohne die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im PMN-ÜS so deutlich in TCM differenzieren.

Die Differenzierung in TCM erfolgte erst am 5. Tag nach der Aktivierung in PMN-ÜS mit nor-NOHA. Am 3. Tag nach Aktivierung waren der größte Anteil der T-Zellen TN. Beides sind Zeiträume, die in bisherigen Arbeiten von Vonwirth et al. (260) bzw. Vonwirth (265) und Bülbül (261) weniger untersucht wurden. In vitro Kultivierungszeiträume sind in der Generierung von CAR-T-Zellen ein entscheidender Schritt. So sind gewöhnlich in vitro Kultivierungszeiten von 9-14 Tagen nötig, um eine ausreichend große Anzahl an Zellen zu erhalten. Ghassemi et al. zeigten, dass CAR-T-Zellen, die früher geerntet wurden (interessanterweise auch an Tag 3 und 5) eine deutlich höhere Zytotoxizität aufwiesen (286). Diese Entdeckung ist mit dem Hintergrund der hier gewonnenen Erkenntnisse nachvollziehbar, da in diesen Zeiträumen der größte Anteil der T-Zellen (auch die konventionell aktivierten) in TN oder TCM differenziert ist. Die von PMN sezernierten Faktor(en) kombinieren eine gesteigerte T-Zellproliferation (die einen kürzeren in vitro Kultivierungszeitraum möglich machen könnte, um ausreichend Zellen zu erhalten) und die vermehrte Differenzierung in TCM und TN.

Zusätzlich stellen sich jedoch für Langzeitkultivierungen die Fragen: (i) Behalten hyperaktivierte T-Zellen ihren TCM-Phänotyp auch nach längerer Zeit ohne Stimulation in Kultur? (ii) Wie verhält sich die Verteilung der T-Zellphänotypen nach erneuten Stimulationen?

Dass T-Zellen (transduziert mit einem Einzelketten TCR, spezifisch für p53<sub>262-272</sub>), die über einen längeren Zeitraum wiederholt antigenspezifisch in PMN-ÜS mit nor-NOHA restimuliert wurden eine deutlich stärkere Zytotoxizität aufweisen, konnte in dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden (Abbildung 54). Die von PMN sezernierten Faktor(en) sind somit auch in der Lage, über einen längeren Zeitraum und nach wiederholtem Antigenkontakt (was eine Situation wie im TME simuliert) die T-Zellhyperaktivierung bezüglich einer gesteigerten Zytotoxizität aufrecht zu erhalten. Die erhöhte Zytotoxizität nach wiederholter Restimulation ist möglicherweise auch durch das stabile CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> Verhältnis erklärbar, das durch den PMN-ÜS in Langzeitkultivierung erreicht wurde, während in konventionellen +Arg-RPMI mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden waren (Abbildung 55).

An dieser Stelle ist auch zu erwähnen, dass für die Einteilung der Phänotypen in dieser Arbeit die beiden Oberflächenmarker CD62L und CD45RA verwendet wurden. Es wäre möglich, dass der Anteil der Gedächtniszellen sogar unterschätzt wurde. TN und auch TSCM exprimieren beide Oberflächenmarker und sind somit durch die alleinige Färbung dieser beiden Marker nicht zu unterscheiden. Es ist daher denkbar, dass es sich bei einem Anteil der in dieser Arbeit als TN dargestellten T-Zellen womöglich doch um TSCM handelt. Ferner ist bekannt, dass eine Akt-Inhibition die Differenzierung in TSCM fördert (158, 159). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass in hyperaktivierten T-Zellen die Phosphorylierung von Akt sehr gering ist (sogar geringer als in unaktivierten T-Zellen). Es wäre somit möglich, dass der/die hyperaktivierende(n) Faktor(en) der PMN zu einer Inhibition von Akt führen und somit die Differenzierung in TSCM fördern. Auch unter diesen Gesichtspunkten wäre hier eine genauere Unterscheidung zwischen TN und TSCM sinnvoll, welche über die Expression von CD95 untersucht werden kann, da dieser Marker nur auf Gedächtniszellen exprimiert wird (148).

### **7.6.3 Reduktion der Seneszenz und gesteigerte TCM-Differenzierung durch Hyperaktivierung in T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom**

Die von PMN sezernierten Faktoren scheinen in gesunden Spendern einen starken Einfluss auf die Bildung von TCM zu haben. Daher war es von großem Interesse, den Einfluss des immunstimulatorischen Effektes auch auf T-Zellen von Tumorpatienten zu untersuchen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in den kaum proliferierenden und anergen T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten mit Multiplen Myelom eine deutlichen Hyperaktivierung durch den PMN-ÜS mit nor-NOHA induziert werden konnte (260). Es ist bekannt, dass T-Zellen aus dem peripheren Blut, vor allem aber aus dem Knochenmark und somit direkt aus dem TME, von Patienten mit Multiplem Myelom durch den langanhaltenden und repetitiven Kontakt zu Tumorantigenen zu einem großen Anteil Erschöpfungs- und Seneszenz-Marker exprimieren bzw. anerg werden (264). Wiederholter Antigenkontakt führt in T-Zellen zu einem Verlust des Aktivierungsmarkers CD28 und zu einer vermehrten Expression von CD57 (336). Diese

Zeichen der T-Zell Seneszenz konnte auch in den T-Zellen aus dem peripheren Blut sowie aus dem Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom festgestellt werden. Durch die Aktivierung dieser T-Zellen in PMN-ÜS mit nor-NOHA exprimierte wieder ein deutlich größerer Anteil an T-Zellen CD28 und der Anteil der seneszenten T-Zellen reduzierte sich (Abbildung 40, 41). Ähnlich wie bei T-Zellen gesunder Probanden konnte eine vermehrte Differenzierung in TCM festgestellt werden (Abbildung 42, 43). Nach der Zellisolation wiesen die T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom einen großen Anteil an TEMRA auf, ein Phänotyp, der nicht nur mit steigendem Alter im Knochenmark sowie im peripheren Blut zunimmt (337), sondern auch auf eine wiederholte Antigenstimulation zurückzuführen ist und als spät differenzierter Zelltyp eine reduzierte Effektorkapazität besitzt (161). Während sich in konventionell in +Arg-RPMI-Medium aktivierten T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom der TEMRA Anteil über den beobachteten Zeitraum nicht veränderte, konnte bei T-Zellen stimuliert in PMN-ÜS mit nor-NOHA ein deutlicher Rückgang dieses Zellphänotypen beobachtet werden, bei einem gleichzeitig stark zunehmenden Anteil an TCM. Hier war ebenfalls zu beobachten, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich stärker auf den PMN-ÜS reagieren und vermehrt zu TCM differenzieren. Interessanterweise ist bekannt, dass PMN in der Lage sind, durch Therapie seneszent gewordene Tumorzellen wieder in aktiv proliferierende Zellen umzuwandeln (44). Die in vitro Experimente dieser Arbeit zeigen, dass durch den Einsatz von Arginaseinhibitoren in der Tumorthherapie nicht nur ausreichend Arginin für die adäquate T-Zellaktivierung zur Verfügung stünde, sondern auch senescente und erschöpfte T-Zellen durch die immunstimulatorischen Effekte der PMN, die im TME zahlreich vorhanden sind, ihre Anergie überwinden, der Anteil an seneszenten T-Zellen zurückgeht und aktivierte, für die Tumorthherapie essentielle Phänotypen wie TCM generiert werden.

## **7.7 Therapeutischer Einsatz**

### **7.7.1 T-Zellhyperaktivierung und TCM-Differenzierung als Vorteil in der zellulär basierten Tumorthherapie bzw. (Tumor)Vakzinierung**

T-Zell Seneszenz und Erschöpfung stellt eine der größten Herausforderungen in der Therapie von Tumorkranken und auch in der zellulärbasierten Tumorthherapie mit CAR-T-Zellen dar (210, 211). Das immunsuppressive TME limitiert CAR-T-Zellen in ihrer Proliferation, Differenzierung und in ihren antitumoralen Eigenschaften. CAR-T-Zellen werden auf unterschiedliche Weise in ihrer Expansion im TME u.a. durch den Tumor direkt oder durch MDSCs, sei es durch inhibitorische Signalwege über PD1/PDL-1 oder durch die Reduktion des Arginins durch Arginase, gehemmt (338). Es existieren bereits vielversprechende Daten, in denen die CAR-T-Zelltherapie mit ICIs kombiniert wird, um diese Herausforderungen zu umgehen (241). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse liefern mit der Inhibition der Arginase und den zusätzlich immunstimulatorischen Effekten der PMN einen weiteren Ansatzpunkt, T-Zellen bzw. CAR-T-Zellen in ihrer Effizienz für die Tumorthherapie zu steigern.

Eine Untersuchung der Auswirkung des PMN-ÜS mit Arginaseinhibition auf CAR-T-Zellen wäre in diesem Zusammenhang ein weiterer Schritt, um diese Annahme zu stützen.

