

Aus dem Bereich der Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Funktionale Analyse von Tötungsmechanismen
humaner Melanom-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und
natürlicher Killerzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2019

vorgelegt von

Kim Sina Friedmann

geb. am 04.01.1991 in Homburg/Saar

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Biophysik am Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Jens Rettig

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Summary	8
3	Einleitung	10
3.1	CD8 ⁺ T-Zellen	10
3.1.1	<i>In vivo</i> Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	11
3.1.2	<i>In vitro</i> Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	11
3.1.3	Diversität des T-Zell-Rezeptors	13
3.1.4	Antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellklone	14
3.2	Tumorbekämpfung durch Effektorzellen des Immunsystems	16
3.2.1	Konzept des <i>Cancer Immunoeditings</i>	16
3.2.2	Zytotoxische Mechanismen CD8 ⁺ T-Zellen und NK-Zellen	17
3.2.3	Detektion der CTL- und NK-vermittelten Zytotoxizität	20
3.3	CD8 ⁺ T- und NK-Zell-basierte Immuntherapie im Melanom.....	22
3.4	Zielsetzung	24
4	Material	26
4.1	Antikörper	26
4.2	Reagenzien	27
4.3	Lösungen.....	29
4.4	Laborgeräte.....	32
4.5	Kits	33
4.6	Verbrauchsmaterialien	34
4.7	Verwendete Zellen.....	34
4.7.1	T2 Zellen.....	34
4.7.2	K562/K562 pCasper Zellen	35
4.7.3	Jurkat E6-1/ Jurkat E6-1 pCasper Zellen.....	35
4.7.4	Epstein-Barr Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCL).....	35
4.7.5	SK-Mel5.....	35
4.7.6	WM3734.....	36
4.7.7	MCF-7.....	36
4.7.8	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	36

5	Methoden	37
5.1	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	37
5.2	Isolation humaner natürlicher Killerzellen.....	37
5.3	Herstellung antigenspezifischer CD8 ⁺ T Zellklone	38
5.3.1	Generierung antigenpräsentierender dendritischer Zellen.....	38
5.3.2	Vorbereitung naiver CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
5.3.3	DC-vermittelte antigenspezifische Aktivierung CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
5.3.4	Vereinzelung der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	40
5.3.5	Expansion antigenspezifischer T-Zellklone	41
5.4	SK-Mel5-Kokultur mit CTL _{MART1} und primären NK-Zellen	41
5.5	Real-time Killing Assay.....	42
5.5.1	Quantifizierung der Ca ²⁺ -abhängigen Zytotoxizität von CD8 ⁺ T- und NK-Zellen.....	44
5.6	Die Generierung von Tumorzellsphäroiden	44
5.7	Durchflusszytometrische Analysen.....	45
5.8	Transiente Transfektion	46
5.9	Mikroskopische Messungen.....	46
5.10	Quantifizierung der Proteinmenge.....	48
5.11	Statistik.....	48
6	Ergebnisse	49
6.1	Zytotoxizität der Effektorzellen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes	49
6.2	Antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellklone	52
6.2.1	Generierung pp65-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellklone	52
6.2.2	Tumorspezifische CD8 ⁺ T-Zellklone	54
6.2.3	Zytotoxische Kapazität der MART1-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklone	64
6.3	Lyse von Melanomzellen durch CD8 ⁺ und natürliche Killerzellen.....	67
6.3.1	Interdependenz der CD8 ⁺ - und NK-vermittelten Zytotoxizität.....	69
6.4	Apoptoseinduktion durch CTL _{MART1} und NK-Zellen.....	79
6.4.1	Direkter Vergleich von Annexin V und pCasper3-GR als Apoptosensoren.....	81
6.4.2	Annexin V als Apoptosemarker in der Durchflusszytometrie	89
7	Diskussion.....	93
7.1	Generierung antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	93
7.2	Interdependenz der CD8 ⁺ - und NK-vermittelten Zytotoxizität.....	95

7.2.1	Die Resistenz der Melanomzellen gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität nach einer NK-Kokultur ist bedingt durch eine Hochregulation an NK-inhibitorischen Rezeptoren.....	96
7.2.2	Aufgrund der hohen Avidität der CTL _{MART1} ist die Melanom-spezifische Lyse durch CTL _{MART1} trotz NK-induzierter MHC-I-Hochregulation der SK-Mel5 Zellen unbeeinträchtigt	97
7.2.3	Eine Kokultur mit CTL _{MART1} induziert eine MHC-I-Hochregulation in SK-Mel5 Zellen und schützt sie somit vor der NK-vermittelten Zytotoxizität.....	97
7.2.4	Die Kokultur von SK-Mel5 mit CTL _{MART1} induziert eine Resistenz gegen die CTL _{MART1} -vermittelte Zytotoxizität und ist durch eine Herunterregulation der MART1-Proteinexpression der Melanomzellen bedingt	98
7.2.5	Kritische Betrachtung der Methodik und Ausblick.....	101
7.3	Direkter Vergleich von Annexin V und pCasper3-GR als Apoptosensoren.....	105
7.3.1	CTL _{MART1} induzieren hauptsächlich Apoptosen in SK-Mel5 Zellen.....	105
7.3.2	Der PS-Sensor Annexin V ist zur Unterscheidung zwischen Effektor-induzierten Nekrosen und Apoptosen nicht geeignet.....	106
7.3.3	Kritische Betrachtung der Methodik.....	109
7.3.4	Alternative Apoptose-Sensoren zu Annexin V und pCasper-3GR.....	110
8	Anhang.....	113
8.1	Literaturverzeichnis.....	113
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	135
8.3	Tabellenverzeichnis.....	136
8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	137
	Danksagung.....	140
	Veröffentlichungen.....	142

1 Zusammenfassung

Sowohl natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als auch CD8⁺ T-Zellen (CTL) übernehmen als zytotoxische Effektorzellen komplementäre Aufgaben in der Immunantwort gegen Pathogene und entartete Zellen. NK-Zellen zählen zur angeborenen Immunität und erkennen ihre Zielzellen über die Bindung keimbahnkodierter Rezeptoren. CD8⁺ T-Zellen sind hingegen Teil der adaptiven Immunität und interagieren antigenspezifisch über ihren T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-I-Peptid-Komplex der Zielzelle.

Um eine antigenspezifische Interaktion zwischen einer CD8⁺ T-Zelle und ihrer Zielzelle auch *in vitro* zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone erstmals in unserem Labor etabliert. Die Generierung Melanom-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone (CTL_{MART1} und CTL_{gp100}) hat die direkte Interaktion mit Melanomzellen ermöglicht, wodurch ein Melanom-Kokultur-Modell etabliert werden konnte. Dieses Kokultur-Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um die NK- und CD8⁺ T-Zell-Interdependenz (gegenseitige Abhängigkeit) besser verstehen zu können. Dabei wurde die SK-Mel5 Zelllinie zunächst dem Selektionsdruck durch NK bzw. CTL_{MART1} ausgesetzt. Die überlebenden Melanomzellen aus dieser Kokultur wurden anschließend in einem Zytotoxizitäts-Assay (Real-time Killing Assay) als Zielzellen von NK und CTL_{MART1} verwendet. Eine Erhöhung des NK:SK-Mel5 Verhältnisses in der Kokultur korrelierte dabei invers mit der Lyseeffizienz der kokultivierten Melanomzellen durch NK. Somit hatte eine NK-Kokultur eine Resistenz der überlebenden Melanomzellen gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität zur Folge. Parallel wurde auch in den kokultivierten SK-Mel5 Zellen eine Hochregulation von MHC-I, einem Liganden für NK-inhibitorische Rezeptoren, festgestellt. Im Gegenzug war die CTL_{MART1}-vermittelte Zytotoxizität auf die NK-inkubierten SK-Mel5 Zellen unverändert. Eine CTL_{MART1}-Kokultur hatte überraschenderweise sowohl eine Resistenz der überlebenden SK-Mel5 Zellen gegen die NK- als auch CTL_{MART1}-vermittelte Zytotoxizität zur Folge. Außerdem wurde auch hier die Expression der MHC-I-Rezeptoren hoch-, jedoch ebenso die Expression des MART1-Proteins herunterreguliert. Durch extrazelluläre Beladung der CTL_{MART1}-inkubierten SK-Mel5 Zellen mit dem korrespondierenden MART1-Antigen konnte die Resistenz gegenüber der CTL_{MART1}-vermittelten Zytotoxizität kompensiert werden. Die Herunterregulation der MART1-Proteinexpression bewirkt somit eine verminderte Präsentation des korrespondierenden MART1-Antigens über MHC-I-Moleküle an der Plasmamembran (PM) und bedingt dadurch eine Reduktion der CTL_{MART1}-vermittelten Zytotoxizität gegen CTL_{MART1}-kokultivierte SK-Mel5 Zellen.

Die CTL- und NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität basiert in beiden Fällen auf den gleichen Mechanismen: Das Perforin-vermittelte Killing über Sezernierung von lytischen Vesikeln sowie die Bindung spezifischer Todes-Rezeptoren. Dabei kann der Zielzelltod durch Induktion der Apoptose, bei der die Integrität der PM erhalten bleibt, und durch Induktion der Nekrose, die ein Aufplatzen der Zelle und damit den Verlust der PM-Integrität zur Folge hat, herbeigeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der beiden Apoptose-Sensoren pCasper3-GR sowie Annexin V in bildgebenden Verfahren zur Charakterisierung des Effektor-induzierten Zelltodes untersucht und miteinander verglichen. Der FRET-basierte Sensor pCasper3-GR indiziert mittels Farbumschlag der Zelle von orange nach grün die Aktivierung der Effektor-Caspase 3, während das Fluorophor-gekoppelte Annexin V die extrazellulär translozierten Phosphatidylserine (PS) an der PM bindet. Das apoptotische Sterben von Zielzellen wurde dabei stets signifikant früher durch Analyse des pCasper Signals als durch Verwendung von Annexin V detektiert. Interessanterweise wurden Nekrosen durch beide Sensoren nahezu gleichzeitig nachgewiesen. Das deutet darauf hin, dass Annexin V bei Nekrosen und Sekundärnekrosen (Verlust der Membranintegrität einer bereits apoptotischen Zelle) in die Zelle diffundiert und intrazellulär PS bindet, was es für die genaue Charakterisierung des Effektor-induzierten Zelltodes ungeeignet macht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone ein wertvolles Werkzeug in der AG Hoth etabliert, das die Analyse der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität *in vitro* in einem physiologischen Kontext, wie z. B. der Melanom-Kokultur, ermöglicht. Mit Hilfe des etablierten Kokultur-Modells kann die Charakterisierung der Resistenzmechanismen von Tumorzellen, die vor allen Dingen bei Immuntherapien von Krebspatienten eine Rolle spielen, untersucht werden. Außerdem kann ein besseres Verständnis der CD8⁺-NK-Zell-Interdependenz langfristig eine Optimierung von zellbasierten Immuntherapien zur Folge haben. Zudem ermöglicht der Vergleich verschiedener Zelltod-Sensoren eine verbesserte Analyse zytotoxischer Mechanismen und trägt so zu einem besseren Verständnis der Funktion von zytotoxischen Immunzellen bei.

2 Summary

Natural killer (NK) cells as well as CD8⁺ T cells (CTL) act as cytotoxic effector cells and perform complementary roles in immune responses against pathogens and malignant cells. NK cells belong to the innate immunity and express germ-line encoded activating and inhibitory receptors. CTL on the other hand are part of the adaptive immune system and recognize their targets by antigen-specific interactions of their T cell receptors (TCR) with MHC I-peptide-complexes presented by target cells.

In this thesis, antigen-specific CD8⁺ T cell clones were generated for the first time in our laboratory to allow antigen-specific interactions between CD8⁺ T cells with their cognate target antigen *in vitro*. Generation of melanoma specific CD8⁺ T cell clones (CTL_{MART1} and CTL_{gp100}) gave us the opportunity to analyze combined CTL- and NK-mediated cytotoxicity against human melanoma cells (SK-Mel5). To this end, a melanoma-coculture-model has been established. Firstly, SK-Mel5 cells were coincubated together with NK cells or CTL_{MART1}, respectively. Surviving melanoma cells served as target cells and were challenged again by adding NK cells or CTL_{MART1} as effector cells in a cytotoxicity assay (real-time killing assay). An increase of the NK:SK-Mel5-ratio in coculture correlated with a reduced NK-mediated cytotoxicity and thus an NK cell resistance of surviving melanoma cells. Simultaneously, MHC class I (MHC I), a ligand for inhibitory NK receptors, was upregulated by NK-cocultured SK-Mel5 cells. In contrast, CTL_{MART1}-mediated cytotoxicity against melanoma cells was unaffected by NK-coincubation. Surprisingly, addition of CTL_{MART1} in SK-Mel5 coculture induced a resistance of surviving SK-Mel5 cells against NK- as well as CTL_{MART1}-mediated cytotoxicity. A CTL_{MART1}-coculture caused an upregulation of MHC I molecules in parallel to a decrease of MART1 expression. Exogenous administration of corresponding MART1-peptide in a rescue-experiment restored CTL_{MART1}-mediated cytotoxicity against SK-Mel5 cells coincubated with CTL_{MART1} beforehand. Thus, downregulation of MART1-protein expression induces a reduced presentation of corresponding MART1-antigens via MHC I molecules at the plasma membrane (PM), thereby causing a reduction of CTL_{MART1}-mediated cytotoxicity against CTL_{MART1}-cocultured SK-Mel5 cells.

CTL and NK cells are activated by different receptors but kill their target cells using the same basic mechanisms: perforin-mediated killing via secretion of lytic granules as well as binding of specific death receptors. Thereby different modes of cell death can be induced: apoptosis, which preserves PM integrity, and necrosis, which is indicated by disruption of the PM. In this thesis two different apoptosis sensors, pCasper3-GR and Annexin V, were tested in imaging-based

Summary

techniques to characterize effector cell-mediated cell death. The FRET-based pCasper3-GR sensor indicates activation of effector caspase 3 via color change from orange to green fluorescence emission. Fluorophore-labeled Annexin V on the other hand senses extracellular translocated phosphatidyl serines (PS) at the PM. In all experiments, pCasper signal analysis revealed apoptotic cell death before Annexin V signal analysis. Interestingly, analysis of both sensors revealed necrotic cell death almost simultaneously, indicating a diffusion of Annexin V into the cell, which causes an intracellular PS-binding. Thus, Annexin V seems to be an inappropriate marker for characterization of effector-induced cell death.

By generating antigen-specific CD8⁺ T cell clones, a valuable tool has been established in our laboratory to study CTL-mediated cytotoxicity *in vitro* in a more physiological context. Using this tool, a melanoma-coculture-model could be established, which allows the characterization of resistance mechanisms used by tumor cells, having an impact on immune cell based tumor therapies of cancer patients. Furthermore, a better understanding of CTL-NK-cell interdependence could give rise to optimization strategies of immune therapies. Moreover, a comparison of different cell death markers facilitates an optimized analysis of cytotoxic mechanisms and thereby contributes to a better understanding of cytotoxic immune cell function.

3 Einleitung

3.1 CD8⁺ T-Zellen

„B and T are the first and the last letter of bullshit“. Diese Aussage aus dem Jahr 1968, über den Vorschlag von Jacques Miller Lymphozyten in B-Zellen („bone-marrow-derived antibody producing cells“) und T-Zellen („thymus-derived helper cells“) einzuteilen, wird der Immunologe Prof. Bede Morris nach heutigem Wissensstand vermutlich nicht noch einmal wiederholen (Miller 1999; Miller & Mitchell 1967). Denn Miller war es, der als Erster erkannte, dass der Thymus kein rudimentäres Überbleibsel der Evolution darstellt, sondern vielmehr als Organ des Immunsystems für die Heranreifung der T Lymphozyten unerlässlich ist (Miller 1962). Diese T Lymphozyten sind Teil des adaptiven Immunsystems und lassen sich anhand der Expression des CD4 bzw. CD8 Moleküls in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen einteilen. Über eine Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) erkennen sie Peptide, auch Antigene genannt, die über sogenannte MHC Moleküle (engl. Major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex) von APC (antigenpräsentierenden Zellen) präsentiert werden. CD4⁺ T-Zellen erkennen ausschließlich MHC-Klasse-II (MHCII) assoziierte Antigene und werden auch als Helferzellen bezeichnet. Die CD8⁺ T-Zellen können über die TCR-vermittelte Bindung des MHC-Klasse-I-Peptidkomplexes (pMHCI) Krebszellen und infizierte Zellen antigenspezifisch erkennen und eliminieren. Sie sind daher auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bekannt. Humane MHCI Rezeptoren sind Teil des HLA-Systems (HLA = humanes Leukozytenantigen) und werden abhängig von ihrem Genlokus in HLA-A, -B und -C Isotypen eingeteilt. Sie präsentieren hauptsächlich Peptide, die über die Proteasom-vermittelte Degradierung endogener Proteine entstehen. Diese Peptide werden durch die Aktivität des TAP (engl. *Transporter associated with Antigen Processing*) Moleküls in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie mit dem MHCI Rezeptor zu pMHCI assembliert und über den sekretorischen Signalweg an die Plasmamembran (PM) transportiert werden. Die MHCI-vermittelte Präsentation von Peptiden exogenen Ursprungs erfolgt hingegen über einen Mechanismus, der auch als Kreuzpräsentation (engl. *cross presentation*) bezeichnet wird. Exogene Proteine werden dabei phagozytiert und ins Zytosol freigesetzt, was nach proteolytischer Spaltung zur MHCI-vermittelten Präsentation der Peptide führt (Blum et al. 2013). Die Kreuzpräsentation von Antigenen exogenen Ursprungs (z. B. von Pathogenen) wird hauptsächlich durch eine bestimmte Untergruppe der APC, die dendritischen Zellen (DC), vermittelt. Dieser Prozess ist essentiell für die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen (T-Zelle ohne

vorherigen Antigenkontakt) und damit unerlässlich für die Induktion einer effizienten adaptiven Immunantwort (Joffre et al. 2012).

3.1.1 *In vivo* Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Sekundäre lymphatische Organe, wie die Lymphknoten und die Milz, spielen bei der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen *in vivo* eine wichtige Rolle. Findet eine Erstinfektion statt, reichern sich neben naiven CD8⁺ T-Zellen auch DC in den peripheren Regionen der Lymphknoten an (Hickman et al. 2008) und aktivieren die CD8⁺ T-Zellen über die Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) (Abbildung 1A). Der erstmalige Antigenkontakt einer naiven CD8⁺ T-Zelle mit einer reifen DC wird auch als „*Priming*“ (dt. Initialisierung) bezeichnet. Dieses Priming durch DC stellt einen wesentlichen Schritt dar, da dieser die komplette nachfolgende Immunantwort formt und beeinflusst (Arens & Schoenberger 2010). Eine effiziente antigenspezifische Aktivierung wird dabei durch das Zusammenspiel von drei unterschiedlichen Signalen während der IS-Ausbildung induziert. Das erste Signal spiegelt die Interaktion des TCR mit pMHC I wider. Jedoch führt erst das zweite Signal, die Interaktion des kostimulatorischen Rezeptors CD28 der CD8⁺ T-Zelle mit CD80 bzw. CD86 der DC, zu einer Verstärkung des antigenspezifischen Stimulus und induziert somit die Teilung der CD8⁺ T-Zelle (van Stipdonk et al. 2001). Das zusätzliche dritte Signal, die Zytokin-induzierte Signalkaskade, ermöglicht letztendlich die klonale Expansion, die Entwicklung der Effektorfunktionen sowie die Etablierung einer langlebigen Gedächtniszell-Population (engl. *Memory cell population*), die auch nach Bekämpfung der Infektion erhalten bleibt (Mescher et al. 2006).

3.1.2 *In vitro* Stimulation von CD8⁺ T-Zellen

Die antigenspezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen kann auch *in vitro* durchgeführt werden. Allerdings ist die Handhabung zur Herstellung monoklonaler, antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu polyklonalen, antigenunspezifischen Stimulationen komplex und langwierig. Aus diesem Grund wurden auch in der AG Hoth bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit hauptsächlich die CD8⁺ T-Zellstimulation mittels Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und Antikörper-gekoppelter Beads durchgeführt (Abbildung 1B, C).

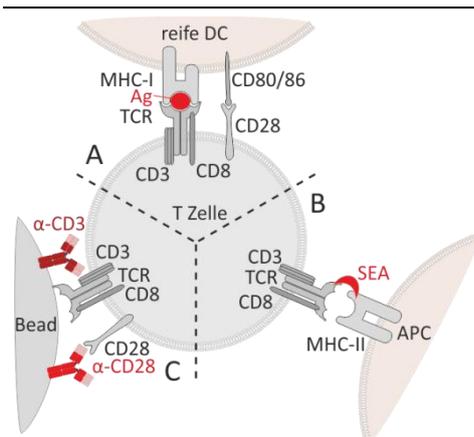


Abbildung 1: Drei unterschiedliche *in vitro* Stimulationen von CD8⁺ T-Zellen. (A) Bei der physiologischen Stimulation bildet eine antigenpräsentierende DC mit dem TCR einer naiven CD8⁺ T-Zelle eine IS. (B) Bei der SEA-Stimulation vernetzt das SEA-Molekül antigenunabhängig den MHCII-Rezeptor einer APC mit der vβ-Region des TCR der T-Zelle. (C) Die Bindung anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper gebundener Beads an den TCR-Komplex sowie den kostimulatorischen Rezeptor induziert eine artifizielle antigenunspezifische Stimulation CD8⁺ T-Zellen. Abbildung modifiziert nach Friedmann et al. 2019.

Bei der SEA-Stimulation bindet das Superantigen außerhalb der konventionellen Antigen-Bindestelle des MHCII-Moleküls (Jardetzky et al. 1994). So kann es den TCR der CD8⁺ T-Zellen (über Bindung der vβ-Region) mit dem speziellen MHCII Isotyp HLA-DR der APC verknüpfen und eine antigenunspezifische Stimulation induzieren. Auch bei der Verwendung von Beads wird eine antigenunspezifische Stimulation von CD8⁺ T-Zellen durch die Bindung der anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper verursacht (Trickett & Kwan 2003). Wenn auch Vorteile wie die unkomplizierte und schnelle Handhabung zu nennen sind, gibt es bei beiden Stimulationen dennoch einige entscheidende Nachteile. So ist in beiden Fällen die starke Donorvariabilität oft ein Hindernis in der Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse. Dies trifft vor allem bei der Superantigen-basierten Stimulation zu, da die Allel-Polymorphismen der PBMC-Spender (PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zu einer Expression diverser HLA-DR Allele führen, die unterschiedliche SEA-Affinitäten aufweisen, und damit eine starke Heterogenität der Superantigen-induzierten Immunantwort verursachen (Llewelyn et al. 2006). Zudem bindet das Superantigen SEA ausschließlich eine bestimmte vβ-Region (vβ22) des TCR und kann dadurch nur um die 20 % aller in den PBMC vorkommenden CD8⁺ T-Zellen stimulieren (Sharma et al. 2013). Andererseits werden durch die Stimulation mit Beads nur zwei der drei Signale zur erfolgreichen CD8⁺ T-Zellstimulation geliefert. Anti-CD3 bindet antigenunabhängig den TCR Komplex (Signal 1) und anti-CD28 induziert die kostimulatorische Stimulation (Signal 2), allerdings ist die Sezernierung von Zytokinen durch APC als drittes Signal der T-Zellstimulation nicht gegeben. Des Weiteren können artifizielle Beads schon allein durch ihre Unfähigkeit zur dynamischen Remodellierung ihrer Protein-Komposition während der IS-Ausbildung nicht als adäquater APC-Ersatz betrachtet werden. Auch die unbiegsame Oberfläche der Beads limitiert das *Mechanosensing* (dt. mechanisches Interagieren) der CD8⁺ T-Zelle, was für die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung wichtig ist (Platzman et al. 2013). Im direkten Vergleich der antigenspezifischen Stimulation durch APC mit der anti-CD3/CD28-vermittelten Bead-Aktivierung wurden außerdem von Tan und Kollegen signifikante

Unterschiede in der Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen festgestellt (Tan et al. 2014). Die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone würde somit die funktionelle *in vitro* Untersuchung CD8⁺ T-Zellen in einem physiologischeren Kontext (antigenspezifische Interaktion mit Zielzellen) erlauben und damit die Relevanz der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erhöhen.

3.1.3 Diversität des T-Zell-Rezeptors

Der TCR besteht aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, der sogenannten α - und β -Kette, die wiederum über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Eine Minderheit der T-Zellen exprimiert TCR, die aus einer γ - und einer δ -Kette bestehen. Die Funktion und Antigenerkennung dieser $\gamma\delta$ T-Zellen ist allerdings weitestgehend unbekannt (Willcox & Willcox 2019). Beide Ketten des TCR (α - und β - bzw. γ - und δ -Kette) sind über eine Transmembrandomäne in der Lipidmembran der T-Zelle verankert und weisen eine extrazelluläre konstante Region (C) und variable Region (V) auf. Aufgrund der speziellen Faltung, die der Faltung des Fab-Fragments (antigenbindendes Fragment) eines Antikörpers ähnelt, bilden die beiden Ketten ein dreidimensionales Gebilde, das antigenspezifisch den pMHC1 einer APC binden kann (Bjorkman et al. 1987; Garboczi et al. 1996). CD8⁺ T-Zellen exprimieren als Kollektiv ein breites Spektrum an TCR, wobei jeder TCR eine spezifische Kombination von Peptid und MHC erkennt. Diese stark ausgeprägte Diversität der TCR wird durch Rekombinationsprozesse der sogenannten V(D)J DNA Elemente (engl. *variable, diversity, joining DNA elements*) in der frühen T-Zell-Entwicklung ermöglicht (Akamatsu & Oettinger 1998; Serra et al. 2002). Initiiert werden diese Rekombinationsprozesse von den beiden Proteinen RAG1 und RAG2 (rekombinante Aktivierungs-Gene) (Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992). Somit ergibt sich eine Vielfalt von mehr als 10^{10} verschiedener TCR (Elhanati et al. 2018; Arstila 1999), die von den CD8⁺ T-Zellen des naiven Repertoires exprimiert werden und es so Pathogenen folglich nahezu unmöglich machen, undetektiert zu bleiben (Zarnitsyna et al. 2013). Allerdings ergeben sich antigenabhängige Unterschiede in der Anzahl CD8⁺ T-Zellen des naiven Repertoires, die durch konservierte Selektionsprozesse innerhalb und außerhalb des Thymus reguliert werden (Alanio et al. 2010; McLaren et al. 2015; Allen et al. 2011). Die Effizienz der induzierten Immunantwort durch individuelle Antigene korreliert dabei mit der Größe des korrespondierenden Pools naiver antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen (Jenkins & Moon 2012).

3.1.4 Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellklone

Die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone ist ein sehr komplexes Verfahren, welches von zahlreichen Faktoren und Parametern beeinflusst wird. So wurden neben *in vitro* generierter DC auch bereits Antigen-beladene PBMC (Riddell & Greenberg 1990; Neller et al. 2014), CD40-aktivierte B-Zellen (Bergwelt-Baildon et al. 2002) und artifizielle APC zur antigenspezifischen Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen verwendet (Suhoski et al. 2007). Das verwendete Protokoll zur DC-Generierung hat zudem auch einen Einfluss auf die spätere Effizienz der antigenspezifischen Aktivierung CD8⁺ T-Zellen (Dauer et al. 2003; Jonuleit et al. 1997; Ho et al. 2006; Wöfl & Greenberg 2014). Des Weiteren können CD8⁺ T-Zellen direkt in den PBMC, nach einer CD8-Positivisolierung oder als aufgereinigte naive CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden. Auch die Zusammensetzung der Zytokine, das verwendete Medium und die Dauer der DC-CD8⁺ T-Zell-Kokultur sind Faktoren, die einen enormen Einfluss auf den späteren Erfolg der CD8⁺ T-Zellklonierung haben. Aus diesem Grund haben Wöfl und Greenberg ein sehr ausführliches Protokoll zur antigenspezifischen Stimulierung naiver CD8⁺ T-Zellen veröffentlicht (Wöfl & Greenberg 2014). Sie legten dabei einen besonderen Fokus auf die Antigenauswahl zur Stimulation CD8⁺ T-Zellen. Ihr Ziel war es robuste antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantworten zu induzieren, vor allen Dingen bei der Verwendung von Tumorantigenen.

3.1.4.1 Tumorantigene

Mit der Entdeckung von MAGEA1 (engl. *melanoma antigen family A 1*) im Jahr 1991 von van der Bruggen et al. ist es erstmals gelungen ein Antigen zu identifizieren, welches tumorspezifisch exprimiert und von CTL erkannt wird (van der Bruggen et al. 1991). Die Anzahl identifizierter Tumorantigene ist seitdem stark gestiegen. Seit 2001 werden die relevantesten Tumorantigene, basierend auf ihrer Tumorspezifität, von mehreren Wissenschaftlern in einer regelmäßig aktualisierten Datenbank aufgeführt (<https://caped.icp.ucl.ac.be/Peptide/list>). Sie können grob in zwei Kategorien eingeordnet werden: die tumorspezifischen und die tumorassoziierten Antigene (Coulie et al. 2014). Die tumorspezifischen Antigene (TSA) werden entweder durch Mutationen hervorgerufen oder zählen zu den Cancer/Testis Antigenen, welche ausschließlich von Tumorzellen oder keimbahn-spezifischen Zellen exprimiert werden. Tumorassoziierte Antigene (TAA) hingegen schließen Differenzierungs-Antigene und Proteine, die in Tumoren lediglich überexprimiert werden, ein. Die Differenzierungs-Antigene sind ausschließlich in Tumorzellen und den Zellen des Ursprungsgewebes exprimiert. Sowohl für TSA als auch TAA ist die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen aus dem naiven Repertoire z. T. sehr gering, was

die verlässliche antigenspezifische Aktivierung CD8⁺ T-Zellen erschwert und somit auch direkten Einfluss auf den Erfolg der Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone hat.

3.1.4.2 Melanomassoziiertes Antigen MART1

Das tumorassoziierte Antigen MART1 (engl. *Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1*) zählt zu der Kategorie der Differenzierungsantigene. Es wird ausschließlich von Melanozyten (Pigmentzellen der Haut) und Melanomzellen (Hautkrebszellen) exprimiert. MART1 ist als Membranprotein u. a. stark in Melanosomen, den Melanin-produzierenden Organellen, angereichert und als frühes Differenzierungsantigen in Melanozyten bei der Pigmentierung der Haut involviert (Hoashi et al. 2005; Kawakami et al. 1997). Es sind ungewöhnlich viele CD8⁺T-Zellen aus dem naiven Repertoire MART1-spezifisch, was auf eine starke positive Selektion MART1-spezifischer naiver CD8⁺ T-Zellen im Thymus zurückzuführen ist (Zippelius et al. 2002). Mit 0,1 % aller naiven CD8⁺ T-Zellen, die einen MART1-spezifischen TCR exprimieren, ist der Anteil 10-100fach höher als bei anderen TAA (Dutoit et al. 2002). Es wurde im Jahr 1994 parallel von zwei Arbeitsgruppen entdeckt, die zeigten, dass MART1 von einer hohen Anzahl an tumorinfiltrierenden T Lymphozyten (TIL) von Melanom-Patienten erkannt wird (Kawakami et al. 1994; Coulie et al. 1994). Hier zeigte sich vor allem das HLA-A2 spezifische Peptid MART1₂₇₋₃₅ (Sequenz AAGIGILTV) als stark immundominant. Durch den Austausch der Aminosäure Alanin zu Leucin kann die Bindeaffinität zum MHCI-Rezeptor noch weiter verstärkt werden (Zippelius et al. 2002). Außerdem haben Romero und Kollegen festgestellt, dass das Dekapeptid im Vergleich zum Nonapeptid eine bessere Effizienz der Antigenerkennung und dadurch bedingt eine bessere MART1-spezifische Zytotoxizität durch T-Zellen ermöglicht (Romero et al. 2002). Folglich wurde für diese Arbeit das Antigen MART1_{26-35A27L} (Sequenz: ELAGIGILTV) ausgewählt. Auch Wölfl und Greenberg haben dieses Peptid verwendet und es als Referenzbedingung in ihrer Publikation über die Stimulation naiver, humaner CD8⁺ T-Zellen mit TAA beschrieben (Wölfl & Greenberg 2014). Dieses veröffentlichte Protokoll hat in dieser Arbeit als Grundlage zur Generierung MART1- bzw. TAA-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone gedient.

3.1.4.3 Melanomassoziiertes Antigen gp100

Parallel zu der Entdeckung von MART1, wurde 1994 auch das Glykoprotein 100 (gp100) als Target von TIL in Melanompatienten identifiziert (Bakker et al. 1994). Wie auch bei MART1 handelt es sich hierbei um ein Differenzierungsantigen, das an der frühen Biogenese von Melanosomen beteiligt ist (Theos et al. 2005). Eins der drei häufigsten vorkommenden gp100 Antigene, das von TIL erkannt wird, ist das HLA-A2 spezifische Peptid gp100₂₀₉₋₂₁₇ (Sequenz: ITDQVPFSV) (Parkhurst et al. 1996). *In silico* Analysen mittels artifizieller neuraler Netzwerke

haben gezeigt, dass Methionin oder Leucin an Position 2 und Valin an Position 9 HLA-A2-spezifischer Antigene mit einer starken Bindeaffinität zum HLA-A2 Molekül korrelieren (Rasmussen et al. 2014; Lundegaard et al. 2008). Folglich bedeutet ein Austausch von Threonin zu Methionin (Sequenz: IMDQVPFSV) an Position 2 des Antigens gp100₂₀₉₋₂₁₇ auch eine stärkere antigeninduzierte T-Zellantwort aufgrund der stärkeren pMHC-I-Bindeaffinität (Parkhurst et al. 1996). Allerdings ist die Anzahl an gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im naiven T-Zell-Repertoire im direkten Vergleich zu MART1 stark reduziert. So zeigten Rizzuto und Kollegen in einem Mausmodell, dass nur knapp eine naive T-Zelle in 1x10⁶ CD8⁺ T-Zellen gp100-spezifisch ist (Rizzuto et al. 2009). Auch in Melanompatienten wurden parallel zu MART1-spezifischen CD8⁺ TIL z. T. keine gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert (Boon et al. 2005; Zippelius et al. 2002). Nichtsdestotrotz zeigen andere Studien die Detektion von gp100-spezifischen CTL, sowohl in PBMC von Melanompatienten als auch von gesunden Spendern, weshalb auch die Generierung gp100-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde (Kawakami et al. 1995; Wölfl & Greenberg 2014).

3.2 Tumorbekämpfung durch Effektorzellen des Immunsystems

3.2.1 Konzept des *Cancer Immunoeediting*s

Die Interaktion von Immunzellen des Wirts mit Tumorzellen wird in drei essentielle Phasen eingeteilt, die auch als die „drei E’s“ bezeichnet werden: *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape* (dt. Eliminierung, Gleichgewicht und Entkommen) (Kim et al. 2007). Dieses Konzept des *Cancer Immunoeediting*s beschreibt eine duale Rolle der Immunzellen in der Entstehung von Tumoren (Vesely et al. 2011). Zum einen verhindern sie die Progression des Tumors und zum anderen fördern sie die Transformation und damit auch den Auswuchs von Tumorzellen (Hagerling et al. 2014). In der ersten Phase wirken die Effektorzellen des Immunsystems zunächst zytotoxisch gegen entartete Zellen, was die Eliminierung von Tumorzellen zur Folge hat. Allerdings induziert dieser stetige Selektionsdruck genetische und epigenetische Veränderung einzelner Tumorzellen und begünstigt somit die Ausbildung einer Resistenz gegen die Immunantwort. In der Phase des Equilibriums entwickelt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Tumorbekämpfung und Tumorwachstum, in der immunsensitive Tumorzellen eliminiert werden und parallel die Entwicklung einer Immunresistenz zum Überleben einzelner Tumorzellen führt. Der weiter anhaltende Selektionsdruck durch Immunzellen führt letztendlich zur dritten und letzten Phase: Dem Entkommen des Tumors. Hier geht die Immunkontrolle hauptsächlich durch Entstehung immunresistenter Tumorzellen und deren Etablierung eines immunsuppressiven Milieus verloren (Mittal et al. 2014).

3.2.2 Zytotoxische Mechanismen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen

Neben CD8⁺ T-Zellen agieren auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zytotoxisch gegen Pathogene, Viren und infizierte Zellen. Sie sind Teil der angeborenen Immunität und exprimieren im Vergleich zu T-Zellen, deren TCR hoch variabel und spezifisch für diverse Antigene sind, keimbahnkodierte aktivierende und inhibierende Rezeptoren (Lanier 1998) (Abbildung 2A). Überwiegen bei Ausbildung einer IS die aktivierenden Signale, wird die NK-Zelle zytotoxisch aktiv, während bei überwiegend inhibierenden Signalen keine NK-vermittelten zytotoxischen Mechanismen induziert werden. Die inhibierenden Rezeptoren dienen den NK-Zellen gesunde, körpereigene Zellen zu erkennen und diese somit vor dem NK-Zell-induzierten Zelltod zu schützen. Vor allem die Detektion von MHC I Molekülen, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, verhilft NK-Zellen dabei körpereigene von körperfremden oder gestressten Zellen zu unterscheiden, was auch als *missing self recognition* (dt. fehlende Selbst-Erkennung) bekannt ist (Moretta et al. 2001). Die Herunterregulation von MHC I Molekülen ist ein bekannter Escape-Mechanismus, der von malignen und infizierten Zellen als Schutz vor der CD8⁺-induzierten Immunantwort genutzt wird (Garrido et al. 1993). Somit bleiben die infizierten bzw. entarteten Zellen vor der adaptiven Immunantwort verschont, aktivieren aber gleichzeitig die NK-vermittelte Zytotoxizität (Kärre et al. 1986). Sowohl NK als auch CD8⁺T-Zellen greifen bei der Bekämpfung entarteter Zellen auf gleiche zytotoxische Mechanismen zurück (Topham & Hewitt 2009). Das Abtöten der Zielzelle erfolgt dabei entweder Perforin-abhängig mittels Sezernierung zytotoxischer Vesikel oder über Rezeptor-vermittelte Signalwege. Für beide Tötungsmechanismen ist die Ausbildung einer IS zwischen Ziel- und Effektorzelle unerlässlich (Abbildung 2).

Einleitung

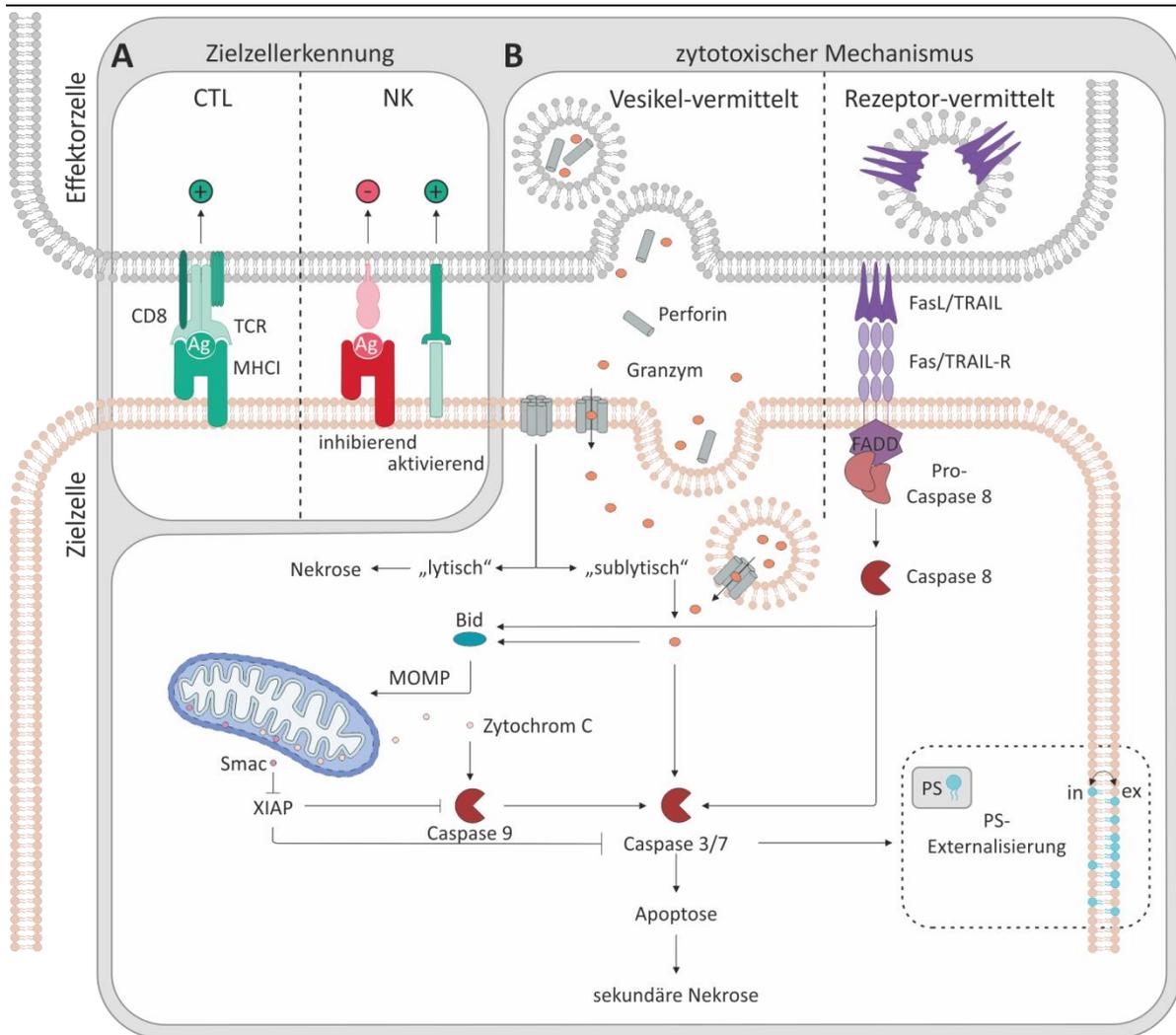


Abbildung 2: Trotz unterschiedlicher Zielzellerkennung verwenden CTL und NK-Zellen gleiche zytotoxische Mechanismen. (A) Die Zielzellerkennung durch CTL erfolgt antigenspezifisch über die Bindung des TCR an den pMHC I der Zielzelle. Die Erkennung durch NK-Zellen wird hingegen über die Bindung keimbahnkodierter aktivierender und inhibierender Rezeptoren vermittelt. (B) Beide Effektorzellen nutzen zur Eliminierung der Zielzelle gleiche Mechanismen, die entweder Vesikel- (links) oder Rezeptor-vermittelt (rechts) stattfinden. Bei der Vesikel-vermittelten Signalkaskade wird der Inhalt lytischer Granula (hauptsächlich Perforin und Granzyme) in den synaptischen Spalt freigesetzt. Bei „sublytischen“ Konzentrationen von Perforin werden Perforinporen in der PM oder (nach Endozytose) in den Endosomen gebildet, durch die Granzyme in die Zielzelle gelangen können, um den apoptotischen Zelltod zu induzieren. Liegt die Konzentration des sezernierten Perforins in einem lytischen Bereich, geht die Membranintegrität der Zielzelle verloren und der nekrotische Zelltod tritt ein (B, links). Die Rezeptor-vermittelte Apoptose wird über die Bindung der Todesrezeptoren Fas oder TRAIL-R der Zielzelle mit ihren korrespondierenden Liganden FasL oder TRAIL der Effektorzelle induziert (B, rechts). Unabhängig des verwendeten Mechanismus hat die Induktion der Apoptose charakteristische Merkmale wie die Caspasenaktivierung, die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) sowie die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) an der PM zur Folge. Bereits apoptotische Zellen verlieren nach einem geräumigen Zeitraum die PM-Integrität, was auch als sekundäre Nekrose bezeichnet wird.

3.2.2.1 Tod der Zielzelle über die Sezernierung lytischer Vesikel

Im Falle des Perforin-abhängigen Signalwegs werden die zytotoxischen Vesikel entlang des MTOC (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) zur IS transportiert, wo sie letztendlich mittels sogenannter SNARE (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein receptor*) Proteine mit der Plasmamembran (PM) fusionieren und so ihren Inhalt in den synaptischen Spalt freisetzen (Orange 2008; de Saint Basile et al. 2010) (Abbildung 2B, links). Hauptbestandteile dieser Vesikel sind die zytotoxischen Proteine Perforin und mehrere Granzyme (Lettau et al. 2007). Perforin polymerisiert und bildet innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten Kalzium-abhängig Poren in der PM der Zielzelle (Voskoboinik et al. 2005), durch die Granzyme in das Zytoplasma gelangen (Pardo et al. 2002; Lopez et al. 2013). Alternativ wird die Aufnahme von Granzymen über Endozytose diskutiert. Dabei induzieren Perforinporen in der PM der Zielzelle einen Kalzium-Influx, der die Reparaturmechanismen der Zielzellen aktiviert und so zu einer Co-Endozytose von Granzymen und Perforin und letztendlich der Perforin-vermittelten Freisetzung der Granzyme aus den Endosomen führt (Pipkin & Lieberman 2007; Thiery et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass Granzyme über die Perforinporen an der PM innerhalb von 80 Sekunden in die Zielzelle gelangen (Lopez et al. 2013), während die Granzymfreisetzung über Endozytose mit ungefähr 15 Minuten langsamer abläuft (Thiery et al. 2011). Aus diesem Grund werden Granzyme vermutlich hauptsächlich direkt über die Perforinporen an der PM in die Zielzelle eintreten (Prager & Watzl 2019). Bei Granzymen handelt es sich um Serin-Proteasen, die über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle induzieren. Das am besten charakterisierte Granzym ist Granzym B, das direkt die Pro-Caspase 3 schneidet und so zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 führt (Atkinson et al. 1998; Andrade et al. 1998). Parallel führt die Granzym B-vermittelte Spaltung des Bid Proteins zu der Aktivierung der beiden proapoptotischen Proteine Bax und Bak, die die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (engl. *mitochondria outer membrane permeabilization* (MOMP)) induzieren (Green & Llambi 2015). Dabei werden Apoptose-induzierende Proteine wie Cytochrom C freigesetzt, was wiederum die Effektor-Caspase 3 schneidet und aktiviert (Luo et al. 1998). Letztendlich werden durch die Aktivierung der Effektor-Caspasen die charakteristischen Anzeichen der Apoptose wie DNA-Fragmentierung, Blasenbildung der Membran, die Umverteilung der Phospholipiden an der Plasmamembran und das Schrumpfen der Zelle verursacht (Woo et al. 1998). Ob die Zelle allerdings einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod erleidet, ist vermutlich hauptsächlich von der sezernierten Perforin-Konzentration abhängig. Bei „sublytischen“ Perforin-Konzentrationen werden von der Zielzelle Reparaturmechanismen aktiviert, sodass die Löcher der Membran geschlossen und die Apoptose mittels Granzyme induziert werden kann (Lopez et al. 2013) (Abbildung 2). Ist die

sezernierte Konzentration allerdings höher und damit in einem „lytischen“ Bereich, schlagen die Reparaturmechanismen fehl, die Zellmembranintegrität geht verloren und eine Granzym-unabhängige Nekrose tritt ein (Keefe et al. 2005). Bei der Nekrose schwillt die Zielzelle samt Organellen an und platzt schließlich auf, sodass die intrazellulären Komponenten unkontrolliert freigesetzt werden (Kroemer et al. 2009). Es wurden auch bereits gemischte Phänotypen der beiden Arten des Zelltodes, also eine Mischung aus Apoptose und Nekrose, beobachtet. Hier wird die Apoptose, über die Aktivität der Granzyme, und die Nekrose, über die Perforation der PM, nahezu parallel eingeleitet (Backes et al. 2018).

3.2.2.2 Rezeptor-vermittelter Tod der Zielzelle

Neben dem Perforin-vermittelten Zelltod kann die Apoptose der Zielzelle auch über Rezeptorbindung durch CTL und NK-Zellen eingeleitet werden (Abbildung 2b, rechts). Die Effektorzellen CTL und NK exprimieren TNF (Tumor Nekrose Faktor) Liganden, zu denen der Fas Ligand (FasL) und TRAIL zählen. Nach ihrer Synthese im ER gelangen sie über den sekretorischen Signalweg an die PM der Effektorzelle (Bossi & Griffiths 1999) und binden dort ihre korrespondierenden Rezeptoren an der Zielzellmembran. Die gebundenen Rezeptoren initiieren anschließend über Konformationsänderungen eine Signalkaskade: Das Adapterprotein FADD (engl. *Fas-associated death domain protein*) wird rekrutiert, welches wiederum im *death-inducing signaling complex* (DISC, dt. Tod-induzierender Signal-Komplex) die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 induziert (Green & Llambi 2015). Caspase 8 schneidet daraufhin direkt die Effektor-Caspasen 3 und 7, die letztendlich zum apoptotischen Zelltod der Zielzelle führen (Woo et al. 1998). Allerdings gibt es Zellen (Typ II Zellen), deren Effektor-Caspasen über das Protein XIAP blockiert werden (Jost et al. 2009). Hier wird, ähnlich wie bei der Granzym B-vermittelten Apoptose, das Protein BID durch Caspase 8 geschnitten, was zur MOMP führt (Li et al. 1998). Das dabei freigesetzte Zytocrom C aktiviert die Initiator-Caspase 9, während die Freisetzung von Smac die Degradierung von XIAP und somit die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 induziert. Bei der Rezeptor-abhängigen Induktion der Apoptose handelt es sich um einen vergleichsweise langsamen Prozess, der erst 1-2 h später als die Vesikel-vermittelte Signalkaskade zum Tod der Zielzelle führt (Hassin et al. 2011; Li et al. 2014).

3.2.3 Detektion der CTL- und NK-vermittelten Zytotoxizität

Im Rahmen dieser Dissertation wird sowohl die Zytotoxizität antigenspezifischer CD8⁺T-Zellklone als auch die der primären, humanen NK-Zellen untersucht. Für die generierten Klone CTL_{MART1} und CTL_{gp100} werden die HLA-A2⁺ T2- und SK-Mel5 Zelllinien als Zielzellen verwendet. Aufgrund einer TAP-Defizienz findet in T2 Zellen keine Präsentation von Antigenen

über MHC-I-Rezeptoren an der Zellmembran statt (Salter & Cresswell 1986). So werden MHC-I Moleküle ohne gebundenes Antigen über den sekretorischen Signalweg an die Zellmembran transportiert, wo sie letztendlich mit exogenen HLA-A2-spezifischen Peptiden, wie MART1₂₆₋₃₅ und gp100₂₀₉₋₂₁₇, beladen werden können (Chang et al. 2011). Bei SK-Mel5 Zellen handelt es sich hingegen um Melanomzellen, die endogen bereits die Proteine MART1 und gp100 exprimieren und somit die Peptide MART1₂₆₋₃₅ und gp100₂₀₉₋₂₁₇ über ihre HLA-A2 Rezeptoren präsentieren (Du et al. 2003).

Jurkat E6-1 und K562 sind etablierte Zelllinien zur Untersuchung der NK-vermittelten Zytotoxizität. Die Fas-FasR-vermittelte Apoptose ist in K562 Zellen durch ein Fehlen der CD95 Expression (FasR) inhibiert, was zu einem hauptsächlich Perforin-vermittelten Zelltod durch NK-Zellen führt (Munker et al. 1997; West et al. 1977). Jurkat E6-1 Zellen können hingegen sowohl über die Sezernierung lytischer Vesikel, als auch über Bindung von Todesrezeptoren sterben (Backes et al. 2018). Zudem wurde bereits gezeigt, dass NK-Zellen auch in der Lage sind primäre Melanomzellen sowie Melanomzelllinien zu töten (Morgado et al. 2011). Für eine effiziente Lyse von Melanomzellen ist allerdings eine vorherige Stimulation der NK-Zellen mit dem Zytokin IL-2 unerlässlich (Carrega et al. 2009; Solana et al. 2007).

Die CTL- bzw. NK-vermittelte Zytotoxizität wird üblicherweise innerhalb eines Zeitraums von 4 h in populationsbasierten Assays ermittelt. Zu den renommierten Standardmethoden zählen hierbei der Cr⁵¹- (Brunner et al. 1968) oder LDH-release Assay (Weidmann et al. 1995), die die Bestimmung der Anzahl lysierter Zellen zum Endzeitpunkt erlauben. Allerdings liefert die Kinetik der Killingprozesse wichtige Informationen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit der Real-time Killing Assay verwendet wurde (Kummerow et al. 2014). Hierbei handelt es sich um einen fluoreszenzbasierten Assay, der die kinetische Erfassung der Zytotoxizität durch CTL und NK-Zellen in einem Plattenmessgerät auf Populationsebene ermöglicht.

Der Real-time Killing Assay ist ein hilfreiches Werkzeug, um das zytotoxische Potential einer gesamten Population schnell und reproduzierbar bestimmen zu können. Allerdings ist hier keine Analyse des Verhaltens individueller Zellen möglich. Außerdem wird der Zelltod bei Populationsassays wie dem Real-time Killing, dem Cr⁵¹- und dem LDH-release Assay erst bei Verlust der Membranintegrität detektiert. Somit können ausschließlich Nekrosen und sekundäre Nekrosen (Verlust der Membranintegrität bereits apoptotischer Zellen) erfasst werden. Aus diesem Grund soll der Effektor-induzierte Zelltod auch mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Messungen untersucht werden. Die Apoptose ist durch einen klar definierten Ablauf

charakteristischer Vorgänge gekennzeichnet, sodass diverse Marker zur Detektion der Apoptose etabliert sind (Vorobjev & Barteneva 2017). So ist die Aktivierung von Initiator- und später Effektor-Caspasen ein eindeutiges Merkmal für die Induktion der Apoptose. Zur Detektion der Caspasenaktivierung kommen u. a. Caspase-sensitiven Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-basierte Konstrukte zum Einsatz. Dabei sind zwei Fluorophore, das Donor- und das Akzeptorfluorophor, über eine Caspase Erkennungssequenz miteinander gekoppelt. Das Donor-Fluorophor wird angeregt und emittiert Licht im Anregungsbereich des Akzeptor-Fluorophors. Durch eine räumliche Nähe von <10nm kann das emittierte Licht von dem Donor- auf das Akzeptorfluorophor übertragen werden, sodass eine lebende Zelle die Signale beider Fluorophore emittiert. Wird durch die Induktion der Apoptose jedoch die korrespondierende Caspase aktiviert, führt das Schneiden der Erkennungssequenz zu einer räumlichen Trennung der beiden Fluorophore und damit zum Verlust des FRET- und zum Anstieg des Donorfluorophor-Signals (Wallace & Atzberger 2017; Förster 1948; Shcherbo et al. 2009). Auch der Verlust des inneren Membranpotentials durch MOMP kann mit Hilfe potentialabhängiger Farbstoffe nachgewiesen werden (Pradelli et al. 2010; Green 2005; Vorobjev & Barteneva 2017). Ein weiteres Kennzeichen der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserinen (PS) von der inneren zur äußeren Seite der PM, sodass apoptotische Zellen von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden können (Fadok et al. 1992). Annexin V bindet PS und dient seit Jahren als Standardmethode, um die Induktion der Apoptose nachzuweisen (Vermes et al. 1995).

3.3 CD8⁺ T- und NK-Zell-basierte Immuntherapie im Melanom

Das maligne Melanom ist ein bösartiger solider Tumor, der durch die Entartung von Melanozyten entsteht. Die Anzahl an jährlichen Neuerkrankungen ist weltweit im Vergleich zu allen anderen soliden Tumoren am schnellsten gestiegen (Leonardi et al. 2018). Außerdem sind vom malignen Melanom hauptsächlich Menschen jungen bis mittleren Alters betroffen (mittleres Alter bei Erstdiagnose 57 Jahre) (Ali et al. 2013). Die Ursachen für diese Erkrankung können grob in zwei Gruppen, die Umwelt-Faktoren (UV-Strahlung) und die genetischen Vorbelastung, eingeteilt werden (Gandini et al. 2005; Ali et al. 2013). Das maligne Melanom ist Gegenstand intensiver Forschung, dessen Bekämpfung vor allem dank der Immuntherapie in den letzten Jahren positiv beeinflusst wurde.

Durch die Entdeckung der melanomassoziierten Antigene MART1 und gp100, wurde die Entwicklung sogenannter adoptiver Therapie-Ansätze zur Manipulation des eigenen Immunsystems mit dem Ziel der malignen Melanombekämpfung erst ermöglicht (Coulie et al. 1994; Kawakami et al. 1994; Bakker et al. 1994). Bei dieser Form der Immuntherapie werden

Immunzellen des Patienten entnommen, *ex vivo* manipuliert und anschließend zur Tumorbekämpfung *in vivo* verabreicht. In diversen Studien wurde bereits gezeigt, dass sich die MART1/gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei *in vivo* Applikation wochenlang am Tumorgewebe anreichern und letztendlich zu einer Eliminierung von Melanomzellen führen können (Yee et al. 2002; Meidenbauer et al. 2002; Peterson et al. 2003). Allerdings wurde im Falle der CD8⁺-T-Zell basierten Therapie nach anfänglicher Regression oft ein Rückfall des Tumors detektiert, was durch eine defekte Funktionalität der Melanom-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erklärt werden kann und zudem eine zunehmende Resistenz des Tumors gegenüber der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität vermuten lässt (Rosenberg et al. 2011; Harlin et al. 2006; Zippelius et al. 2004). Bei soliden Tumoren wie dem Melanom spielt neben der „Fitness“ der applizierten Zellen sowie der Wahl der Antigene auch das immunsupprimierende Mikromilieu eine entscheidende Rolle, das den Erfolg adoptiver Immuntherapien stark beeinflusst (Kunert et al. 2013). Aus diesem Grund hat sich die adoptive Immuntherapie vor allem in der Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen etabliert, da hier keine Ausbildung eines immunsupprimierenden Mikromilieus stattfindet. Jedoch wird auch die Bekämpfung solider Tumore wie dem Melanom mittels adoptiver Immuntherapieansätze stets weiterentwickelt (Johnson & June 2017). Eine Aufschlüsselung der Escape-Mechanismen solider Tumore vor der Immunantwort ist somit von besonderer Wichtigkeit, da sie langfristig zum Erfolg der adoptiven Therapieansätze solider Tumore beitragen wird.

Neben T-Zell-basierten adoptiven Therapien sind auch NK-Zell-basierte adoptive Therapien für die Bekämpfung des Melanoms von besonderem Interesse (Boon et al. 2005; Tarazona et al. 2016). Die Anzahl klinischer Studien über den Einsatz von NK-Zellen in der adoptiven Melanom-Therapie sind jedoch begrenzt und bisher von mäßigem Erfolg (Besser et al. 2013).

Von herausragender Bedeutung sind Immuntherapien mittels Ipilimumab (anti-CTLA-4) und Nivolumab (anti-PD-1) als Checkpoint-Inhibitoren gegen CTLA-4 bzw. PD-1 zur Bekämpfung des malignen Melanoms hervorzuheben, für deren Entdeckung James P. Morrison und Tasuku Honjo im Jahr 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden (Krummel & Allison 1995; Ishida et al. 1992). CTLA-4 konkurriert mit dem Kostimulationsmolekül CD28 um die Bindung mit CD80/86 auf der Oberfläche von APC und induziert inhibitorische Signale in der T-Zellaktivierung. PD-1 (exprimiert auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen) bindet an seinen Liganden PD-L1, welcher vor allen Dingen von Tumorzellen exprimiert wird, was wiederum zur Inhibierung aktivierter T-Zellen führt (Topalian et al. 2015; Houot et al. 2015). Sowohl der anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab als auch der anti-PD-1 Antikörper Nivolumab sind bereits seit

2015 bzw. 2017 von der Food Drug Administration (FDA) zum Einsatz in der Melanomtherapie zugelassen. Lirilumab wirkt hingegen auf der Seite der NK-Zellen und blockt die Interaktion der inhibierenden NK-Rezeptoren KIR2DL-1,-2,-3 mit deren Liganden und fördert so die NK-vermittelte Immunantwort (Benson et al. 2011). Bereits einige klinische Studien befassen sich mit der Kombinationstherapie aus Ipilimumab/Nivolumab und Lirilumab in soliden Tumoren, was somit die Optimierung der parallelen T- und NK-Zell-Immunantwort zum Ziel hat (NCT01750580, NCT01714739, NCT03203876, NCT02599649, NCT01592370).

Die aktuelle Entwicklung der Melanomforschung offenbart das Potential immuntherapeutischer Ansätze (Eggermont et al. 2014). Eine Therapie, die sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunantwort induziert, wäre ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung des malignen Melanoms und anderer solider Tumore (Eggermont & Robert 2018; Rosenberg & Huang 2018). So wird sich womöglich in den kommenden Jahren eine Kombination aus unterschiedlichen Immuntherapien zusammen mit der bisherigen Standardtherapie, wie Chemotherapie, Radiotherapie und Resektion des Tumors, als potentes Werkzeug in der Tumorthherapie etablieren (Wang et al. 2018).

3.4 Zielsetzung

CD8⁺ T-Zellen erkennen und eliminieren *in vivo* Krebszellen antigenspezifisch über Ausbildung einer IS. Zur *in vitro* Analyse der zytotoxischen Funktion CD8⁺ T-Zellen werden aufgrund der einfachen Handhabung oftmals CD8⁺ T-Zellen antigenunspezifisch stimuliert, was die Aussagekraft der daraus gewonnenen Ergebnisse limitiert. Aus diesem Grund war das erste Ziel dieser Dissertation, die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone in der AG Hoth zu etablieren.

Dazu sollen zunächst für das immundominante Antigen des Zytomegalievirus (CMV) pp65 spezifische CD8⁺ T-Zellklone (CTL_{pp65}) generiert werden. Darauf basierend soll schließlich die Generierung von CD8⁺ T-Zellklonen spezifisch für die Melanomassoziierten Antigene MART1 und gp100 erfolgen (CTL_{MART1} bzw. CTL_{gp100}). Damit wäre ein System etabliert, das neben der antigenspezifischen Erkennung Peptid-beladener T2 Zellen auch die Erkennung und Lyse von Melanomzelllinien mit endogener Antigenpräsentation erlaubt.

Die Melanomzelllinien interagieren neben CTL_{MART1} und CTL_{gp100} auch mit den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, den NK-Zellen, über die Bindung keimbahnkodierter aktivierender und inhibierender Rezeptoren. So ist es nach der Generierung Melanom-spezifischer CD8⁺ T-

Zellklone möglich, den Zelltod derselben Zelllinie durch zwei unterschiedliche Effektorzelltypen des Immunsystems, den CTL und NK-Zellen, zu induzieren. Auch *in vivo* arbeiten die beiden Effektorzelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems gemeinsam. Findet eine Erstinfektion durch Krankheitserreger statt, sind NK-Zellen sofort einsatzbereit, während die CD8⁺ T-Zellen zunächst antigenspezifisch aktiviert und expandiert werden müssen. Sie sind dann für die letztendliche Eliminierung des Erregers zuständig, dessen Ausbreitung von NK-Zellen bis zum Einsatz der CD8⁺ T-Zellen weitestgehend verhindert wurde. So ist ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit die wechselseitige Abhängigkeit der beiden Effektorzelltypen in einem *in vitro* Kokultur-Modell auf die Effizienz der Lyse von CTL-/NK-kokultivierten Melanomzellen zu untersuchen.

Sowohl CTL als auch NK-Zellen induzieren in ihren Zielzellen unterschiedliche Arten des Zelltodes, die Apoptose und die Nekrose. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod beschrieben und zeichnet sich u. a. durch die Aktivierung sogenannter Caspasen und der Externalisierung von Phosphatidylserinen aus. Im Rahmen dieser Arbeit soll der FRET-basierte Sensor pCasper3-GR, Indikator für die Effektor-Caspase 3-Aktivierung, mit dem PS-Sensor Annexin V verglichen werden. Ein besonderer Fokus wird dabei auf die Anwendbarkeit der beiden Sensoren zur Detektion der CTL- bzw. NK-Zell-vermittelten Apoptose bzw. Nekrose gelegt.

Durch die Analyse der NK/CTL-Interdependenz beim Killing von Melanomzellen, soll im Rahmen dieser Arbeit ein Kokultur-Modell etabliert werden, das es ermöglicht, zukünftig einzelne Parameter aufzuschlüsseln, die auch für tumorbiologische Fragestellungen *in vivo* von Relevanz sind. Außerdem trägt der direkte Vergleich zweier Apoptosemarker zu einer genaueren Charakterisierung des Effektorzell-induzierten Zelltodes auf Einzelzellebene und zu einem besseren Verständnis der Funktion zytotoxischer Immunzellen bei.

4 Material

4.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper (für Western Blots) unter Angabe von Spezifität, Typ, Hersteller, Bestellnummer und Verdünnung

Antikörper	Spezifität	Wirt	Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung
anti-MART1/Melan A	monoklonal	Maus	Dako	M7196	1:500
anti-GAPDH	polyklonal	Kaninchen	Cell signaling	2118	1:2000
anti- γ -tubulin	polyklonal	Kaninchen	Sigma Aldrich	T5192	1:1000

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper (für Western Blots) unter Angabe von Hersteller, Bestellnummer und eingesetzte Verdünnung

Antikörper	Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung
anti-Maus	GE Healthcare Amersham	NA931	1:5000
anti-Kaninchen	GE Healthcare Amersham	NA9340	1:25000

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Stimulation unter Angabe von gekoppeltem Fluorophor, Hersteller und Bestellnummer

Antigen	Fluorophor	Klon	Hersteller	Bestellnummer
anti-pp65 Dextramer (NLVPMVATV)	PE		Immudex	WB2132-PE
anti-MART1/Melan A Dextramer (ELAGIGILTV)	APC		Immudex	WB2162-APC
anti-gp100 Dextramer (IMDQVPFSV)	APC		Immudex	WB2156-APC
A*0201 Dextramer Negativ Kontrolle	APC		Immudex	WB2666-APC
anti-CD8a	eFluor® 450	SK1	eBioscience	48-0087-42

Material

anti-HLA-A2	FITC	BB7.2	Biolegend	343303
anti-HLA-A,B,C	AlexaFluor® 647	W6/32	Biolegend	311414
anti-CD3	PerCP	SK7	Biolegend	344813
anti-CD3 (Ultra-LEAF)	/	OKT3	Biolegend	317325
anti-CD8	FITC	SK1	Biolegend	344703
anti-CD45RO	PE-Cy7	UCHL1	Biolegend	304230
anti-CCR7	AlexaFluor®647	G043H7	Biolegend	353218
anti-CD14	AlexaFluor®488	HCD14	Biolegend	325610
anti-CD83	PE	HB15e	Biolegend	305307
anti-CD86	Pacific Blue™	IT2.2	Biolegend	305417
anti-Perforin	FITC	dG9	Biolegend	308104
Annexin V	AlexaFluor®488		Thermo Fisher Scientific	A13201
Annexin V	Pacific Blue™		Thermo Fisher Scientific	A35122

4.2 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
APS	Sigma Aldrich	248614-56
Benzonase	Sigma Aldrich	E1014-5KU
BSA	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
CaCl ₂	J.T. Baker	0504
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
cOmplete Proteinaseinhibitor	Merck	05892791001
DMSO	Sigma Aldrich	D4540-100ML
EDTA	Sigma Aldrich	E9884

Material

ELAGIGILTV (MART1 Peptid)	JPT	
Ethanol	Sigma Aldrich	32205
FCS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Fibronectin	Sigma Aldrich	F1141
GM-CSF	Gentaur	04-RHUGM-CSF-300MCG
HEPES	Sigma Aldrich	H-7523
Humanes Serum AB	Pan Biotech	P40-3001
IFN γ	Peprotech	300-02
IL-15 (human)	Miltenyi Biotec	130-095-760
IL-2 (human)	Thermo Fisher Scientific	PHC0023
IL-21 (human)	Peprotech	200-21
IL-4 (human)	Peprotech	200-04
IL-7 (human)	Peprotech	200-07
IMDQVPFSV (gp100 Peptid)	JPT	
Isopropanol	Sigma Aldrich	19516
KCl	Merck	104933
KHCO ₃	Sigma Aldrich	17205
Methanol	Fisher Chemical	M3950
NaCl	Merck	106404
Natriumazid	Sigma Aldrich	S8032
NLVPMVATV (pp65 Peptid)	JPT	
Paraformaldehyd	Polysciences	00380-250
PBS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333-100ML
Precision Plus Protein Dualcolor Standard	Bio-Rad	161-0325
Saponin	Sigma Aldrich	S7900-25G

Material

SDS	Acrosorganics	327315000
TEMED	Sigma Aldrich	T9281
TNF- α	CellGenix	1406-050
Triton X-100	Eurobio	18774
Trypan Blau	Sigma Aldrich	T8154
Trypsin EDTA liquid	Life Technologies	10780384
Tween20	Sigma Aldrich	P1379
β -Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500

4.3 Lösungen

Lösungen für durchflusszytometrische Analysen

Färbelösung

0,5 % BSA
in PBS, pH 7,4

Permeabilisierungslösung

0,5 % BSA
0,1 % Saponin
in PBS, pH 7,4

Annexin V Puffer 10x

0,1 M HEPES
1,4 M NaCl
25 mM CaCl₂
pH 7,4

Blottingpuffer

20 % Methanol
1 % SDS
250 mM Tris-HCl
1,92 M Glycin
pH 8,3

Erythrozyten Lysepuffer

155 mM NH₄Cl
9,99 mM KHCO₃
130 µM EDTA
pH 7,3

HEPES-Puffer

10 mM HEPES
150 mM NaCl
pH 7,4

Lämmli-puffer 5x

125 mM Tris pH 6,8
2,5 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
60 % Glycerin
25 % β-Mercaptoethanol

Primärantikörperlösungen für Western Blot

Antikörper in entsprechender Verdünnung

1 % BSA
0,02 % Natriumazid
in PBS

RIPA-Lysepuffer

10 mM Tris pH 7.4
1 % Triton X-100
0,5 % NP40
150 mM NaCl
in PBS; pH 7,4

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl
0,4 % SDS
in dH₂O; pH 6,8

Sekundärantikörperlösungen für Westernblot

Antikörper in entsprechender Verdünnung

5 % Magermilch in TBST

SDS-Elektrophoresepuffer, 10x

250 mM Tris-HCl
1,92 M Glycin
0,1 % Bromphenolblau
1 % SDS
in dH₂O, pH 8.3

Material

TBS, 10x

5 mM Tris-HCl
 1,5 mM NaCl
 in dH₂O; pH7.5

TBST 1x

0,1 % Tween
 10 % TBS, 10x
 in dH₂O

Trenngelpuffer

1,6 M Tris-HCl
 0,4 % SDS
 in dH₂O; pH 8,8

2 % TU-Medium

4 Teile MCDB153- Basalmedium
 1 Teil L15 Leibovitz-Medium
 2 % FCS
 1,68 mM CaCl₂
 2,5 ng/ml Insulin
 steril filtriert

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturlösungen und-medien unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Medium	Hersteller	Bestellnummer
AIM-V Medium	Thermo Fisher Scientific	12055-083
CellGro GMP DC Medium	CellGenix	0020801-0500
Dulbecco's PBS	Thermo Fisher Scientific	14190-094
Hank's BSS	PAA Laboratories	H15-009
Lymphozyten Separationsmedium 1077	PromoCell	C-44010
MEM	Thermo Fisher Scientific	31095-029
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific	21875-034

4.4 Laborgeräte

Verwendete Messplatz-Komponenten

Tabelle 6: Verwendete Filter im Cell Observer und ImageXpress Micro XLS System unter Angabe des Herstellers und Wellenlängenspezifikation des Emissions- und Excitationsfilters

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Filter Set 38 HE	Zeiss	Ex 470/40, Em 525/50
Filter Set DAPI-5060B	Semrock	Ex 377/50, Em 447/60
Filter Set GFP-3035B	Semrock	Ex 472/30, Em 520/35
Filter Set Cy3-4040B	Semrock	Ex 531/40, Em 593/40
Filter Set FRET	Semrock	Ex 472/30, Em 641/75

Verwendete Laborgeräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
Cell Observer Primo Vert	Zeiss
ChemiDoc TM XRS	Bio-Rad
CO ₂ Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific
CO ₂ Inkubator Heraeus	Thermo Fisher Scientific
FACSVerse™	BD Biosciences
Heizblock	Bioer
ImageXpress Micro XLS System	Molecular Devices
Infinite M200 Pro	Tecan
Magnetrührer IKA RCT basic	Sigma Aldrich
Nucleofector II	Lonza
perfectION Combination Calcium Electrode	Mettler Toledo

Material

pH Elektrode accumet Basic	Thermo Fisher Scientific
Pipetboy acy	Integra Biosciences
GENios Pro	Tecan
Rapidpoint 405	Siemens
Sterilwerkbank	HERAsafe
Stromquelle Power Pac HC	Bio-Rad
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortex Thriller	Peqlab
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Zellzähler Moxi Z	Orflo
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

4.5 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Kit	Hersteller	Bestellnummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Clarity Western ECL	Bio-Rad	1705060
IFN γ Secretion Assay - Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotec	130-054-201
Naive CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec	130-093-244
NHEM Neo Kit	Lonza	VPD-1003

Material

NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec	130-092-657
Dynabeads Untouched Human	Thermo Fisher Scientific	11349D
NK cells Kit		

4.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendetes Verbrauchsmaterial unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
Immobion-P PVDF Membran	Merck	IPVH 00010
LD Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-901
MACS SmartStrainers, 30 µM Miltenyi	Miltenyi Biotec	130-098-458
MS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-201
Whatman Filterpapier	Whatman	512-3939
µDish, 35mm high	Ibidi	81156
Falcon® 96-Well Flachboden Zellkultur-Platte (Black/Clear Bottom)	VWR	353219
96-Well Rundwellbodenplatte	Sarstedt	82.1582

Alltägliche Verbrauchsmaterialien, wie u.a. serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und 6 bis 96-Well Zellkulturplatten wurden, soweit nicht anders angegeben, von VWR, BD, PEQLAB oder Sarstedt bezogen.

4.7 Verwendete Zellen

4.7.1 T2 Zellen

Diese Zelllinie ist eine Abwandlung der T1-Zelllinie. Hierbei handelt es sich um Hybride aus einer T- und B-Zelllinie. T2 Zellen sind HLA-A2-positiv und TAP-defizient. Dieser Defekt führt dazu, dass Peptide nicht über das ER an die Zelloberfläche transportiert werden können und somit ein Großteil der MHCI-Moleküle auf der Zelloberfläche keine zelleigenen Peptide präsentiert, jedoch mit exogenen HLA-A2 spezifischen Peptiden beladen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die T2-Zellen als Zielzellen für HLA-A2⁺ antigenspezifische CD8⁺ T-Zellklone verwendet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.7.2 K562/K562 pCasper Zellen

Die K562-Zelllinie (ATCC® CCL-243™) stammt von einer CML (chronische myeloische Leukämie) Patientin und ist als Zielzelllinie zur Untersuchung der Zytotoxizität von NK-Zellen weitverbreitet (West et al. 1977). Die K562 pCasper Zellen wurden mit dem Plasmid Casper3-GR der Firma Evrogen von Gertrud Schwär transient transfiziert, mittels Antibiotika-Selektion (G418) selektioniert und anschließend vereinzelt. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in RPMI versetzt mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.7.3 Jurkat E6-1/ Jurkat E6-1 pCasper Zellen

Die Jurkat E6-1 Zelllinie (ATCC® TIB-152™) wurde aus dem peripheren Blut eines 14 jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) generiert. Sie ist als Zielzelllinie für die Bestimmung der NK-vermittelten Zytotoxizität geeignet und wurde im Rahmen dieser Arbeit zu diesem Zweck eingesetzt. Die Jurkat E6-1 pCasper Zellen wurden mit dem Plasmid Casper3-GR der Firma Evrogen von Christian Backes transient transfiziert, selektioniert (G418) und anschließend vereinzelt. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in RPMI versetzt mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.7.4 Epstein-Barr Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCL)

Bei den EBV-LCL handelt es sich um immortalisierte humane B Zellen. Dafür werden PBMC mit dem Epstein-Barr Virus infiziert, was eine Transformation der darin enthaltenen B-Zellen zu einer lymphoblastoiden Zelllinie induziert (Lam & Crawford 1995). Die EBV-LCL Linien F18, S22, GS7 und GS17 wurden von Dr. Frank Neumann (Klinik für Innere Medizin I, Uniklinikum Homburg) zur Verfügung gestellt und dienen im Rahmen dieser Arbeit bei der Expansion CD8⁺T Zellklone als Fütterzellen. Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte in RPMI versetzt mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.7.5 SK-Mel5

SK-Mel5 ist eine kommerziell erhältliche humane Melanom Zelllinie (ATCC® HTB-70™). Sie stammt von einer 24 jährigen Frau kaukasischer Herkunft, deren Melanom bereits Metastasen in einem unter der Achsel befindlichen Lymphknoten gebildet hatte. SK-Mel5 Zellen wurden in MEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.7.6 WM3734

Die WM3734 Melanom-Zelllinie wurde im Wistar Institut, Philadelphia, PA USA unter Leitung von Prof. Meenhard Herlyn generiert und ist nicht kommerziell erhältlich. Diese Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer Kooperation mit Prof. Dr. Ivan Bogeski (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Göttingen) verwendet. WM3734 Zellen wurden in TU Medium mit 2 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.7.7 MCF-7

MCF-7 ist eine Brustkrebs-Zelllinie und stammt von einer 69 jährigen Frau mit kaukasischen Wurzeln. Sie ist kommerziell erhältlich (ATCC® HTB-22™) und wurde uns freundlicherweise von Dr. Frank Neumann (Klinik für Innere Medizin I, Uniklinikum Homburg) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte in DMEM versetzt mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.7.8 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

PBMC sind einkernige Zellen des peripheren Blutes, zu denen Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK), Monozyten und DC zählen. Diese wurden aus Leukozyten-Reduktionskammern (LRS-Kammer, Trima Accel System) oder Kammern des Amicus Systems (Fresenius HemoCare) der lokalen Blutbank isoliert. Die Zellen stammen von gesunden Dauerspendern, bei denen eine Thrombozytapherese durchgeführt wurde. Die als Abfall anfallenden Kammern des Trima Accel- bzw. Amicus-Systems wurden anonymisiert an die Forschung abgegeben (Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Unbedenklichkeitserklärung vom 16.4.2015 (83/15; Prof. Dr. Rettig-Stürmer) und vom 20.8.2010 (Prof Re/Ha)). Die isolierten PBMC wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Isolation von NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und von Monozyten zur DC-Generierung eingesetzt.

5 Methoden

5.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Zur Isolation der PBMC wurden die LRS- bzw. Amicus-Kammern, die bei der Thrombozytapherese in der lokalen Blutbank als Abfallprodukt anfallen, verwendet.