Die Differenzierung in TCM gilt als eines der Hauptziele in der Verbesserung der T-Zell-abhängigen Immuntherapie, in der Behandlung von Tumorerkrankungen oder chronisch viralen Infektionen (339). Es konnte zudem gezeigt werden, dass aus TN, TCM oder TSCM hergestellte CAR-T-Zellen sowohl in CD8<sup>+</sup>, als auch in CD4<sup>+</sup> CAR-T-Zellen eine deutlich höhere Effizienz in der antitumoralen Funktion aufweisen als CAR-T-Zellen, die aus TEM hergestellt wurden. TCM-CAR-T-Zellen überleben nach Injektion am längsten und können somit eine effektive antitumorale Funktion aufrechterhalten (235). Die Generierung dieser Zellphänotypen in der Expansionsphase erfolgt über die Verwendung bestimmter Zytokine wie IL-7 und IL-15 (158) sowie durch den richtigen Kultivierungszeitraum nach der Stimulation und Expansion (286). Das Problem bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen oder auch im Zustand nach multiplen Chemotherapien, Infekten oder allein im höheren Alter ist die Zunahme der kurzlebigeren und deutlich ineffektiveren TEM oder TEMRA Phänotypen (159, 235). Dies wird auch in der hier gezeigten Charakterisierung der T-Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom deutlich. Für den Erfolg einer CAR-T-Zell Therapie wären die von PMN sezernierten Faktor(en) daher von großer Bedeutung, da durch diese der Anteil an TEM und TEMRA an der T-Zellpopulation deutlich geringer wird und der TN bzw. TCM-Anteil zunimmt.

Auch in der Therapie mit ICIs könnte durch den Einsatz von Arginaseinhibition und durch die in dieser Arbeit dargestellten hyperaktivierenden Effekte der PMN eine deutlich effektivere T-Zellantwort und somit ein besserer Therapieerfolg erreicht werden. Aber auch „indirekte“ T-Zell-basierte Therapien mit bispezifischen Antikörpern, deren Prinzip darauf basiert, T-Zellen und Tumorantigen gleichzeitig zu binden, T-Zellen somit in direkten Kontakt mit der Tumorzelle zu bringen und dadurch eine gezielte zytotoxische Reaktion der T-Zellen auf die Tumorzelle zu generieren (340) bzw. jegliche Tumortherapie, in welcher T-Zellen für die Tumorbekämpfung aktiviert werden, könnten von den T-Zellstimulierenden Faktor(en) der PMN potentiell profitieren.

Auch im Rahmen von Impfungen spielt die Entstehung von Gedächtniszellen bei der Bildung der lebenslangen Immunität eine entscheidende Rolle. Viele Impfstoffe basieren vor allem auf der B-Zell-vermittelten Immunität mit der Produktion von erregerspezifischen Antikörpern durch Plasmazellen. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. nach einer Infektion mit dem SarsCOV2-Virus die T-Zell-vermittelte Immunität deutlich länger anhält und die nach Infektion gebildete B-Zell-vermittelte Antikörpermenge nach einigen Wochen bereits rückläufig war (341). Die Arbeitsgruppe um Prof. J. Walz entwickelte im Rahmen der Covid19-Pandemie einen peptidbasierten T-Zell-Impfstoff, durch welchen die Möglichkeit bestand, eine langanhaltende T-Zell-Immunität hervorzurufen. Es ist ein Impfstoff, der nicht nur für Personen mit

angeborenem oder erworbenem B-Zell-Defekt, z.B. unter Immunsuppression mit CD20-Antikörpertherapie, ggf. einen Meilenstein in der Infektionsbekämpfung darstellt, sondern auch regulär als Stimulator der zellulären Immunantwort neben herkömmlichen auf Antikörperbildung basierenden Impfstoffen eingesetzt werden könnte (342). Auch in der individualisierten Tumorthherapie mittels peptidbasierten (343) oder mRNA basierten Impfstoffen (344) ist es das Hauptziel, T-Zellen in ihrer antitumoralen Effektivität zu steigern. Auch hier könnte durch die zusätzliche Stimulation der T-Zellen mit den von PMN sezernierten Faktor(en) die Gedächtniszellbildung unterstützt werden und Tumorpimpfstoffe in ihrer Effektivität gesteigert werden. Dies wäre nicht nur bei Impfungen von Vorteil, sondern auch bei der Bildung lebenslanger Gedächtniszellen nach durchgemachten Infektionen. In diesem Zusammenhang wäre es von großem Interesse, den Einfluss der von PMN sezernierten Faktoren auf andere Zellen des Immunsystems zu untersuchen, ob z.B. durch den PMN-ÜS auch in B-Zellen die Bildung von Gedächtnis- oder Plasmazellen gefördert wird und somit eine langanhaltende Immunantwort generiert wird.

### **7.7.2 Identifikation der hyperaktivierenden Mechanismen bzw. Arginaseinhibition als Möglichkeit in der Therapie der Sepsis oder Hyperinflammationssyndrome**

Die Sepsis ist charakterisiert durch eine Dysregulation der Immunantwort als Reaktion auf eine Infektion, welche zu einer starken Aktivierung des Immunsystems führt und in einer lebensgefährlichen Zell- und Organdysfunktion resultiert. Diese starke Aktivierung des Immunsystems (v.a. der PMN) wird durch verschiedene Faktoren ausgelöst. Zu nennen wären hier bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide oder Endotoxine, bekannt als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Kommt es zur Dysbalance des Immunsystems, welche einerseits durch starke Inflammation und andererseits durch die Immunsuppression v.a. von T-Zellen, B-Zellen oder APCs gekennzeichnet ist, werden Bestandteile apoptotischer bzw. zerstörter körpereigener Zellen wie DNA, RNA, Histone, HSPs und Aktin aber auch Ionen wie Kalium oder Kalzium freigesetzt, welche als Schaden/Gefahr-assoziierte molekulare Muster (*damage/danger-associated molecular pattern*, DAMP) bezeichnet werden. Diese wiederum führen zusätzlich zu einer gesteigerten Immunreaktion. Auch in Sepsispatienten ist eine erhöhte Anzahl an MDSCs zu finden (345, 346). Während einer Sepsis ist die Anzahl an PMN erhöht und ihre Lebenszeit verlängert, während die Anzahl der T-Zellen abnimmt (347, 348). PMN wirken durch verschiedene Mechanismen wie den Oxidativen Burst, Phagozytose oder NETs antimikrobiell und induzieren gleichzeitig über verstärkte Sekretion von inhibitorischen Zytokinen oder Arginase eine T-Zellsuppression und die Differenzierung in Tregs (349, 350). Durch den septischen Zustand beeinträchtigte T-Zellen weisen eine reduzierte metabolische Funktion (351) und auch eine beeinträchtigte Proteinsynthese mit reduzierter mTOR-Aktivität auf (345).

Die bisherige universell etablierte Therapie der Sepsis ist der Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung der zugrunde liegenden Infektion. Bezüglich der immunologischen Dysregulation gibt es viele therapeutische Ansätze (Entfernung von DAMPS, PAMPs oder PMN, Stimulation der T-Zellen durch Zytokine), die bislang keinen routinemäßigen Einsatz in der klinischen Praxis gefunden haben (345, 352).

Klinische Krankheitsbilder, welche eine der wichtigsten Differentialdiagnosen zur Sepsis darstellen, sind Hyperinflammations Syndrome wie etwa die Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH). Sie ist durch eine unkontrollierte (Hyper)aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und auch Makrophagen gekennzeichnet. Es kommt zum Zytokinsturm, zu systemischen Infektionszeichen wie anhaltendem hohem Fieber, zur Aktivierung von Makrophagen, zur Hämophagozytose im Knochenmark und schlussendlich zum Multiorganversagen. Zu unterscheiden sind zum einem die primäre HLH, der eine Genmutation (z.B. PFR1) oder eine vererbte Immundefizienzerkrankung (z.B. Griscelli Syndrom Typ 2) zugrunde liegen. Das Immunsystem ist dadurch nicht in der Lage, Infektionen abzuwehren, was zu einer dauerhaften Stimulation von T-Zellen, NK-Zellen oder Makrophagen führt. Eine Manifestation der primären HLH erfolgt daher meist in der frühen Kindheit, häufig mit vorangehender viraler Infektion. Die sekundäre oder erworbene HLH hingegen wird durch maligne, infektiöse oder autoimmune Stimuli ohne zugrundeliegende genetische Mutation ausgelöst (353-355). Es konnte gezeigt werden, dass sich die T-Zellaktivierung und -differenzierung in den beiden Untergruppen der HLH unterscheiden. Während in der primären HLH T-Zellen zu TEM differenzieren, sind in der sekundären HLH mehr TN zu finden. Auch konnte eine deutlich stärkere Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (356). Es ist gut möglich, dass in Prozessen der Hyperinflammation die immunstimulatorischen Faktor(en) der PMN die suppressiven Einflüsse überwiegen und somit verantwortlich für die Hyperaktivierung der T-Zellen sind. Es konnte zudem in dieser Arbeit und auch bei Vonwirth et al. (260) gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die PMN deutlich stärker aktiviert werden.

Hyperinflammatorische Zustände konnten auch während der COVID-19-Pandemie beobachtet werden. So konnte beispielsweise in schweren Krankheitsverläufen eine erhöhte Inflammation bzw. ein Zytokinsturm ausgemacht werden (357), welche in einigen Fällen auch den diagnostischen Parametern einer HLH entsprachen (358). Es zeigte sich in einigen Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf insbesondere eine starke Hyperaktivierung von T-Zellen (359). Auf der anderen Seite wiederum war bei älteren COVID-19 Patienten eine beeinträchtigte T-Zellfunktion zu beobachten (360). Die Hyperinflammation und Hyperaktivierung von T-Zellen und gleichzeitig deren Suppression ist somit in vielen inflammatorischen Prozessen präsent. Die Identifikation der T-Zell hyperaktivierenden Mechanismen durch PMN ist somit auch in diesem Kontext von grundlegender Bedeutung.

Auf der einen Seite wäre es möglich, durch eine Arginase-Inhibition der PMN induzierten T-Zellsuppression in Sepsispatienten entgegenzuwirken und durch die immunstimulatorischen Faktor(en) der PMN die T-Zellen zusätzlich in ihrer Infektionsabwehr zu stimulieren. Auf der anderen Seite könnte durch die Identifikation der Faktor(en) die Möglichkeit eröffnet werden, diese in Zuständen der Hyperinflammation oder gesteigerten T-Zellaktivität spezifisch zu hemmen.