Pro Spender wurde ein Leucosep Röhrchen mit 17 ml LSM 1077 Lymphozyt Separationsmedium beladen und 30 s zentrifugiert (1000 g, RT), bis das Medium unter den Filter gelaufen ist. Dieses Medium besteht u. a. aus einem Saccharose-Epichlorhydrin-Kopolymer (mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/l), das dazu dient Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte während der Zentrifugation zu trennen. Die LRS- bzw. Amicus-Kammern werden mit ungefähr 30 ml Hank's BSS durchgespült und die darin enthaltene Zelllösung im vorbereiteten Leucosep-Röhrchen aufgefangen. Die Trennung der verschiedenen Blutzellen erfolgte mittels Zentrifugation über 30 min bei 450 g und RT (ohne Bremse und geringer Beschleunigung (Acc.:1)). Die PBMC sind in einem weißen Ring, zwischen dem gelblich gefärbten Blutplasma und dem farblosen Separationsmedium, angereichert. Das Blutplasma wurde abgesaugt und verworfen, während der weiße PBMC-Ring in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und auf 50 ml mit Hank's BSS aufgefüllt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (250 g, 15 min bei RT) erfolgte die Erythrozytenlyse, bei der das Pellet für 2 min in 2 ml Erythrozytenlysepuffer inkubiert wurde. Anschließend wurde das Röhrchen mit Hank's BSS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (200 g, 10 min bei RT). Die PBMC wurden in 20 ml PBS/0,5 % BSA aufgenommen, die Zellsuspension zur Vereinzelnung der Zellen durch ein Sieb mit einer Porengröße von 30 μm filtriert und letztendlich die Zellkonzentration mit Hilfe des Z2 Zählgerätes der Firma Beckman Coulter bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PBMC bei 4 °C gelagert.

5.2 Isolation humaner natürlicher Killerzellen

Die Isolation primärer, humaner NK-Zellen aus PBMC erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des „Dynabeads Untouched Human NK cells Kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific oder „NK Cell Isolation Kit, human“ der Firma Miltenyi Biotec. Die Isolation wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben durchgeführt. Die isolierten NK-Zellen wurden in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml in AIMV (10 % FCS) ausgesät. Am Tag der Isolation wurden die NK-Zellen mit 50 ng/ml IL-2 stimuliert. Die Zellen wurden wöchentlich gewaschen (Zentrifugation bei 250 g, 5 min und anschließendes Verwerfen des Überstandes), in einer Zelldichte von 3×10^6

Zellen/ml in frischem AIMV (10 % FCS) ausgesät und erneut mit 50 ng/ml IL-2 restimuliert, falls sie über einen längeren Zeitraum (mehr als 7 Tage) verwendet wurden.

5.3 Herstellung antigenspezifischer CD8⁺ T Zellklone

Zur erfolgreichen antigenspezifischen Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen müssen naive CD8⁺ T-Zellen von ausgereiften APC aktiviert werden. Dieses „Priming“ durch DC stellt einen wesentlichen Schritt dar, da dieser die komplette nachfolgende Immunantwort formt und beeinflusst (Arens & Schoenberger 2010). Dabei ist vor allem die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für seltene Tumorantigene sind, eine Herausforderung. Aus diesem Grund haben Wölfl und Greenberg ein Protokoll veröffentlicht, welches das antigenspezifische Aktivieren von CD8⁺ T-Zellen auch mit sogenannten „rare antigens“ ermöglicht und reproduzierbar macht (Wölfl & Greenberg 2014). Dieses Protokoll dient im Rahmen dieser Arbeit als Grundlage zur Herstellung von CD8⁺T-Zellklonen, die gegen Melanom-assoziierte Antigene (MART1 und gp100) gerichtet sind. Pro HLA-A2⁺ Spender wurden 4-5 PBMC-Aliquots eingefroren: 2 x 300x10⁶, 3 x 80-100 x 10⁶. Die isolierten PBMC wurden in Einfriermedium (90 % FCS/10 % DMSO) aufgenommen und ü/N in einem Einfriertank (Mr. Frosty™, Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff zur längeren Lagerung überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 20 ml kaltes PBS/5 % Humanes Serum Typ AB (Human AB) überführt und zentrifugiert (350g, 5 min bei 4 °C). Es erfolgte ein erneuter Waschschrift in 20 ml kaltem PBS/1 % HS (400g, 5 min bei 4 °C). Die Zellen wurden im gewünschten Medium aufgenommen und für den nächsten Verwendungszweck (z. B. für die DC Generierung oder Isolation naiver CD8⁺ T-Zellen) eingesetzt.

5.3.1 Generierung antigenpräsentierender dendritischer Zellen

Die Herstellung reifer DC erfolgte über ein Zwei-Schritte-Verfahren. Dabei dienten Monozyten als Vorläuferzellen, die über ihre adhärenen Eigenschaften von den restlichen PBMC isoliert werden konnten. Zunächst wurde ein Aliquot à 300 x 10⁶ PBMC aufgetaut, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 10 x 10⁶ Zellen/ml in DC Medium (Cellgro DC Medium/1 % HS/1 % Pen/Strep) aufgenommen und jeweils à 2 ml in 6-Well Platten ausgesät. Nach 2,5 h Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die adhärenen Monozyten vom Rest der nicht adhärenen PBMC getrennt, indem das Medium im Well mit einer 1-ml-Spitze vorsichtig resuspendiert und der Überstand verworfen wurde. Es wurde eine optische/mikroskopische Kontrolle durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Anzahl an großen adhärenen Monozyten gegenüber den kleineren, runden Lymphozyten überwiegt.

Anschließend wurde pro Well 3 ml des DC Mediums (versetzt mit 10 ng/ml IL-4 und 800 IU/ml GM-CSF) zugegeben und die Zellen für 48 h unter Brutschrankbedingungen kultiviert. Pro Well wurde 1,5 ml des DC Mediums (versetzt mit 10 ng/ml IL-4 und 1600 IU/ml GM-CSF) zugegeben und die Zellen für weitere 24 h unter Brutschrankbedingungen kultiviert. Die nun unreifen DC wurden in einem 50 ml Röhrchen geerntet, indem zunächst pro Well 3 ml des Überstandes gesammelt wurde. Die Zellen wurden vom Wellboden abgelöst indem das restliche Medium stark resuspendiert und zu dem bereits gesammelten Überstand überführt wurde. Ein zusätzlicher Waschschrift mit kaltem Puffer (PBS/5 % Human AB) stellte eine maximale Ernte an unreifen DC sicher. Zur weiteren DC-Ausreifung wurden die Zellen in vorgewärmten DC Medium (versetzt mit GM-CSF (800 IU/ml), IL-4 (10 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und IFN- γ (100 IU/ml)) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und 2 ml pro Well in eine 6-Well Platte ausgesät. Das entsprechende Peptid wurde schließlich einzeln in jedes Well in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und die Zellen für die weitere Ausreifung für 16 h im Brutschrank inkubiert.

5.3.2 Vorbereitung naiver CD8⁺ T-Zellen

Die Isolation naiver CD8⁺ T-Zellen erfolgte am gleichen Tag wie die Peptidzugabe zu den autologen DC. Dafür wurden 300×10^6 PBMC aufgetaut und das „Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit“ der Firma Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Isolation wurden die naiven CD8⁺ T-Zellen in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml in T-Zellmedium (Cellgro DC Medium/5 % HS/1 % Pen/Strep) versetzt mit 5 ng/ml IL-7 aufgenommen und in einer 6-Well Platte mit 2 ml/Well ü/N im Brutschrank kultiviert.

5.3.3 DC-vermittelte antigenspezifische Aktivierung CD8⁺ T-Zellen

Zunächst wurden die ausgereiften DC unter starkem Resuspendieren vom Boden des Wells gelöst und geerntet. Anschließend wurde in die Wells vorgekühlter Waschpuffer gegeben und die 6-Well Platten für 20 min auf Eis inkubiert, sodass das Ablösen der restlichen DC induziert und somit eine maximale Ausbeute ermöglicht werden konnte. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem Waschpuffer aufgenommen. Um ein Überwachsen der CD8⁺ T-Zellen (durch die in der DC-Population noch enthaltenen kontaminierenden PBMC wie NK-Zellen) zu verhindern, wurden die ausgereiften DC mit 30 Gy in der lokalen Blutbank bestrahlt und anschließend in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in vorgewärmten T-Zellmedium aufgenommen. Die am Vortag isolierten naiven CD8⁺ T-Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml T-Zellmedium resuspendiert und mit 60 ng/ml IL-21 versetzt. Die beiden vorbereiteten Zelltypen (DC und naive CD8⁺ T-Zellen) wurden in einem

Volumenverhältnis von 1:1 gemischt (Zellverhältnis von DC:CD8 = 1:4), jeweils 500 µl/Well in eine 48-Well Platte ausgesät und für 72 h im Brutschrank kultiviert.

Für das erste Füttern der Zellen wurden jeweils 0,5 ml vorgewärmtes T-Zellmedium (versetzt mit jeweils 10 ng/ml IL-15 und IL-7) vorbereitet (je nach getesteter Bedingung wurde zusätzlich in diesem Schritt 20-60 ng IL-21 zugegeben, siehe Tabelle 10) und pro Well appliziert. Nach weiteren 72 h im Brutschrank wurden die Zellen von der 48-Well Platte in eine 12-Well Platte überführt, um optimale Expansionsbedingungen für die CD8⁺ T-Zellen zu schaffen. Dafür wurde jeweils 1 ml vorgewärmtes T-Zellmedium (versetzt mit 10 ng/ml IL-15 und IL-7 und z.T. 20-60 ng/ml IL-21) pro Well in die 12-Well Platte vorgelegt und die Zellen von der 48-Well Platte Wellweise überführt. Eine weitere Überführung der Zellen in eine 6-Well Platte erfolgte nach weiteren 48 h Inkubation im Brutschrank. Dafür wurden jeweils 2 ml vorgewärmtes T-Zellmedium (versetzt mit 20 ng/ml IL-15 und IL-7 und z.T. 20-60 ng/ml IL-21) vorgelegt und die Zellen anschließend Well für Well von der 12-Well Platte zu der 6-Well Platte überführt. Nach weiteren 72 h Kultivierung im Brutschrank konnten die CD8⁺ T-Zellen für die T-Zellklonierung eingesetzt werden.

5.3.4 Vereinzlung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Ziel dieses Schrittes war es, die durch DC stimulierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu isolieren, um diese zu vereinzeln und somit die Expansion klonaler Populationen zu ermöglichen. Damit ausschließlich antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen zur Vereinzlung verwendet werden und die Ausbeute an antigenspezifischen T-Zellklonen erhöht wird, wurden die CD8⁺ T-Zellen mittels antigenspezifischer Restimulation zur IFN γ Sezernierung angeregt. Die IFN γ positiven Zellen können so anschließend isoliert und letztendlich vereinzelt werden.

Für die antigenspezifische Restimulation wurde zunächst ein Aliquot à 100 x 10⁶ PBMC des autologen Spenders aufgetaut. Bis zu 5 x 10⁶ PBMC wurden in 0,5 ml T-Zellmedium aufgenommen und mit 0,5 µg des korrespondierenden Peptids für 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ beladen. Die Zellen wurden anschließend mit 30 Gy bestrahlt und in einer Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml in T-Zellmedium (versetzt mit 40 ng/ml IL-7) aufgenommen. Die DC stimulierten CD8⁺ T-Zellen wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml in T-Zellmedium supplementiert und jeweils 500 µl/Well in einer 48-Well Platte ausgesät. Pro Well wurden jeweils 250 µl der vorbereiteten PBMC-Suspension pipettiert und die Platte für 6 h im Brutschrank inkubiert.

Zur Isolation der IFN γ sezernierenden Zellen wurde der IFN γ Secretion Assay der Firma Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten Zellen wurden in einer Konzentration

von 20-40 Zellen/ml in RPMI Medium aufgenommen und à 50 µl/Well in bereits vorbereitete 96-Well Rundwellplatten pipettiert (Endkonzentration 1-2 Zellen/Well).

In diese 96-Well Rundwellplatten wurden bereits pro Well 150 µl des vorgewärmten T-Zellklonierungsmedium vorgelegt. Bei diesem Medium handelt es sich um RPMI/10 % Human AB. Als Wachstumsfaktor wurde 25 ng/ml IL-2 zugesetzt, während die Zugabe von 30 ng/ml anti-CD3 Antikörper (OKT3) die TCR-Stimulation der vereinzelt Klone induziert und dadurch deren Expansion unterstützt (Riddell & Greenberg 1990). Außerdem wurde dem Medium als Fütterzellen ein Mix aus bestrahlten PBMC allogener Spender (Endkonzentration $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, bestrahlt mit 30 Gy) sowie ein Mix aus bestrahlten EBV-LCL (Endkonzentration $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, bestrahlt mit 120 Gy) zugegeben, was die Expansion der vereinzelt CD8⁺ T-Zellen verbessert.

Nach 7 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde erneut der Wachstumsfaktor IL-2 zugegeben. Dafür wurde RPMI/10 % Human AB mit einer Konzentration von 125 ng/ml IL-2 vorbereitet und jeweils 50 µl pro Well appliziert. Nach weiteren 7 Tagen Kultivierung im Brutschrank wurden die ausgewachsenen Kolonien weiter expandiert.

5.3.5 Expansion antigenspezifischer T-Zellklone

Zur Expansion CD8⁺ T-Zellklone wurden pro Klon jeweils eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 20 ml Expansionsmedium vorbereitet. Dafür wurden RPMI/10 % Human AB zusammen mit 30 ng/ml anti-CD3 Antikörper (OKT3) versetzt. Zusätzlich wurde dem Medium als Fütterzellen ein Mix aus bestrahlten PBMC allogener Spender (Endkonzentration $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml, bestrahlt mit 30 Gy) sowie ein Mix aus bestrahlten EBV-LCL (Endkonzentration $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, bestrahlt mit 120 Gy) zugegeben. Pro Flasche wurden $0,2-0,5 \times 10^6$ CD8⁺T-Zellklone expandiert bzw. eine ausgewachsene Kolonie aus der CD8⁺ T-Zellklonierung überführt (siehe 5.3.4). Die Flasche wurde stehend im Brutschrank kultiviert und an Tag 3, 5, 8 und 11 der Expansion mit 30 ng/ml IL-2 und 2 ng/ml IL-15 gefüttert. Die CD8⁺ T-Zellklone wurden an Tag 11-14 verwendet und ggf. an Tag 14 erneut expandiert.

5.4 SK-Mel5-Kokultur mit CTL_{MART1} und primären NK-Zellen

Die Reaktion des menschlichen Körpers auf eine erstmalige Infektion lässt sich im Prinzip in zwei Schritte einteilen: zunächst erfolgt die Abwehr durch das angeborene Immunsystem, welche dann später durch den Einsatz des adaptiven Immunsystems unterstützt bzw. ersetzt wird (Murphy & Weaver 2018; Pallmer & Oxenius 2016). NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems sind somit einige Zeit vor den CD8⁺ T-Zellen aktiv, deren adaptive

Immunantwort zunächst durch antigenspezifische Aktivierung und klonale Expansion der Zellen induziert werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einem Kokultursystem genauer untersucht werden, inwiefern die beiden Effektorzellpopulationen miteinander kooperieren bzw. sich gegenseitig beeinflussen.

An Tag 0 der Kokultur wurden jeweils 1×10^6 SK-Mel5 Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche in 12 ml MEM Medium (supplementiert mit 10 % FCS) ausgesät und für 4 h liegend im Brutschrank inkubiert, um das Adhären der Melanomzellen zu ermöglichen. CTL_{MART1} bzw. NK-Zellen wurden mit 30 Gy bestrahlt, um eine weitere Proliferation der Effektorzellen in der Kokultur zu verhindern. Sie wurden in unterschiedlicher Anzahl zu den Melanomzellen zugegeben, sodass das Effektor-Zielzell-Verhältnis (E:T-Ratio) in der NK-Zell Kokultur von 1:1-10:1 und in der CTL_{MART1}-Kokultur von 0,5:1-2:1 variiert hat. Nach 3-4 Tagen wurde der Überstand entfernt, die Flasche mit 5 ml DPBS gespült und die restlichen adhären SK-Mel5 Zellen unter Verwendung von 1,5 ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Nach 1-2 min wurde die Trypsin-induzierte Reaktion durch Zugabe von 3,5 ml des serumhaltigen MEM (+10 % FCS) Medium gestoppt und die Zellzahl bestimmt. Mit diesen Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen und Proteinbestimmungen mittels Western Blot durchgeführt. Außerdem dienten sie als Zielzellen im Real-time Killing Assay zur Quantifizierung der CTL_{MART1}- und NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Zur weiteren Kokultur wurden 1×10^6 der bereits kokultivierten SK-Mel5 Zellen in 75cm² Flaschen ausgesät und erneut dem Selektionsdruck durch CTL_{MART1} bzw. NK-Zellen ausgesetzt. Als Kontrolle wurden parallel unbehandelte SK-Mel5 Zellen ohne Zugabe der Effektorzellen kultiviert.

5.5 Real-time Killing Assay

Die Effektorfunktion zytotoxischer Lymphozyten wie NK- und CD8⁺ T-Zellen wird mit Hilfe zytotoxischer Populationsassays bestimmt. Bisherige Standardverfahren wie ⁵¹Cr- und LDH-release Assay sind die etablierten Methoden, die schon seit Jahren für diese Zwecke angewendet werden. Jedoch sind hier neben der Radioaktivität beim ⁵¹Cr- und der suboptimalen Sensitivität des LDH-release Assays vor allem die Einschränkungen durch die Endzeitpunktbestimmungen zu nennen. Da die Kinetik des Killing-Prozesses zytotoxischer Immunzellen jedoch wichtige Informationen liefert, wurde in der AG Hoth der Real-time Killing Assay von Carsten Kummerow und Bin Qu etabliert (Kummerow et al. 2014). Die Zielzellen werden hierbei mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen, der nach dem Abtöten der Zielzelle durch eine Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird. So nimmt die intrazelluläre Fluoreszenz mit zunehmender Anzahl

lysierter Zellen ab, was mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgeräts mit *bottom-reading* Funktion kinetisch verfolgt werden kann.

Durchführung

Jeweils $0,5 \times 10^6$ T2-Zellen wurden in 500 μl AIMV/10 % FCS mit 1 μg des HLA-A2 spezifischen Peptids von Interesse (CMV pp65/ MART1/ gp100) beladen und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Im Falle des Rescue-Experiments (Abbildung 25) wurden CTL_{MART1}-kokultivierte SK-Mel5 Zellen mit 1 μg des MART1-Peptids in einem Volumen von 500 μl AIMV/10 % FCS in 24-Well low binding Platten beladen. Die Zielzellen (T2-, SK-Mel5 Zellen) wurden daraufhin mit Calcein-AM (500 nM) gefärbt und 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert (Calcein-AM in AIMV mit 10 mM HEPES). Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in AIMV mit 10 mM HEPES (AIMV°) in einer Endkonzentration von $0,125 \times 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und je 200 μl in die Wells einer schwarzen 96-Well Platte mit transparentem Boden pipettiert. Nach Absetzen der Zielzellen wurden je 50 μl der Effektorzellpopulation in der gewünschten Konzentration vorsichtig in die jeweiligen Wells hinzugefügt.

Zusätzlich wurden vier Kontrollen vorbereitet:

1. Hintergrundkontrolle: 250 μl AIMV°
2. Negativ-/Lebendkontrolle: 200 μl der Zielzellsuspension mit 50 μl AIMV°
3. Positiv-/Lysekontrolle: 200 μl der Zielzellsuspension mit 50 μl AIMV° und 20 μl einer 10 %igen Tritonlösung
4. Lyse-Hintergrundkontrolle: 250 μl AIMV° mit 20 μl Triton

Von jeder untersuchten Bedingung wurden Doppelwerte pipettiert. Unmittelbar nach Zugabe der Effektorzellen zu den Zielzellen wird die Messung im Plattenmessgerät gestartet, wobei ein Fluoreszenzsignal bei 485 nm Anregungswellenlänge alle 10 min über einen Zeitraum von 4 h am Wellboden detektiert wird. Zur Messung wurde ein Filterset von AHF (BrightLine HC 485/20, F39-485/ BrightLine HC 531/22, F37-531) verwendet.

Analyse

Von den Doppelwerten wurden für alle gemessenen Zeitpunkte t die Mittelwerte bestimmt. Daraufhin wurden die Werte der Hintergrundkontrollen zum Zeitpunkt t von allen gemittelten Werten subtrahiert. Von der Lysekontrolle (Zielzellen + Medium + Tritonlösung) wurde, zur

Korrektur der Volumenvariabilität, die detektierten Fluoreszenzsignale der Lyse-Hintergrundkontrolle zum Zeitpunkt t subtrahiert.

Um die Killing-Kapazität der CTL über die Zeit genau quantifizieren zu können wurde folgende Formel verwendet:

Berechnung der Zielzellyse eines Real-time Killing Assays

$$\text{Zielzellyse (\%)} = \frac{y - (NK \cdot I)}{I \cdot (PK - NK)} \cdot 100$$

- y: Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt t
- NK: Fluoreszenz der Negativkontrolle zum Zeitpunkt t
- PK: Fluoreszenz der Positivkontrolle zum Zeitpunkt t
- I: Index zum Zeitpunkt t=0 ($I = y_{t=0} / NK_{t=0}$)

5.5.1 Quantifizierung der Ca²⁺-abhängigen Zytotoxizität von CD8⁺ T- und NK-Zellen

Für ein effizientes Killing von Tumorzellen durch CTL bzw. NK-Zellen ist der Influx von Ca²⁺-Ionen, durch den sogenannten *Store Operated Calcium Entry* (SOCE), unerlässlich (Maul-Pavicic et al. 2011; Schwarz et al. 2013). Allerdings fördert Ca²⁺ auch die Proliferation, Migration und die Metastasierung von Tumorzellen (Hoth 2016). Aus diesem Grund wurde die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration im Real-time Killing Assay variiert, um ein Ca²⁺-Optimum für eine effiziente Tumorzellyse durch CTL bzw. NK-Zellen bestimmen zu können (Zhou et al. 2018). Die Methodik ist in der Publikation unseres Labors von Xiao Zhou et. al genauer beschrieben. Kurz zusammengefasst: Die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von AIMV^o wurde durch Zugabe des Ca²⁺-Chelators EGTA oder durch zusätzliche Addition von CaCl₂ variiert und die freie Ca²⁺-Konzentration mit Hilfe einer Ca²⁺-selektiven Elektrode und eines Blut-Gas-Analyse-Gerätes bestimmt. Die gleichen Lösungen wurden als Medien im Real-time Killing Assay eingesetzt um die Killingeffizienz von SEA-stimulierten CTL gegen Raji Zellen bzw. primären NK-Zellen gegen K562 Zellen zu quantifizieren.

5.6 Die Generierung von Tumorzellsphäroiden

Sphäroide sind primären humanen Tumoren sehr ähnlich und spiegeln physiologisch relevantere immunmodulatorische Funktionen als 2D Tumorzellkulturen wider (Hirt et al. 2014). Die Generierung solcher Sphäroide erlaubt die Analyse der Interaktion von Immunzellen mit Tumorzellen in einem 3D-Model. So wurde auch im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion eines Sphäroids aus transient mit pCasper3-GR transfizierten MCF-7 Tumorzellen zusammen mit primären NK-Zellen in einer 3D Matrix im Lightsheet-Mikroskop beobachtet (Backes et al.

2018). Die Methodik ist in dieser Publikation unseres Labors genauer beschrieben. Kurz zusammengefasst wurden zur Herstellung des Sphäroids 1×10^6 MCF-7 Zellen nach der Transfektion in 1 ml DMEM (supplementiert mit 10 % FCS) in 24-Well low binding Platten ausgesät, nach 24 h von Carsten Kummerow in die Kollagenmatrix eingebettet und zusammen mit primären NK-Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Lightsheet Z.1 (Zeiss) mikroskopiert.

5.7 Durchflusszytometrische Analysen

In der Durchflusszytometrie werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt, wobei die Emission, die von der Zelle ausgeht, detektiert wird. Durch diese Signale können wiederum Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle getroffen werden. Anhand des Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC) wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel detektiert, was direkte Rückschlüsse auf das Volumen bzw. auf die Größe der Zelle zulässt. Das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) gibt die Brechung des Lichts im rechten Winkel wieder, die von der Granularität der Zelle abhängt. Zudem ist es möglich, die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu färben, wodurch sowohl extra- als auch intrazelluläre Epitope quantifiziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Messungen am FACS Verse (Laser: 488 nm, Filter: 530/30, 575/26, 670/14, 695/40, 780/60; Laser: 640 nm, Filter: 660/20, 780/60; Laser: 405 nm, Filter: 450/40, 525/50) der Firma Becton Dickinson mit der Software BD FACSuite™ durchgeführt. Die Darstellung der gemessenen Daten erfolgte entweder in einem Histogramm, bei dem ein Parameter betrachtet wird oder in einem zweidimensionalen Dot-Plot, bei dem zwei Parameter gegeneinander aufgetragen werden. Ein Punkt in der Dot-Plot Darstellung repräsentiert hierbei eine gemessene Zelle. Zur Quantifizierung wurden in den verschiedenen Darstellungen *Gates* gesetzt, die es ermöglichen, die Zellen anhand der gemessenen Parameter in unterschiedliche Untergruppen zu unterteilen. Dabei wurden die Messungen über prozentualen Anteile oder die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der anhand der Gates definierten Populationen quantifiziert. Die Analyse der Daten wurde unter Verwendung der FloJo Software 10.0.7. durchgeführt.

Extrazelluläre Färbung:

Es wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen bei 250 g für 5 min pelletiert und in 500 µl FACS-Puffer (PBS/0,5 % BSA) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, die gewünschten Antikörper zugesetzt und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen zweimal in je 500 μl FACS Puffer gewaschen, in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Zur Quantifizierung der Antigenpezifität der generierten CD8⁺ T-Zell Klone wurden Fluorophor-gekoppelte Multimere, sogenannte Dextramere, der Firma Immudex nach Herstellerangaben verwendet.

Annexin V Färbung:

Jurkat E6-1 Zellen wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ AIMV (10 % FCS) aufgenommen und jeweils 200 μl pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Durch Zugabe von 2,5 μM Staurosporin bzw. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Apo1-1 wurde die Apoptose induziert und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 100 μl der Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 ml gekühltes PBS zugegeben und bei 250 g, 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 μl Annexin V Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) aufgenommen, 5 μl Annexin V AlexaFluor® 488 und 1 μl einer 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid (PI)-haltigen Lösung zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 400 μl des Annexin V Puffers erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

5.8 Transiente Transfektion

Mit Hilfe der Transfektion wird zellfremde DNA oder RNA in die zu transfizierende Zelle transportiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden SK-Mel5 und MCF-7 Zellen mittels Elektroporation transient mit dem pCasper3-GR cDNA Konstrukt (Evrogen) und MCF-7 Zellen ggf. zusätzlich mit einem Caspase 3 Konstrukt (Addgene, 11813) transfiziert. Zu diesem Zweck wurde das NHEM Neo Kit sowie das Elektroporationsgerät Nucleofector II der Firma Lonza (Programm A024) nach Herstellerangaben verwendet. Pro Transfektion wurden 2×10^6 Zellen und jeweils 2 μg des jeweiligen Konstrukts eingesetzt.

5.9 Mikroskopische Messungen

Es wurden zwei unterschiedliche Systeme für Live Cell Imaging Messungen angewendet: Der Cell Observer der Firma Zeiss sowie das ImageXpress Micro XLS System der Firma Molecular Devices.

Beim Cell Observer handelt es sich um ein Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, das es erlaubt, Zellen auf Einzelzellebene hochauflösend zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in

Kooperation mit der AG Bogeski die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität von Calcein-AM-beladenen WM3734 Melanomzellen untersucht. Dafür wurden die ibidi 25 mm μ -dishes mit jeweils 50 μ l Fibronectin (0,1 mg/ml) für 30 min bei RT beschichtet, welches anschließend durch Absaugen entfernt wurde. Es wurden daraufhin $0,1 \times 10^6$ WM3734 Zellen in 1,2 ml AIMV (versetzt mit 10 mM HEPES) auf dem Fibronectin-beschichteten μ -dish ausgesät und durch Zugabe von 500 nM Calcein-AM im Brutschrank gefärbt. Nach 1 h wurde der Überstand verworfen und durch 1,2 ml AIMV (10 mM HEPES) ersetzt. Die Probe wurde im Cell Observer eingesetzt und, unter Verwendung des Zeiss Fluor Öl-Objektivs 40x/1.3 M27, fokussiert. Es wurden $0,25 \times 10^6$ NK-Zellen in 50 μ l AIMV (10 mM HEPES) vorsichtig in die Mitte des μ -dish pipettiert, ein passender Bildausschnitt ausgewählt und die Messung gestartet. Dabei wurden in einem Zeitintervall von 10 s im GFP (Ex 470/40, Em 525/50) und Durchlichtkanal über einen Zeitraum von 1 h Bilder aufgenommen.

Das ImageXpress Micro XLS System ist ein Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, das mit diversen Well-Platten kompatibel ist und somit die parallele Analyse von verschiedenen Bedingungen auf Einzelzellebene in brutschrankähnlichen Bedingungen ermöglicht. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse der beiden Apoptose-Sensoren pCasper3-GR und Fluorophor-gekoppeltes Annexin V verwendet. Dafür wurde der Well-Boden von schwarzen 96-Well Platten mit transparentem Boden mit jeweils 50 μ l Fibronectin (0,1 mg/ml) für 30 min bei RT beschichtet, welches anschließend durch Absaugen entfernt wurde. Es wurden daraufhin 10.000-20.000 E6-1 bzw. K562 pCasper Zellen in 50 μ l AIMV (10 % FCS) in die Wells pipettiert, die Platte in das Mikroskop eingesetzt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wurde AIMV (10 % FCS) mit Annexin V (gekoppelt mit dem Fluorophor Pacific Blue bzw. AlexaFluor® 488) versetzt (5 μ l Annexin V/50 μ l Medium). In diesem Medium wurden entweder primäre NK-Zellen in einer Endkonzentration von 10.000/50 μ l aufgenommen oder die Apoptose-induzierende Substanzen Staurosporin (Endkonzentration im Well 2,5-5 μ M) oder der anti-CD95 Antikörper Apo1-1 (Endkonzentration im Well 5 μ g/ml) beigegeben. Letztendlich wurden 50 μ l dieser Lösung zu den bereits vorbereiteten Zielzellen pipettiert und die Messung gestartet. Es wurde ein Nikon Super Fluor Objektiv 20x/0,75 verwendet und die Zellen in einem Zeitintervall von 0,5-5 min im GFP, FRET, DAPI und Durchlichtkanal über eine Dauer von 3-8 h beobachtet.

Die Analyse der Mikroskopiedaten wurde mit Hilfe der Programme FIJI (Schindelin et al. 2012) und Microsoft Excel durchgeführt. Zunächst wurde in allen Fluoreszenzkanälen der Rolling-Ball Algorithmus (r = zweifacher Durchmesser der zu untersuchenden Zelle) zur

Hintergrundkorrektur angewendet. Mittels des ImageJ-Plugins SpeckleTracker] (Smith et al. 2011) wurden Zellen automatisiert und ggf. unter manueller Nachjustierung *getracked* (engl. Tracking = Verfolgen der Spur einer Zelle). Die Verwendung des Plugins Speckle-Intensity-Trajectories (modifiziert durch Carsten Kummerow) ermöglichte schließlich die Quantifizierung der Einzelzellfluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Kanälen mittels Microsoft Excel. Alle Intensitäten wurden auf den ersten Zeitpunkt normiert (F/F_0) und im Falle der pCasper-Analyse die Donor-Ratio (FRET/GFP) bestimmt.

5.10 Quantifizierung der Proteinmenge

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde, wie bereits in der Dissertation von Kathrin Dörr ausführlich beschrieben, durchgeführt (Dörr 2015). Kurz zusammengefasst: Zunächst wurden Zellysate hergestellt, deren Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay bestimmt wurden. Jeweils 75 µg Protein wurde in Lämmli-Puffer nach Hitzedenaturierung in einem diskontinuierlichen Gel (10-15 % Trenngel und 5-7 % Sammelgel), unter Anlegung von Spannung, ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine, mittels einer quer zum Gel angelegten Spannung, auf eine Methanol-aktivierte PVDF Membran übertragen. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mittels 5 %iger Magermilchlösung und Waschschritten wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator mit dem MART1-spezifischen Primärantikörper (1:1000 verdünnt) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus, 1:5000 verdünnt) in 5 %iger Magermilch Lösung für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran fand die Entwicklung des Blots unter Verwendung der ECL-Entwicklerlösung im ChemiDoc™ XRS-System statt. Zur Normierung der detektierten Proteinmengen in den verschiedenen Banden wurde die Membran anschließend mit einem Primärantikörper gegen das Haushaltsgen GAPDH (1:2000 verdünnt) bzw. γ -Tubulin (1:1000 verdünnt) behandelt. Die quantitative Analyse der Proteinmenge anhand der Bandendichte erfolgte in der Image Lab Software der Firma Bio-Rad.

5.11 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 7 durchgeführt. Dafür wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson normality test) getestet und abhängig davon geeignete statistische Testverfahren (gepaarter T-Test, Wilcoxon Test, Mann-Whitney-Test, one-way oder two-way Anova) ausgewählt. Dargestellte p-Werte stehen für: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

6 Ergebnisse

6.1 Zytotoxizität der Effektorzellen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität von Effektorzellen des humanen Immunsystems untersucht. Eine Möglichkeit ausreichend viele PBMC als Quelle für humane Immunzellen zu erhalten, ist die Thrombozytapherese gesunder Spender. In der lokalen Blutbank standen dafür zeitweilig zwei unterschiedliche Apherese-Systeme zur Verfügung: Die Amicus (Fenwal) und die Trima Accel (Terumo BCT) Apparatur. Bei der Thrombozytapherese beider Systeme fallen jeweils Kammern (gefüllt mit angereicherten Zellen des peripheren Blutes) als Abfallprodukte an, die als PBMC-Quellen von unserer Arbeitsgruppe qualitativ untersucht und miteinander verglichen wurden (Knörck et al. 2018). Dabei wurde u. a. auch das zytotoxische Potential der in den PBMC enthaltenen NK-Zellen quantifiziert (Abbildung 3A-C). Als interne Kontrolle wurden PBMC der jeweils gleichen Spender aus Vollblut gewonnen und mit PBMC der beiden Apherese-Systeme verglichen.

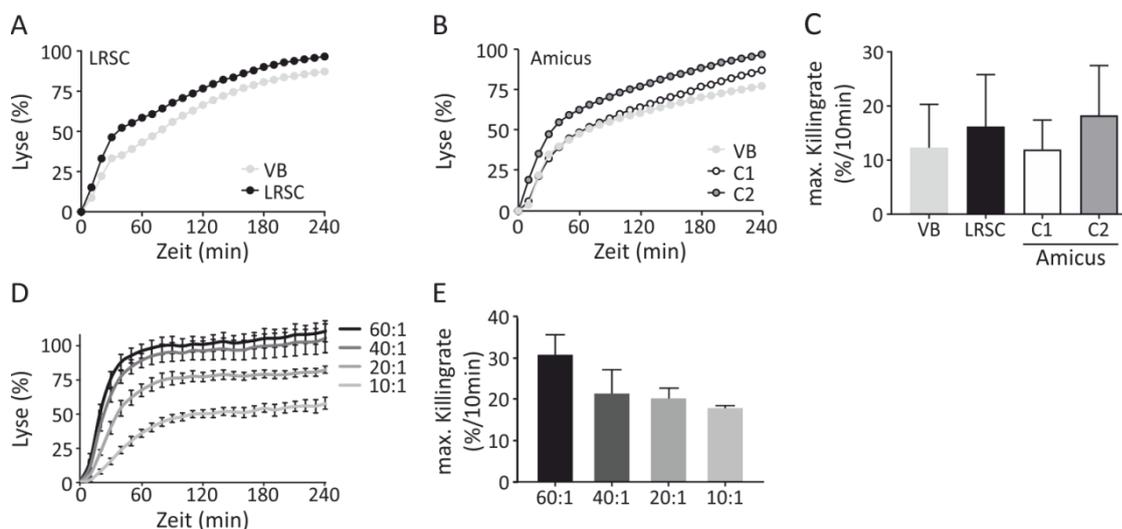


Abbildung 3: NK-vermittelte Zytotoxizität der PBMC aus Vollblut ist vergleichbar mit PBMC aus der Thrombozytapherese mit Hilfe des Amicus und Trima Accel Systems. (A-C) Darstellung der kinetischen K562-Lyse durch PBMC mit einem Effektor:Zielzellverhältnis (E:T-Ratio)=40:1. Ein repräsentativer Donor ist gezeigt für LRSC (Trima Accel) (A) und für die beiden Kammern des Amicus Systems (C1 und C2) (B) mit den jeweiligen Vollblutkontrollen (VB). Darstellung der gemittelten maximalen Killingrate (%/10min) \pm SD der PBMC aller untersuchten Systeme (VB n= 16, LRSC n=7, C1 n=8, C2 n=9) (C). (D und E) Darstellung der gemittelten K562-Lyse durch PBMC (ohne Monozyten und CD8⁺ T-Zellen) von Patienten mit Glioblastoma multiforme mit unterschiedlichen E:T-Ratios \pm SEM (n=4) (D). Quantifizierung der gemittelten maximalen Killingrate mit unterschiedlichen E:T-Ratios \pm SEM (E). Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C ein einfaktorielles Anova-Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Abbildung modifiziert nach Knörck et al. 2018 (A-C) und nach Müller et al. 2016 (D-E).

Die Analyse der NK-vermittelten Zytotoxizität der PBMC mittels Real-time Killing Assay (Kummerow et al. 2014) hat keine Unterschiede zwischen PBMC aus Vollblut und den Aphereseprodukten des Amicus oder Trima Accel Systems ergeben (Abbildung 3A-C) (Knörck et al. 2018). Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl beide Apherese-Apparaturen als auch Vollblut als adäquate PBMC-Quellen genutzt werden können, um die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität mittels Real-time Killing Assay zu bestimmen. Langfristig ist es das Ziel unserer Arbeitsgruppe mehr Projekte mit einem direkten klinischen Bezug zu bearbeiten, um so u. a. die Immunzell-vermittelte Zytotoxizität von Krebspatienten zu untersuchen. Sollen Immunzellen von Krebspatienten untersucht werden, werden diese meist direkt aus dem Vollblut gewonnen. Als Vorversuch wurde in einem klinischen Kooperationsprojekt bereits nachgewiesen, dass die NK-Zell-vermittelte Lyse der PBMC (isoliert aus dem Vollblut von Patienten mit dem bösartigen Hirntumor Glioblastoma multiforme (GBM)) von K562 Zielzellen mittels Real-time Killing Assay zu detektieren ist (Abbildung 3D-E) (Müller et al. 2016). Basierend auf der Erkenntnis, dass keine qualitativen Unterschiede zwischen PBMC aus Vollblut und PBMC aus Apherese-Systemen bestehen und zudem eine NK-Zell-vermittelte Lyse von GBM-Patienten detektiert wurde, kann der Real-time Killing Assay zukünftig auch zu klinischen Zwecken eingesetzt werden.

Kalzium (Ca^{2+}) stellt einen essentiellen *second messenger* in Lymphozyten dar. Es ist bekannt, dass sowohl die CTL- als auch die NK-vermittelte Zytotoxizität über Perforin und Granzym B-Freisetzung aus lytischen Vesikeln von Ca^{2+} gesteuert wird (Lyubchenko et al. 2001). Da im Rahmen dieser Arbeit sowohl die NK- als auch CTL-vermittelte Zytotoxizität untersucht wurde, sollte im Vorhinein eine Bedingung bestimmt werden, die für beide Zelltypen eine optimale extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$) für eine effiziente Lyse von Zielzellen darstellt.

Ergebnisse

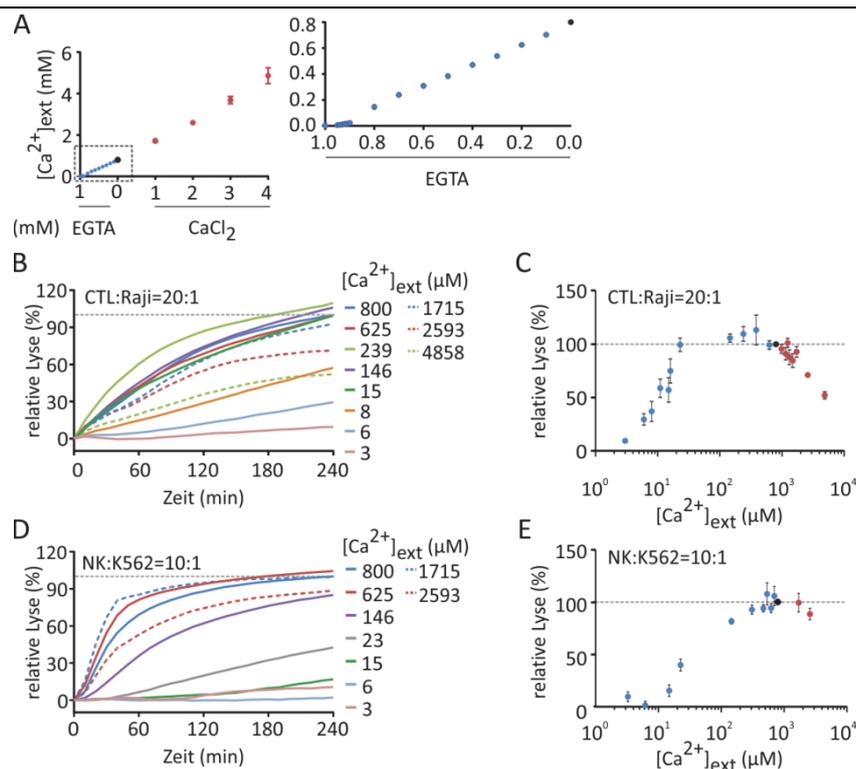


Abbildung 4: Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ in AIMV Medium ermöglicht sowohl eine effiziente CTL- als auch NK-vermittelte Zytotoxizität. (A) Die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ von AIMV Medium (schwarz) wurde unter Zugabe von EGTA (blau) bzw. CaCl_2 (rot) verändert. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ wurde mit Hilfe einer Ca^{2+} -selektiven Elektrode bzw. eines Blut-Gas-Analysegerätes bestimmt ($n=2-6$). (B und C) Darstellung der gemittelten Lysekinetik unter unterschiedlichen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ Bedingungen von SEA-beladenen Raji Zellen durch SEA-stimulierte CTL mit einem Effektor:Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 20:1 im Real-time Killing Assay ($n=4-24$). Die Daten sind auf die Endlyse der Zielzellen nach 4 h in AIMV ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=800 \mu\text{M}$) normiert. Die Zugabe von EGTA wird durch kontinuierliche Linien, die Zugabe von CaCl_2 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (B). Korrelation der normierten Endlyse nach 4 h von SEA-beladenen Raji Zielzellen durch SEA-stimulierte CTL mit verschiedenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ($n=4-24$) (C). (D und E) Darstellung der gemittelten Lysekinetik unter unterschiedlichen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ Bedingungen von K562 Zellen durch primäre, humane NK-Zellen mit einer E:T-Ratio von 10:1 im Real-time Killing Assay ($n=3-10$). Die Daten sind auf die Endlyse der Zielzellen nach 4 h in AIMV ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=800 \mu\text{M}$) normiert. Die Zugabe von EGTA wird durch kontinuierliche Linien, die Zugabe von CaCl_2 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (D). Korrelation der normierten Endlyse nach 4 h von K562 Zielzellen durch primäre NK-Zellen mit verschiedenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ($n=3-10$) (E). Abbildung modifiziert nach Zhou et al. 2018. Die Daten in (B und C) wurden zusammen mit Cora Hoxha gewonnen. Die Versuche in (D und E) wurden von Yan Zhou und Rouven Schoppmeyer durchgeführt.

Zunächst wurde die freie Ca^{2+} -Konzentration in AIMV Medium durch die Zugabe des Ca^{2+} -Chelators EGTA reduziert bzw. durch Addition von CaCl_2 erhöht und mit Hilfe eines Blut-Gas-Analysegerätes und einer Ca^{2+} -sensitiven Elektrode gemessen (Abbildung 4A). Die kinetische Lyse der Zielzellen Raji bzw. K562 durch CTL und NK-Zellen wurde anschließend in den verschiedenen Medien im Real-time Killing Assay untersucht (Abbildung 4B und D). Ein effizientes Killing durch CTL findet in einem relativ breiten Spektrum zwischen $23 \mu\text{M}$ bis knapp $1000 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ (normierte Endlyse 99,3-122,2 %) statt (Abbildung 4C). Eine effiziente Lyse durch NK-Zellen ist zwischen $384-1715 \mu\text{M}$ (normierte Endlyse 94-107,7 %) möglich und zeigt, dass NK-Zellen, verglichen zu CTL, eine höhere $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ Konzentration benötigen, um eine effiziente Zielzelllyse induzieren zu können (Abbildung 4D). Überraschenderweise findet das

optimale Killing beider Effektorzellen in einer $[Ca^{2+}]_{ex}$ statt, die deutlich niedriger als die freie Ca^{2+} -Konzentration von knapp $1200 \mu M$ im Blutplasma ist (Buckley & Russell 1988). Die freie Ca^{2+} Konzentration von knapp $800 \mu M$ in AIMV Medium liegt bei beiden Zelltypen im optimalen Bereich und wurde somit für alle folgenden Versuche verwendet. Allerdings ist zu beachten, dass in dieser Studie unterschiedliche Zielzellen zur Untersuchung der NK- und CTL-vermittelten Zytotoxizität verwendet wurden. Die Ca^{2+} -abhängige Zytotoxizität dieser beiden Effektorzelltypen kann nur bei Verwendung gleicher Zielzellen direkt miteinander verglichen werden. Die Generierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellklone, die eine NK-sensitive Zelllinie erkennen, ermöglicht eine solche Analyse.

6.2 Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellklone

Es gibt diverse Möglichkeiten humane $CD8^+$ T-Zellen *in vitro* zu stimulieren. Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurden in der AG Hoth humane $CD8^+$ T-Zellen hauptsächlich über zwei Wege stimuliert: Beladung der PBMC mit Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) oder die Verwendung artifizierender Beads, die auf ihrer Oberfläche Antikörper gegen CD3 und CD28 präsentieren und dadurch eine fokale Stimulation $CD8^+$ T-Zellen ermöglichen (Friedmann et al. 2019). *In vivo* werden $CD8^+$ T-Zellen allerdings über Interaktion ihres TCR mit dem pMHC I einer APC stimuliert (Abbildung 1A). Um diese physiologische Aktivierung auch *in vitro* zu ermöglichen, war es das erste Ziel, die Generierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellklone in der AG Hoth zu etablieren.

6.2.1 Generierung pp65-spezifischer $CD8^+$ T-Zellklone

Eine entscheidende Frage bei der Generierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellklone ist die Wahl des Antigens. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits beschrieben, dass das humane Zytomegalievirus (CMV) starke Immunantworten induziert (Rosa & Diamond 2013; Sylwester et al. 2005) und speziell Antigene des CMV-Matrixproteins pp65 (Phosphoprotein 65) sehr effektive $CD8^+$ T-Zellantworten hervorrufen (Kern et al. 1999; Wills et al. 1996; Slezak et al. 2007).

Zur antigenspezifischen Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen wurden $CD8^+$ T-Zellen eines HLA-A2⁺ PBMC-Spenders wöchentlich mit pp65-beladenen $CD8^-$ T-Zellen (die nicht markierten Zellen der positiven $CD8^+$ T-Zellisolation) über einen Zeitraum von vier Wochen stimuliert. Anschließend wurden die antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen isoliert (CTL_{pp65}), vereinzelt, expandiert und schließlich funktionell untersucht (Abbildung 5A-E).

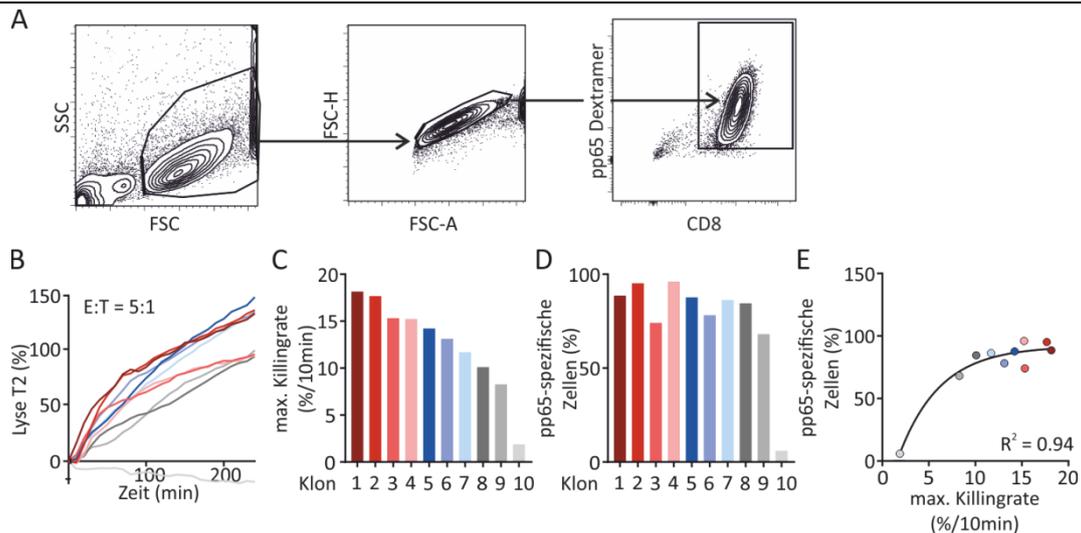


Abbildung 5: Funktionelle Analyse pp65-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone. (A) Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Analyse, mittels pp65-spezifischer Dextramere, der CTL_{pp65} zur Erfassung der Antigenpezifität gegen pp65 anhand eines repräsentativen Klon. (B und C) Darstellung der Lysekinetik (B) und der maximalen Killingrate (C) von pp65-beladenen T2 Zielzellen durch CTL_{pp65} im Real-time Killing Assay (Klon 1-10). (D) Quantitative Analyse aller CTL_{pp65} auf den Anteil an pp65-spezifischen T-Zellen innerhalb einer Klonpopulation. (E) Korrelation der maximalen Killingrate und der Antigenpezifität der CTL_{pp65}.

Mittels Real-time Killing Assay wurde die antigenspezifische Zytotoxizität der generierten Klone untersucht. Neun von zehn Klonpopulationen zeigten ein effizientes Lyse-Potential mit einer Endlyse der Zielzellen von mindestens 95 % (Abbildung 5B). Um die Anzahl der verwendeten Zellen für die funktionelle Analyse zu minimieren, wurden in diesem Schritt 384-Well Platten anstatt der 96-Well Platten verwendet, die die Experimentdurchführung erschweren und damit zu Varianzen bei den detektierten Fluoreszenzwerten geführt haben. Mittels pp65-spezifischen Dextrameren wurde in der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt, dass neun der zehn Klonpopulationen einen Anteil von mindestens 68 % an antigenspezifischen Zellen enthalten (Abbildung 5D). Die Korrelation der max. Killingrate (Abbildung 5C), ein Wert der die höchste Zielzelllyse innerhalb zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten (10 min) widerspiegelt, und der Antigenpezifität (Abbildung 5D) ergab eine Sättigungskurve mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,94$ (Abbildung 5E). So liegt die maximale Killingrate in einer Klonpopulation mit knapp 68 % antigenspezifischer Zellen noch bei 8,3 %/10 min, während der Anteil von 74 % pp65-spezifischer T-Zellen bereits zu einer maximalen Killingrate von über 15 %/10 min führt. Die durchschnittliche maximale Killingrate der antigenspezifischen Klone 1-9 liegt mit $\bar{13,8\%}/10 \pm 3,1$ min (n=9) deutlich über der mittleren maximalen Killingrate von SEA-stimulierten CTL mit $8,7\%}/10 \pm 4$ min (n=24). Somit ist neben der physiologischen Interaktion zwischen CD8⁺ T-Zelle und Zielzelle auch die effektivere Zielzelllyse als weiterer Vorteil der CD8⁺ T-Zellklonierung zu nennen.

6.2.2 Tumorspezifische CD8⁺ T-Zellklone

6.2.2.1 Generierung MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone

Mit der Herstellung pp65-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone war es möglich, die physiologische Interaktion des TCR der T-Zelle mit dem Antigen, präsentiert über den MHC I der Zielzelle, zu untersuchen. Als Zielzellen kamen dafür im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich exogen Peptid-beladene T2 Zellen zum Einsatz. Im nächsten Schritt sollten CD8⁺ T-Zellklone für MART1_{26-35A27L} (Sequenz: ELAGIGILTV) generiert werden. Diese Klone (CTL_{MART1}) können direkt mit Melanomzellen als Zielzellen interagieren, da Melanomzellen bereits endogen das korrespondierende Antigen exprimieren. Auch Wöfl und Greenberg haben dieses Peptid verwendet und es als Referenzbedingung in ihrer Publikation über die Stimulation naiver, humaner CD8⁺ T-Zellen mit Tumor-spezifischen Antigenen beschrieben (Wöfl & Greenberg 2014). Dieses veröffentlichte Protokoll diente in dieser Arbeit als Grundlage zur Generierung MART1- bzw. tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellklone.

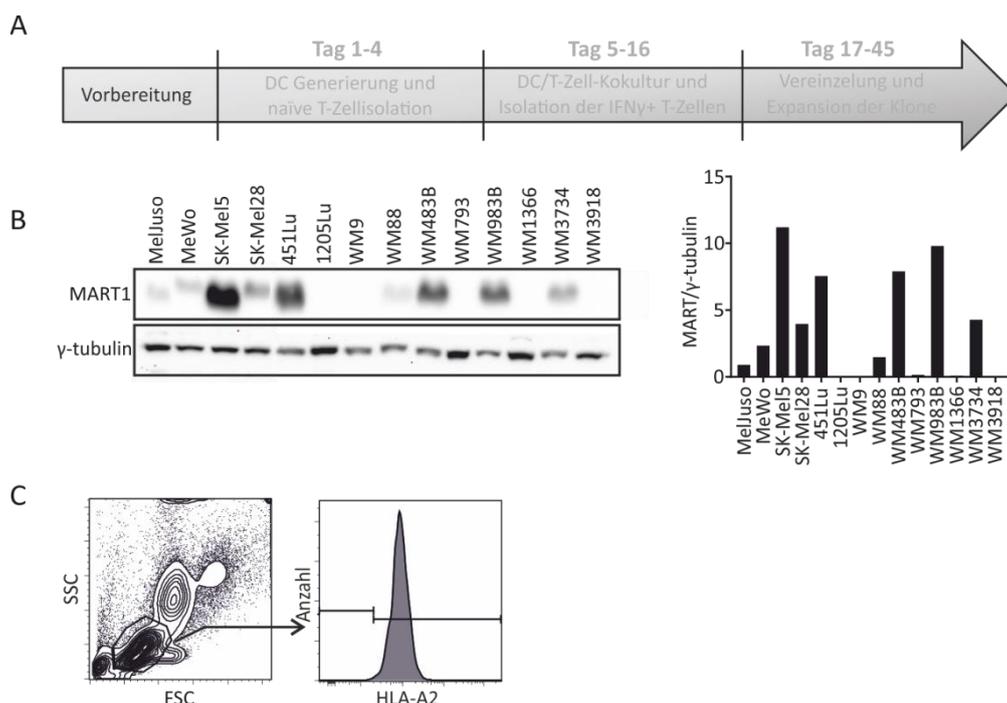


Abbildung 6: Die Melanomzelllinie SK-Mel5 ist eine geeignete Zielzelllinie zur Untersuchung der Zytotoxizität von CTL_{MART1}. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wöfl & Greenberg 2014. (B) MART1 Proteinexpressionsanalyse aller in der AG Hoth kultivierten Melanomzelllinien. (C) Gatingstrategie zur Bestimmung des HLA-A2 Status der PBMC Spender.

Wie in Abbildung 6A illustriert, gliedert sich die Generierung MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone (CTL_{MART1}) in insgesamt vier aufeinanderfolgende Schritte auf. Als erster Schritt wurden unterschiedliche Melanomzelllinien auf die Expression von MART1 untersucht und quantitativ analysiert (Abbildung 6B). Neben den kommerziell erhältlichen Zelllinien MelJuso,

Ergebnisse

MeWo, SK-Mel5 und SK-Mel28 wurden auch Zelllinien, die im Wistar Institut (Philadelphia, PA, USA) unter der Leitung von Prof. Meenhard Herlyn generiert wurden, in einer gemeinsamen Kollaboration mit Ivan Bogeski (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universitätsmedizin Göttingen) getestet. Mit einem Faktor von 11,4 verglichen zur Expression des Referenzgens γ -Tubulin, hat die Melanomzelllinie SK-Mel5 die höchste Expression an MART1 gezeigt. Da das Antigen MART1_{26-35A27L} spezifisch für den MHCII-Serotyp HLA-A2 ist, wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen ein HLA-A2⁺ PBMC Spender ausgewählt (Abbildung 6C).

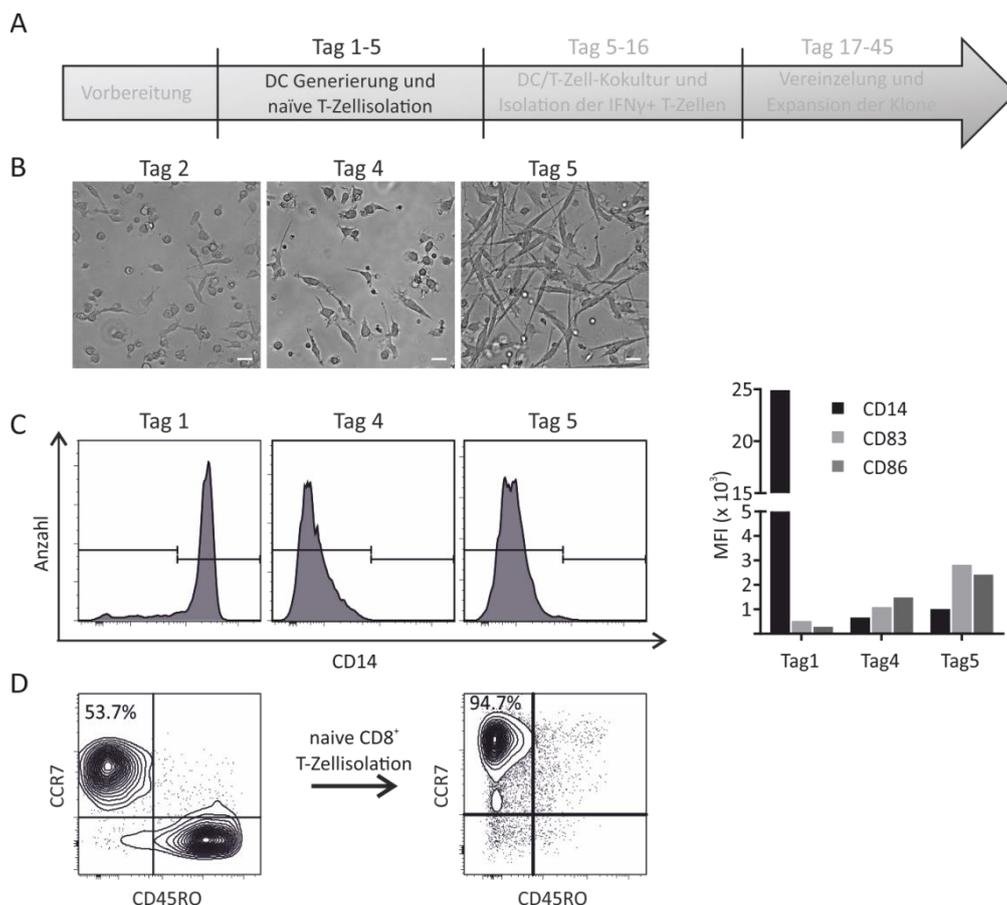


Abbildung 7: Generierung dendritischer Zellen und Isolation naiver CD8⁺ T-Zellen für die Generierung MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wölfl & Greenberg 2014. (B) Transmissionsaufnahmen an Tag 2, 4 und 5 der DC-Generierung. (C) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle CD14, CD83 und CD86 an Tag 1, 4 und 5 der DC-Generierung. (D) Durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung von CD8⁺ T-Zellen vor und nach der Aufreinigung naiver CD8⁺ T-Zellen. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 20 μ m.

Die Generierung antigenpräsentierender, ausgereifter DC erfolgt innerhalb von 5 Tagen (Abbildung 7A). Diese Ausreifung wurde morphologisch (Abbildung 7B) und durchflusszytometrisch (Abbildung 7C) verfolgt. Monozyten weisen eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD14 auf, der während der weiteren Ausreifung der DC herunterreguliert wird. Parallel findet eine Hochregulation an kostimulatorischen Moleküle wie CD83 und CD86 statt (Abbildung 7C). Am Anfang des Differenzierungsprotokolls waren mittels mikroskopischer

Analysen hauptsächlich rundliche und kleinere Monozyten erkennbar, die sich bis Tag 4 zu größeren mit mehr Ausläufer gekennzeichneten unreifen DC weiterentwickelt haben. Nach Antigenzugabe haben sich die DC schließlich an Tag 5 zu stark adhärenenten und lang gezogenen APC differenziert (Abbildung 7B). Naive CD8⁺ T-Zellen wurden an Tag 4 mit einer Reinheit von 94,7 % isoliert (Abbildung 7D). Die ausgereiften, MART1-präsentierenden DC wurden an Tag 5 geerntet, mit 30 Gy bestrahlt und letztendlich mit den naiven CD8⁺ T-Zellen für 10 Tage kokultiviert.

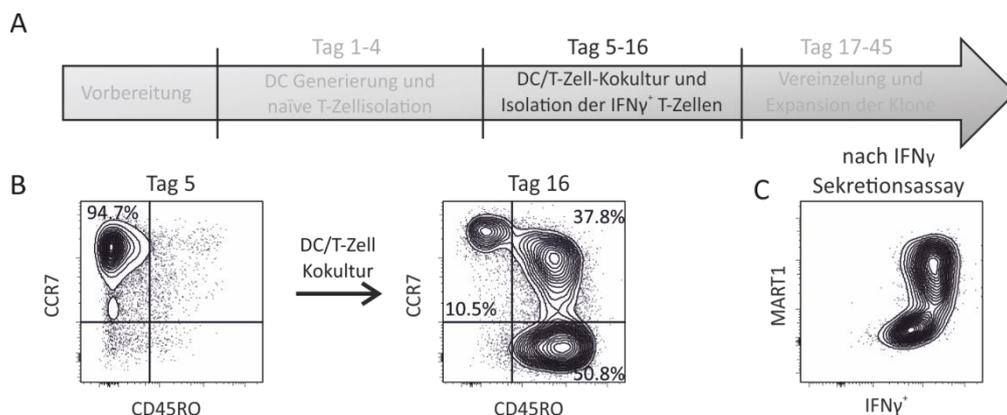


Abbildung 8: Analyse MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach DC/T-Zell-Kokultur für die Generierung MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wölf & Greenberg 2014. (B) CD8⁺ Subtypenanalyse nach naiver T-Zell Isolation an Tag 5 und an Tag 16 nach abgeschlossener DC/T-Zell-Kokultur. (C) Durchflusszytometrische Messung der MART1-stimulierten CD8⁺ T-Zellen nach erfolgtem IFN γ -Sekretionsassay.

Wie bereits in Abbildung 7D gezeigt, wurden naive CD8⁺ T-Zellen mit einer Reinheit von knapp 95 % in die DC-T-Zellkokultur eingesetzt. Die Zellen wurden an Tag 5 (Start der DC-CD8⁺-Kokultur) mit IL-21 und an Tag 8, 11 und 13 mit den Wachstumsfaktoren IL-7 und IL-15 behandelt. An Tag 16 wurde eine erneute Subtypenanalyse der CD8⁺ T-Zellen durchgeführt (Abbildung 8B). Während sich die CD45RO⁺/CCR7⁻ Effektor-Gedächtniszellen T_{EM} mit mehr als 50 % angereichert haben, reduzierte sich der Anteil an CD45RO⁺/CCR7⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen auf knapp 10 %, was auf eine erfolgreiche Stimulation der CD8⁺ T-Zellen hindeutet. Diese Zellen wurden erneut mit autologen MART1-beladenen PBMC für 6 h restimuliert. Da dadurch ausschließlich antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen zur einer Sezernierung des pro-inflammatorischen Zytokins IFN γ angeregt werden, können diese anschließend mit Hilfe eines IFN γ Sezernierungskits aufgereinigt und mit MART1-spezifischen Dextrameren gefärbt werden (Abbildung 8C). Aufgrund der geringen Zellzahl konnte keine Negativkontrolle gemessen werden, was für die Quantifizierung der MART1-spezifischen Zellen in der IFN γ ⁺ Population notwendig gewesen wäre. Der „Contour-Blot“ zeigte allerdings eine Auftrennung in eine größere MART1-positive und eine kleinere MART1-negative Population, was auf eine erfolgreiche Anreicherung MART-1 spezifischer CD8⁺ T-Zellen schließen lässt. Die so aufgereinigten Zellen

Ergebnisse

wurden anschließend auf 96-Rundwell-Platten vereinzelt und das Wachstum klonaler Populationen MART1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Zytokin- und anti-CD3 Antikörperzugabe induziert. An Tag 31 wurden die Platten auf hochgewachsene Kolonien überprüft und diese in einer weiteren zweiwöchigen Kultur in 25 cm² Zellkulturflaschen expandiert.

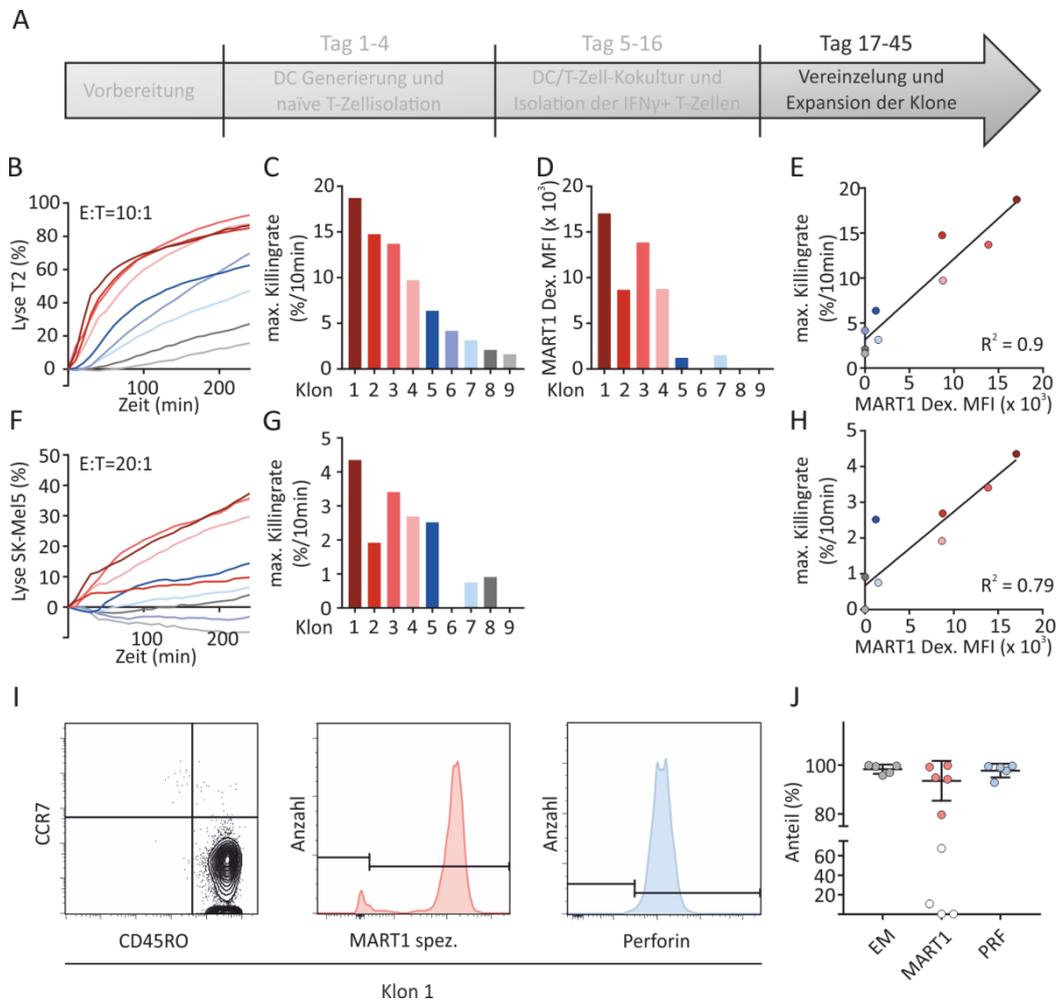


Abbildung 9: Funktionelle Analyse der generierten MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wölfel & Greenberg 2014. (B-H) Darstellung der Lysekinetik und der maximalen Killingrate von MART1-beladenen T2 Zielzellen (B, C) und SK-Mel5 Zielzellen (F, G) durch CTL_{MART1} im Real-time Killing Assay. Die maximale Killingrate wurde im Fall von negativen Lysewerten zum Endzeitpunkt des Assays auf einen Wert von 0 %/10 min festgelegt. Quantitative Analyse aller CTL_{MART1} auf ihre mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des MART1-Dextramersignals (D). Korrelation der maximalen Killingrate von MART1-beladenen T2 Zielzellen (E) oder SK-Mel5 Zellen (H) mit der Antigenspezifität der CTL_{MART1}. (I und J) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von Klon 1 auf die CD8⁺ Subtypenverteilung, MART1-Spezifität und den Perforingehalt (I). Die durchflusszytometrische Analyse zur Ermittlung der MART1-Spezifität wurde in allen expandierten Klonen untersucht (Klon 1-5 in rot, 6-9 in weiß dargestellt), während die Subtypen-Analyse (grau) und die Ermittlung der Perforingehalts (blau) nur in Klon 1-5 durchgeführt wurden. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD (J).

An Tag 45 wurden die 9 erfolgreich expandierten MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone funktionell analysiert (CTL_{MART1}). Zunächst wurden die T-Zellen mittels Real-time Killing Assay auf ihr antigenspezifisches zytotoxisches Potential untersucht. Dafür wurden sie als

Effektorzellen gegen MART1-beladene T2 (Abbildung 9B) und SK-Mel5 Zielzellen (Abbildung 9F) eingesetzt. In beiden Fällen zeigten alle untersuchten Klone eine starke Variabilität in ihrer Killingeffizienz. Die maximale Killingrate der T2 Zielzellen reichte von 1,6 %/10 min bei Klon 9 bis 18,73 %/10 min bei Klon 1 (Abbildung 9C). Im direkten Vergleich lag die Lyse der Melanomzelllinie SK-Mel5 mit einer maximalen Killingrate von 4,35 %/10 min durch Klon 1 deutlich darunter. So wurde im Fall der SK-Mel5 Lyse vermittelt durch Klon 9 und Klon 6 sogar negative Lyseergebnisse detektiert, die allerdings als Artefakte angesehen werden können. Aus diesem Grund wurden auch deren Killingraten auf einen Wert von 0 %/10 min festgesetzt (Abbildung 9G). Alle Klone wurden zudem auf ihre Antigenpezifität mittels Dextramerfärbung in durchflusszytometrischen Untersuchungen analysiert (Abbildung 9D). Ähnlich wie bei der Zielzellyse von T2 bzw. SK-Mel5 Zellen haben die 9 untersuchten Klone auch hier sehr divergente Werte gezeigt. Die MFI hat dabei von 3,85 (Klon 9) bis 17045 (Klon 1) gestreut. Interessanterweise haben die Werte der maximalen Killingraten beider Zelllinien und die MFI-Werte der Dextramerfärbung linear miteinander korreliert. Das Bestimmtheitsmaß von maximaler Killingrate T2/MFI liegt dabei bei $R^2=0,9$ (Abbildung 9E) und für SK-Mel5/MFI bei $R^2=0,82$ (Abbildung 9H). Fünf Klone mit den höchsten maximalen Killingraten wurden daraufhin zusätzlich auf ihre Subtypenverteilung und ihren Perforingehalt untersucht (Abbildung 9I). Unabhängig ihres zytotoxischen Potentials oder ihrer Antigenpezifität waren 95,8-99,9 % aller Zellen Effektor-Gedächtniszellen. Auch der Anteil Perforin⁺ Zellen hat sich zwischen Klon 1-5 kaum unterschieden (92,9-99,7 %) (Abbildung 9J). Somit ist ein Rückschluss auf das antigenspezifische zytotoxische Potential anhand einer Subtypenanalyse bzw. anhand des Perforingehalts alleine nicht möglich.

Die Generierung MART1-spezifischer T-Zellklone war erfolgreich, was eine direkte pMHC1-TCR-Interaktion von CD8⁺ T-Zellen mit endogen MART1-exprimierenden Melanomzellen erlaubt. In der AG Hoth kann somit ab sofort die antigenspezifische Interaktion von Zielzellen und CTL wie sie *in vivo* stattfindet auch *in vitro* untersucht werden.

6.2.2.2 Generierung gp100-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits MART1-spezifische CD8⁺ T-Zellklone generiert (siehe Kapitel 6.2.2.1). Im folgenden Schritt sollten nun Klone spezifisch für gp100_{209-217(T210M)} (Sequenz: IMDQVPFSV) hergestellt werden. Dieses Antigen ist von besonderem Interesse, da eine Expression dieses Proteins in der verwendeten Melanomzelllinie SK-Mel5 bereits nachgewiesen ist (Chen et al. 2012). Außerdem wurde in anderen Studien gezeigt, dass gp100 auch von GBM-Tumorzellen exprimiert wird (Saikali et al. 2007; Liu et al. 2004). Primäre GBM-

Ergebnisse

Zellen wurden der AG Hoth bereits über eine Kollaboration mit der klinischen Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. Steffi Urbschat zur Verfügung gestellt. Neben der Melanomzelllinie SK-Mel5 könnten somit zukünftig auch primäre GBM-Zellen als interessante potentielle Zielzellen für CTL_{gp100} eingesetzt werden. Bei dem Antigen gp100_{209-217(T210M)} handelt es sich allerdings um ein TAA mit geringerer Frequenz an antigenspezifischen T-Zellen aus dem naiven Repertoire. Um die Effizienz der antigenspezifischen Stimulation nach Wöfl und Greenberg zu optimieren, wurden im Folgenden verschiedene Bedingungen getestet, die sich womöglich fördernd auf die Ausbeute antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen auswirken könnten (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Auflistung der getesteten Bedingungen der DC/T-Zell-Kokultur zur Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone

Bedingung	Beschreibung
I	+DC \checkmark (Standard) Beschrieben bei Wöfl & Greenberg 2014
II	+DC \checkmark + PBMC \checkmark Zusätzliche Zugabe von autologen, bestrahlten PBMC als Fütterzellen zur DC/T-Zell-Kokultur
III	+DC Ausgereifte DC wurden vor DC/T-Zell-Kokultur nicht bestrahlt
IV	+DC + PBMC \checkmark Ausgereifte DC wurden vor DC/T-Zell-Kokultur nicht bestrahlt; zusätzliche Zugabe von autologen, bestrahlten PBMC als Fütterzellen zur DC/T-Zell-Kokultur
V	+IL-21 Zusätzliche Zugabe von 10 ng/ml IL-21 an Tag 8, 11, 13 während der DC/T-Zell-Kokultur
VI	+IL-21 Zusätzliche Zugabe von 30 ng/ml IL-21 an Tag 8, 11, 13 während der DC/T-Zell-Kokultur

Laut dem publizierten Protokoll von Wöfl und Greenberg werden die ausgereiften DC vor der DC/T-Zell-Kokultur mit 30 Gy bestrahlt, um die Proliferation von kontaminierenden Zellen wie NK-Zellen zu verhindern. Wie in Abbildung 10A dargestellt startet die DC/T-Zell-Kokultur an Tag 5 des Protokolls, an dem gleichen Tag erfolgt laut Standardprotokoll auch die Zugabe von 30 ng/ml IL-21, das die proliferative Kapazität der T-Zellen erhält und so eine robuste Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen fördert (Li et al. 2005). An Tag 8, 11 und 13 werden laut Protokoll geringe Mengen an IL-7 und IL-15 zugegeben, die unterstützend auf die antigenspezifische T-Zellantwort wirken (Alves et al. 2005). Bei diesem langwierigen Protokoll gibt es zahlreiche Möglichkeiten, Bedingungen zu modifizieren bzw. zu optimieren. Zum einen

Ergebnisse

könnte die Zugabe von sogenannten Fütterzellen (in diesem Fall bestrahlte autologe PBMC) die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen durch Zell-Zell-Kontakte fördern (Bedingung II und IV). Außerdem könnte die Bestrahlung der DC deren Fähigkeit zur Stimulation der T-Zellen negativ beeinflussen (Bedingung II und IV). Des Weiteren berichteten Wöfl und Greenberg von präliminären Daten, die darauf hinweisen, dass eine zusätzliche Zugabe von IL-21 an den Tagen 8, 11 und 13 sehr wohl positive Effekte auf die Effizienz der Stimulation haben kann und wurde aus diesem Grund auch im Rahmen dieser Arbeit getestet (Bedingung V und VI). Die CD8⁺ T-Zellen wurden nach der DC/T-Zell-Kokultur unter verschiedenen Bedingungen auf ihr zytotoxisches Potential sowie ihre Antigen-spezifität untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 10 dargestellt.

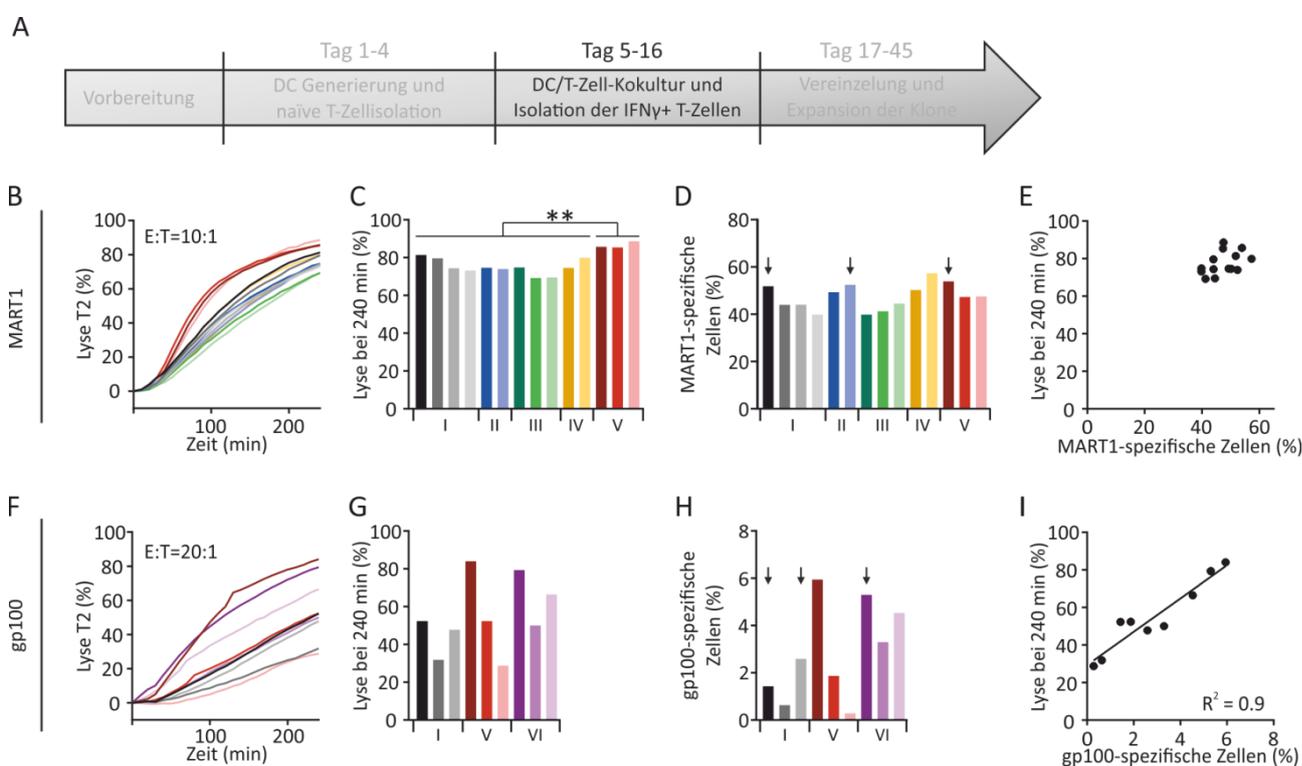


Abbildung 10: Funktionelle Analyse CD8⁺ T-Zellen nach der DC/T-Zell-Kokultur unter verschiedenen Bedingungen (siehe Tabelle 10). (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wöfl & Greenberg 2014. (B-I) Darstellung der Lysekinetik und der Endzeitpunktlyse von MART1- (B, C) bzw. gp100- (F, G) beladenen T2 Zielzellen durch MART1- bzw. gp100-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Real-time Killing Assay. Quantitative Analyse aller expandierten MART1- (D) bzw. gp100- (H) stimulierten CD8⁺ T-Zellen auf deren Anteil an antigenspezifischen T-Zellen mittels antigenspezifischer Dextramere im Durchflusszytometer. Korrelation der Lyse zum Endzeitpunkt des Real-time Killing Assays von MART1-beladenen (E) bzw. gp100-beladenen T2 Zielzellen (I) mit der Antigen-spezifität der expandierten MART1- bzw. gp100-stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C, D, G und H jeweils ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der Real-time Killing Assay wurde von Gertrud Schwär durchgeführt.