## 8 Zusammenfassung

Im TME wirken unterschiedlichste Mechanismen immunsuppressiv und hemmen vor allem T-Zellen in ihren antitumoralen Funktionen und Eigenschaften. Diese umfassen die Induktion und Rekrutierung von MDSCs, die Expression von hemmenden Rezeptoren, die Reduktion von Nährstoffen und Sauerstoff und somit veränderte metabolische Bedingungen für T-Zellen, die Sekretion von hemmenden Zytokinen oder ROS und die Arginase-vermittelte Depletion von der für die T-Zellaktivierung essenziellen Aminosäure Arginin. Diese vielfältigen immunsuppressiven Mechanismen machen deutlich, dass Tumor(immun)therapie vielfältig sein muss, um die Funktion von T-Zellen auf unterschiedlichste Weise zu unterstützen und zu verbessern. Ein bei konsekutiver Hemmung der Arginase-induzierten Arginin-Depletion gewonnener Überstand humaner PMN (PMN-ÜS) wirkt dagegen auf aktivierte T-Zellen sehr stark stimulierend, wie unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt hatte.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zentrale Aspekte dieser so hyperaktivierten T-Zellen detailliert untersucht. Diese T-Zellen zeigten eine deutliche Differenzierung hin zu effizienten antitumoralen T-Zellphänotypen wie TCM und naiven CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> T-Zellen. Dies zeigte sich nicht nur in T-Zellen gesunder Spender, sondern auch in anergen und seneszenten T-Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut von Patienten mit Multiplen Myelom, die bei Aktivierung in PMN-ÜS stark proliferieren können. Die Hyperaktivierung humaner T-Zellen war assoziiert mit einem gesteigerten Metabolismus, sowohl von Glykolyse als auch von oxidativer Phosphorylierung, vermehrter Glukose-Aufnahme sowie einem Kinase-Profil, welches mit einer gesteigerten Protein-Translation assoziiert ist. Auch konnte eine verstärkte Degranulation, ein Grundpfeiler effektiver Zytotoxizität, in den T-Zellen induziert werden. Hyperaktivierte T-Zellen zeigten eine bessere Viabilität in Langzeitkultivierungen und auch nach wiederholter peptidspezifischer Restimulation eine höhere antitumorale Zytotoxizität. Durch die PMN-induzierte Hyperaktivierung erlangen T-Zellen also Eigenschaften, die sie vermutlich deutlich effektiver in ihren antitumoralen Funktionen auch in vivo machen.

Ein Großteil der neu entwickelten Tumortherapien basiert auf der Aktivierung des T-Zell-Kompartiments im Immunsystem. Für ICI, CAR-T-Zellen, TCR-T-Zellen, Tumorimpfungen oder bispezifische Antikörper liefern die, molekular noch nicht identifizierten, durch PMN sezernierten T-Zell stimulierenden Faktoren unter Arginaseinhibition genau die Art der vielfältigen T-Zellaktivierung, die in der zukünftigen Tumorimmuntherapie eine immer größere Rolle spielen wird.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 2021;221:107753.
4. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884-901.
5. Barriga V, Kuol N, Nurgali K, Apostolopoulos V. The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8).
6. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):329-37.
7. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*. 2020;13(6):100773.
8. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-72.
9. Leach J, Morton JP, Sansom OJ. Neutrophils: Homing in on the myeloid mechanisms of metastasis. *Mol Immunol*. 2019;110:69-76.
10. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
11. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
12. Galassi C, Chan TA, Vitale I, Galluzzi L. The hallmarks of cancer immune evasion. *Cancer Cell*. 2024;42(11):1825-63.
13. Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, Booth S, Quek L, McEwen-Smith RM, et al. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood*. 2013;122(5):749-58.
14. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamagnere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*. 2005;105(6):2549-56.
15. Canè S, Geiger R, Bronte V. The roles of arginases and arginine in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2024.
16. Dumitru CA, Moses K, Trelakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(8):1155-67.
17. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21(8):938-45.
18. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(7):431-46.
19. SenGupta S, Hein LE, Parent CA. The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators. *Front Immunol*. 2021;12:734188.
20. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*. 2016;127(18):2173-81.
21. Dincey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*. 1976;58(3):705-15.
22. Ng MSF, Kwok I, Tan L, Shi C, Cerezo-Wallis D, Tan Y, et al. Deterministic reprogramming of neutrophils within tumors. *Science*. 2024;383(6679):eadf6493.
23. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-11.
24. Duffy D, Perrin H, Abadie V, Benhabiles N, Boissonnas A, Liard C, et al. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity*. 2012;37(5):917-29.

25. Hampton HR, Bailey J, Tomura M, Brink R, Chtanova T. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun.* 2015;6:7139.
26. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* 2015;10(4):562-73.
27. Fridlender ZG, Granot Z. Neutrophils in the tumor microenvironment - when a company becomes a crowd. *Cell Mol Immunol.* 2024;21(4):313-4.
28. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity.* 2018;48(2):364-79.e8.
29. Cadet J, Wagner JR. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2).
30. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8<sup>+</sup> T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007;13(7):828-35.
31. Parekh A, Das S, Parida S, Das CK, Dutta D, Mallick SK, et al. Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2018;37(33):4546-61.
32. Wu L, Saxena S, Singh RK. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1224:1-20.
33. Dallegri F, Ottonello L, Ballestrero A, Dapino P, Ferrando F, Patrone F, et al. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation.* 1991;15(1):15-30.
34. Felix K, Gaida MM. Neutrophil-Derived Proteases in the Microenvironment of Pancreatic Cancer -Active Players in Tumor Progression. *Int J Biol Sci.* 2016;12(3):302-13.
35. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.* 2004;5(3):182-90.
36. Gaida MM, Steffen TG, Günther F, Tschaharganeh DF, Felix K, Bergmann F, et al. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *Eur J Immunol.* 2012;42(12):3369-80.
37. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2014;5(9):2736-49.
38. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(33):12493-8.
39. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
40. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3446-58.
41. Wang Y, Liu F, Chen L, Fang C, Li S, Yuan S, et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Promote Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis by Suppressing lncRNA MIR503HG to Activate the NF- $\kappa$ B/NLRP3 Inflammasome Pathway. *Front Immunol.* 2022;13:867516.
42. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood.* 2006;108(5):1627-34.
43. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer.* 2020;6(10):838-57.
44. Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, et al. Tumour-infiltrating Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature.* 2014;515(7525):134-7.
45. Jamieson T, Clarke M, Steele CW, Samuel MS, Neumann J, Jung A, et al. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3127-44.
46. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):913-22.

47. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8<sup>+</sup> T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol*. 1999;162(10):5728-37.
48. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS One*. 2011;6(11):e27690.
49. Casbon AJ, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(6):E566-75.
50. Huang Y, Chen X, Dikov MM, Novitskiy SV, Mosse CA, Yang L, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood*. 2007;110(2):624-31.
51. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2007;67(9):4507-13.
52. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):3-8.
53. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(1):53-65.
54. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-68.
55. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011;32(1):19-25.
56. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol*. 2012;91(1):167-81.
57. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2007;67(1):425; author reply 6.
58. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7:12150.
59. Condamine T, Dominguez GA, Youn JI, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*. 2016;1(2).
60. Condamine T, Kumar V, Ramachandran IR, Youn JI, Celis E, Finnberg N, et al. ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2626-39.
61. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111(8):4233-44.
62. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015;88(2):77-91.
63. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1319:47-65.
64. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(2):161-9.
65. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*. 2004;172(2):989-99.

66. 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. *Cancer Res.* 2001;61(12):4756-60.
67. Jou E, Chaudhury N, Nasim F. Novel therapeutic strategies targeting myeloid-derived suppressor cell immunosuppressive mechanisms for cancer treatment. *Explor Target Antitumor Ther.* 2024;5(1):187-207.
68. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med.* 2011;208(10):1949-62.
69. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;65(8):3044-8.
70. 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. *Cancer Res.* 2004;64(16):5839-49.
71. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006;176(11):6752-61.
72. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology.* 2002;107(4):452-60.
73. Castellano F, Molinier-Frenkel V. Control of T-Cell Activation and Signaling by Amino-Acid Catabolizing Enzymes. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:613416.
74. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164514.
75. 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. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183-94.
76. Andzinski L, Kasnitz N, Stahnke S, Wu CF, Gereke M, von Köckritz-Blickwede M, et al. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int J Cancer.* 2016;138(8):1982-93.
77. Antuamwine BB, Bosnjakovic R, Hofmann-Vega F, Wang X, Theodosiou T, Iliopoulos I, et al. N1 versus N2 and PMN-MDSC: A critical appraisal of current concepts on tumor-associated neutrophils and new directions for human oncology. *Immunol Rev.* 2023;314(1):250-79.
78. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, Savova V, Zemmour D, Saatcioglu HD, et al. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity.* 2019;50(5):1317-34.e10.
79. Hsu BE, Tabariès S, Johnson RM, Andrzejewski S, Senecal J, Lehuédé C, et al. Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis. *Cell Rep.* 2019;27(13):3902-15.e6.
80. Ballesteros I, Rubio-Ponce A, Genua M, Lusito E, Kwok I, Fernández-Calvo G, et al. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell.* 2020;183(5):1282-97.e18.
81. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside.* Bogota (Colombia): El Rosario University Press © 2013 Universidad del Rosario.; 2013.
82. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):227-42.
83. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:411-33.
84. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med.* 2020;52(5):750-61.

85. Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(6):a002485.
86. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):485-97.
87. Huang YH, Sauer K. Lipid signaling in T-cell development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(11):a002428.
88. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):690-702.
89. Rozengurt E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda).* 2011;26(1):23-33.
90. D'Souza WN, Chang CF, Fischer AM, Li M, Hedrick SM. The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival. *J Immunol.* 2008;181(11):7617-29.
91. Navarro MN, Cantrell DA. Serine-threonine kinases in TCR signaling. *Nat Immunol.* 2014;15(9):808-14.
92. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo j.* 1997;16(8):1909-20.
93. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63.
94. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science.* 1998;279(5351):710-4.
95. Macintyre AN, Finlay D, Preston G, Sinclair LV, Waugh CM, Tamas P, et al. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity.* 2011;34(2):224-36.
96. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, et al. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol.* 2009;10(2):176-84.
97. Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, Proud CG. Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem J.* 2003;372(Pt 2):555-66.
98. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science.* 2001;294(5544):1102-5.
99. Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity.* 2010;33(3):301-11.
100. Laletin V, Bernard PL, Costa da Silva C, Guittard G, Nunes JA. Negative intracellular regulators of T-cell receptor (TCR) signaling as potential antitumor immunotherapy targets. *J Immunother Cancer.* 2023;11(5).
101. Riese MJ, Moon EK, Johnson BD, Albelda SM. Diacylglycerol Kinases (DGKs): Novel Targets for Improving T Cell Activity in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:108.
102. Ting JP, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell.* 2002;109 Suppl:S21-33.
103. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
104. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003;19(5):641-4.
105. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol.* 2014;5:603.
106. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383(6603):787-93.
107. Bashyam H. Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. *J Exp Med.* 2007;204(2):237.
108. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbj H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1341-6.
109. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.* 2013;252(1):104-15.

110. Schnell A, Littman DR, Kuchroo VK. T(H)17 cell heterogeneity and its role in tissue inflammation. *Nat Immunol.* 2023;24(1):19-29.
111. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):864-71.
112. King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):757-66.
113. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
114. Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity.* 2011;35(1):109-22.
115. Bilate AB, Lafaille JJ. It takes two to tango. *Immunity.* 2011;35(1):6-8.
116. Huang H, Ma Y, Dawicki W, Zhang X, Gordon JR. Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen. *J Immunol.* 2013;191(3):1136-43.
117. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626-35.
118. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
119. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev.* 2008;222:129-44.
120. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998;188(12):2357-68.
121. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441(7095):890-3.
122. Kennedy R, Celis E. T helper lymphocytes rescue CTL from activation-induced cell death. *J Immunol.* 2006;177(5):2862-72.
123. Giuntoli RL, 2nd, Lu J, Kobayashi H, Kennedy R, Celis E. Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):922-31.
124. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300(5617):337-9.
125. Kennedy R, Undale AH, Kieper WC, Block MS, Pease LR, Celis E. Direct cross-priming by th lymphocytes generates memory cytotoxic T cell responses. *J Immunol.* 2005;174(7):3967-77.
126. Chen T, Guo J, Cai Z, Li B, Sun L, Shen Y, et al. Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Front Immunol.* 2020;11:1026.
127. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006;36(5):1309-23.
128. Zhang K, Chen L, Zhu C, Zhang M, Liang C. Current Knowledge of Th22 Cell and IL-22 Functions in Infectious Diseases. *Pathogens.* 2023;12(2).
129. Wang ZN, Xu T, Liu KS. Research progress on Th22 cells and related cytokines in tumors: current status and future perspectives. *Am J Cancer Res.* 2023;13(8):3315-23.
130. Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res.* 2019;42(7):549-59.
131. Marques HS, de Brito BB, da Silva FAF, Santos MLC, de Souza JCB, Correia TML, et al. Relationship between Th17 immune response and cancer. *World J Clin Oncol.* 2021;12(10):845-67.
132. Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, et al. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med.* 2011;3(104):104ra0.
133. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer.* 2020;19(1):116.

134. Bluestone JA, McKenzie BS, Beilke J, Ramsdell F. Opportunities for Treg cell therapy for the treatment of human disease. *Front Immunol.* 2023;14:1166135.
135. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11(1):7-13.
136. Tay C, Tanaka A, Sakaguchi S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy. *Cancer Cell.* 2023;41(3):450-65.
137. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(6):356-71.
138. Kim HR, Hwang KA, Park SH, Kang I. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev Immunol.* 2008;28(4):325-39.
139. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011;35(2):161-8.
140. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology.* 2013;435(1):157-69.
141. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):361-70.
142. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995;267(5203):1449-56.
143. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):24-35.
144. Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P, et al. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev.* 1996;86(3):173-95.
145. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood.* 2003;101(11):4260-6.
146. Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, Fearon DT. The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):662-8.
147. Mackay CR, Marston WL, Dudley L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med.* 1990;171(3):801-17.
148. Wang Y, Qiu F, Xu Y, Hou X, Zhang Z, Huang L, et al. Stem cell-like memory T cells: The generation and application. *J Leukoc Biol.* 2021;110(6):1209-23.
149. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.
150. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
151. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell.* 2020;11(8):549-64.
152. Klonowski KD, Williams KJ, Marzo AL, Blair DA, Lingenheld EG, Lefrançois L. Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity.* 2004;20(5):551-62.
153. Park J, Hsueh PC, Li Z, Ho PC. Microenvironment-driven metabolic adaptations guiding CD8(+) T cell anti-tumor immunity. *Immunity.* 2023;56(1):32-42.
154. Edwards J, Wilmott JS, Madore J, Gide TN, Quek C, Tasker A, et al. CD103(+) Tumor-Resident CD8(+) T Cells Are Associated with Improved Survival in Immunotherapy-Naïve Melanoma Patients and Expand Significantly During Anti-PD-1 Treatment. *Clin Cancer Res.* 2018;24(13):3036-45.
155. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB, et al. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol.* 2005;6(9):889-94.
156. Cheuk S, Schlums H, Gallais Sérézal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8(+) T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity.* 2017;46(2):287-300.
157. Hasan F, Chiu Y, Shaw RM, Wang J, Yee C. Hypoxia acts as an environmental cue for the human tissue-resident memory T cell differentiation program. *JCI Insight.* 2021;6(10).

158. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*. 2013;121(4):573-84.
159. Wang F, Cheng F, Zheng F. Stem cell like memory T cells: A new paradigm in cancer immunotherapy. *Clin Immunol*. 2022;241:109078.
160. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2005;11(12):1299-305.
161. Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*. 2014;85(1):25-35.
162. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013;38(1):187-97.
163. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(16):3491-4.
164. Singer K, Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(3):425-31.
165. Seliger B. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs*. 2005;19(6):347-54.
166. Starz AM, Preusser M, Berghoff AS. Immune escape mechanisms and therapeutic approaches in cancer: the cancer-immunity cycle. *Ther Adv Med Oncol*. 2022;14:17588359221096219.
167. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):269-81.
168. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96.
169. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*. 2009;30(11):522-30.
170. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):467-77.
171. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
172. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305-34.
173. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):214-21.
174. Chen ML, Wang FH, Lee PK, Lin CM. Interleukin-10-induced T cell unresponsiveness can be reversed by dendritic cell stimulation. *Immunol Lett*. 2001;75(2):91-6.
175. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10):1269-74.
176. Blesson S, Thiery J, Gaudin C, Stancou R, Kolb JP, Moreau JL, et al. Analysis of the mechanisms of human cytotoxic T lymphocyte response inhibition by NO. *Int Immunol*. 2002;14(10):1169-78.
177. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*. 1927;8(6):519-30.
178. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.
179. Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, et al. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol*. 1997;150(2):409-15.
180. Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol*. 2008;180(11):7175-83.
181. Vuillefroy de Silly R, Dietrich PY, Walker PR. Hypoxia and antitumor CD8(+) T cells: An incompatible alliance? *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1232236.

182. Bannoud N, Dalotto-Moreno T, Kindgard L, García PA, Blidner AG, Mariño KV, et al. Hypoxia Supports Differentiation of Terminally Exhausted CD8 T Cells. *Front Immunol.* 2021;12:660944.
183. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(1):27-35.
184. Khan O, Giles JR, McDonald S, Manne S, Ngiow SF, Patel KP, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature.* 2019;571(7764):211-8.
185. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
186. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* 2017;7(2):165-76.
187. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(9):427-38.
188. Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:87-105.
189. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998;336 ( Pt 1)(Pt 1):1-17.
190. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):638-51.
191. Ash DE. Structure and function of arginases. *J Nutr.* 2004;134(10 Suppl):2760S-4S; discussion 5S-7S.
192. 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. *J Immunol.* 1999;163(7):3771-7.
193. 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. *Cell.* 2016;167(3):829-42.e13.
194. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21123-9.
195. 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. *Int Immunol.* 2012;24(5):303-13.
196. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* 2007;109(4):1568-73.
197. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):675-87.
198. Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, et al. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol.* 2007;37(4):935-45.
199. Mussai F, Egan S, Hunter S, Webber H, Fisher J, Wheat R, et al. Neuroblastoma Arginase Activity Creates an Immunosuppressive Microenvironment That Impairs Autologous and Engineered Immunity. *Cancer Res.* 2015;75(15):3043-53.
200. Grzywa TM, Sosnowska A, Matryba P, Rydzynska Z, Jasinski M, Nowis D, et al. Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front Immunol.* 2020;11:938.
201. Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol Invest.* 2012;41(6-7):614-34.
202. Kim SH, Roszik J, Grimm EA, Ekmekcioglu S. Impact of L-Arginine Metabolism on Immune Response and Anticancer Immunotherapy. *Front Oncol.* 2018;8:67.
203. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev.* 2008;222:180-91.