Die MART1-spezifische CD8⁺ T-Zell Stimulation erfolgte in insgesamt 14 unterschiedlichen Ansätzen, wobei 5 verschiedene Bedingungen getestet wurden (4 x Bedingung I, 2 x Bedingung II, 3 x Bedingung III, 2 x Bedingung IV, 3 x Bedingung V, siehe Tabelle 10). Die MART1-

Ergebnisse

stimulierten CD8⁺ T-Zellen lysierten innerhalb von 4 h durchschnittlich $77,47 \pm 5,8$ % MART1-beladene T2 Zellen im Real-time Killing Assay und zeigten somit keine großen Schwankungen zwischen den verschiedenen Bedingungen (Abbildung 10A, B). Allerdings ist zu beachten, dass die signifikant höchsten Lyseergebnisse von den MART1-stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus den drei Ansätzen der Bedingung V (Zugabe von 10 ng/ml IL-21) stammten ($86,6 \pm 1,8$ %). Auch der Anteil an MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit $47,4 \pm 5,2$ % war in allen Ansätzen vergleichbar (Abbildung 10D). Die gp100-spezifische CD8⁺ T-Zell Stimulation erfolgte in insgesamt 9 unterschiedlichen Ansätzen, wobei 3 verschiedene Bedingungen getestet wurden (3 x Bedingung I, 3 x Bedingung V, 3 x Bedingung VI, siehe Tabelle 10). Es zeigte sich eine starke Variabilität zwischen den unterschiedlichen Ansätzen, sowohl beim Real-time Killing Assay (Lyse bei 240 min $54,8 \pm 19$ %; Abbildung 10F,G) als auch beim Anteil gp100-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ($2,9 \pm 1,9$ %; Abbildung 10 H). Vor allem in den Ansätzen der Bedingung VI (Zugabe 30 ng/ml IL-2 zur DC/T-Zell-Kokultur) lagen in beiden Fällen, also der T2-Lyse ($65,3 \pm 14,7$ %) und der Antigenpezifität ($4,4 \pm 1$ %), die detektierten Werte über denen des Durchschnitts. Allerdings konnte aufgrund der geringen Anzahl an getesteten gp100-stimulierten Populationen keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Zugabe von IL-21 sowohl im Falle der MART1- als auch der gp100-Stimulation von CD8⁺ T-Zellen von Vorteil ist. Durch die homogene Verteilung gleichgroßer Werte sowohl bei der Zielzellyse von MART1-beladenen T2 Zellen als auch dem Anteil an MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, ergibt sich bei der Korrelation der beiden Werte eher eine Punktwolke als eine Trendlinie (Abbildung 10E). Die Antigenpezifität korrelierte hingegen linear mit der zytotoxischen Kapazität gp100-stimulierter CTL ($R^2=0,9$) (Abbildung 10I). Die in der Abbildung 10D und H mit Pfeilen gekennzeichneten Ansätze wurden zur Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone weiterverwendet.

Ergebnisse

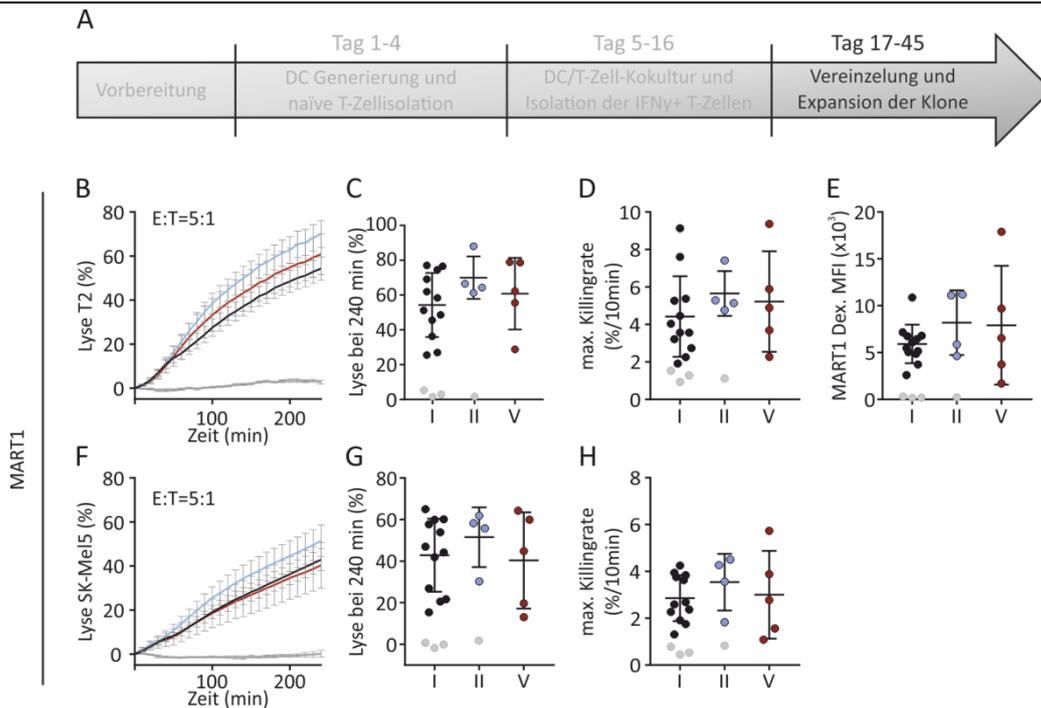


Abbildung 11: Funktionelle Analyse der generierten MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone abstammend von unterschiedlich stimulierten CD8⁺ T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wölfel & Greenberg 2014. (B-H) Darstellung der Lysekinetik, der Enzeitpunktlyse und der maximalen Killingrate von MART1-beladenen T2 (B, C, D) und SK-Mel5 Zielzellen (F, G, H) durch CTL_{MART1}, kategorisiert nach Stimulationsbedingung, im Real-time Killing Assay. Quantitative Analyse aller CTL_{MART1} nach deren medianen Fluoreszenzintensität (MFI) des MART1-spezifischen Dextramersignals, kategorisiert nach Stimulationsbedingung (E). Alle CTL_{MART1}, die eine T2-Endlyse von <10 % zeigten wurden als *non-responders* (dt. nicht reaktive Zellen) kategorisiert (grau gekennzeichnet) und sind bei der Ermittlung der Mittelwerte nicht berücksichtigt worden. Der Real-time Killing Assay wurde von Gertrud Schwär durchgeführt. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde ein einfaktorieller Anova Test und Tukey's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach Beendigung der Klonierung wurden alle 25 expandierte MART1-spezifische CD8⁺ T-Zell Klone im Real-time Killing Assay auf ihr zytotoxisches Potential gegen MART1-beladene T2 Zellen (Abbildung 11B-D) und SK-Mel5 Zellen (Abbildung 11F-H) und ihre Antigenpezifität mittels Dextramärfärbung (Abbildung 11E) untersucht. Die Bedingungen II (Zugabe von bestrahlten, autologen PBMC zur DC/T-Zell-Kokultur) und V (Zugabe von 10 ng/ml IL-21 an den Tagen 8, 11, 13) scheinen in allen untersuchten Parametern einen positiven wenn auch keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Standard-Stimulationsbedingung zu haben. Außerdem war die Zugabe von IL-21 die einzige Bedingung, die keine *non-responders* hervorbrachte, dies war bei den Bedingungen I und II hingegen bei jeweils 20 % der Klone der Fall.

Ergebnisse

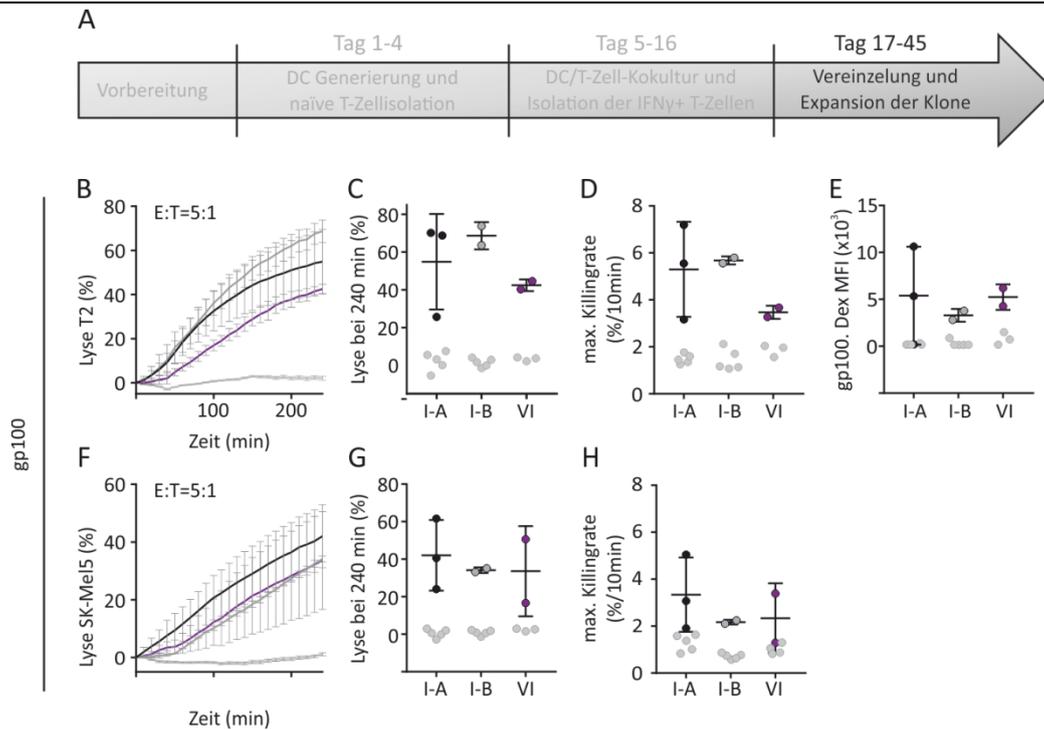


Abbildung 12: Funktionelle Analyse der generierten gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone abstammend von unterschiedlich stimulierten CD8⁺ T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Zeitabläufe der CD8⁺ T-Zellklonierung basierend auf dem Protokoll von Wölfel & Greenberg 2014. (B-H) Darstellung der Lysekinetik, der Enzeitpunktlyse und der maximalen Killingrate von gp100-beladenen T2 (B, C, D) und SK-Mel5 Zielzellen (F, G, H) durch CTL_{gp100}, kategorisiert nach Stimulationsbedingung, im Real-time Killing Assay. Quantitative Analyse aller expandierten gp100-spezifischen Klone nach deren medianen Fluoreszenzintensität (MFI) des gp100-spezifischen Dextramersignals, kategorisiert nach Stimulationsbedingung (E). Alle CTL_{gp100}, die eine T2-Endlyse von <10 % zeigten wurden als *non-responders* (dt. nicht reaktive Zellen) kategorisiert (grau gekennzeichnet) und sind bei der Ermittlung der Mittelwerte nicht berücksichtigt worden. Der Real-time Killing Assay wurde von Gertrud Schwär durchgeführt. Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde ein Kruskal-Wallis Test und Dunns Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Auch die insgesamt 20 expandierten gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone (CTL_{gp100}) wurden auf ihre Zytotoxizität gegen T2 Zellen (Abbildung 12B-D) und SK-Mel5 Zellen (Abbildung 12F-H) sowie ihre Antigenpezifität (Abbildung 12E) untersucht. Hier scheint die Bedingung VI (Zugabe von 30 ng/ml IL-21 an den Tagen 8, 11, 13) weder einen Effekt bei der Lyse von Zielzellen noch der Antigenpezifität der Klone im Vergleich zu den beiden Standardbedingungen I-A und I-B zu haben. Die Anzahl der *non-responders* ist durch die Zugabe von IL-21 (Ø60 %) im Vergleich zu den Standardbedingungen I-A (Ø62,5 %) und I-B (Ø71,4 %) leicht gesunken, wobei eine eindeutige Aussage erst bei einer größeren Anzahl expandierter Klone getroffen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden killingkompetente TAA-spezifische CD8⁺ T-Zellklone, 22 spezifisch gegen MART1 und 5 spezifisch gegen gp100, generiert. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Generierung tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellklone basierend auf dem Stimulationsprotokoll von Wölfel und Greenberg sowohl für MART1 als auch für das niedriger frequentierte TAA gp100 erfolgreich angewendet wurde.

6.2.3 Zytotoxische Kapazität der MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone

Im Folgenden wurde das zytotoxische Potential des MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons CTL_{MART1} 3 untersucht. Dafür wurde der zu untersuchende Klon aufgetaut und erneut expandiert. Wie in 5.3.5 beschrieben, dauert diese Prozedur 11 Tage. Die Zellen können anschließend von Tag 11 bis 14 für funktionale Analysen verwendet werden. An Tag 14 kann ggf. erneut eine Expansion der Klone gestartet werden. Das zytotoxische Potential des CTL_{MART1} Klon 3 wurde in verschiedenen Expansionen (gekennzeichnet mit 2., 3., 4.) unter Verwendung der zwei Zielzelllinien T2 (MART1-beladen) und SK-Mel5 in Real-time Killing Assays getestet. Außerdem wurde untersucht, ob die Klone auch innerhalb einer „Zwischen-Expansion“ (gekennzeichnet mit 2.-3., 3.-4.), also auch an den Tagen 4-7 des Expansionsprotokolls, verwendet werden können, sodass es möglich ist, mit diesen Zellen im wöchentlichen anstatt im zweiwöchentlichen Rhythmus zu arbeiten (Abbildung 13).

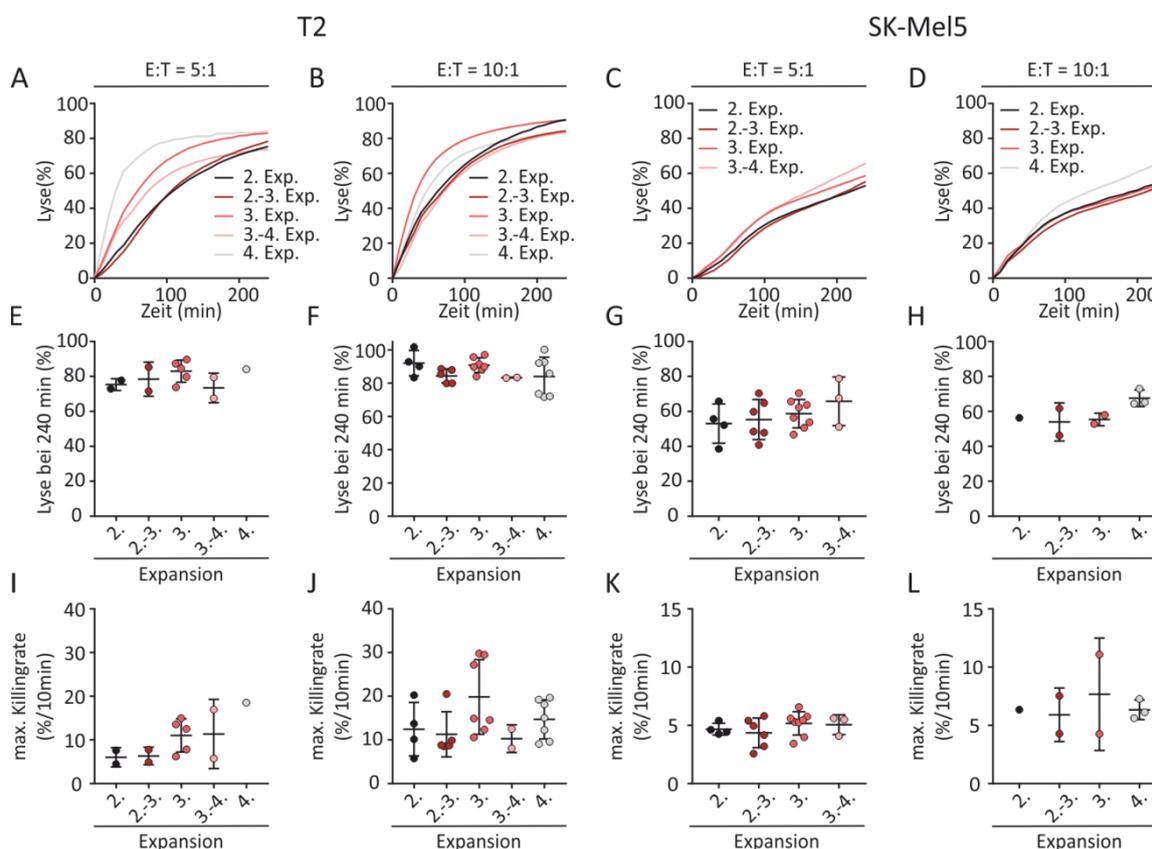


Abbildung 13: Keine signifikante Änderung des zytotoxischen Potentials von CTL_{MART1} zwischen unterschiedlichen Expansionen. (A-D) Darstellung der gemittelten Lysekinetik von MART1-beladenen T2 Zellen (A (n=1-5), B n=(2-7)) und SK-Mel5 Zellen (C (n=3-8), D(n=1-3)) mit zwei unterschiedlichen E:T-Ratios von 5:1 und 10:1 durch CTL_{MART1} Klon 3 im Real-time Killing Assay. (E-H) Darstellung der Endlyse zum Zeitpunkt 4 h der Zielzellen T2 (E, F) und SK-Mel5 (G, H) Zellen. (I-L) Analyse der maximalen Killingrate anhand der Lysekinetik von T2 (I, J) und SK-Mel5 (K, L) Zellen. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert ± SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde bei normalverteilten Datensätzen ein einfaktorielles Anova mit einem Tukey's Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde ein Kruskal-Wallis mit einem Dunn's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Unabhängig in welcher Expansion und zu welcher E:T-Ratio CTL_{MART1} Klon 3 im Real-time Killing Assay zum Killing von MART1-beladenen T2 Zellen eingesetzt wurde, blieb die Enzeitlyse nach 4 h konstant (E:T=5:1: $078,9 \pm 2,6 \%$; E:T=10:1: $086,9 \pm 3,5 \%$; Abbildung 13 E, F). Die scheinbare Tendenz zum Expansions-abhängigen Anstieg der maximalen Killingrate bei einer E:T-Ratio von 5:1, konnte in den Real-time Killing Assays mit einer E:T-Ratio von 10:1 nicht bestätigt werden (Abbildung 13I, J). Auch bei der Lyse der Melanomzelllinie SK-Mel5 wurde weder ein eindeutiger Unterschied zum Endzeitpunkt der Messung (E:T=5:1: $058,2 \pm 1,4 \%$; E:T=10:1 : $058,3 \pm 2,8 \%$) noch bei der maximalen Killingrate (E:T=5:1: $04,8 \pm 1,4 \%/10\text{min}$; E:T=10:1 : $06,6 \pm 1,3 \%/10\text{min}$) zwischen den verschiedenen Expansionen detektiert (Abbildung 13G, H, K, L). Was allerdings auffällt ist, dass die durchschnittlichen Endlysen der SK-Mel5 Zellen nach 4 h zwischen den E:T-Ratios von 5:1 und 10:1 fast identisch waren. Durch den Real-time Killing Assay können ausschließlich die Lysen von Zielzellen durch Verlust der PM-Integrität und den dadurch bedingten Austritt des Farbstoffs Calcein aus der Zelle detektiert werden. Werden die Zielzellen jedoch apoptotisch getötet, wodurch die PM-Integrität zunächst erhalten bleibt, kann der Zelltod erst indirekt nach dem Eintritt der Sekundärnekrose nachgewiesen werden. Womöglich ist also die Anzahl getöteter Zielzellen bei einer E:T-Ratio von 10:1 höher als bei 5:1, was jedoch mittels Real-time Killing Assay nicht nachgewiesen werden kann, da viele bereits apoptotische Zellen nach 4 h Messzeit eine noch intakte PM aufweisen. Der CTL_{MART1} Klon 3 zeigt bis zur 4. Expansion ein konstantes Lysepotential. Auch in den „Zwischen-Expansionen“ 2.-3. und 3.-4. sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Expansionen 2., 3. und 4. zu beobachten. Der CTL_{MART1} Klon 3 kann somit bis zur 4. Expansion in funktionellen Assays verwendet werden.

Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Avidität des CTL_{MART1} Klon 3 untersucht. Diese sogenannte Avidität spiegelt die Antigen-Sensitivität einer gesamten T-Zellklonpopulation wider (Viganò et al. 2012). Die funktionelle Avidität wird von verschiedenen Faktoren wie u. a. der TCR Affinität (also der Stärke des TCR mit dem pMHC), TCR Cluster-Bildung, Korezeptoren und Adhäsionsmoleküle beeinflusst (Ioannidou et al. 2017). Die Analyse der funktionellen Avidität wird meist unter limitierenden Antigen-Konzentrationen in IFN γ Elispot Assays oder ⁵¹Chromium Release Assays durchgeführt. In Abbildung 14 wurde erstmalig der Real-time Killing Assay zu diesem Zwecke angewendet.

Ergebnisse

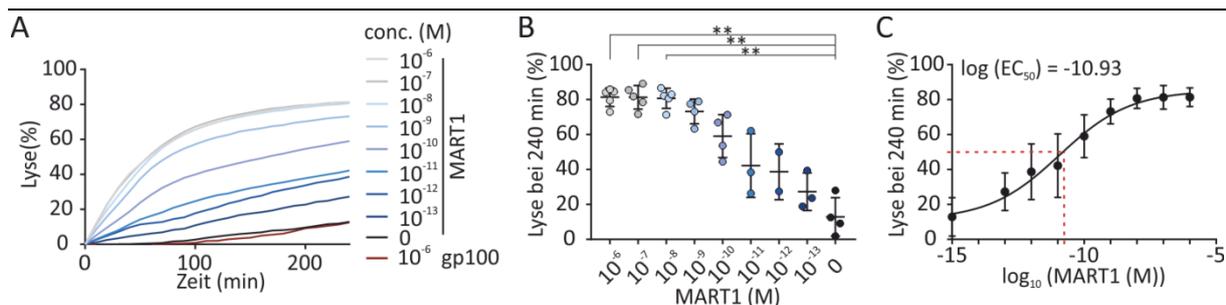


Abbildung 14: Die mittlere funktionelle Avidität des MART1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons 3 liegt bei $\log(EC_{50})=-10,93$. (A) Gemittelte Lysekinetik von T2 Zielzellen beladen mit unterschiedlichen Konzentrationen des MART1-Peptids durch CTL_{MART1} Klon 3 mit einer E:T-Ratio von 5:1 (n=2-5). Als Kontrolle der MART1-Spezifität des CTL_{MART1} Klon 3 wurden auch gp100-beladene T2 Zellen als Zielzellen eingesetzt. (B) Darstellung der Endlyse zum Zeitpunkt 4 h. (C) Analyse der mittleren funktionellen Avidität des CTL_{MART1} Klon 3 unter Korrelation der detektierten Endlyse von T2 Zellen zum Zeitpunkt 4 h mit der jeweilig beladenen Peptidkonzentration. Die Datenpunkte wurden mittels einer vier-Parameter Hill-Funktion gefittet. Die durchgeführten Real-time Killing Assays wurden z. T. von Gertrud Schwär pipettiert. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Mit Hilfe des Real-time Killing Assays wurde die Lyse von T2 Zellen, exogen beladen mit unterschiedlichen Konzentrationen des MART1-spezifischen Peptids, durch den CTL_{MART1} Klon 3 untersucht. Bei einer Peptidkonzentration von 10^{-6} - 10^{-8} M ist das zytotoxische Potential nicht beeinflusst. Erst bei niedrigeren Konzentrationen wurde eine stufenweise Herunterregulation der T2-Endlyse detektiert (Abbildung 14A, B). Die untersuchten Antigenkonzentrationen wurden logarithmisch gegen die korrespondierende gemittelte Endlyse aufgetragen (Abbildung 14C). Anhand dieser Daten wurde eine vier-Parameter Hill Funktion an die Daten gefittet.

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot HillSlope}}$$

Die Konzentration an dem die halbmaximale Lyseeffizienz des CTL_{MART1} Klon 3 erreicht wird, wurde mit einem Wert von $\log(EC_{50}) = -10,93$ ermittelt, was einer Konzentration von knapp 10^{-11} M entspricht.

6.3 Lyse von Melanomzellen durch CD8⁺ und natürliche Killerzellen

Mit der Generierung Melanom-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone steht mit den SK-Mel5 Zellen eine Zelllinie zur Verfügung, die als Zielzelle für zwei unterschiedliche zytotoxische Effektorzelltypen des angeborenen bzw. adaptiven Immunsystems, NK und CD8⁺ T-Zellen, eingesetzt werden kann (Abbildung 15A-I).

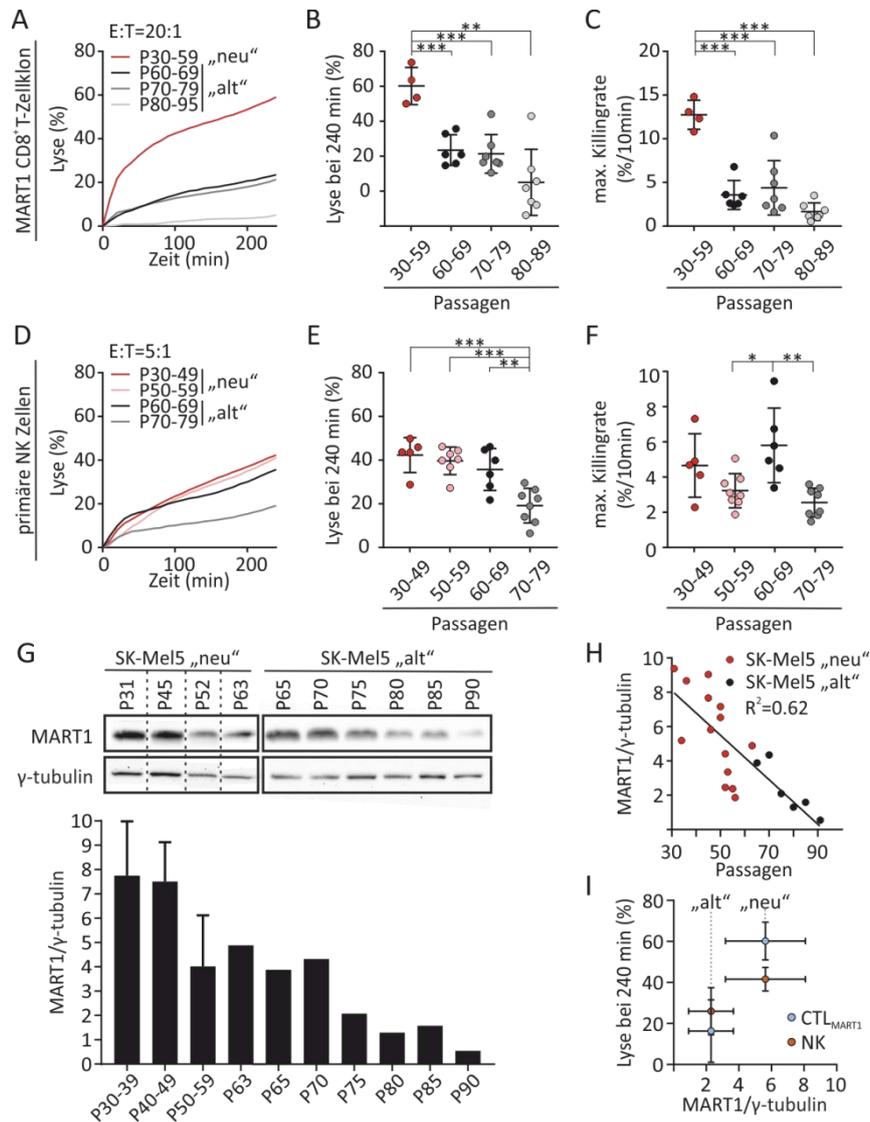


Abbildung 15: In vitro kultivierte SK-Mel5 Zellen entwickeln eine Passagen-abhängige Resistenz gegen die Lyse durch CTL_{MART1} und primäre NK-Zellen. (A-F) Darstellung der gemittelten Lysekinetik, der Lyse zum Endzeitpunkt 4 h und der maximalen Killingrate der SK-Mel5 Zellen in unterschiedliche Passagen (P) durch CTL_{MART1} Klon 3 (A-C, n=4-7) und primäre NK-Zellen (D-F, n=5-8) im Real-time Killing Assay. (G) MART1 Proteinexpressionsanalyse unterschiedlich lang kultivierter SK-Mel5 Zellen unter Angabe der Passage (n=1-7). Ursprünglich nicht direkt benachbarte Banden wurden durch gestrichelte Linien getrennt voneinander dargestellt. (H) Korrelation der normierten MART1 Proteinexpression mit der Passage der SK-Mel5 Zellen. (I) Korrelation der gemittelten Lyse zum Endzeitpunkt 4h durch CTL_{MART1} bzw. NK-Zellen mit der MART1 Expression „neuer“ (P30-60) und „alter“ (P61-90) SK-Mel5 Zellen. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert ± SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Relevanz wurde ein einfaktorier Anova und Tukey's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Ergebnisse

Zu Beginn des Projektes waren die im Labor kultivierten SK-Mel5 Zellen („alte“ SK-Mel5) in ihrer Passage mit einer Anfangspassage von über 60 bereits weit vorangeschritten. Mit zunehmender Passage zeichnete sich eine deutlich reduzierte Lyse durch CTL_{MART1} ab (Abbildung 15A-C). In den Passagen 60-69 und 70-79 waren die Werte der Endlyse ($\bar{0}23,5 \pm 8 \%$ und $\bar{0}21,4 \pm 10,2 \%$) und der maximalen Killingrate ($\bar{0}3,6 \pm 1,5 \%/10\text{min}$ und $\bar{0}4,4 \pm 2,9 \%/10\text{min}$) vergleichbar. Allerdings sind diese Werte in den darauf folgenden Passagen 80-95 drastisch gesunken (Endlyse: $\bar{0}5 \pm 17,5 \%$; maximale Killingrate: $\bar{0}1,65 \pm 0,92 \%/10\text{min}$) (Abbildung 15A-C). Der Einsatz einer neu erworbenen SK-Mel5 Zelllinie mit einer Anfangspassage von 31 („neue“ SK-Mel5) hatte eine signifikante Erhöhung der Lyseeffizienz mit einer Endlyse von $\bar{0}60,2 \pm 9,2 \%$ und einer maximalen Killingrate von $\bar{0}12,7 \pm 1,44 \%/10\text{min}$ durch CTL_{MART1} zur Folge (Passage 30-59) (Abbildung 15C-E). Auch die Lyse durch humane, primäre NK-Zellen wurde durch den Erwerb der Melanomzelllinie mit geringerer Anfangspassage um einen Faktor von zwei signifikant erhöht (Endlyse P70-79 $\bar{0}19,2 \pm 7,4 \%$ vs. Endlyse P30-49 $\bar{0}42,3 \pm 7,16 \%$) (Abbildung 15D-F). Es ist bekannt, dass eine hohe Anzahl an Passagen mit der Zeit einen Einfluss auf die charakteristischen Merkmale einer Zelllinie wie Morphologie, Wachstumsraten und Proteinexpression nimmt (ATCC 2010). So konnte auch in diesem Fall eine Passage-abhängige Reduktion der MART1 Proteinexpression von SK-Mel5 Zellen beobachtet werden (Abbildung 15G,H). Zelllinien werden in unserem Labor nach einer dreimonatigen Kultur verworfen und ihre Anfangspassage neu aufgetaut. Außerdem werden die SK-Mel5 Zellen zweimal pro Woche gesplittet, was dazu führt, dass diese Zelllinie innerhalb eines dreimonatigen Kulturzyklus rund 25 Passagen voranschreitet. Die „neuen“ SK-Mel5 Zellen exprimieren in ihrem dreimonatigen Kulturzyklus (P31-60) im Vergleich zu den „alten“ SK-Mel5 Zellen (P65-95) durchschnittlich die 2,5fache Menge an MART1 ($\bar{0}$ MART1/ γ -tubulin, „neue“ SK-Mel5=5,63; „alte“ SK-Mel5=2,3). Die Reduktion der MART1-Expression hat vermutlich auch eine verminderte MART1₂₇₋₃₅-Antigenpräsentation zur Folge, was die Verbesserung der CTL_{MART1}-vermittelten Lyse bei Verwendung der „neuen“ SK-Mel5 Zellen erklären würde ($\bar{0}$ Endlyse nach 4 h: „neue“ SK-Mel5=60,2 %; „alte“ SK-Mel5=16,2 %) (Abbildung 15I). Die Verwendung „neuer“ SK-Mel5 Zellen hatte auch auf die NK-Zell-vermittelte Lyse einen positiven, wenn auch nicht vergleichbar starken Effekt wie bei der CTL_{MART1}-vermittelten Lyse zur Folge ($\bar{0}$ Endlyse nach 4 h: „neue“ SK-Mel5=41,6 %; „alte“ SK-Mel5=26 %) (Abbildung 15I). Dies deutet daraufhin, dass sich neben der MART1-Expression auch andere Merkmale der Zelllinie durch Voranschreiten der Passagen verändern, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

6.3.1 Interdependenz der CD8⁺- und NK-vermittelten Zytotoxizität

Die Etablierung einer *in vitro* Kokultur von Tumorzellen mit CD8⁺ und NK-Zellen ermöglicht eine Analyse der dynamischen Interaktion von Tumor- und Effektorzellen und kann somit langfristig zu einer verbesserten Tumorbekämpfung *in vivo* beitragen. In bereits publizierten Kokultur-Modellen wurde der Einfluss von CD8⁺ bzw. NK-Zellen auf Melanomzellen untersucht (Balsamo, Vermi, et al. 2012; Neubert et al. 2016). Allerdings wurde die wechselseitige Abhängigkeit (Interdependenz) von NK und CD8⁺ hierbei nicht berücksichtigt, was im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte. Wie in Abbildung 15 gezeigt, kann die Zytotoxizität sowohl der NK- als auch der CTL_{MART1} an SK-Mel5 Zellen untersucht werden, welche sich somit als Modellzelllinie für diese Fragestellung anbietet (Abbildung 16).

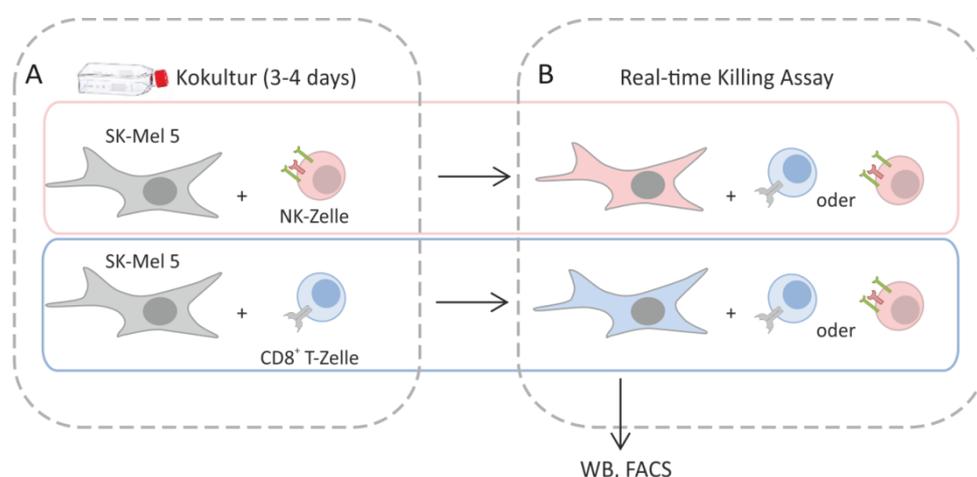
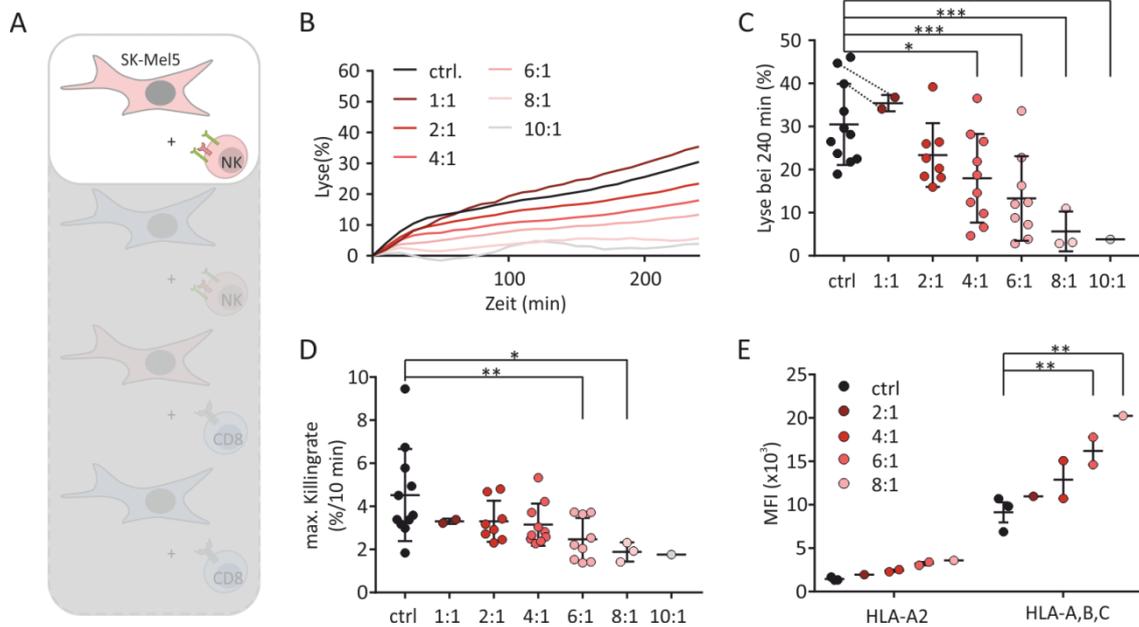


Abbildung 16: Modell zur Untersuchung einer wechselseitigen Abhängigkeit der Zytotoxizität von CTL_{MART1} und NK-Zellen. (A) SK-Mel5 Zellen, die sowohl für die NK- als auch die CTL_{MART1} vermittelte Lyse anfällig sind, wurden mit CTL_{MART1} oder NK-Zellen über eine Zeitspanne von 3-4 Tagen kokultiviert. (B) Die verbliebenen SK-Mel5 Zellen wurden anschließend geerntet und als Zielzellen im Real-time Killing Assay für beide Effektorzelltypen eingesetzt, zur funktionellen Analyse in Western Blot (WB) und durchflusszytometrischen Analysen (FACS) verwendet und ggf. zur weiteren Kokultur erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

6.3.1.1 Die NK-Kokultur mit SK-Mel5 Zellen führt zu einer Resistenz der Melanomzellen gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität

Bereits 2012 haben Balsamo und Kollegen einen Effekt beschrieben, bei dem Melanomzellen in Kokultur mit IL-2 stimulierten NK-Zellen eine Resistenz gegenüber NK-Zell-vermitteltem Killing entwickeln (Balsamo, Vermi, et al. 2012). Auch Sabrina Cappello untersuchte diesen Einfluss der NK-Zellen in der Kokultur mit der im Wistar Institut entwickelten Melanomzelllinie WM3734. Das von ihr entwickelte Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert (Abbildung 16) und zur Untersuchung einer wechselseitigen Abhängigkeit der Zytotoxizität von CTL_{MART1} und NK-Zellen anhand der Melanomzelllinie SK-Mel5 angewendet.

Ergebnisse



Die gemittelte Lysekinetik der SK-Mel5 Zellen zeigte eine stufenweise Reduktion der Lyseeffizienz durch NK-Zellen, welche sich umgekehrt proportional zum Anstieg des NK:SK-Mel5-Verhältnisses in der Kokultur verhielt (Abbildung 17A). Sowohl die Endlyse als auch die maximalen Killingrate der kokultivierten SK-Mel5 waren im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. So erreichten unbehandelte SK-Mel5 Zellen (ctrl) noch eine gemittelte Endlyse von $\bar{0}30,5 \pm 9 \%$ und eine maximale Killingrate von $\bar{0}4,52 \pm 2 \%/10\text{min}$, während bei einer Kokultur-E:T-Ratio von 10:1 die Endlyse bei $3,83 \%$ und die maximale Killingrate bei $1,76 \%/10\text{min}$ lag (Abbildung 17C, D). Parallel zur Lyseeffizienz wurde auch die Expression von MHC I, als inhibitorischer Rezeptor für NK-Zellen, und HLA-A2, dem Serotyp für die Präsentation von MART1_{27-35A27L}, untersucht. Sowohl das Signal des HLA-A2 Moleküls, als auch das gesamte Signal aller MHC I-Rezeptoren wurde mehr als verdoppelt, wenn man die Kontrolle mit dem Kokultur-Verhältnis 8:1 vergleicht (ctrl: HLA-A2 MFI = $\bar{0}1,45 \times 10^3$; HLA-A,B,C MFI = $\bar{0}9,13 \times 10^3$ und E:T=8:1: HLA-A2 MFI = $\bar{0}3,6 \times 10^3$; HLA-A,B,C MFI = $\bar{0}20,2 \times 10^3$) (Abbildung 17E). Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse stammen ausschließlich von Versuchen mit SK-Mel5 Zellen aus höheren Passagen („alte“ SK-Mel5, Passagen 65-90). Wie schon in Abbildung 15 dargestellt, ist die Lyseeffizienz durch sowohl CTL_{MART1}, als auch durch primäre NK-Zellen in den

höheren Passagen dieser Melanomzelllinie beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurden die Versuche im Real-time Killing Assay mit SK-Mel5 Zellen aus niedrigeren Passagen („neue“ SK-Mel5, Passage 30-60) wiederholt. Zum direkten Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit SK-Mel5 Zellen aus verschiedenen Passagen wurden die Endlysen nach 4 h Messzeit auf die jeweilige Kontrollbedingung normiert. Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigten beide Melanomzelllinien, also die „neuen“ und „alten“ SK-Zellen, nahezu deckungsgleiche Effekte. Dabei ist mit einem zunehmenden NK-SK-Mel5 Verhältnis in der Kokultur eine abnehmende Lyseeffizienz der Melanomzellen durch NK-Zellen im Real-time Killing Assay zu beobachten. In beiden Fällen verläuft diese Reduktion nahezu linear (SK-Mel5 P65-90: $R^2=0,97$; Steigung $-8,02 \pm 0,6 \%$ und SK-Mel5 P30-60: $R^2=0,97$; Steigung $-8,467 \pm 0,9 \%$).

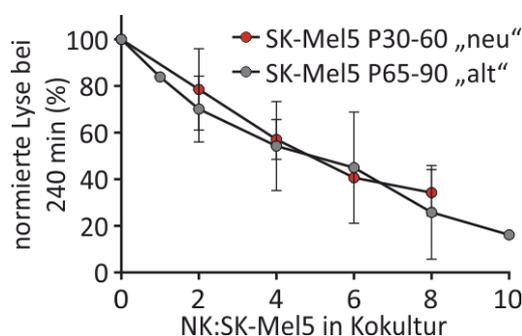


Abbildung 18: Die normierte Lyseeffizienz primärer NK-Zellen ist unabhängig von der Passage von SK-Mel5 Zellen im NK-SK-Mel5 Kokultur Modell. Darstellung der zur jeweiligen Kontrollbedingung normierten Lyse zum Endzeitpunkt 240 min von „alten“ und „neuen“ SK-Mel5 Zellen durch primäre NK-Zellen im Real-time Killing Assay (E:T=5:1) in Abhängigkeit zu der E:T-Ratio der NK:SK-Mel5-Kokultur. Die SK-Mel5 Zellen wurden kategorisiert abhängig von ihrer Passage (P). Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SD normiert zur Lyse der jeweiligen Kontrollbedingung zum Zeitpunkt 240 min (P30-60 n = 2-16; P65-90 n = 1-11;).

SK-Mel5 Zellen entwickeln somit eine Resistenz gegenüber der NK-vermittelten Zytotoxizität, wenn sie vorher einem Selektionsdruck durch NK-Zellen ausgesetzt worden sind. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits gewonnenen Erkenntnisse von Balsamo et. al und Sabrina Cappello (Balsamo, Vermi, et al. 2012).

6.3.1.2 Nach einer Kokultur mit CTL_{MART1} entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen die NK-vermittelte Lyse

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Kokultur von Melanomzellen mit CTL_{MART1} einen Einfluss auf die NK-vermittelte Lyse von SK-Mel5 Zellen hat (Abbildung 19).

Ergebnisse

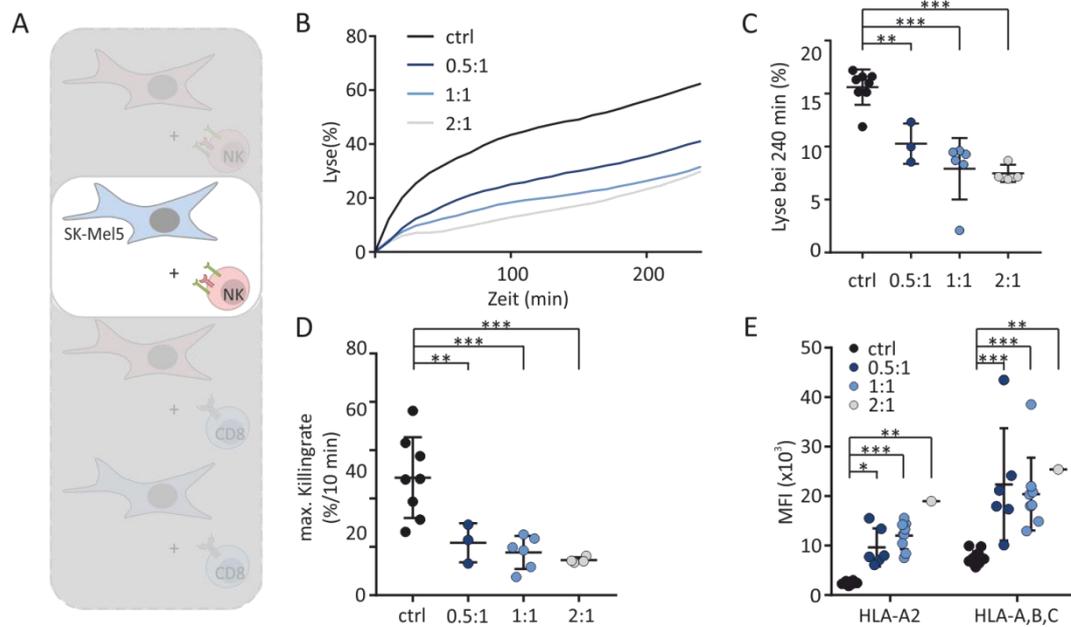


Abbildung 19: Nach einer Kokultur mit CTL_{MART1} entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen die NK-vermittelte Lyse. (A) SK-Mel5 Zellen wurden 3-4 Tage zusammen mit bestrahlten CTL_{MART1} (30 Gy) bei verschiedenen E:T-Ratios kokultiviert. (B) Darstellung der gemittelten Lysekinetik der SK-Mel5 Zielzellen durch primäre, humane NK-Zellen mit einer E:T-Ratio im Real-time Killing Assay von 10:1 (n=3-8) und unter Angabe des NK:SK-Mel5 Verhältnis zu Beginn der untersuchten Kokultur. (C und D) Analyse der Lyse zum Endzeitpunkt 240 min (C) und der maximalen Killingrate (D). (E) Durchflusszytometrische Analyse der SK-Mel5 Zellen auf ihre Expression des MART1-spezifischen MHC I Rezeptor HLA-A2 und der gesamten Expression an MHC I Proteinen (HLA-A,B,C) (n=1-12). Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert ± SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C und D ein einfaktorieller Anova mit Dunnett's Mehrfachvergleichstest und in E ein zweifaktorieller Anova mit Dunnett's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Ähnlich wie durch die Kokultur mit NK-Zellen (Abbildung 17), haben die SK-Mel5 auch nach einer Inkubation mit CTL_{MART1} eine Resistenz gegenüber der NK-vermittelten Zelllyse entwickelt (Abbildung 19B). Bereits ein CTL_{MART1}-Verhältnis von 0,5:1 in der Kokultur hatte eine signifikante Herunterregulation der Endlyse und der maximalen Killingrate von SK-Mel5 Zellen durch NK-Zellen im Real-time Killing Assay zur Folge. Im Vergleich zur Kontrolle war die Endlyse in der Kokultur um ein Drittel (ctrl=062,43 ± 6,2 %; 0,5:1=041,1 ± 6,2 %) und die maximale Killingrate sogar um mehr als die Hälfte (ctrl=012,16 ± 3,9 %/10min; 0,5:1=05,44 ± 1,7 %/10min) reduziert (Abbildung 19C,D). Parallel wurde in allen Kokultur-Bedingungen sowohl die HLA-A2 und als auch die gesamte MHC I Expression signifikant hochreguliert (Abbildung 19E).

Ergebnisse

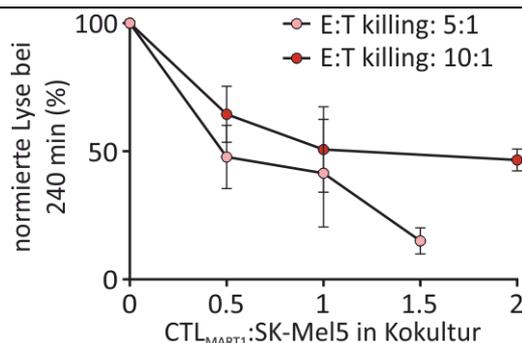


Abbildung 20: Die normierte Lyseeffizienz primärer NK-Zellen von SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit CTL_{MART1}, ist bei unterschiedlichen E:T-Ratios im Real-time Killing Assay herunterreguliert. Darstellung der zur jeweiligen Kontrollbedingung normierten Lyse zum Endzeitpunkt 240 min von SK-Mel5 Zellen durch primäre NK-Zellen im Real-time Killing Assay in Abhängigkeit der E:T-Ratio der CTL_{MART1}:SK-Mel5-Kokultur. Die SK-Mel5 Zellen wurden kategorisiert in Abhängigkeit der verwendeten NK:SK-Mel5-Ratio im Real-time Killing Assay. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SD normiert zur Lyse der jeweiligen Kontrollbedingung zum Zeitpunkt 240 min (5:1: n = 2-13; 10:1: n = 3-8).

Die Real-time Killing Assays wurden auch mit einer niedrigeren NK:SK-Mel5 Ratio von 5:1 durchgeführt, da der Einsatz weniger Effektorzellen womöglich einen noch stärkeren CTL_{MART1}-Kokultur-induzierten Effekt auf die Lyseeffizienz durch NK-Zellen enthüllt. So ist bei einer E:T-Ratio von 5:1 die normierte Lyse, der mit einem CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis von 1,5:1 kokultivierten SK-Mel5 Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, auf einen Wert von $\emptyset 15,02\% \pm 3,6$ gesunken. Bei einer E:T-Ratio von 10:1 im Real-time Killing Assay wurden hingegen durchschnittlich noch $\emptyset 46,7\% \pm 3,7$ SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit einem CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis von 2:1, durch die NK-vermittelte Zytotoxizität lysiert (Abbildung 20).

6.3.1.3 Die Kokultur von SK-Mel5 mit NK-Zellen hat keinen Effekt auf die Sensitivität der Melanomzellen gegenüber der CTL_{MART1}-vermittelten Zytotoxizität

Nachdem die Resistenz der SK-Mel5 Zellen gegen die NK-vermittelte Lyse durch eine Kokultur mit CTL_{MART1} nachgewiesen wurde, sollte nun der Effekt der NK-Zell-Kokultur auf das CTL_{MART1}-vermittelte Killing untersucht werden.

Ergebnisse

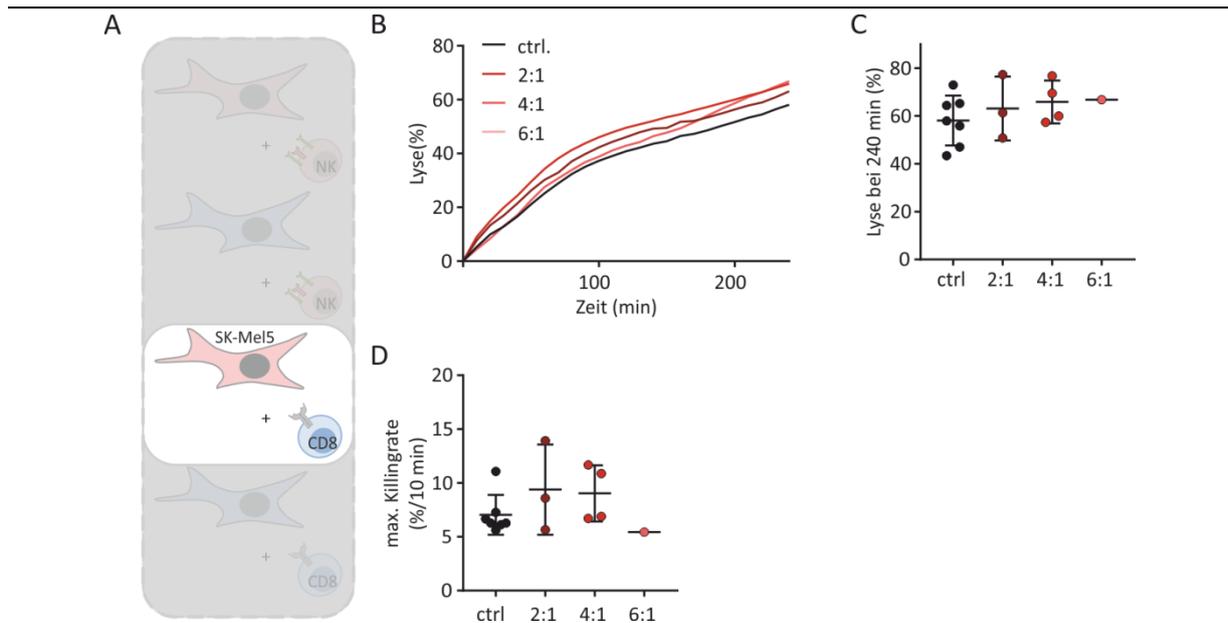


Abbildung 21: Die Kokultur von SK-Mel5 mit NK-Zellen hat keinen Effekt auf die Empfänglichkeit der Melanomzellen gegenüber der CTL_{MART1}-vermittelten Zytotoxizität. (A) SK-Mel5 Zellen wurden 3-4 Tage zusammen mit bestrahlten NK-Zellen (30 Gy) bei verschiedenen E:T-Ratios kokultiviert. (B) Darstellung der gemittelten Lysekinetik der SK-Mel5 Zielzellen durch CTL_{MART1} Zellen mit einer E:T-Ratio im Real-time Killing Assay von 5:1 (n=1-7) und unter Angabe des NK:SK-Mel5 Verhältnis zu Beginn der untersuchten Kokultur. (C und D) Analyse der Lyse zum Endzeitpunkt 240 min (C) und der maximalen Killingrate (D). Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert ± SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C und D ein einfaktorier Anova mit Dunnett's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Bei Betrachtung der gemittelten Lysekinetik wird bereits deutlich, dass eine Kokultur mit NK-Zellen keinen Effekt auf die CTL_{MART1}-vermittelte Lyse von SK-Mel5 Zellen verursacht hat (Abbildung 21B). Auch der Vergleich der Endlyse und der maximalen Killingrate der Kontroll- mit den Kokulturbedingungen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 21C,D). Um auszuschließen, dass ein Unterschied aufgrund der hohen Anzahl an Effektorzellen (E:T = 10:1) im Real-time Killing Assay kaschiert wird, wurden die Assays auch mit einem CTL_{MART1}-Verhältnis von 5:1 durchgeführt (Abbildung 22). In beiden Fällen lag die normierte Endlyse der kokultivierten SK-Mel5 Zellen, unabhängig der E:T-Ratio in der Kokultur, um die 100 % (5:1=Ø102,8 ± 8,5 %; 10:1=Ø102,7 ± 8,2 %).

Ergebnisse

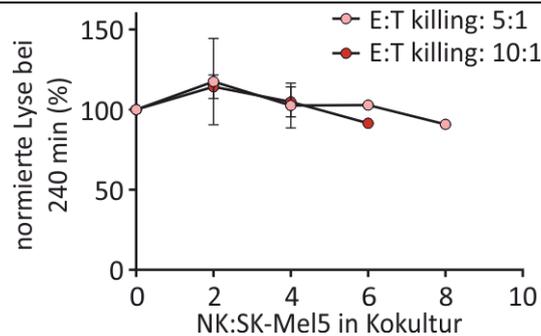


Abbildung 22: Die normierte Lyseeffizienz durch CTL_{MART1} von SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit primären NK-Zellen, ist bei unterschiedlichen E:T-Ratios im Real-time Killing Assay unverändert. Darstellung der zur jeweiligen Kontrollbedingung normierten Lyse zum Endzeitpunkt 240 min von SK-Mel5 Zellen durch CTL_{MART1} im Real-time Killing Assay in Abhängigkeit der E:T-Ratio der NK:SK-Mel5-Kokultur. Die SK-Mel5 Zellen wurden kategorisiert abhängig der verwendeten E:T-Ratio im Real-time Killing Assay. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± SD normiert zur Lyse der jeweiligen Kontrollbedingung zum Zeitpunkt 240 min (5:1: n = 2-13; 10:1: n = 1-10).

6.3.1.4 Durch die Kokultur mit CTL_{MART1} entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen die CTL_{MART1}-vermittelte Lyse

Zuletzt wurden SK-Mel5 Zellen mit CTL_{MART1} kokultiviert und schließlich deren Resistenz gegenüber der CTL_{MART1}-vermittelten Zytotoxizität untersucht.

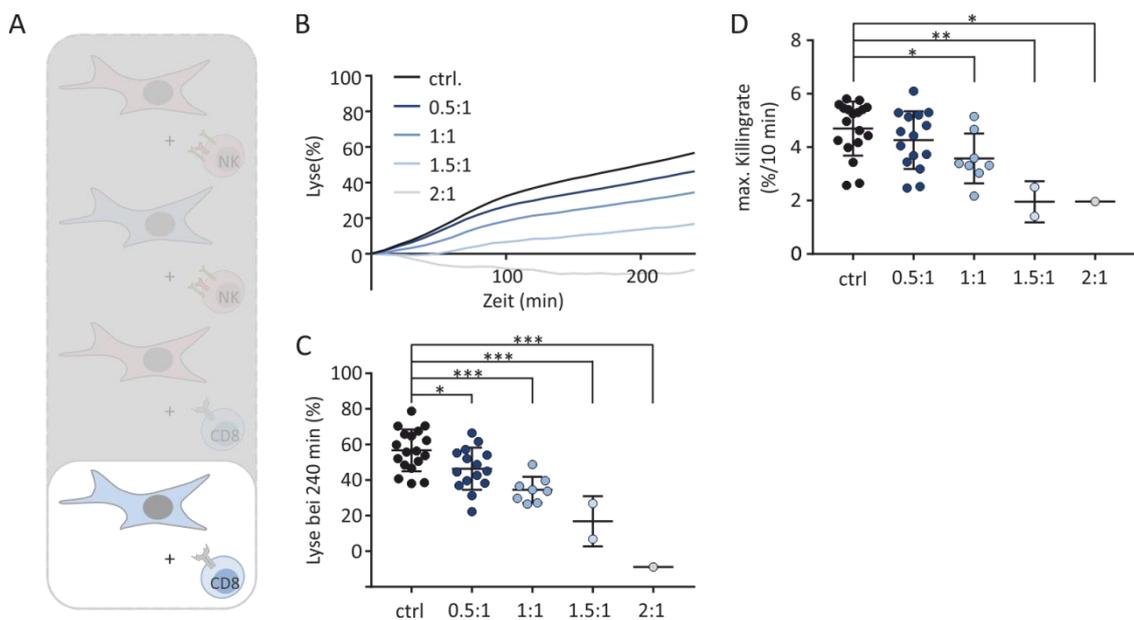


Abbildung 23: Nach einer Kokultur mit CTL_{MART1} entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen CTL_{MART1}-vermittelte Lyse. (A) SK-Mel5 Zellen wurden 3-4 Tage zusammen mit bestrahlten CTL_{MART1} (30 Gy) bei verschiedenen E:T-Ratios kokultiviert. (B) Darstellung der gemittelten Lysekinetik der SK-Mel5 Zielzellen durch CTL_{MART1} Zellen mit einer E:T-Ratio im Real-time Killing Assay von 5:1 (n=1-18) und unter Angabe des CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis zu Beginn der untersuchten Kokultur. (C und D) Analyse der Lyse zum Endzeitpunkt 240 min (C) und der maximalen Killingrate (D). Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert ± SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C und D ein einfaktorier Anova mit Dunnett's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Mit zunehmendem CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis in der Kokultur haben die kokultivierten SK-Mel5 Zellen eine zunehmende Resistenz gegen CTL_{MART1} entwickelt (Abbildung 23B). Bei

einem Verhältnis von 0,5:1 an CTL_{MART1} in der Kokultur war die Endlyse durch CTL_{MART1} bereits um knapp 10 % herunterreguliert (ctrl=Ø56,7 ± 11,4 %, 0,5:1= Ø46,4 ± 6,8 %; Abbildung 23C). Diese Differenz wurde bei einem Verhältnis von 1,5:1 in der Kokultur auf knapp 40 % erhöht (Ø16,9 ± 6,8 %), bis bei einem Verhältnis von 2:1 letztendlich keine CTL_{MART1}-vermittelte Lyse mehr detektiert wurde (Abbildung 23C). Auch die maximale Killingrate wurde bei einem CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis von 1,5:1 im Vergleich zur Kontrolle mehr als halbiert (ctrl= Ø4,65 ± 6,8 %/10min, 1,5:1= Ø1,96 ± 0,55 %/10min; Abbildung 23D).

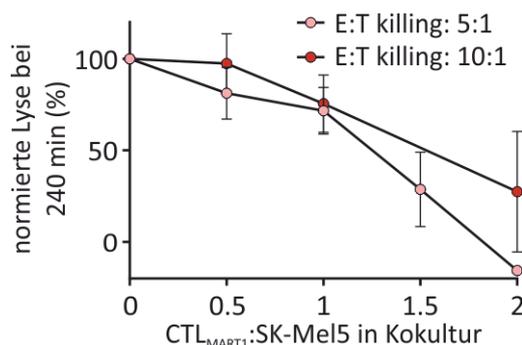


Abbildung 24: Die normierte Lyseeffizienz durch CTL_{MART1} von SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit CTL_{MART1}, ist bei unterschiedlichen E:T-Ratios im Real-time Killing Assay herunterreguliert. Darstellung der zur jeweiligen Kontrollbedingung normierten Lyse zum Endzeitpunkt 240 min von SK-Mel5 Zellen durch CTL_{MART1} im Real-time Killing Assay in Abhängigkeit der E:T-Ratio der CTL_{MART1}:SK-Mel5-Kokultur. Die SK-Mel5 Zellen wurden kategorisiert abhängig der verwendeten E:T-Ratio im Real-time Killing Assay. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± SD normiert zur Lyse der jeweiligen Kontrollbedingung zum Zeitpunkt 240 min (5:1: n = 1-18; 10:1: n = 3-7).

Neben einer E:T-Ratio von 5:1, wurden auch Versuche mit einem 10:1 Effektor:Zielzell-Verhältnis durchgeführt. In beiden Fällen konnte mit steigendem CTL_{MART1}:SK-Mel5-Verhältnis in der Kokultur auch eine abnehmende Lyseeffizienz durch CTL_{MART1} im Real-time Killing Assay beobachtet werden. Durch die höhere Effektorzahl im Real-time Killing Assay wurde bei einer E:T-Ratio von 10:1 eine ähnlich hohe Lyse von SK-Mel5 Zellen (kokultiviert CTL_{MART1}:Melanom-Verhältnis von 2:1) detektiert, wie es bei einer E:T-Ratio von 5:1 und einem Kokultur-Verhältnis von 1,5:1 bereits der Fall gewesen war (10:1= Ø27,45 % ± 26,8; 5:1= Ø28,7 % ± 14,4; Abbildung 24). Eine CTL_{MART1} Kokultur von SK-Mel5 Zellen induziert somit nicht nur eine Resistenz gegen NK-vermittelte Zellyse (Abbildung 19), sondern auch eine Resistenz gegen CTL_{MART1} induziertes Killing (Abbildung 23).

6.3.1.5 *Rescue* der Resistenz gegen CTL_{MART1} durch exogene Beladung der SK-Mel5 Zellen mit dem korrespondierenden MART1-Peptid

Die Erkennung einer Zielzelle durch eine antigenspezifische CD8⁺ T-Zelle erfolgt über die Interaktion des TCR der T-Zelle mit dem korrespondierenden Antigen, präsentiert über den MHCI Rezeptor der Zielzelle (Abbildung 1). So ist es verwunderlich, dass parallel zur Hochregulation des MART1-spezifischen MHCI-Rezeptor HLA-A2 auf der Oberfläche der mit

Ergebnisse

CTL_{MART1} kokultivierten SK-Mel5 Zellen (Abbildung 19E), eine Reduktion der CTL_{MART1}-vermittelten Lyse detektiert wurde (Abbildung 23B-D).

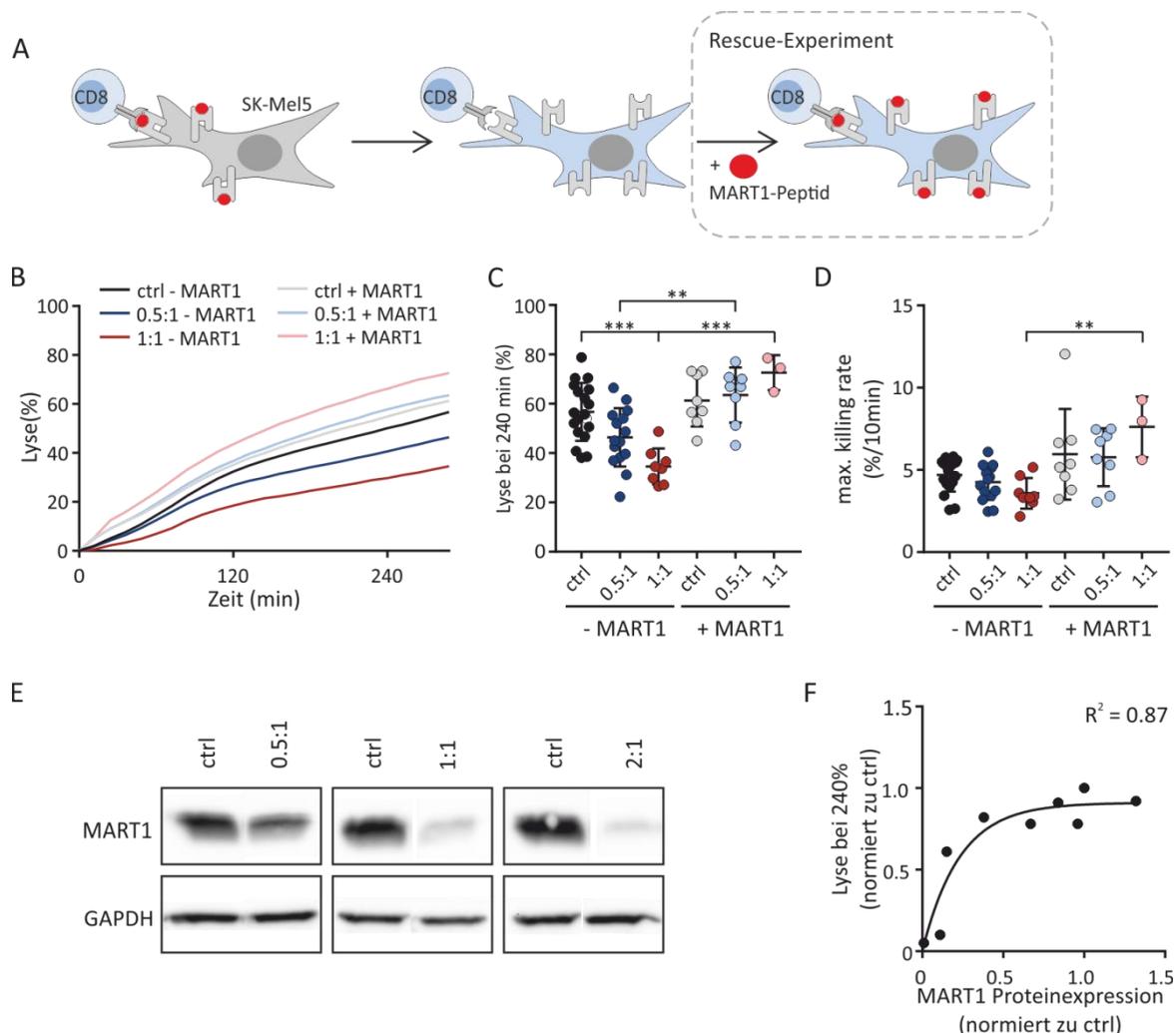


Abbildung 25: Rescue der Resistenz gegen CTL_{MART1} durch exogene Beladung der SK-Mel5 Zellen mit dem korrespondierenden MART1-Peptid. (A) Hypothese: Eine Kokultur von SK-Mel5 Zellen mit CTL_{MART1} führt zu einer CTL_{MART1}-Resistenz, indem der MHC I auf der Oberfläche der SK-Mel5 Zellen hochreguliert, jedoch parallel die Präsentation der korrespondierenden MART1-Antigens beeinträchtigt wird. Durch Zugabe des korrespondierenden Peptids, kann dieser Effekt aufgehoben werden. (B) Darstellung der gemittelten Lysekinetik der SK-Mel5 Zielzellen durch CTL_{MART1} unter Angabe des CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnisses in der untersuchten Kokultur mit (+MART1) und ohne (-MART1) zusätzlichen Beladung der Zielzellen mit dem korrespondierendem MART1-Peptid. Die E:T-Ratio im Real-time Killing Assay war 5:1 (n=3-18). (C und D) Analyse der Lyse zum Endzeitpunkt 240 min (C) und der maximalen Killingrate (D). (E) Repräsentative MART1 Proteinexpressionsanalyse der SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit unterschiedlichen Mengen an CTL_{MART1}. (F) Korrelation der MART1-Proteinmenge der SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit CTL_{MART1}, und der CTL_{MART1}-vermittelten Lyse zum Endzeitpunkt des Real-time Killing Assays. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in C und D ein einfaktorielles Anova mit Tukey's Mehrfachvergleichstest durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Als mögliche Hypothese wurde untersucht, ob eine Kokultur mit CTL_{MART1} zwar die Hochregulation von MHC I induziert, aber parallel dazu die Präsentation des MART1-spezifischen Antigens inhibiert wird. Durch exogenes Beladen der kokultivierten SK-Mel5 Zellen, ähnlich wie bei der Verwendung der TAP-defizienten T2 Zelllinie, könnte somit ein *Rescue* (dt. Rettung) der

Resistenz gegen die CTL_{MART1}-vermittelte Lyse ermöglicht werden (Abbildung 25A). Wie die verschiedenen Lysekinetiken zeigen, wurde nach der exogenen Zugabe des MART1-Peptids zu den kokultivierten SK-Mel5 Zellen keine Resistenz gegenüber CTL_{MART1}-vermittelter Lyse detektiert (Abbildung 25B). So hatte ein 1:1 Verhältnis in der CTL_{MART1}-Melanom-Kokultur eine signifikante Reduktion der Lyse durch CTL_{MART1} zur Folge (ctrl=Ø54,7 ± 11,4 %, 1:1=Ø34,6 ± 6,8 %), die jedoch durch SK-Mel5-Beladung mit dem MART1-Peptid zu einem kompletten Ausbleiben dieses Effekts führte (1:1+MART1=Ø72,64 ± 5,8 %). Es ist sogar eine nicht signifikante Tendenz zum gegenteiligen Effekt, also zur Verbesserung der Killingeffizienz im Vergleich zur MART1-beladenen Kontrolle, zu beobachten. Sowohl bei der Lyse zum Endzeitpunkt (ctrl+MART1= Ø61,33 % ± 9,8; 1:1+MART1= Ø72,64 % ± 5,8) als auch bei der maximalen Killingrate (ctrl+MART1: Ø5,95 %/10min ± 2,6; 1:1+MART1= Ø7,61 %/10min ± 1,4) sind die Werte der SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit CTL_{MART1} im Verhältnis 1:1 und exogen beladen mit dem korrespondierenden MART1-Peptid, am höchsten (Abbildung 25C, D). Somit konnte mit diesem *Rescue*-Experiment gezeigt werden, dass die Kokultur von SK-Mel5 Zellen mit CTL_{MART1} zu einer verschlechterten Präsentation des korrespondierenden Antigens führt. Es wurde nun untersucht, ob dieser CTL_{MART1}-induzierte Effekt in der SK-Mel5 Kokultur auf eine Reduktion der gesamten MART1-Proteinexpression zurückzuführen ist oder andere Ursachen hat. Zur Quantifizierung der MART1-Proteinexpression wurden SK-Mel5 Zellen nach ihrer Kokultur mit unterschiedlichen CTL_{MART1}-SK-Mel5 Verhältnissen mittels Western Blot Analyse analysiert. Dabei zeigte sich ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der MART1-Expression und der E:T-Ratio in der Kokultur. Interessanterweise war die Herunterregulation der MART1-Expression nicht nur von der Stärke des Selektionsdrucks (CTL_{MART1}-SK-Mel5 Kokultur-Verhältnis), sondern auch von der Dauer des Selektionsdrucks (z. B. erneute Zugabe von CTL_{MART1} zu bereits kokultivierten SK-Mel5 Zellen nach Ende eines Kokulturzyklus von 3-4 Tagen) abhängig. So führte ein dauerhafter Selektionsdruck von insgesamt 31 Tagen bei einem CTL_{MART1}-SK-Mel5 Verhältnis von 1:1 in der Kokultur zu einer stärkeren Herunterregulation der MART1 Expression (1 % im Vergleich zur Kontrollbedingung) als ein CTL_{MART1}:SK-Mel5 Verhältnis von 2:1 in einer zwei Wochen andauernden Kokultur (11 % im Vergleich zur Kontrollbedingung) (Abbildung 25E). Die Korrelation der detektierten MART1-Proteinmenge und der normierten Endlyse der kokultivierten SK-Mel5 Zellen ergab eine steile Sättigungskurve (R²=0,87), sodass 15 % der ursprünglichen MART1-Expression noch zu einer Lyse von zwei Drittel aller kokultivierten SK-Mel5 Zellen durch CTL_{MART1} innerhalb von 4 h führten (Abbildung 25F). Ähnlich wie in Abbildung 15A, bedingt auch hier eine Herunterregulation der MART1-Proteinexpression der SK-Mel5 Zellen ab einem bestimmten Level eine verschlechterte Lyseeffizienz durch CTL_{MART1}.

6.4 Apoptoseinduktion durch CTL_{MART1} und NK-Zellen

Die bereits im Rahmen dieser Arbeit genauer untersuchten Effektorzellen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen sind in der Lage zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes in ihren Zielzellen zu induzieren: Apoptose und Nekrose. Das apoptotische Killing kann über verschiedene Signalwege ausgelöst werden. All diese Signalwege haben die Aktivierung von Caspasen, das Schrumpfen der Zelle und die Blasenbildung („Blebbing“) der Zellmembran gemein. Bei der Nekrose hingegen platzt die Zelle auf und im Gegensatz zur Apoptose wird Zytoplasma mitsamt all seinen löslichen Bestandteilen freigesetzt (Zhang et al. 2018). Beim Real-time Killing Assay werden die Zielzellen mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM beladen (Abbildung 26). Wird die beladene Zielzelle über den nekrotischen Signalweg lysiert, platzt die Membran auf und Calcein diffundiert aus der Zelle, was als Lyse der Zielzelle detektiert wird. Bei der Apoptose bleibt die Zellmembranintegrität jedoch erhalten, sodass Calcein nicht entweichen kann (Abbildung 26, Zelle 1-3, 0-22 min). Erst bei der sogenannten sekundären Nekrose, bei der die Membran der bereits apoptotischen Zelle erst zu einem späteren Zeitpunkt aufplatzt, diffundiert Calcein aus der Zelle (Abbildung 26, Zelle 1, 60 min). Somit ist es mittels Real-time Killing Assay nicht möglich Apoptosen direkt zu detektieren, sodass der Anteil an lysierten Zellen ausschließlich Nekrosen und Apoptosen, die bereits in Sekundärnekrosen übergegangen sind, widerspiegelt.

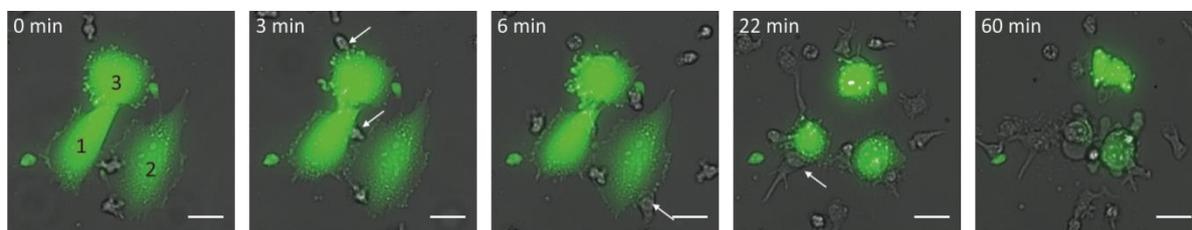


Abbildung 26: Während der Apoptose bleibt die Membranintegrität der Zielzellmembran intakt, sodass Calcein nicht aus der Zelle diffundiert. Melanomzellen WM3734 wurden mit Calcein-AM beladen und auf einen Fibronectin-beschichteten Coverslip ausgesät. Nach Zugabe von primären NK-Zellen wurden die Zielzellen 1-3 in einem Zeitintervall von 10 s mit einem 20x Objektiv über einen Zeitraum von 1 h mikroskopiert. Die Ausbildung von immunologischen Synapsen wurde zum jeweiligen Zeitpunkt mit weißen Pfeilen markiert. Diese Messung wurde in Kooperation mit AG Bogeski durchgeführt. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 20 µm.