204. Lamas B, Vergnaud-Gauduchon J, Goncalves-Mendes N, Perche O, Rossary A, Vasson MP, et al. Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability. *Cell Immunol.* 2012;280(2):182-90.
205. Oberlies J, Watzl C, Giese T, Luckner C, Kropf P, Müller I, et al. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J Immunol.* 2009;182(9):5259-67.
206. Niu F, Yu Y, Li Z, Ren Y, Li Z, Ye Q, et al. Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment. *Biomed Pharmacother.* 2022;149:112840.
207. García-Navas R, Munder M, Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy.* 2012;8(11):1557-76.
208. 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 Regenerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression. *Front Immunol.* 2017;8:864.
209. Kim CG, Jang M, Kim Y, Leem G, Kim KH, Lee H, et al. VEGF-A drives TOX-dependent T cell exhaustion in anti-PD-1-resistant microsatellite stable colorectal cancers. *Sci Immunol.* 2019;4(41).
210. Kasakovski D, Xu L, Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):91.
211. Tang L, Zhang Y, Hu Y, Mei H. T Cell Exhaustion and CAR-T Immunotherapy in Hematological Malignancies. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6616391.
212. Peranzoni E, Ingangi V, Masetto E, Pinton L, Marigo I. Myeloid Cells as Clinical Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol.* 2020;11:1590.
213. Chesney JA, Mitchell RA, Yaddanapudi K. Myeloid-derived suppressor cells-a new therapeutic target to overcome resistance to cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2017;102(3):727-40.
214. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, et al. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* 2003;63(15):4441-9.
215. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010;70(8):3052-61.
216. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1045-7.
217. Cazzaniga ME, Cordani N, Capici S, Cogliati V, Riva F, Cerrito MG. Metronomic Chemotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(9).
218. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):423-36.
219. Lien K, Georgsdottir S, Sivanathan L, Chan K, Emmenegger U. Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. *Eur J Cancer.* 2013;49(16):3387-95.
220. Pujol JL, Coffy A, Camerini A, Kotsakis A, Mencoboni M, Gusella M, et al. An individual patient-data meta-analysis of metronomic oral vinorelbine in metastatic non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220988.
221. Romiti A, Falcone R, Roberto M, Marchetti P. Current achievements and future perspectives of metronomic chemotherapy. *Invest New Drugs.* 2017;35(3):359-74.
222. Pongudom S, Phinyo P, Chinthammitr Y, Charoenprasert K, Kasyanan H, Wongyai K, et al. Efficacy and Safety of Metronomic Chemotherapy Versus Palliative Hydroxyurea in Unfit Acute Myeloid Leukemia Patients: A Multicenter, Open-Label Randomized Controlled Trial. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(1):147-55.
223. Mitra A, Barua A, Huang L, Ganguly S, Feng Q, He B. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol.* 2023;14:1188049.
224. Zhang J, Wang L. The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:1533033819831068.

225. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380(1):45-56.
226. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439-48.
227. Munshi NC, Anderson LD, Jr., Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2021;384(8):705-16.
228. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet.* 2021;398(10297):314-24.
229. Labanieh L, Mackall CL. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature.* 2023;614(7949):635-48.
230. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11(4):69.
231. Hay KA, Gauthier J, Hirayama AV, Voutsinas JM, Wu Q, Li D, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood.* 2019;133(15):1652-63.
232. Mussai F, Wheat R, Sarrou E, Booth S, Stavrou V, Fultang L, et al. Targeting the arginine metabolic brake enhances immunotherapy for leukaemia. *Int J Cancer.* 2019;145(8):2201-8.
233. Fultang L, Booth S, Yogev O, Martins da Costa B, Tubb V, Panetti S, et al. Metabolic engineering against the arginine microenvironment enhances CAR-T cell proliferation and therapeutic activity. *Blood.* 2020;136(10):1155-60.
234. Alizadeh D, Wong RA, Yang X, Wang D, Pecoraro JR, Kuo CF, et al. IL15 Enhances CAR-T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(5):759-72.
235. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia.* 2016;30(2):492-500.
236. El Marabti E, Abdel-Wahab O. Enhancing CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Through Memory-Enriched T Cells. *Clin Cancer Res.* 2023;29(4):694-6.
237. Blaesche F, Stenger D, Kaeuferle T, Willier S, Lotfi R, Kaiser AD, et al. Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4(+) and CD8(+) CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19(+) acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(7):1053-66.
238. Kantari-Mimoun C, Barrin S, Vimeux L, Haghiri S, Gervais C, Joaquina S, et al. CAR T-cell Entry into Tumor Islets Is a Two-Step Process Dependent on IFN $\gamma$  and ICAM-1. *Cancer Immunol Res.* 2021;9(12):1425-38.
239. Albelda SM. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn. *Nat Rev Clin Oncol.* 2024;21(1):47-66.
240. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med.* 2017;68:139-52.
241. Grosser R, Cherkassky L, Chintala N, Adusumilli PS. Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors. *Cancer Cell.* 2019;36(5):471-82.
242. Rodriguez-Garcia A, Palazon A, Noguera-Ortega E, Powell DJ, Jr., Guedan S. CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Front Immunol.* 2020;11:1109.
243. Mackensen A, Haanen J, Koenecke C, Alsdorf W, Wagner-Drouet E, Borchmann P, et al. CLDN6-specific CAR-T cells plus amplifying RNA vaccine in relapsed or refractory solid tumors: the phase 1 BNT211-01 trial. *Nat Med.* 2023;29(11):2844-53.

244. Garber K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors. *Nat Biotechnol.* 2018;36(3):215-9.
245. Baulu E, Gardet C, Chuvin N, Depil S. TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives. *Sci Adv.* 2023;9(7):eadf3700.
246. Bai R, Chen N, Li L, Du N, Bai L, Lv Z, et al. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Front Oncol.* 2020;10:1290.
247. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017;168(4):707-23.
248. Fulop T, Larbi A, Kotb R, de Angelis F, Pawelec G. Aging, immunity, and cancer. *Discov Med.* 2011;11(61):537-50.
249. Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity.* 2016;44(6):1255-69.
250. Yi M, Zheng X, Niu M, Zhu S, Ge H, Wu K. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer.* 2022;21(1):28.
251. Acuto O, Di Bartolo V, Michel F. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):699-712.
252. Pudlo M, Demougeot C, Girard-Thernier C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century. *Med Res Rev.* 2017;37(3):475-513.
253. Failla M, Molaro MC, Schiano ME, Serafini M, Tiburtini GA, Gianquinto E, et al. Opportunities and Challenges of Arginase Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2024;67(22):19988-20021.
254. Borek B, Nowicka J, Gzik A, Dziegielewska M, Jedrzejczak K, Brzezinska J, et al. Arginase 1/2 Inhibitor OATD-02: From Discovery to First-in-man Setup in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2023;22(7):807-17.
255. Andersen MH. The targeting of tumor-associated macrophages by vaccination. *Cell Stress.* 2019;3(5):139-40.
256. Martinenaite E, Ahmad SM, Svane IM, Andersen MH. Peripheral memory T cells specific for Arginase-1. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(8):718-9.
257. Glöckner HJ, Martinenaite E, Landkildehus Lisle T, Grauslund J, Ahmad S, Met Ö, et al. Arginase-1 specific CD8+ T cells react toward malignant and regulatory myeloid cells. *Oncoimmunology.* 2024;13(1):2318053.
258. 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. *J Immunother Cancer.* 2017;5(1):101.
259. Pilanc P, Wojnicki K, Roura AJ, Cyranowski S, Ellert-Miklaszewska A, Ochocka N, et al. A Novel Oral Arginase 1/2 Inhibitor Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Experimental Gliomas by Altering the Immunosuppressive Environment. *Front Oncol.* 2021;11:703465.
260. 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. *Front Immunol.* 2020;11:617699.
261. Bülbül Y. Charakterisierung einer neuartigen T-Zell-Stimulation durch humane neutrophile Granulozyten: Dissertation: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2021.
262. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435(2):297-312.
263. Pangrazzi L, Reidla J, Carmona Arana JA, Naismith E, Miggitsch C, Meryk A, et al. CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2020;50(3):363-79.
264. 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. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):116.
265. Vonwirth VM. Untersuchungen zur Arginin-abhängigen Aktivierung humaner T-Lymphozyten durch neutrophile Granulozyten: Dissertation: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2023.

266. Gao R, Ma J, Wen Z, Yang P, Zhao J, Xue M, et al. Tumor cell-released autophagosomes (TRAP) enhance apoptosis and immunosuppressive functions of neutrophils. *Oncoimmunology*. 2018;7(6):e1438108.
267. Cemerski S, Cantagrel A, Van Meerwijk JP, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19585-93.
268. Öörni K, Rajamäki K, Nguyen SD, Lähdesmäki K, Plihtari R, Lee-Rueckert M, et al. Acidification of the intimal fluid: the perfect storm for atherogenesis. *J Lipid Res*. 2015;56(2):203-14.
269. 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. *Nat Immunol*. 2020;21(5):555-66.
270. Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(1):218-30.
271. Hampton HR, Chtanova T. The lymph node neutrophil. *Semin Immunol*. 2016;28(2):129-36.
272. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519-31.
273. Minns D, Smith KJ, Hardisty G, Rossi AG, Gwyer Findlay E. The Outcome of Neutrophil-T Cell Contact Differs Depending on Activation Status of Both Cell Types. *Front Immunol*. 2021;12:633486.
274. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81.
275. Yajuk O, Baron M, Toker S, Zelter T, Fainsod-Levi T, Granot Z. The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer. *Cells*. 2021;10(6).
276. Gibbons Johnson RM, Dong H. Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. *Front Immunol*. 2017;8:961.
277. He G, Zhang H, Zhou J, Wang B, Chen Y, Kong Y, et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:141.
278. Wang TT, Zhao YL, Peng LS, Chen N, Chen W, Lv YP, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut*. 2017;66(11):1900-11.
279. He X, Lin H, Yuan L, Li B. Combination therapy with L-arginine and  $\alpha$ -PD-L1 antibody boosts immune response against osteosarcoma in immunocompetent mice. *Cancer Biol Ther*. 2017;18(2):94-100.
280. Sosnowska A, Chlebowska-Tuz J, Matryba P, Pilch Z, Greig A, Wolny A, et al. Inhibition of arginase modulates T-cell response in the tumor microenvironment of lung carcinoma. *Oncoimmunology*. 2021;10(1):1956143.
281. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(4):1053-63.
282. Le Boucher J, Charret C, Coudray-Lucas C, Giboudeau J, Cynober L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin Chem*. 1997;43(8 Pt 1):1421-8.
283. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*. 2010;32(1):79-90.
284. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010;33(2):153-65.
285. Barrett DM, Singh N, Liu X, Jiang S, June CH, Grupp SA, et al. Relation of clinical culture method to T-cell memory status and efficacy in xenograft models of adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 2014;16(5):619-30.
286. Ghassem S, Nunez-Cruz S, O'Connor RS, Fraietta JA, Patel PR, Scholler J, et al. Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(9):1100-9.

287. Hunziker L, Klenerman P, Zinkernagel RM, Ehl S. Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):374-82.
288. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010;70(21):8368-77.
289. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):402.
290. Villarino AV. Transcriptional programming of T cell metabolism by STAT family transcription factors. *Eur J Immunol*. 2023;53(6):e2048825.
291. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The  $\gamma$ (c) Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity*. 2019;50(4):832-50.
292. Villarino AV, Laurence AD, Davis FP, Nivelon L, Brooks SR, Sun HW, et al. A central role for STAT5 in the transcriptional programming of T helper cell metabolism. *Sci Immunol*. 2022;7(77):eabl9467.
293. Bitar M, Boldt A, Freitag MT, Gruhn B, Köhl U, Sack U. Evaluating STAT5 Phosphorylation as a Mean to Assess T Cell Proliferation. *Front Immunol*. 2019;10:722.
294. Maguire M, Coates AR, Henderson B. Chaperonin 60 unfolds its secrets of cellular communication. *Cell Stress Chaperones*. 2002;7(4):317-29.
295. Collins M, Bartelt RR, Houtman JC. T cell receptor activation leads to two distinct phases of Pyk2 activation and actin cytoskeletal rearrangement in human T cells. *Mol Immunol*. 2010;47(9):1665-74.
296. Rebsamen M, Pochini L, Stasyk T, de Araújo ME, Galluccio M, Kandasamy RK, et al. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*. 2015;519(7544):477-81.
297. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell*. 2016;165(1):153-64.
298. Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, Chantranupong L, Pacold ME, Wang T, et al. Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*. 2016;351(6268):53-8.
299. Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell*. 2002;13(7):2276-88.
300. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(11):844-52.
301. Proud CG. Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;279:215-44.
302. Raught B, Gingras AC. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(1):43-57.
303. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):1871-80.
304. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-12.
305. Klebanoff CA, Crompton JG, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Chandran SS, Eil RL, et al. Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI Insight*. 2017;2(23).
306. Abu Eid R, Friedman KM, Mkrtychyan M, Walens A, King W, Janik J, et al. Akt1 and -2 inhibition diminishes terminal differentiation and enhances central memory CD8(+) T-cell proliferation and survival. *Oncoimmunology*. 2015;4(5):e1005448.
307. Wang T, Marquardt C, Foker J. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature*. 1976;261(5562):702-5.
308. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
309. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342(6155):1242454.
310. Pearce EL. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(3):314-20.

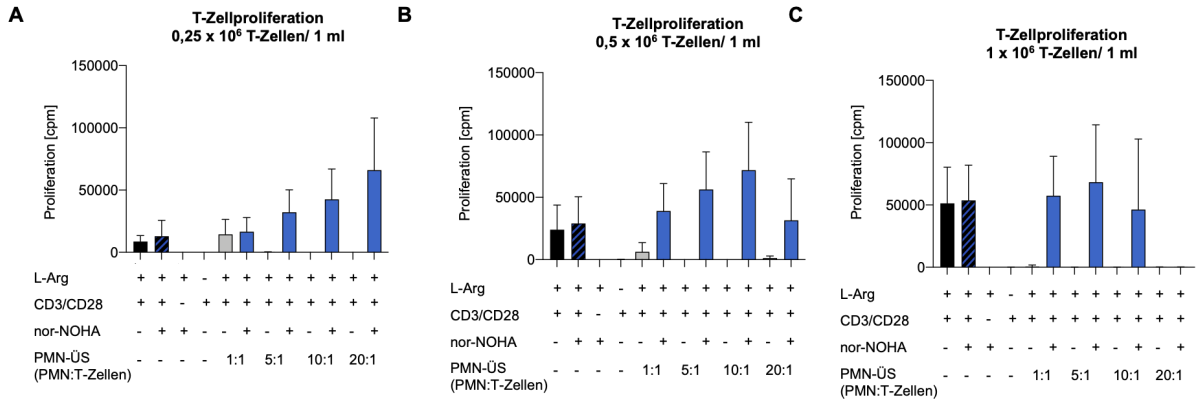
311. Nicholls DG. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 6):1385-8.
312. Yadava N, Nicholls DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosci.* 2007;27(27):7310-7.
313. van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity.* 2012;36(1):68-78.
314. Jones N, Vincent EE, Cronin JG, Panetti S, Chambers M, Holm SR, et al. Akt and STAT5 mediate naïve human CD4+ T-cell early metabolic response to TCR stimulation. *Nat Commun.* 2019;10(1):2042.
315. Li H, Zhao A, Li M, Shi L, Han Q, Hou Z. Targeting T-cell metabolism to boost immune checkpoint inhibitor therapy. *Front Immunol.* 2022;13:1046755.
316. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118.
317. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity.* 2016;45(2):374-88.
318. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell.* 2007;18(4):1437-46.
319. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol.* 2004;172(8):4661-5.
320. Delgoffe GM, Powell JD. Feeding an army: The metabolism of T cells in activation, anergy, and exhaustion. *Mol Immunol.* 2015;68(2 Pt C):492-6.
321. Corrado M, Pearce EL. Targeting memory T cell metabolism to improve immunity. *J Clin Invest.* 2022;132(1).
322. Steinert EM, Vasan K, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism Regulation of T Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2021;39:395-416.
323. Wu H, Zhao X, Hochrein SM, Eckstein M, Gubert GF, Knöpper K, et al. Mitochondrial dysfunction promotes the transition of precursor to terminally exhausted T cells through HIF-1 $\alpha$ -mediated glycolytic reprogramming. *Nat Commun.* 2023;14(1):6858.
324. Chen S, Wang Q, Wang H, Xia S. Endoplasmic reticulum stress in T cell-mediated diseases. *Scand J Immunol.* 2023;98(3):e13307.
325. Kemp K, Poe C. Stressed: The Unfolded Protein Response in T Cell Development, Activation, and Function. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).
326. Li A, Song NJ, Riesenberger BP, Li Z. The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front Immunol.* 2019;10:3154.
327. Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:233-59.
328. Gomez TS, Billadeau DD. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv Immunol.* 2008;97:1-64.
329. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 2015;6(6):e1792.
330. Riha P, Rudd CE. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self Nonself.* 2010;1(3):231-40.
331. Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol.* 2009;21(2):69-77.
332. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013;43(11):2797-809.
333. Minns D, Smith KJ, Findlay EG. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:8968943.
334. Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. CD4 T-cell memory. *Semin Immunol.* 2004;16(5):295-303.

335. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol.* 2003;4(9):835-42.
336. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
337. Herndler-Brandstetter D, Landgraf K, Tzankov A, Jenewein B, Brunauer R, Laschober GT, et al. The impact of aging on memory T cell phenotype and function in the human bone marrow. *J Leukoc Biol.* 2012;91(2):197-205.
338. Beatty GL, Moon EK. Chimeric antigen receptor T cells are vulnerable to immunosuppressive mechanisms present within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2014;3(11):e970027.
339. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH. Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:189-225.
340. Klein C, Brinkmann U, Reichert JM, Kontermann RE. The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23(4):301-19.
341. Tegeler CM, Bilich T, Maringer Y, Salih HR, Walz JS, Nelde A, et al. Prevalence of COVID-19-associated symptoms during acute infection in relation to SARS-CoV-2-directed humoral and cellular immune responses in a mild-diseased convalescent cohort. *Int J Infect Dis.* 2022;120:187-95.
342. Heitmann JS, Bilich T, Tandler C, Nelde A, Maringer Y, Marconato M, et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature.* 2022;601(7894):617-22.
343. Nelde A, Rammensee HG, Walz JS. The Peptide Vaccine of the Future. *Mol Cell Proteomics.* 2021;20:100022.
344. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 2017;547(7662):222-6.
345. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):407-20.
346. Ma M, Jiang W, Zhou R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases. *Immunity.* 2024;57(4):752-71.
347. Farkas JD. The complete blood count to diagnose septic shock. *J Thorac Dis.* 2020;12(Suppl 1):S16-s21.
348. Shen XF, Cao K, Jiang JP, Guan WX, Du JF. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):1687-97.
349. Kwok AJ, Allcock A, Ferreira RC, Cano-Gamez E, Smee M, Burnham KL, et al. Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis. *Nat Immunol.* 2023;24(5):767-79.
350. Luperto M, Zafrani L. T cell dysregulation in inflammatory diseases in ICU. *Intensive Care Med Exp.* 2022;10(1):43.
351. Cheng SC, Scicluna BP, Arts RJ, Gresnigt MS, Lachmandas E, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol.* 2016;17(4):406-13.
352. Moriyama K, Nishida O. Targeting Cytokines, Pathogen-Associated Molecular Patterns, and Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis via Blood Purification. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).
353. Al-Samkari H, Berliner N. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:27-49.
354. Hayden A, Park S, Giustini D, Lee AY, Chen LY. Hemophagocytic syndromes (HPSs) including hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in adults: A systematic scoping review. *Blood Rev.* 2016;30(6):411-20.
355. Machowicz R, Janka G, Wiktor-Jedrzejczak W. Similar but not the same: Differential diagnosis of HLH and sepsis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;114:1-12.
356. Ammann S, Lehmborg K, Zur Stadt U, Janka G, Rensing-Ehl A, Klemann C, et al. Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis have different patterns of T-cell activation, differentiation and repertoire. *Eur J Immunol.* 2017;47(2):364-73.