Um den durch CTL_{MART1}- oder NK-Zell-induzierten Zielzelltod genauer zu klassifizieren, wurde in dieser Arbeit der FRET-basierte pCasper3-GR Sensor eingesetzt (Evrogen 2008; Shcherbo et al. 2009). Dabei dient GFP als Donor und RFP als Akzeptorfluorophor, die über eine Caspase 3 sensitive Erkennungssequenz gekoppelt sind, sodass eine lebende Zelle ein orangefarbenes Signal zeigt. Wird durch die Induktion der Apoptose jedoch Caspase 3 aktiviert, führt das Schneiden der Erkennungssequenz zu einer räumlichen Trennung der beiden Fluorophore und damit zum Verlust des FRET- und Anstieg des GFP-Signals.

Ergebnisse

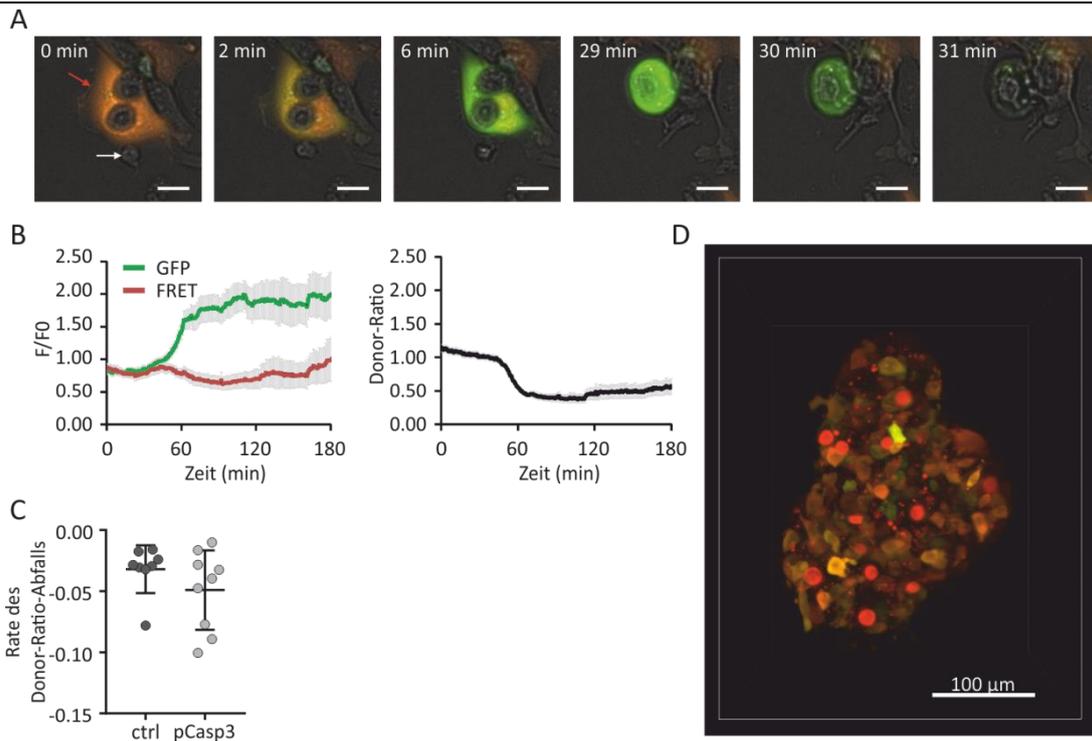


Abbildung 27: Expression des Apoptoseindikators pCasper3-GR zeigt den Eintritt der Apoptose durch den Farbumschlag von orange nach grün. (A) Primäre humane NK-Zellen (weißer Pfeil) induzieren eine Caspase-abhängige Apoptose in Caspase 3-defizienten MCF-7 Zellen, transfiziert mit dem pCasper3-GR und einem Caspase 3-Konstrukt (roter Pfeil). (B) Durchschnittliches GFP-, FRET-Signal und Donor-Ratio (FRET/GFP) von pCasper3-GR transfizierten MCF-7 Zellen nach NK-induzierter Apoptose (n=16). (C) Caspase 3-defiziente MCF-7 Zellen und MCF-7 Zellen transfiziert mit Caspase 3-kodierendem Vektor wurden mit pCasper3-GR transfiziert und die Rate des Donor-Ratio-Abfalls nach NK-induzierter Apoptose bestimmt. (D) Es wurden Sphäroide aus MCF-7 Zellen (transient mit pCasper3-GR transfiziert) hergestellt und zusammen mit NK-Zellen in eine Kollagen-Matrix eingebettet. Die Aufnahme erfolgte durch Carsten Kummerow 1h nach der Einbettung der Zellen in die Kollagen-Matrix im Lightsheet-Mikroskop. In der abgebildeten Maximumintensitätsprojektion ist pCasper-FRET in rot, pCasper-GFP in grün und Lysotracker-Red auch in rot dargestellt. Abbildung erweitert und modifiziert aus Backes et al. 2018.

Mit Hilfe des pCasper Sensors konnte in der AG Hoth gezeigt werden, dass NK-Zellen unterschiedliche Arten von Zelltod in Krebszellen induzieren können (Backes et al. 2018). Abbildung 27A zeigt eine pCasper exprimierende MCF-7 Zelle (zusätzlich transfiziert mit einem Caspase 3-kodierenden Vektor), deren Apoptose durch einen NK-vermittelten Kontakt induziert wird. Diese Brustkrebszelllinie ist Caspase 3 defizient. Da die DEVD-Sequenz jedoch nicht ausschließlich von Caspase 3, sondern auch von anderen Caspasen erkannt werden kann, ist auch in der Caspase 3 defizienten Zelllinie ein Anstieg des GFP-Signals mit einem parallelen Verlust des FRET Signals während einer NK-vermittelten Apoptose zu beobachten (Abbildung 27B) (Walsh et al. 2008; Poreba et al. 2013). Durch die zusätzliche Transfektion eines Caspase 3 kodierenden Vektors, konnte eine Tendenz zur Beschleunigung der Apoptose (gemessen anhand der Rate des Donor-Ratio-Abfalls) detektiert werden (Abbildung 27C). Es wurde zudem ein Sphäroid aus MCF-7 Zellen (transient transfiziert mit dem pCasper Konstrukt) zusammen mit NK-Zellen in eine Kollagen Matrix eingebettet und mit Hilfe des Lightsheet-Mikroskops in 3D beobachtet (Abbildung 27D). Dabei wurde wie in Backes et al. gezeigt, eine Migration der

Effektorzellen (deren Vesikel mittels LysoTracker-Red rot angefärbt wurden) zu den Rändern des 3D-Sphäroiden sowie die Eigenschaft der NK-Zellen zur Induktion des apoptotischen Zelltodes in einem dreidimensionalen Milieu beobachtet (Backes et al. 2018).

6.4.1 Direkter Vergleich von Annexin V und pCasper3-GR als Apoptosensoren

Wie bereits gezeigt, ist die Melanomzelllinie SK-Mel5 sowohl als Zielzelllinie für CTL_{MART1} als auch für NK-Zellen geeignet (Abbildung 15). Da mittels Real-time Killing Assay keine Apoptosen direkt detektiert werden können, sollte eine stabil exprimierende SK-Mel5 pCasper Zelllinie hergestellt werden, um die Killingereignisse auf Einzelzellebene zu untersuchen. Bereits etablierte Methoden zur Generierung stabiler Zelllinien sind in diesem Fall jedoch fehlgeschlagen. Als Alternative zu dem pCasper Konstrukt sollte im Rahmen dieser Arbeit ein transients Apoptosemarker getestet werden, der die Analyse des induzierten Zelltodes von SK-Mel5 Zellen auf Einzelzellebene ermöglicht und zudem auch bei primärem Tumormaterial verwendet werden könnte. Neben der Aktivierung von Caspasen, kann auch die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) an der Zellmembran als Apoptosemarker dienen. Dabei transloziert PS vom inneren zum äußeren Monolayer der Zellmembran und kann durch exogene Zugabe des fluoreszenzmarkierten Phospholipid-Bindeproteins Annexin V detektiert werden (Vermees et al. 1995). Im Folgenden wurde die Detektion von CTL_{MART1}-induzierten Apoptosen durch Annexin V und durch das pCasper Konstrukt in transient transfizierten SK-Mel5 Zellen verglichen.

Ergebnisse

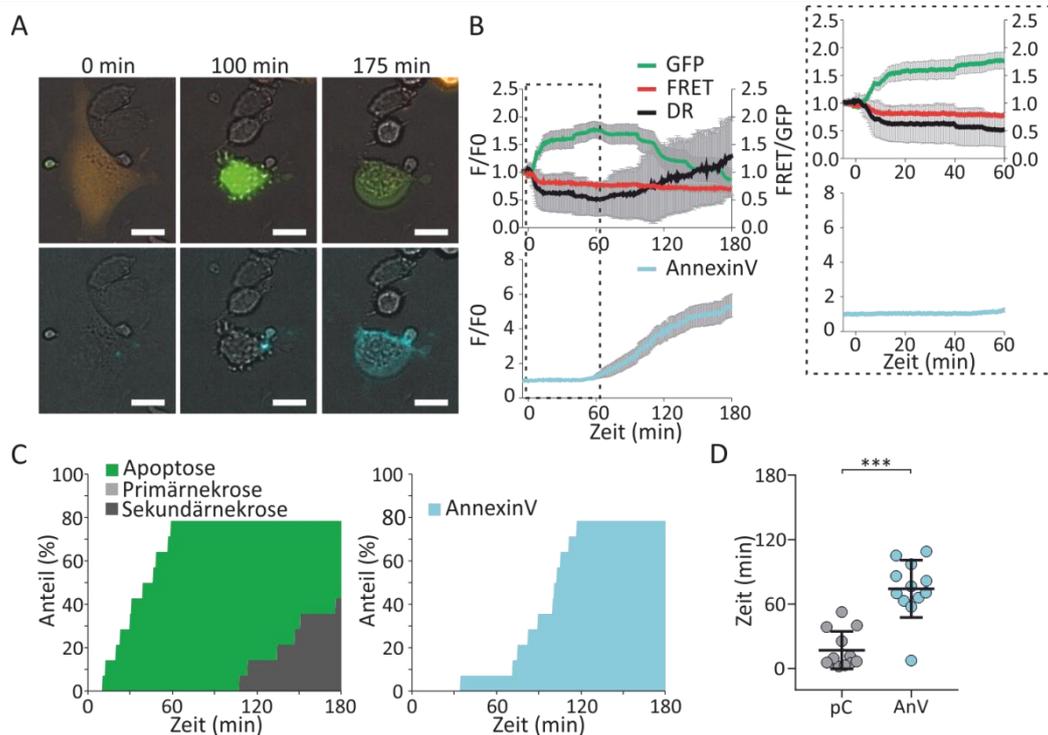


Abbildung 28: Die Annexin V-Signale erscheinen später als pCasper-Signale bei CTL_{MART1} vermittelten Apoptoseinduktion in SK-Mel5 Zellen. Zellen stammen aus einem Experiment. (A) SK-Mel5 pCasper Zellen wurden ausschließlich apoptotisch durch CTL_{MART1} getötet. Das pCasper-Signal ist bei Apoptosen durch einen Anstieg der GFP-Emission und einen Verlust des FRET-Signals charakterisiert (obere Reihe, DR (Donor-Ratio)<0,8). Das Annexin V-Signal steigt bei Induktion der Apoptose an (untere Reihe, AnV>1,2). (B) Die pCasper- und Annexin V-Signale wurden auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS) normiert und deren Mittelwerte \pm SEM quantifiziert. (C) Darstellung des Eintritts der Apoptose (grün, DR<0,8) und der Sekundärnekrose (dunkelgrau, normiertes GFP und FRET<0,8) anhand des pCasper-Signals (links) und anhand des Annexin V-Signals (rechts, normiertes Annexin V-Signal>1,2) aller quantifizierter Zellen (n=12) in Flächendiagrammen (*Cell Death Plots*). (D) Vergleich des Zeitpunktes des Zelltodes nach Ausbildung der IS nach Auswertung des pCasper (pC) oder Annexin V-Signals (AnV). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in D ein Wilcoxon Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

CTL_{MART1} Zellen induzieren ausschließlich Apoptosen in den untersuchten SK-Mel5 Zellen. In einzelnen Fällen wurden auch sekundäre Nekrosen detektiert, die zum einen morphologisch durch das Aufplatzen der Zelle und zum anderen durch einen Verlust des gesamten pCasper Signals charakterisiert sind (Abbildung 28A). Nach Ausbildung der IS wurde der Eintritt der Apoptose durch Analyse der pCasper Signale nach $\bar{0}17,0 \pm 16,8$ min, mit Hilfe der Annexin V-Signale hingegen erst nach mehr als 1 h ($\bar{0}74,1 \pm 25,5$ min), detektiert (Abbildung 28B-D).

In unserem Labor sind bereits zwei Zelllinien etabliert, die das pCasper Konstrukt stabil exprimieren: Jurkat E6-1 und K562 Zellen. Beide Zelllinien sind für die Untersuchung der NK-vermittelten Zytotoxizität geeignet. Mittels apoptoseinduzierender Substanzen wurde die Apoptose in Jurkat E6-1 pCasper Zellen induziert und die Annexin V und pCasper Signale verglichen.

Ergebnisse

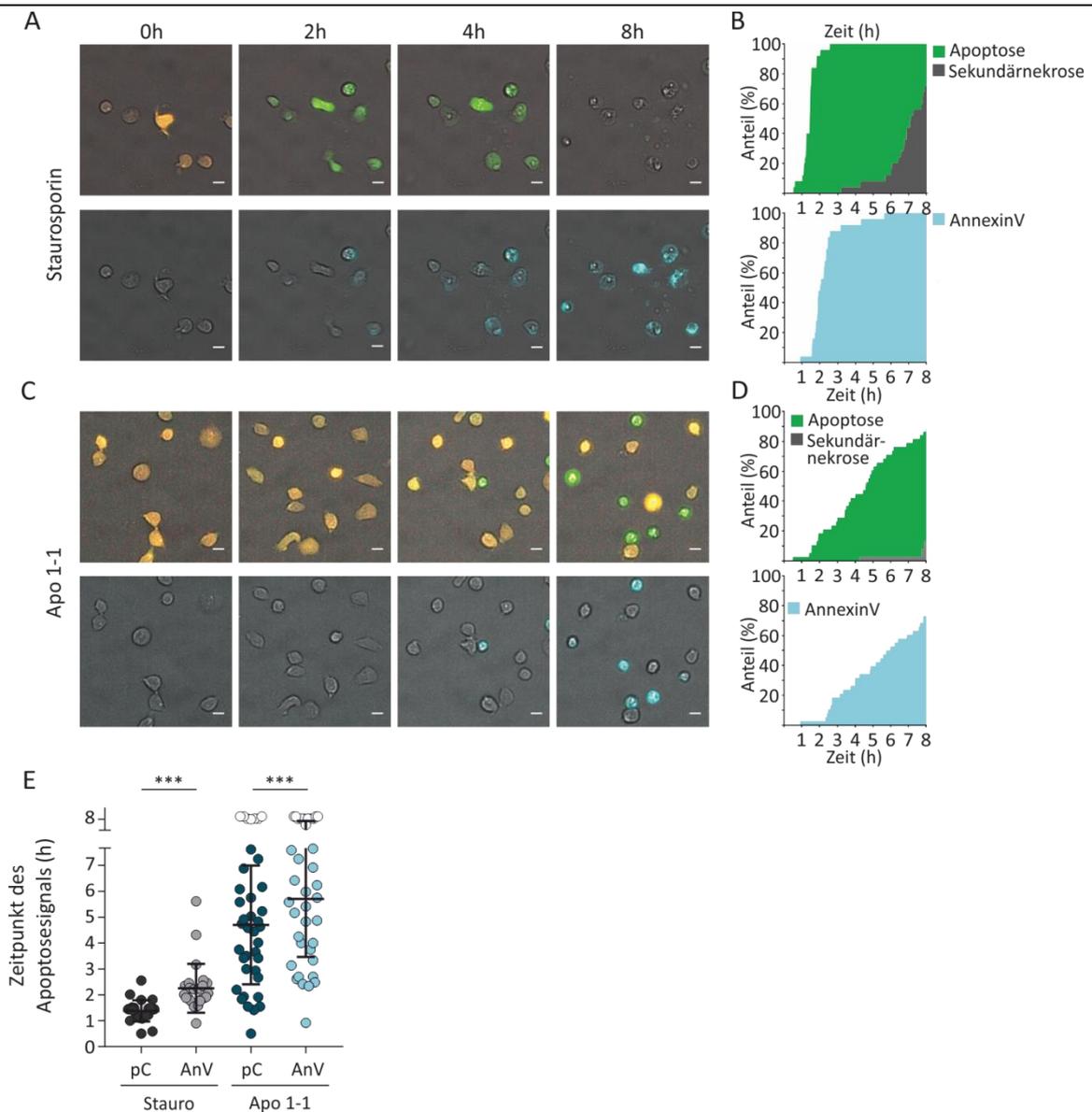


Abbildung 29: Das Annexin V-Signal erscheint später als das pCasper Signal bei Apoptoseinduktion in Jurkat E6-1 Zellen. Zellen stammen aus zwei Experimenten. (A-D) Jurkat E6-1 Zellen, die das pCasper3-GR Konstrukt (pC) stabil exprimieren, wurden mit 10 μM Staurosporin (Stauro) bzw. 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD95 Antikörper Apo 1-1 behandelt und über einen Zeitraum von 8 h von 1 min mikroskopiert. (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von Staurosporin behandelten Jurkat E6-1 pCasper Zellen (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (B) Darstellung des Eintritts der Apoptose (grün, Donor-Ratio<0,8) und der Sekundärnekrose (dunkelgrau, normiertes GFP und FRET <0,8) anhand des pCasper-Signals und anhand des Annexin V-Signals (hellblau, Annexin V-Signal > 1,2) der Staurosporin-behandelten Zellen in „Cell Death Plots“. (C) Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von anti-CD95 Antikörper-behandelten (Apo 1-1) Jurkat E6-1 pCasper Zellen (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin-Signal). (D) Darstellung des Eintritts der Apoptose (grün, Donor-Ratio<0,8) und der Sekundärnekrose (dunkelgrau, GFP und FRET <0,8) anhand des pCasper-Signals und anhand des Annexin V-Signals (hellblau, Annexin V-Signal > 1,2) der anti-CD95 Antikörper-behandelten (Apo 1-1) Zellen in „Cell Death Plots“. (E) Vergleich des Zeitpunktes des Apoptoseintritts nach Auswertung des pCasper- (pC) oder Annexin V-Signals (AnV) (Staurosporin n=25, Apo 1-1 n=19). Dots in weiß dargestellt zeigen Zellen, die zum Endzeitpunkt der Messung nach Auswertung des pCasper- bzw. Annexin V-Signals noch nicht apoptotisch waren. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μm . Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in E ein Wilcoxon Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Die Zugabe von 10 μM Staurosporin hat innerhalb der 8 h Messzeit zum Zelltod aller untersuchten Zellen geführt, unabhängig ob die Apoptose mittels pCasper oder Annexin V Signal

Ergebnisse

detektiert wurde (Abbildung 29 A, B). Nach der Analyse des pCasper-Signals trat die Apoptose hierbei nach durchschnittlich $82,8 \pm 24,3$ min ein, was nach der Analyse des Annexin V-Signals erst nach $135,2 \pm 55,5$ min der Fall war. Nach Zugabe des anti-CD95 Antikörpers (Apo 1-1) waren zum Endzeitpunkt der Messung nach pCasper-Signal-Analyse noch 15,4 % der Jurkat E6-1 Zellen lebendig, während nach der Annexin V-Signal-Analyse noch 30,8 % der Zellen keine Anzeichen für Apoptose zeigten (Abbildung 29 C, D). Die noch lebenden Zellen wurden bei der Quantifizierung über den Eintritt der Apoptose mit einem Wert von 480 min berücksichtigt, was den wahren Zeitpunkt unterschätzt und den tatsächlichen Unterschied zwischen pCasper und Annexin V womöglich schmälert (Abbildung 29E). Dennoch wurde nach Zugabe von anti-CD95 die Apoptose mittels pCasper knapp 60 min früher als mittels Annexin V detektiert (pCasper: $282 \pm 135,9$ min; Annexin V: $342,4 \pm 132,7$ min).

Im nächsten Schritt wurde die NK-vermittelte Zytotoxizität mit Hilfe des pCasper-Sensors und des Apoptoseindikators Annexin V in Jurkat E6-1 pCasper Zellen untersucht und miteinander verglichen.

Ergebnisse

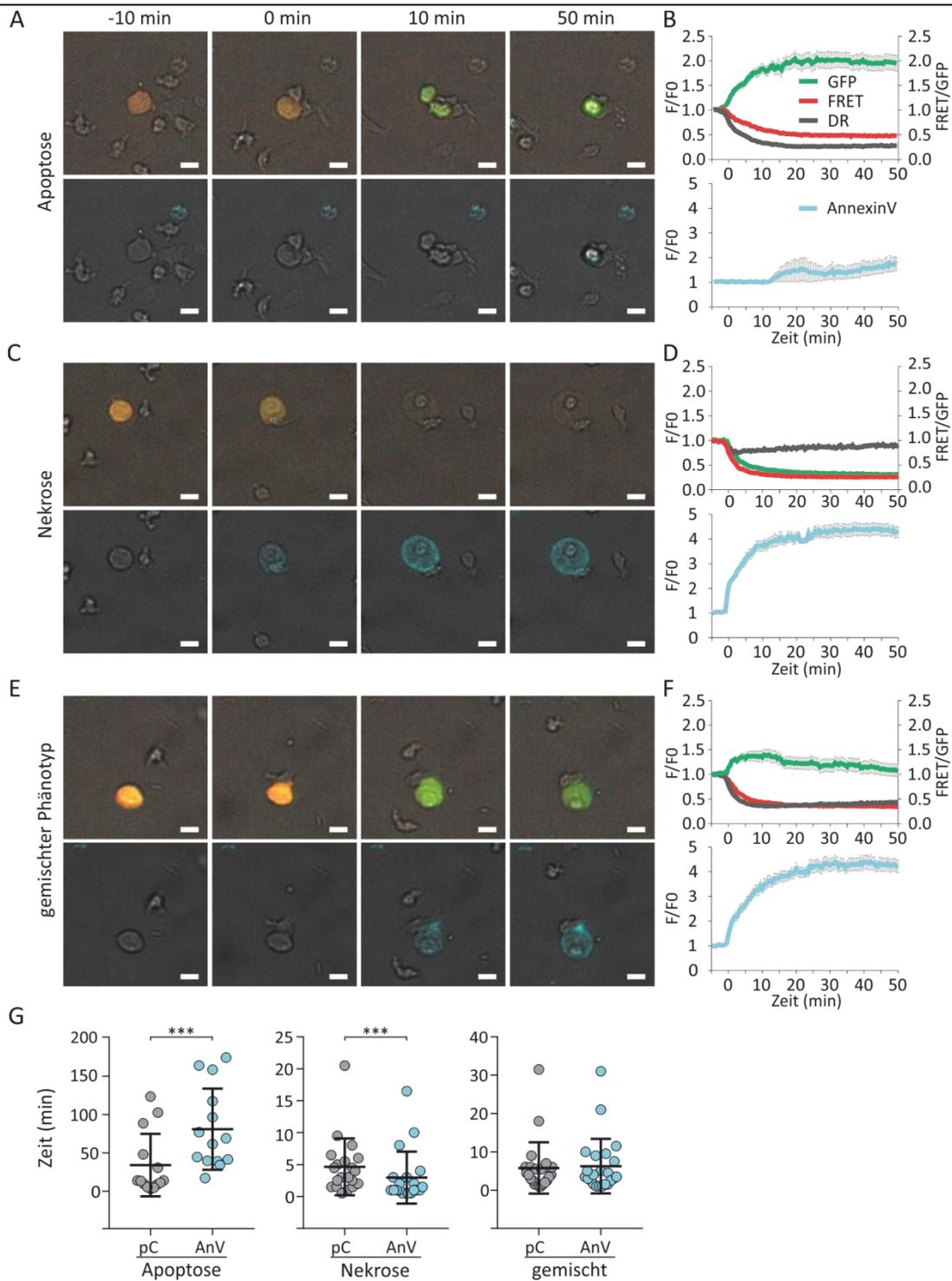


Abbildung 30: Die NK-induzierte Apoptose in Jurkat E6-1 Zellen wird durch Annexin V später detektiert als durch pCasper. Bei NK-induzierter Nekrose und gemischten Phänotypen des Zelltodes reagieren beide Sensoren ähnlich schnell. Zellen stammen aus einem Experiment. Jurkat E6-1 pCasper wurden zusammen mit NK-Zellen und unter Zugabe von Annexin V (Pacific Blue) in einem Intervall von 30 s mikroskopiert. NK Killing von E6-1 pCasper Zellen wurde kategorisiert in Apoptose (A, pCasper: DR<0,8, Annexin V>1,2), Nekrose (C, pCasper: GFP und FRET<0,8; Annexin V>1,2) und gemischter Phänotyp (E, pCasper: DR<0,8 und morphologische Betrachtung der Zelle; Annexin V>1,2). (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von einer NK-vermittelten Apoptoseinduktion einer Jurkat E6-1 pCasper Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (B) Darstellung der gemittelten pCasper- und Annexin V-Signale von apoptotischen Zellen (\pm SEM) normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (C) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von einer NK-vermittelten Nekroseinduktion einer Jurkat E6-1 pCasper

Ergebnisse

Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (D) Darstellung der gemittelten pCasper- und Annexin V-Signale von nekrotischen Zellen (\pm SEM) normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (E) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme eines NK-vermittelten Zelltodes mit gemischtem Phänotyp einer Jurkat E6-1 pCasper Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (F) Darstellung der gemittelten pCasper- und Annexin V-Signale (\pm SEM) nach NK-vermittelter Induktion eines Zelltodes mit gemischtem Phänotyp von Jurkat E6-1 pCasper Zellen normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (G) Vergleich des Zeitpunktes des Zelltodes von Jurkat E6-1 pCasper Zellen nach Auswertung des pCasper (pC) oder Annexin V-Signals (AnV) kategorisiert in Apoptose (n=14), Nekrose (n=20) und gemischter Phänotyp (n=23). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in G ein Wilcoxon Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Beim apoptotischen Killing nähert sich die NK-Zelle der Zielzelle (Abbildung 30A, -10 min), bildet eine IS (0 min) und induziert letztendlich die Caspasen-Aktivierung in der Zielzelle, was durch einen Verlust der FRET- und einen Anstieg der GFP-Fluoreszenz charakterisiert ist (10-50 min). Das Annexin V-Signal dieser Zelle steigt hingegen erst ab dem Zeitpunkt 50 min an (Abbildung 30A). Auch die Darstellung der Mittelwerte der Annexin V- und pCasper-Signale aller analysierter Zielzellen nach Ausbildung der IS zeigt, dass der Caspase-induzierte Anstieg des GFP- und parallele Verlust des FRET-Signals früher stattfindet, als die PS-Translokation an der Zellmembran den Anstieg des Annexin V-Signals induzieren kann (Abbildung 30B). Der Eintritt der Apoptosen fand mittels pCasper-Signal Analyse durchschnittlich $33 \pm 39,2$ min nach IS-Ausbildung statt, nach Quantifizierung des Annexin V Signals war dies aber erst $\emptyset 80 \pm 51$ min der Fall (Abbildung 30G). Anders verhielt es sich bei der Analyse der Nekrosen. Hier wurde sowohl in den mikroskopischen Aufnahmen als auch bei Quantifizierung der Mittelwerte nahezu direkt nach NK-Kontakt ein Anstieg des Annexin V- mit einem parallelen Verlust des FRET- und GFP-Signals der Zellen beobachtet (Abbildung 30C, D). Überraschenderweise wurden Nekrosen mittels Auswertung des Annexin V-Signals sogar signifikant früher nachgewiesen als durch Analyse des pCasper-Signals (Annexin V: $\emptyset 3 \pm 4$ min; pCasper: $\emptyset 4,7 \pm 4,3$ min). Der Zelltod kann auch als gemischter Phänotyp, also als eine Kombination aus Apoptose und Nekrose, auftreten. Hierbei wird die Nekrose durch Perforierung der Membran induziert, parallel dazu erfolgt jedoch auch die Aktivierung der Caspasen, was zum Farbumschlag der Zelle von orange nach grün führt (Abbildung 30E). Der Anstieg des Annexin V-Signals ist dabei parallel zum Anstieg des GFP-Signals eingetreten (Abbildung 30F) und es ergaben sich somit keine signifikanten Unterschiede in dem Zeitpunkt der Zelltod-Detektion nach IS-Ausbildung (Abbildung 30, pCasper: $\emptyset 5,8 \pm 6,2$ min; Annexin V: $\emptyset 6,2 \pm 7$ min).

Neben den Jurkat E6-1 pCasper Zellen, wurde von Christian Backes zusammen mit Gertrud Schwär und Carsten Kummerow auch eine stabile K562 pCasper Zelllinie etabliert. Diese Zellen exprimieren keinen Fas-Rezeptor (FasR, CD95) auf ihrer Oberfläche, wodurch hauptsächlich der Vesikel-vermittelte Zelltod durch NK-Zellen induziert wird.

Ergebnisse

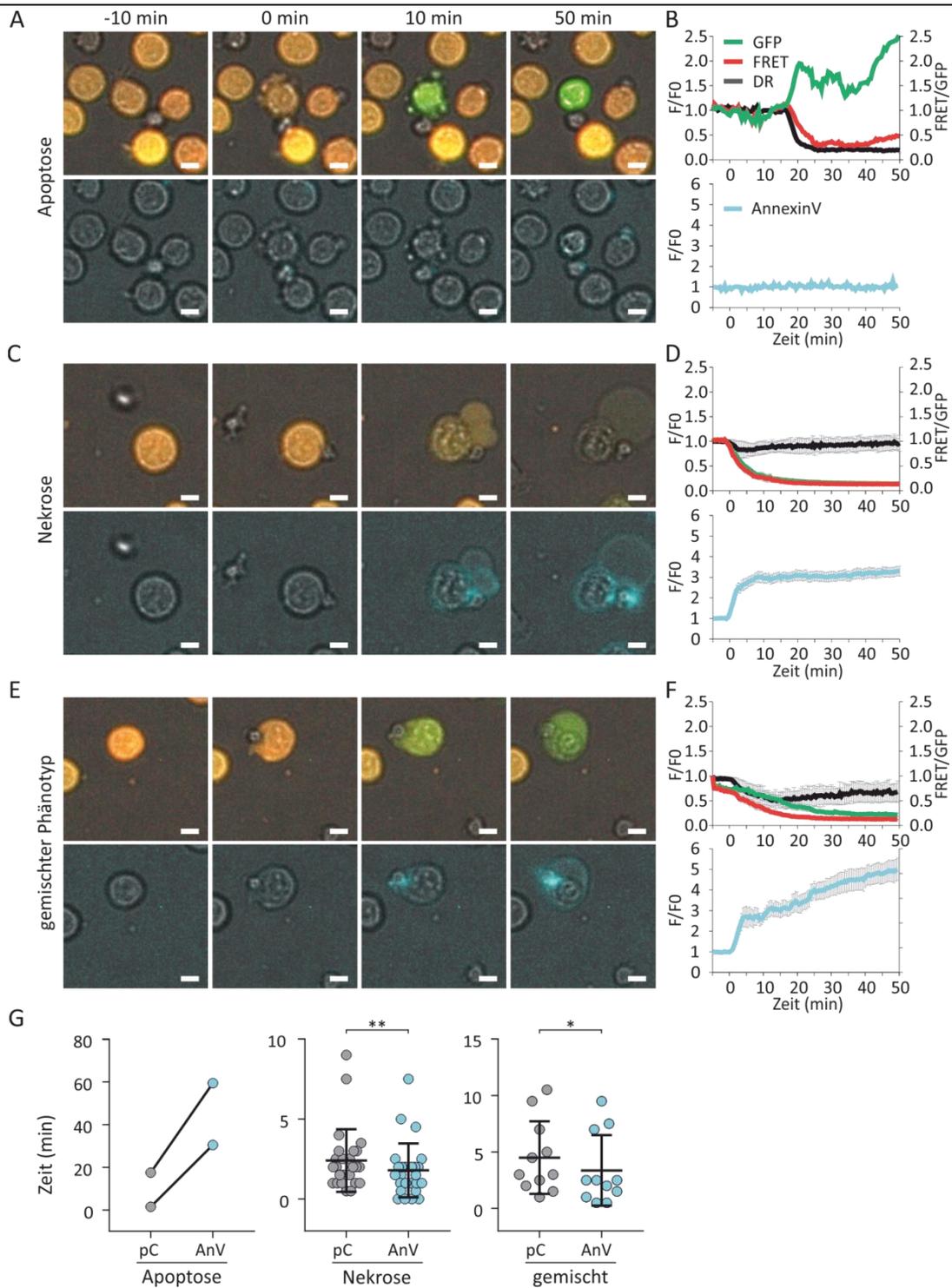


Abbildung 31: Die NK-induzierte Apoptose in K562 Zellen wird durch Annexin V später detektiert als durch pCasper. Bei NK-induzierten Nekrosen und gemischten Phänotypen des Zelltodes treten Annexin V-Signale früher als pCasper-Signale auf. Zellen stammen aus einem Experiment. K562 pCasper (pC) wurden zusammen mit NK-Zellen und unter Zugabe des Apoptoseindicators Annexin V (Pacific Blue) in einem Intervall von 30 s mikroskopiert. NK-Killing von K562 pCasper Zellen wurde kategorisiert in Apoptose (A, pCasper: $DR < 0,8$, Annexin V $> 1,2$), Nekrose (C, pCasper: GFP und $FRET < 0,8$; Annexin V $> 1,2$) und gemischter Phänotyp (E, pCasper: $DR < 0,8$ und morphologische Betrachtung der Zelle; Annexin V $> 1,2$). (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von einer NK-vermittelten Apoptoseinduktion einer K562 pCasper Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (B) Darstellung des pCasper- und Annexin V-Signals einer apoptotischen K562 pCasper Zelle (\pm SEM) normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (C) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von einer NK-

Ergebnisse

vermittelten Nekroseinduktion einer K562 pCasper Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (D) Darstellung der gemittelten pCasper- und Annexin V-Signale von nekrotischen Zellen (\pm SEM) normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (E) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme eines NK-vermittelten Zelltodes mit gemischtem Phänotyp einer K562 pCasper Zelle (obere Reihe pCasper-Signal, untere Reihe Annexin V-Signal). (F) Darstellung der gemittelten pCasper- und Annexin V-Signale (\pm SEM) nach NK-vermittelter Induktion eines Zelltodes mit gemischtem Phänotyp von K562 pCasper Zellen normiert auf den Zeitpunkt 0 min (Ausbildung der IS). (G) Vergleich des Zeitpunktes des Zelltodes von K562 pCasper Zellen nach Auswertung des pCasper (pC) oder Annexin V-Signals (AnV) kategorisiert in Apoptose (n=2), Nekrose (n=26) und gemischter Phänotyp (n=11). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in G ein Wilcoxon Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Durch das Fehlen des FasR auf der Oberfläche der K562 pCasper Zellen wird der Anteil an NK-vermittelten Apoptosen stark reduziert, jedoch war auch hier das Annexin V Signal deutlich später als der Farbumschlag des pCasper Konstrukts eingetreten (Abbildung 31A, B, G). Bei der Nekrose und dem gemischten Phänotyp des Zelltodes liegen zwischen Detektion des Annexin V Signals und dem Verlust des pCasper Signals nur Sekunden. Dennoch findet in beiden Fällen der Nachweis des Zelltodes durch Analyse des Annexin V-Signals früher als durch Quantifizierung des pCasper-Signals statt (Nekrose: pC: $\emptyset 2,4 \pm 1,8$ min, AnV: $\emptyset 1,8 \pm 1,7$ min; gemischt: pC: $\emptyset 4,5 \pm 3$ min, AnV: $\emptyset 3,4 \pm 3$ min).

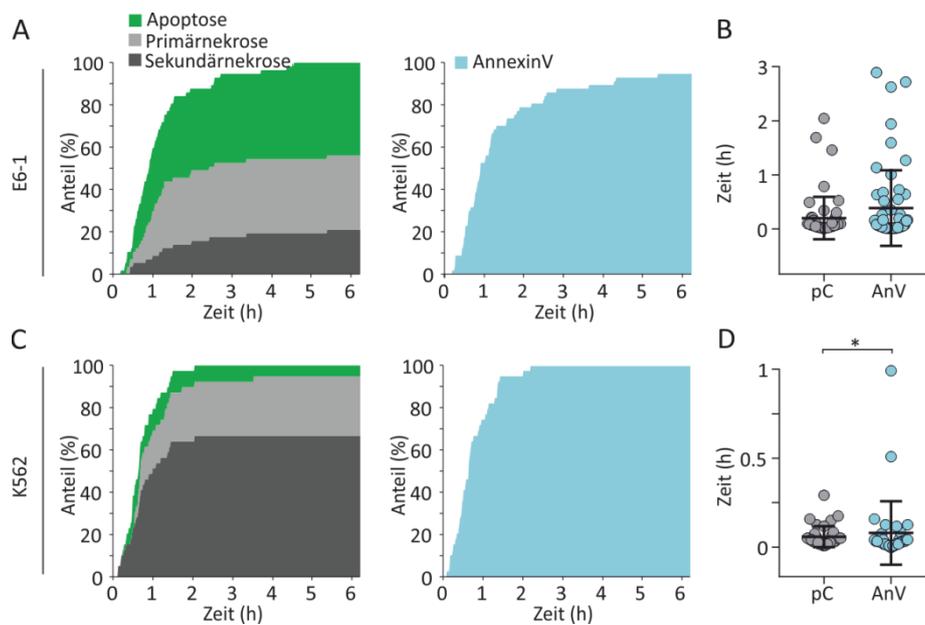


Abbildung 32: Annexin V detektiert nicht nur Apoptosen sondern auch Nekrosen und gemischte Phänotypen des Zelltodes. Dargestellte Daten stammen aus den Experimenten aus Abbildung 30 und 31. (A) Eintritt des NK-induzierten Zelltodes in Jurkat E6-1 pCasper Zellen anhand des pCasper-Signals (Apoptose: grün, Nekrose: hellgrau, Sekundärnekrose: dunkelgrau) und anhand des Annexin V-Signals (hellblau) dargestellt in einem *Cell Death Plot*. (B) Vergleich des Zeitpunktes des Zelltodes nach Auswertung des pCasper- (pC) oder Annexin V-Signals (AnV) unabhängig der Art des NK-induzierten Zelltodes der Jurkat E6-1 pCasper Zellen (n=57). (C) Eintritt des NK-induzierten Zelltodes in K562 pCasper Zellen anhand des pCasper-Signals (Apoptose: grün, Nekrose: hellgrau, Sekundärnekrose: dunkelgrau) und anhand des Annexin V-Signals (hellblau) dargestellt in einem *Cell Death Plot*. (D) Vergleich des Zeitpunktes des Zelltodes nach Auswertung des pCasper- (pC) oder Annexin V-Signals (AnV) unabhängig der Art des NK-induzierten Zelltodes der K562 pCasper Zellen (n=36). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m. Eindimensionale Scatter Plot Diagramme stellen den Mittelwert \pm SD dar. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde in B und D ein Wilcoxon Test durchgeführt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). In

Abbildung 32A und B sind alle NK-vermittelten Killingereignisse aus Abbildung 30 (Zielzellen:

Jurkat E6-1) und Abbildung 31 (Zielzellen: K562) in *Cell Death Plots* zusammengefasst. Anhand der pCasper-Signale wurde der NK-induzierte Zelltod der E6-1 Zellen unabhängig von der Art (Apoptose, Nekrose, Sekundärnekrose) nicht signifikant früher als durch Annexin V-Signale detektiert (Abbildung 32B; pC: $\emptyset 12 \pm 23,3$ min, AV: $\emptyset 23 \pm 41,4$ min). Die Detektion des K562-Zelltodes findet mittels pCasper-Signal-Analyse zwar signifikant früher statt als durch Annexin V, jedoch handelt es sich hier nur um kleine Unterschiede von 1-2 min (Abbildung 32D; pC: $\emptyset 3,5 \pm 3,5$ min, AV: $\emptyset 4,8 \pm 10,6$ min). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass mittels pCasper eine Unterscheidung der verschiedenen Arten des Zelltodes möglich ist. Mittels Annexin V kann allerdings nur der Zelltod an sich, unabhängig von der Zelltodart, detektiert werden.