357. Liu JM, Chi J. Is COVID-19-associated cytokine storm distinct from non-COVID-19 secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis? *Exp Biol Med* (Maywood). 2022;247(4):330-7.
358. Prilutskiy A, Kritselis M, Shevtsov A, Yambayev I, Vadlamudi C, Zhao Q, et al. SARS-CoV-2 Infection-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Am J Clin Pathol*. 2020;154(4):466-74.
359. Kang CK, Han GC, Kim M, Kim G, Shin HM, Song KH, et al. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. *Int J Infect Dis*. 2020;97:313-21.
360. Westmeier J, Paniskaki K, Karaköse Z, Werner T, Sutter K, Dolff S, et al. Impaired Cytotoxic CD8(+) T Cell Response in Elderly COVID-19 Patients. *mBio*. 2020;11(5).

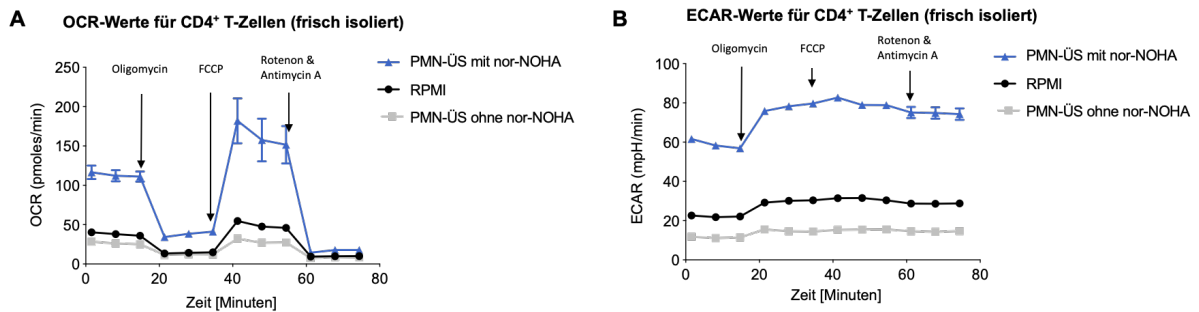
# 10 Anhang

## 10.1 T-Zellproliferation in [cpm]



**Abbildung 56: T-Zellproliferation in [cpm].** T-Zellen wurden in RPMI Medium oder PMN-ÜS mit oder ohne 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads aktiviert, für 48 h inkubiert und die Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation bestimmt. Die T-Zellen wurden in eine Zellkonzentration von (A) 0,25 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 1 ml, (B) 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 1 ml und (C) 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 1 ml angesetzt, die PMN-Überstände wurden der entsprechenden T-Zellkonzentration angepasst. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die absolute Proliferation ist in [cpm] angegeben.

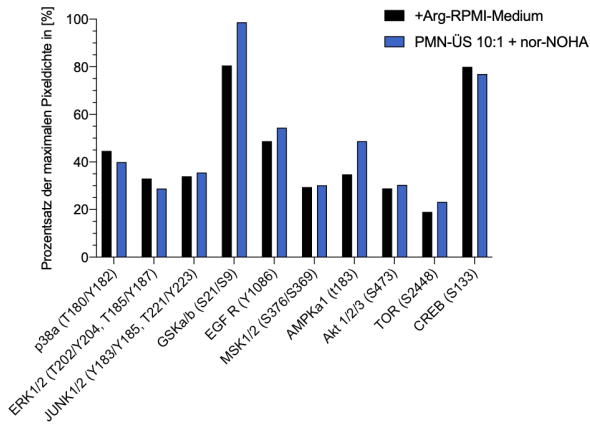
## 10.2 OCR- und ECAR-Werte von frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen



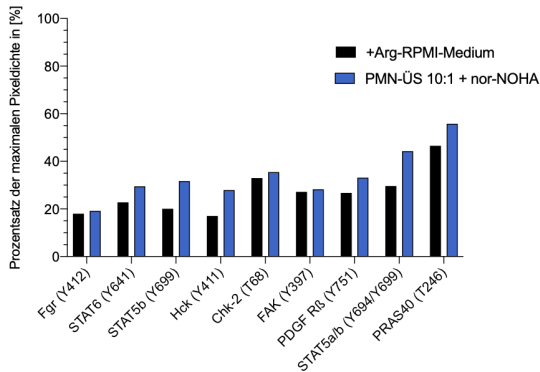
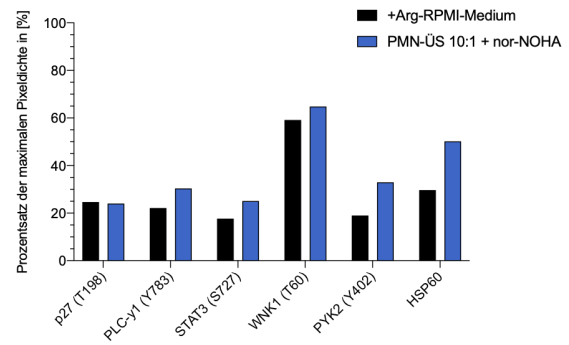
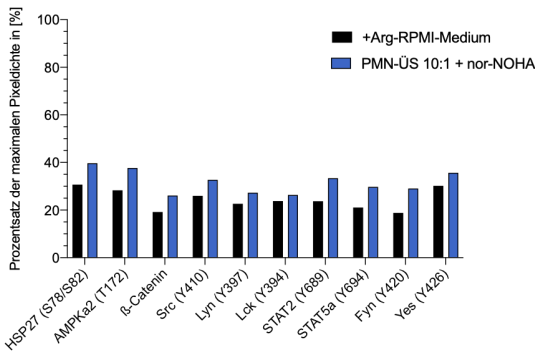
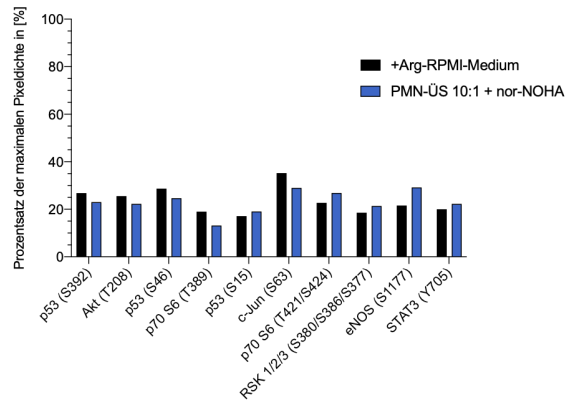
**Abbildung 57: OCR- und ECAR-Werte von frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die Messwerte des Agilent Seahorse XF Mito Stress Test im Zeitverlauf. Jeweils markiert sind die Zugaben von Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A. Dargestellt sind jeweils die Kurven von n = 1 Experiment.

### 10.3 Proteom Profiler™ Array von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen

Membran A: Phospho-Array 48h



Membran B: Phospho-Array 48h

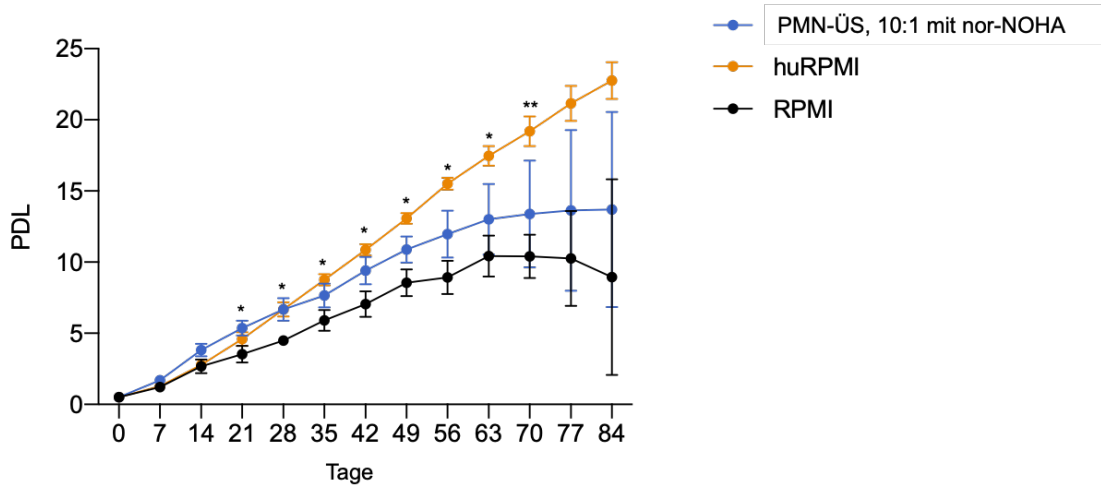


Membran A	Membran B
1 p38a (T180/Y182)	30 p53 (S392)
2 ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)	31 Akt (T208)
3 JUNK1/2 (Y183/Y185, T221/Y223)	32 p53 (S46)
4 GSK3b (S21/S9)	33 p70 S6 (T389)
5 EGF R (Y1086)	34 p53 (S15)
6 MSK1/2 (S376/S369)	35 c-Jun (S63)
7 AMPKa1 (T183)	36 p70 S6 (T421/S424)
8 Akt 1/2/3 (S473)	37 RSK 1/2/3 (S380/S386/S377)
9 TOR (S2448)	38 eNOS (S1177)
10 CREB (S133)	39 STAT3 (Y705)
11 HSP27 (S78/S82)	40 p27 (T198)
12 AMPKa2 (T172)	41 PLC-γ1 (Y783)
13 β-Catenin	42 STAT3 (S727)
14 Src (Y410)	43 WNK1 (T60)
15 Lyn (Y397)	44 PYK2 (Y402)
16 Lck (Y394)	45 HSP60
17 STAT2 (Y689)	
18 STAT5a (Y694)	
19 Fgr (Y412)	
20 Yes (Y426)	
21 Fgr (Y412)	
22 STAT6 (Y641)	
23 STAT5b (Y699)	
24 Hck (Y411)	
25 Chk-2 (T68)	
26 FAK (Y397)	
27 PDGF Rβ (Y751)	
28 STAT5a/b (Y694/Y699)	
29 PRAS40 (T246)	

**Abbildung 58: Proteom Profiler™ Array von konventionell und hyperaktivierten T-Zellen.** T-Zellen wurden in +Arg-RPMI-Medium oder PMN-ÜS mit 1 mM nor-NOHA mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads für 48 h aktiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Assay Membranen mit dem Proteinlysate inkubiert. Vorhandene phospho-Kinasen konnten so an die Capture-Antikörper der Membran binden. Anschließend wurden die auf der Membran gebundenen Kinasen mit Sekundär-Antikörpern markiert und diese mit Streptavidin-HRP nachgewiesen. Das durch Chemilumineszenz gemessene Signal entsprach der Menge an gebundenem phosphoryliertem Protein. Dargestellt sind die auf Referenzpunkte der jeweiligen Membranen normierten Werte für die phosphorylierten Proteine sowie die Beschriftung für die einzelnen Membranen für n = 1 Experiment.

## 10.4 Langzeit Proliferation von T-Zellen in RPMI, huRPMI und PMN-ÜS mit nor-NOHA

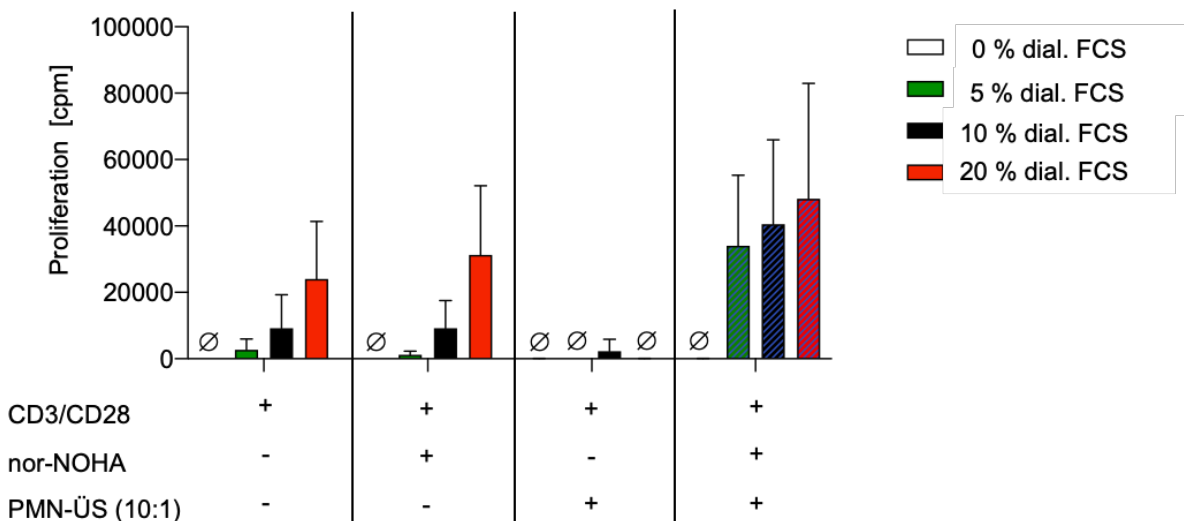
### Langzeit Proliferation von T-Zellen in RPMI, huRPMI und PMN-Überstand mit nor-NOHA



**Abbildung 59: Langzeitproliferation von transduzierten T-Zellen in huRPMI, +Arg-RPMI und PMN-ÜS mit nor-NOHA.** T-Zellen wurden mit einem gegen p53<sub>264-272</sub> spezifischen Einzelketten TZR transduziert und einen Zeitraum von 84 Tagen wöchentlich mit p53<sub>264-272</sub> beladenen und bestrahlten K562-Zellen in huRPMI-Medium, +Arg-RPMI oder PMN-Überstand mit 1 mM nor-NOHA restimuliert. Die Zellzahl wurde zu jedem Restimulationszeitpunkt bestimmt und daraus die Proliferation Double Time ermittelt, die gegen die Zeit in Kultur aufgetragen wurde. Hier dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängige Experimente. Statistische Berechnungen erfolgten mittels two-way ANOVA (\*\*\*p<0,0002; \*\*p<0,0021; \*p<0,0332) Tag 21 signifikanter Unterschied zwischen RPMI und PMN-ÜS 10:1 mit nor-NOHA, ab Tag 28 signifikanter Unterschied zwischen RPMI und huRPMI.

## 10.5 T-Zellproliferation in RPMI mit 0, 5, 10 und 20 % dial. FCS

### T-Zellproliferation in RPMI mit 0, 5, 10 und 20 % dial. FCS



**Abbildung 60: T-Zellproliferation in RPMI mit unterschiedlichen dial. FCS-Konzentrationen.** T-Zellen und PMN wurden aus Vollblut isoliert. Die frisch isolierten PMN wurden mit und ohne Zugabe von nor-NOHA im PMN-zu T-Zell-Verhältnis 10:1 in 150 µM Arginin RPMI und 0, 5, 10 und 20 % dial. FCS für 72 h vorinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen in den Medien und PMN-Überständen mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen mit anti-CD3/anti-CD28-Beads (5 µl pro 1x10<sup>6</sup> T-Zellen) für 48 h aktiviert. Die Proliferation wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation ermittelt. Dargestellt sind die Proliferationsrohwerte ohne Normierung in counts per minute aus n =3 unabhängig Experimenten. ∅ = keine Proliferation nachweisbar. Die unterschiedlichen Konditionen sind mittels senkrechter Striche voneinander getrennt.

## 11 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung von vielen Menschen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle danke ich zuallererst sehr meinem Doktorvater [REDACTED]. Ich bin unendlich dankbar, dass ich meine Doktorarbeit in Deiner Arbeitsgruppe und unter Deiner hervorragenden Betreuung anfertigen durfte. Die motivierende Atmosphäre, die optimale Balance zwischen der Inspiration Deinerseits und der Möglichkeit, dass ich meine eigenen Ideen und Konzepte mit in diese Forschung bringen durfte, haben dieses Projekt für mich zu etwas ganz Besonderem gemacht. Deine wissenschaftliche Begeisterung für Granulozyten, T-Zellen und Arginase hat auf mich abgefärbt und wird mich hoffentlich noch lange begleiten. Vielen Dank für Dein Vertrauen und Deine Unterstützung. Herzlich danken möchte ich [REDACTED] [REDACTED], die diese Arbeit ebenfalls begutachtet haben.

Auch möchte ich der gesamten AG Munder danken, insbesondere [REDACTED] die als PhD-Studentin den Beginn meiner Arbeit betreut hat. Vielen lieben Dank für Deine großartige Einarbeitung in die vielen Methoden, Deine Geduld und die vielen produktiven und auch lustigen Laborabende, die wir gemeinsam an der Bench verbrachten.

Mein Dank gilt auch [REDACTED], der ganz unkompliziert die wunderschönen und faszinierenden elektronenmikroskopischen Bilder der hyperaktivierten T-Zellen aufgenommen hat. Vielen lieben Dank an Sie und ihr Team für diese gute Kooperation.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten AG Theobald. Hier ist vor allem [REDACTED] [REDACTED] zu nennen, der in unseren Besprechungen immer den passenden Input für weitere Experimente lieferte. Aber auch [REDACTED] möchte ich danken, die durch ihre Expertise für alle methodischen oder technischen Probleme im Labor eine Lösung parat hatte.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der AG Theobald ([REDACTED] [REDACTED]), Mitgliedern weiterer AGs der III. Medizinischen Klinik (insbesondere [REDACTED]), sowie der AG Rajalingam, die mich in verschiedenen Versuchen und deren Auswertung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern [REDACTED], sowie meiner Schwester [REDACTED] die mir die Zeit für diese Arbeit ermöglicht haben und nie aufgehört haben mich zu motivieren. Ich danke an dieser Stelle auch meinen Freunden, die immer Verständnis dafür hatten, wenn ich zu jeder Tages- und Nachtzeit noch einmal „kurz“ ins Labor musste. Zuletzt gilt mein Dank meinem Partner [REDACTED], der immer an mich glaubt und eine große Unterstützung im gesamten Entstehungsprozess dieser Arbeit war.

## 12 Tabellarischer Lebenslauf