6.4.2 Annexin V als Apoptosemarker in der Durchflusszytometrie

Da Annexin V als Standardmethode zur Detektion der Apoptose in durchflusszytometrischen Messungen anerkannt ist, war es das Ziel diesen Apoptosesensor auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen. Dabei wird üblicherweise Annexin V als PS-Sensor für den Nachweis von Apoptosen (in der Literatur auch als „early apoptosis“ bezeichnet) und Propidiumiodid (PI) zum Nachweis der Nekrosen (in der Literatur auch als „late apoptosis“ bezeichnet) verwendet (Vermees et al. 1995). PI ist eine nukleininterkalierende Substanz, die die intakte Zellmembran nicht passieren kann. Erst bei Verlust der Membranintegrität, wie es bei Nekrosen der Fall ist, diffundiert PI in das Zellinnere und bindet an DNA und RNA. Durch die Interkalierung wird zum einen die Fluoreszenz des Farbstoffs 20-30fach erhöht und zum anderen das Maximum der Fluoreszenzemission von 590 nm auf 617 nm verschoben. Folglich ergeben sich bei der Annexin V/PI Färbung folgende Populationen: Annexin V⁻/PI⁻ für lebende, Annexin V⁺/PI⁻ für apoptotische bzw. „early apoptotic“ und Annexin V⁺/PI⁺ für nekrotische bzw. „late apoptotic“ Zellen.

Ergebnisse

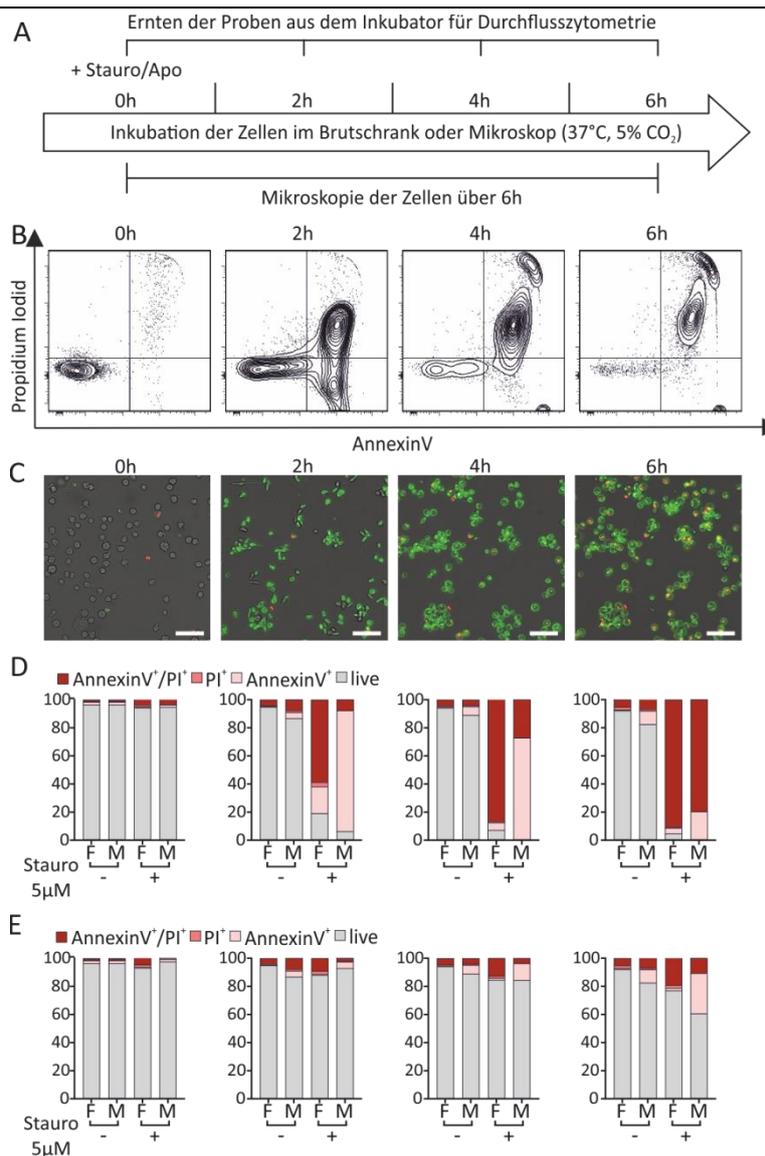


Abbildung 33: Mittels Annexin V/PI Färbung wird der eigentliche Anteil an Nekrosen in durchflusszytometrischen Analysen nach Apoptoseinduktion in Jurkat E6-1 Zellen überschätzt. Zellen stammen aus einem Experiment. Jurkat E6-1 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit 5 µM Staurosporin bzw. 5 µg/ml Apo1-1 zur Induktion der Apoptose behandelt. Dabei wurden zwei Ansätze vorbereitet: zum einen wurden die Zellen für durchflusszytometrische Analysen im Brutschrank gelagert und Proben zum Zeitpunkt 0 h, 2 h, 4 h und 6 h abgenommen, um diese mit Annexin V (Alexa 488) und Propidiumiodid (PI) zu färben und zu messen. Zum anderen wurden die Zellen über einen Zeitraum von 6 h und einem Intervall von 10 min nach Zugabe von Annexin V (Alexa 488), PI und Staurosporin bzw. Apo1-1 unter Brutschrankbedingungen mikroskopiert. (A) Schema des Versuchsaufbaus. (B) Durchflusszytometrische Analysen der Annexin V/PI Färbung der Staurosporin-behandelten Jurkat E6-1 Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. (C) Mikroskopische Aufnahmen der Annexin V (grün)/PI (rot) gefärbten und mit Staurosporin behandelten Zellen zum Zeitpunkt 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. (D und E) Quantitative Analyse der Annexin V/PI Signale mittels durchflusszytometrischer (markiert mit F) und mikroskopischer Analysen (markiert mit M, Annexin V⁺ bzw. PI⁺, wenn Signal > als Mittelwert + SD lebender Zellen) der Staurosporin (D, n (M)=353-598) und Apo1-1 (E, n (M)=235-598) behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 50 µm.

Bei dem in Abbildung 33A dargestellten Versuchsaufbau wurden Jurkat E6-1 Zellen mit apoptoseinduzierenden Substanzen (Staurosporin und anti-CD95 (Apo1-1)) behandelt und der Eintritt der Apoptosen bzw. Nekrosen mittels Annexin V/PI Färbung sowohl durchflusszytometrisch (Abbildung 33B) als auch mikroskopisch (Abbildung 33C) parallel

Ergebnisse

verfolgt. Je nach gewählter Methode (Durchflusszytometrie oder Mikroskopie) ergeben sich bei der Handhabung der Zellen Unterschiede. Die mikroskopierten Zellen wurden nach Zugabe von Staurosporin bzw. Apo1-1 nicht mehr pipettiert, während für die FACS-Analyse zu den jeweiligen Zeitpunkten Proben entnommen, gefärbt und gewaschen werden mussten. Unabhängig der verwendeten Substanz zur Induktion der Apoptose, war der Anteil an nekrotischen Zellen (Annexin V⁺/PI⁺) in den durchflusszytometrischen Analysen zu allen analysierten Zeitpunkten höher als bei den mikroskopierten Zellen (Abbildung 33D und E). Bis auf eine Ausnahme (Apo1-1 Behandlung nach 6 h) war der Anteil an toten Zellen, also die Summe aus Annexin V⁺/PI⁻ und Annexin V⁺/PI⁺ Zellen, bei beiden Analysen ähnlich hoch. Im Falle der Staurosporin-behandelten Zellen waren zum Beispiel 2 h nach mikroskopischer Untersuchungen 86 % der Zellen apoptotisch und nur 7,9 % nekrotisch, die durchflusszytometrische Analyse ergab allerdings einen Wert von 19,1 % an Annexin V⁺ (apoptotischen) Zellen und von 58,8 % an Annexin V⁺/PI⁺ (nekrotischen) Zellen. Das deutet daraufhin, dass bereits apoptotische Zellen durch die Scherkräfte beim Pipettieren, Zentrifugieren und Färben, die bei der Vorbereitung der Proben für die durchflusszytometrische Analysen unerlässlich sind, in Sekundärnekrosen übergehen.

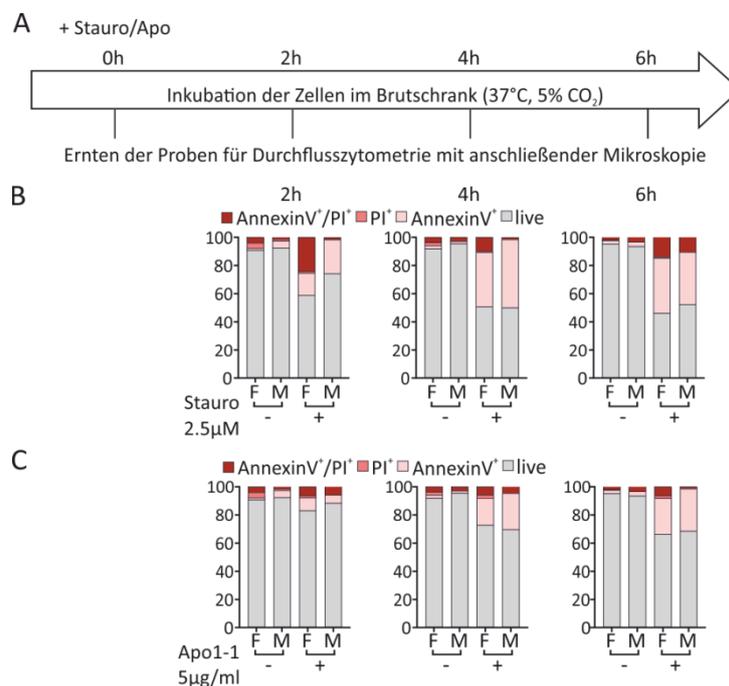


Abbildung 34: Bei gleicher Behandlung Annexin V/PI gefärbter Jurkat E6-1 Zellen werden vergleichbare Ergebnisse in durchflusszytometrischen und mikroskopischen Untersuchungen erzielt. Zellen stammen aus einem Experiment. Jurkat E6-1 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit 2,5 µM Staurosporin bzw. 5 µg/ml Apo1-1 zur Induktion der Apoptose behandelt, im Brutschrank inkubiert und Proben zum Zeitpunkt 0 h, 2 h, 4 h und 6 h abgenommen, um diese mit Annexin V (Alexa 488) und Propidiumiodid (PI) zu färben und durchflusszytometrisch zu messen. Die restlichen Zellen wurden zur mikroskopischen Analyse verwendet. (A) Schema des Versuchsaufbaus. (B und C) Quantitative Analyse der Annexin V/PI Signale mittels durchflusszytometrischer (markiert mit F) und mikroskopischer Analysen (markiert mit M, Annexin V⁺ bzw. PI⁺, wenn Signal > als Mittelwert + SD lebender Zellen)

Ergebnisse

der Staurosporin (B, n(M)=62-67) und Apo1-1 (C, n(M)=69-73) behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μm .

Es stellt sich nun die Frage, ob die Unterschiede der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Analysen in Abbildung 33 allein auf die Handhabung der Zellen zurückzuführen sind, oder ob auch die angewandte Messmethode (Mikroskopie oder Durchflusszytometrie) einen Einfluss hat. Aus diesem Grund wurden im darauffolgenden Versuch Jurkat E6-1 Zellen zum Zeitpunkt 0 h mit Staurosporin bzw. anti-CD95 (Apo1-1) behandelt, im Brutschrank inkubiert und zu gegebenen Zeitpunkten Proben zur durchflusszytometrischen Analyse vorbereitet. Die verbliebenden Zellen wurden anschließend im Mikroskop auf ihr Annexin V und PI Signal untersucht (Abbildung 34A). Im direkten Vergleich der mikroskopischen und durchflusszytometrischen Analyse zeigten sich bei Staurosporin- und Apo1-1-behandelten Zellen vergleichbare Ergebnisse im Anteil apoptotischer, nekrotischer und lebender Zellen. Schlussfolgernd ist, bei Verwendung von Annexin V und PI zur Unterscheidung der Apoptose und Nekrose die Handhabung der Zellen von wichtiger Bedeutung und deswegen in durchflusszytometrischen Analysen eher nicht geeignet. Der Anteil toter Zellen, unabhängig von der Zelltodart, kann damit jedoch verlässlich und einfach bestimmt werden.

7 Diskussion

7.1 Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Das erste Hauptziel dieser Arbeit war die Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone in der AG Hoth zu etablieren. Diese ermöglicht die antigenspezifische Interaktion des TCR der T-Zelle mit dem pMHC I der Zielzelle, wie sie *in vivo* stattfindet, auch *in vitro* zu untersuchen. Bisher wurden in der AG Hoth zur *in vitro* Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen sogenannte Superantigene, wie das Staphylokokken Enterotoxin A, bzw. Antikörper (anti-CD3 und anti-CD28) gekoppelte magnetische Beads nach klar definierten und einfachen Protokollen verwendet. Im Gegensatz dazu sind in der Literatur für die antigenspezifische Stimulation CD8⁺ T-Zellen zahlreiche Protokolle zu finden, die sich alle in scheinbar kleinen jedoch letztendlich ausschlaggebenden Details unterscheiden. So haben u. a. die Wahl der APC, die Zugabe der Zytokine, die Dauer der Stimulation und das verwendete Medium starke Auswirkungen auf die Effizienz der CD8⁺ T-Zell-Stimulation. In üblichen Protokollen zur Herstellung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone findet meist eine wochenlange Kultur der T-Zellen mit wiederholendem antigenspezifischen Stimulus über die Zugabe von APC statt (Riddell & Greenberg 1990). Dies hat die Verkürzung der Telomere und sogenanntes *Exhaustion* (dt. Erschöpfung) der antigenspezifischen T-Zellen zur Folge (Weng et al. 1995; Röth et al. 2003). Wölfl und Greenberg haben 2014 ein Protokoll veröffentlicht, das es ermöglicht CD8⁺ T-Zellen verlässlich und reproduzierbar mit seltenen TAA zu stimulieren (Wölfl & Greenberg 2014). Ein großer Vorteil dieses Protokolls liegt in der Dauer der Stimulation. Hier werden naive CD8⁺ T-Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen mit antigenpräsentierenden DC kokultiviert und zu antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen differenziert. Letztendlich kann anschließend über die Vereinzelung der Zellen die Expansion klonaler antigenspezifischer Populationen erfolgen. Wie in Abbildung 9 gezeigt, war die Generierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen für das TAA MART1 basierend auf diesem Protokoll erfolgreich. Mit Hilfe einer Dextramerfärbung wurde die TCR Avidität der verschiedenen Klonpopulationen untersucht. Bei der TCR Avidität handelt es sich um die Stärke der Bindung der TCR-pMHC I Komplexe als Kollektiv einer gesamten Klonpopulation, während die Affinität ausschließlich die Interaktion eines einzelnen TCR mit dem korrespondierenden pMHC I Molekülkomplex beschreibt (Viganò et al. 2012). Weder die TCR Avidität noch Affinität lassen jedoch Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften einer Klonpopulation zu. Aus diesem Grund wurde parallel zu der Dextramerfärbung das zytotoxische Potential der generierten CD8⁺ T-Zellklone im Real-time Killing Assay untersucht. Durch die Verwendung Peptid-beladener T2 Zellen als Zielzellen wurde die antigenspezifische

Zytotoxizität der Klonpopulationen quantifiziert. Zudem wurde auch das zytotoxische Potential gegen die Melanomzelllinie SK-Mel5 untersucht, die bereits endogen das MART1-Protein exprimiert. Dabei korrelierte die maximale Killingrate der Peptid-beladenen T2 Zellen und der SK-Mel5 Melanomzelllinie (gemessen mittels Real-time Killing Assay) stark mit der Antigen-spezifität (gemessen mittels Dextramerfärbung). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Verwendung des Real-time Killing Assays sowohl eine Aussage bezüglich des zytotoxischen Potentials, als auch bezüglich der Antigen-spezifität generierter antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen erlaubt. Somit ist die Verwendung von kostenintensiven Dextrameren nicht zwingend notwendig, um die funktionelle Antigen-spezifität zytotoxischer T-Zellen bestimmen zu können.

Das Protokoll nach Wöfl und Greenberg ist bereits für die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen mit sogenannten „rare antigens“ (engl. seltene Antigene), also Antigene gegen die wenige CD8⁺ T-Zellen des naiven Repertoires spezifisch sind, etabliert. Dennoch werden von den Autoren weitere Optimierungsschritte für eine mögliche effizientere Aktivierung diskutiert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit u. a. die zusätzliche Gabe von IL-21 in unterschiedlichen Dosen an Tag 8, 11 und 13 der DC/CD8⁺-Kokultur getestet (Tabelle 10). Niedrige Dosen an IL-21 (10 ng/ml) hatten bereits einen positiven Effekt auf das zytotoxische Potential MART1- und gp100-stimulierter CD8⁺ T-Zellen. Durch Zugabe höherer Dosen (30 ng/ml IL-21) wurde dieser Effekt bei der gp100-spezifischen Stimulation noch weiter verstärkt (Abbildung 10). Im Einklang mit diesen Ergebnissen beschrieben Wöfl und Greenberg in präliminären Experimenten sowie auch Li und Kollegen einen positiven IL-21-abhängigen Effekt sowohl auf die Anzahl als auch das zytotoxische Potential antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Li et al. 2005). Zudem haben Parrish-Novak und Kollegen bereits gezeigt, dass IL-21 die Expansion naiver CD8⁺ T-Zellen stark fördert (Parrish-Novak et al. 2000). Somit hat wie zu erwarten die Zugabe von IL-21 auch eine höhere Anzahl an ausgewachsenen klonalen Populationen nach Vereinzelung der IFN γ ⁺ T-Zellen zur Folge. Nach Zugabe von 10 ng/ml IL-21 während der MART1-spezifischen Stimulation sind in durchschnittlich 4,7 % aller ausgesäten Wells der 96-Well Platten Klone ausgewachsen (Gesamtdurchschnitt für MART1 = 4 %). Im Falle der gp100-Stimulation hatte die Zugabe niedriger Dosen IL-21 (10 ng/ml) in 4,9 % und die Zugabe hoher Dosen (30 ng/ml) sogar in 24 % aller Wells das Auswachsen klonaler Populationen zur Folge (Durchschnitt Standardbedingung gp100 = 2,8 %). Die funktionelle Analyse der letztendlich expandierten Klone zeigte jedoch keine signifikante Veränderung, weder in der Antigen-spezifität noch im zytotoxischen Potential (Abbildung 11, Abbildung 12). Es ist bereits beschrieben, dass IL-21 die IFN γ Produktion von T-Zellen fördert (Strengell et al. 2003). So könnte eine IL-21 Zugabe während der Stimulation zu einer Isolation von vermehrt antigen-un-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

mittels IFN γ Sekretionsassay führen und somit das Auswachsen unspezifischer Klone ermöglichen. Allerdings ist zu beachten, dass aufgrund der geringen Anzahl expandierter Klone (25 MART1, davon 5 IL-21 stimuliert und 20 gp100, davon 5 IL-21 stimuliert) keine eindeutige Aussage über den Einfluss von IL-21 auf die Effizienz der T-Zellklonierung getroffen werden kann.

Basierend auf dem Protokoll von Wölfl und Greenberg wurden erfolgreich MART1- und gp100-spezifische CD8⁺ T-Zellklone generiert. Es wurde somit ein wertvolles *Tool* (dt. Werkzeug) geschaffen, das es in der AG Hoth ermöglicht die antigenspezifische T-Zell-vermittelte Zytotoxizität *in vitro* zu studieren. Neben in der Arbeit vorgestellten Fragestellungen kamen diese Klone u. a. bereits zur Untersuchung von intrazellulären Ca²⁺-Signalen, siRNA und miRNA Transfektionen (Hart et al. 2019), Substanzenscreens (in Kooperation mit dem Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland) sowie der Lyse von primärem Tumormaterial zum Einsatz.

7.2 Interdependenz der CD8⁺- und NK-vermittelten Zytotoxizität

NK-Zellen als Teil der angeborenen Immunität sind im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen, die dem adaptiven Immunsystem angehören, bei Erstinfektionen früher aktiv. Sie bilden die sogenannte erste Hürde gegen Pathogene, Krebs- und sonstige entartete Zellen. Dies ist möglich, da NK-Zellen zum einen in einer sehr viel höheren Anzahl als spezifisch aktivierte CD8⁺ T-Zellen vorliegen und zum anderen nicht antigenspezifisch, sondern über die Detektion von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren reguliert werden (Lanier 1998; Moretta et al. 2001). Antigen-spezifische naive CD8⁺ T-Zellen werden hingegen nach korrespondierendem Antigenkontakt mit APC aktiviert und damit erst zur Expansion angeregt (Brenchley et al. 2002). Dennoch gibt es eine Phase in der beide Zelltypen, also NK- sowie antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen, parallel agieren (Pallmer & Oxenius 2016). Es gibt bereits einige Studien, die beschreiben, dass NK-Zellen einen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellantwort haben. Dies kann direkt, über die Sezernierung von Zytokinen (z. B. IFN γ , IL-15, IL-18) (Vankayalapati et al. 2004; Krebs et al. 2009) oder indirekt über die Modulation der Anzahl und Funktion von DC, welche wiederum direkt Einfluss auf die T-Zellantwort nimmt, geschehen (Gerosa et al. 2002; Wehner et al. 2011; Vitale et al. 2005). Wie sich jedoch die Interaktion von NK-Zellen mit den Zielzellen (also den Krebs- bzw. entarteten Zellen) auf die antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort auswirkt, war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt. Auch der umgekehrte Fall, also die Auswirkung der CD8⁺ T-Zellinteraktion mit den Zielzellen auf die NK-vermittelte Zytotoxizität, wurde bisher nicht adressiert.

7.2.1 Die Resistenz der Melanomzellen gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität nach einer NK-Kokultur ist bedingt durch eine Hochregulation an NK-inhibitorischen Rezeptoren

Die Interdependenz der beiden Effektorzelltypen wurde in Melanomzellen untersucht. Da die Melanomzelllinie SK-Mel5 sowohl von CTL_{MART1} als auch NK-Zellen detektiert und getötet wird (Abbildung 15), wurde dieses System für das in dieser Arbeit etablierte Kokulturmodell eingesetzt (Abbildung 16). Die mit NK-Zellen kokultierten SK-Mel5 Zellen entwickelten eine Resistenz gegenüber der NK-vermittelten Zielzellyse. Das Ausmaß dieser Resistenz stieg dabei proportional zur Anzahl der eingesetzten NK-Zellen in der Kokulturbedingung an (Abbildung 17B-D). Zudem wurde parallel eine Hochregulation von MHC I Molekülen im Allgemeinen und des MART1₂₇₋₃₅-bindenden HLA-A2 Moleküls im Speziellen detektiert (Abbildung 17E). Beide Beobachtungen wurden bereits von Balsamo und Kollegen, sowie Sabrina Cappello in unserem Labor getroffen (Balsamo, Vermi, et al. 2012; Cappello 2015). MHC I Rezeptoren, dabei vor allem HLA-C, dienen als Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL1-3 auf der Oberfläche von NK-Zellen (Anfossi et al. 2006). Dieser Mechanismus schützt den menschlichen Körper normalerweise vor Autoimmunreaktionen, also dem Angriff körpereigener Zellen, ist jedoch in dem Fall der NK-vermittelten Tumorbekämpfung hinderlich. Es ist bereits gezeigt, dass das inflammatorische Zytokin IFN γ über die JAK/STAT1 Signalkaskade zur Hochregulation der MHC I Expression führt (Zhou 2009). IFN γ wird wiederum von NK-Zellen sezerniert und induziert damit direkt die MHC I Hochregulation (Gidlund et al. 1978; Balsamo, Vermi, et al. 2012). Auch Cho und Kollegen haben in einem Melanom-Mausmodell gezeigt, dass die Zugabe von IFN γ eine starke Hochregulation der gesamten MHC I-Expression von Tumorzellen fördert (Cho et al. 2011). Dieser IFN γ induzierte Effekt war bereits nach 6 h Inkubationszeit zu detektieren, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um einen reversiblen Signal-induzierten Effekt handelt. Auch in der Studie von Balsamo et. al wurde die MHC I-Hochregulation nach Ausbleiben des NK-vermittelten Selektionsdrucks von den Melanomzellen wieder auf Ausgangsniveau herunterreguliert (Balsamo, Vermi, et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die NK- und CTL-induzierten Kokultur-Effekte auf die Melanomzellen hauptsächlich über eine Dauer von 3-4 Tagen beobachtet, was darauf hindeutet, dass auch hierbei hauptsächlich Signal-induzierte reversible Resistenzmechanismen untersucht wurden. Um tatsächliche Mutations-induzierte Escape Mechanismen aufschlüsseln zu können, müssten die kokultierten Melanomzellen über einen längeren Zeitraum beobachtet und untersucht werden.

7.2.2 Aufgrund der hohen Avidität der CTL_{MART1} ist die Melanom-spezifische Lyse durch CTL_{MART1} trotz NK-induzierter MHCI-Hochregulation der SK-Mel5 Zellen unbeeinträchtigt

Während eine Hochregulation von MHCI Molekülen also eine Inhibierung der NK-Zellen zur Folge hat, könnte sie bei der Interaktion mit CD8⁺ T-Zellen genau den gegenteiligen Effekt hervorrufen (Balsamo, Pietra, et al. 2012). Denn der TCR der CD8⁺ T-Zelle bindet antigenspezifisch den pMHCI und kann erst durch die Ausbildung dieser IS den Zelltod in der Zielzelle induzieren. Die Koinkubation von SK-Mel5 Zellen mit NK-Zellen hatte allerdings keinerlei Einfluss auf die CTL_{MART1}-vermittelte Zytotoxizität (Abbildung 21). Dies könnte mit der hohen funktionellen Avidität des CTL_{MART1} verwendeten Klon 3 begründet werden. Wie in Abbildung 14 gezeigt, wurde mit Hilfe des Real-time Killing Assays festgestellt, dass bereits eine Peptidbeladung der T2 Zelllinie mit einer Konzentration von knapp 10⁻¹¹ M ausreicht um eine halbmaximale Lyse (EC₅₀) der Ziellzellen zu induzieren. Sykulev und Kollegen zeigten bereits im Jahr 1994, dass weniger als 10 pMHCI präsentiert auf der Zielzelle für eine effiziente Aktivierung der zytotoxischen Kaskade von CD8⁺ T-Zellen notwendig sind (Sykulev et al. 1994). Zwei Jahre später hat dieselbe Arbeitsgruppe mit Hilfe von radioaktiv-markierten Peptiden bewiesen, dass nur 3 pMHCI bereits eine halbmaximale zytotoxische T-Zellantwort induzieren. Basierend auf diesen Ergebnissen haben sie geschlussfolgert, dass auch bei nur einem MHCI-Peptid-Komplex die zytotoxische Signalkaskade aktiviert werden kann (Sykulev et al. 1996). Der in dieser Studie verwendete Klon zeigte eine ähnlich hohe funktionelle Avidität wie der in Abbildung 21 verwendete CTL_{MART1} Klon 3, womit angenommen werden kann, dass auch im Falle des hier untersuchten MART1-spezifischen Klons bereits wenige pMHCI ausreichen um eine effiziente zytotoxische Signalkaskade zu aktivieren.

7.2.3 Eine Kokultur mit CTL_{MART1} induziert eine MHCI-Hochregulation in SK-Mel5 Zellen und schützt sie somit vor der NK-vermittelten Zytotoxizität

Neben NK-Zellen, die die MHCI Expression in Tumoren bewirken, ist auch bereits bekannt, dass CD8⁺ T-Zellen den gegenteiligen Effekt induzieren können. Bereits in den frühen 1990er Jahren haben Arbeitsgruppen den Effekt der MHCI-Herunterregulation und somit den *Escape* der Tumorzellen vor der CD8⁺ T-Zellantwort beschrieben (Restifo et al. 1993; Möller & Hämmerling 1992). Auch in Melanompatienten, die mittels CD8⁺-basierter Immuntherapien behandelt wurden, wurde eine Herunterregulation von funktionalen MHCI Molekülen beobachtet (Chang et al. 2005; Restifo et al. 1996). Somit war zu erwarten, dass eine Koinkubation von SK-Mel5 Zellen mit CTL_{MART1} zu einer Herunterregulation von MHCI und zum anderen dadurch

bedingt ein verbessertes NK-vermitteltes Killing zur Folge haben könnte. Allerdings ist keiner der beiden Fälle eingetreten. Überraschenderweise hat die CTL_{MART1}-Kokubation von SK-Mel5 Zellen eine starke Hochregulation von MHCI induziert, was eine Resistenz der Melanomzellen gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität zur Folge hatte (Abbildung 19B-E). Es gibt bereits einige Studien, die zeigen dass eine Hochregulation von MHCI in Tumoren durch Immuntherapien induziert wird (Garrido et al. 2017; Lennicke et al. 2017; Carretero et al. 2008). Allerdings handelt es sich dabei in keinem der Fälle um einen CD8⁺ T-Zell-induzierten Effekt. Eine CD8⁺ T-Zell-bedingte MHCI Hochregulation von Melanomzellen wurde allerdings bereits von einer anderen Arbeitsgruppe in einem CTL_{MART1}-Melanom-Kokultur Modell beobachtet (Neubert et al. 2016). Womöglich hat die Ausschüttung von IFN γ durch CTL_{MART1} zur Induktion der MHCI-Hochregulation beigetragen. Um diese Hypothese jedoch zu beweisen, wäre eine Kokultur von SK-Mel5 Zellen mit CTL_{MART1} im Beisein von anti-IFN γ Antikörpern notwendig.

7.2.4 Die Kokultur von SK-Mel5 mit CTL_{MART1} induziert eine Resistenz gegen die CTL_{MART1}-vermittelte Zytotoxizität und ist durch eine Herunterregulation der MART1-Proteinexpression der Melanomzellen bedingt

Die Hochregulation von MHCI in SK-Mel5 Zellen nach einer CTL_{MART1}-Kokultur hat einen inhibierenden Effekt auf die NK-Zell vermittelte Zytotoxizität. Im Umkehrschluss wurde ein gegenteiliger Effekt bzw. keine Veränderung (wie es bereits nach der NK-induzierten MHCI Hochregulation der Fall war (Abbildung 21)) in der Lyse durch CTL_{MART1} erwartet. Jedoch haben die mit CTL_{MART1}-kokultivierten SK-Mel5 Zellen parallel zu einer Hochregulation von MHCI eine Resistenz gegenüber der CTL_{MART1}-vermittelten Lyse entwickelt (Abbildung 23). Es wurde bereits von Rivoltini et al. gezeigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der MHCI Expression von Melanomzellen und der Killingeffizienz durch antigenspezifische CTL besteht (Rivoltini et al. 1995). So ist es verwunderlich, dass eine Erhöhung des MART1₂₇₋₃₅-spezifischen MHCI Serotyps HLA-A2 eine verminderte Zytotoxizität durch CTL_{MART1} zur Folge hat. Jedoch haben Cho und Kollegen in einem Melanom-Mausmodell gezeigt, dass IFN γ (wie es auch von aktivierten CTL sezerniert wird) eine Tumoresistenz gegen die CTL-vermittelte Zytotoxizität fördert. Dies wurde zum einen durch eine Hochregulation des CTL-inhibierenden Liganden PD-L1 von Melanomzellen begründet und zum anderen durch eine verschlechterte CTL-vermittelte Tumorerkennung erklärt. Die verschlechterte Erkennung wurde laut Cho et. al durch eine starke Hochregulation von pMHCI hervorgerufen, die jedoch nicht die CTL-entsprechenden Antigene (MART1) präsentieren und so zu einer starken Reduktion des Verhältnisses MART1-MHCI/gesamte pMHCI führt (Cho et al. 2011). Auch Cormier und Kollegen konnten in einer weiteren Studie im Jahr 1999 zeigen, dass neben der Expression des antigenspezifischen HLA

Moleküls auch die Verfügbarkeit der TAA eine wichtige Rolle in der CD8⁺-vermittelten Zytotoxizität einnimmt. Hier zeigten Melanomzelllinien, generiert von 25 verschiedenen Patienten, auch bei vergleichbar hoher Expression von HLA-A2 unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber der MART1-spezifischen Zytotoxizität vermittelt durch einen antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellklon. Ein Unterschied zwischen den Zelllinien lag hier bei der Expression von MART1. Durch exogene Beladung der Melanomzellen mit dem korrespondierenden MART1₂₇₋₃₅-Peptid konnte die Variabilität der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Lyse aufgehoben werden (Cormier et al. 1999). Es könnte also sein, dass die MHC I Level der kokultivierten SK-Mel5 Zellen zwar erhöht, die Epitop-Präsentation von MART1₂₇₋₃₅ allerdings vermindert ist. Durch ein *Rescue*-Experiment, bei dem die resistenten Melanomzellen mit dem korrespondierenden Antigen exogen beladen wurden, wurde diese Hypothese bestätigt (Abbildung 25B-D). So hatte die exogene Beladung der SK-Mel5 Zellen, die mit einem CTL_{MART1}:Melanom Verhältnis von 1:1 kokubiert wurden, sogar eine Erhöhung des Killings im Vergleich zu den MART1-beladenen Kontrollzellen zur Folge (ctrl+MART1= 61,33 ± 9,8 %; 1:1+MART1= 72,64 ± 5,8 %). Aufgrund der exogenen Beladung können somit mehr MHC I Moleküle dieses Epitop präsentieren, was zu einer effizienteren CTL_{MART1}-vermittelten Lyse von Melanomzellen führt. Auch Ohashi und Kollegen konnten in einem akuten T-Zelleukämie Modell durch exogene Beladung CD8⁺-resistenter Zellen die *in vitro* CTL-vermittelte Zytotoxizität wiederherstellen (Ohashi et al. 2002). Zudem hatte eine Vakzinierung von Ratten mit dem korrespondierenden Peptid einen positiven Einfluss auf die *in vivo* Tumorbekämpfung (Hanabuchi et al. 2001). Die Peptidvakzinierung wurde auch bereits in Melanompatienten durchgeführt. So führte die erstmalige Vakzinierung mit gp100_{209-217(T210M)} in Kombination mit IL-2 in 42 % aller untersuchten Patienten zur Regression des Melanoms (Rosenberg et al. 1998). Auch später konnte dieser positive Effekt noch einmal bestätigt werden (Schwartzentruber et al. 2009). In Kombination mit Ipilimumab (anti-CTLA4) wurde jedoch kein vorteilhafter Effekt durch eine zusätzliche gp100_{209-217(T210M)} Vakzinierung erreicht (Prieto et al. 2012; Hodi et al. 2010). Neben der gp100-Vakzinierung wurde bereits auch eine MART1-Vakzinierung von Melanompatienten durchgeführt. Eine MART1₂₇₋₃₅-Vakzinierung führte dabei zu keiner deutlichen Regression des Tumors in Melanompatienten (Cormier et al. 1997). Allerdings ist zu beachten, dass eine Peptid-Vakzinierung in diesen Fällen das primäre Ziel hatte, die Antigenpräsentation durch DC und andere APC zu fördern, sodass eine verbesserte antigenspezifische CD8⁺ T-Zell-Immunantwort induziert werden kann. In Kombination mit adoptiven CD8⁺ T-Zelltherapien wurde diese Peptidvakzinierung noch nicht durchgeführt und wäre somit ein interessanter Ansatzpunkt in der Immuntherapie von Melanompatienten. Die Nebenwirkungen bei Peptidvakzinierungen beschränken sich üblicherweise auf lokale, oberflächliche

Hautirritationen an den Injektionsstellen und sind somit als minimal einzustufen. Allerdings sollte bei den adoptiven Therapieansätzen beachtet werden, dass CTL_{MART1} mit einer hohen funktionellen Avidität *in vivo* schädliche zytotoxische Immunantworten induzieren können. MART1 wird als TAA im Melanom zwar überexprimiert, liegt jedoch in geringerem Maße auch in Melanozyten vor. So beschrieb das Labor von Steven Rosenberg bei der Behandlung von Melanompatienten mit hoch affinen CTL_{MART1} bzw. CTL_{gp100} in einer klinischen Studie starke Nebeneffekte wie die Zerstörung der Melanozyten in der Haut, den Augen und den Ohren, die teilweise mit lokalen Steroid-Applikationen behandelt werden mussten (Johnson et al. 2009).

Mit der Hochregulation von MHC I Molekülen, sowie der parallelen Inhibierung der Präsentation des korrespondierenden Epitops MART1₂₇₋₃₅ während einer Kokultur mit CTL_{MART1}, haben die Melanomzellen einen sehr effektiven Escape-Mechanismus entwickelt: Die erhöhte MHC I Expression führt zu einem Schutz vor der NK-Zell vermittelten Lyse und die inhibierte Präsentation des MART1-Antigens bewahrt vor einem Angriff durch CTL_{MART1}. Es stellt sich nun die Frage, wie ein solcher Mechanismus reguliert wird. Aus diesem Grund wurde zunächst die allgemeine Expression des gesamten MART1 Proteins mittels Western Blot Analyse untersucht. Wie in Abbildung 25E dargestellt ist, wird die Expression des MART1-Proteins mit zunehmendem E:T-Verhältnis in der Kokultur herunterreguliert. Dass dieser Effekt womöglich auch IFN γ -induziert sein könnte, zeigt die Studie von Le Poole et al.. Hier hatte die Inkubation der Melanomzelllinie M14 mit IFN γ eine Herunterregulation der MART1-Proteinexpression um 65 % zur Folge. Damit ging auch eine um 80 % verminderte Zytotoxizität vermittelt durch MART1-spezifische CD8⁺ T-Zellen einher. Interessanterweise konnte durch eine exogene Beladung der IFN γ -behandelten M14 Zellen mit dem Peptid MART1₂₇₋₃₅ das zytotoxische Potential wiederhergestellt werden (Le Poole et al. 2002). Auch die Arbeitsgruppe von Daniel Speiser konnte in einem Melanom-CTL_{MART1}-Kokultur Modell eine Erhöhung der MHC I parallel zum Verlust der MART1-Expression feststellen (Neubert et al. 2016). Die IFN γ -induzierte Herunterregulation von TAA wurde als Tumor-Escape-Mechanismus auch *in vivo* bereits beobachtet (Beatty & Paterson 2000). Die Korrelation der detektierten MART1-Proteinmenge mit der normierten Endlyse der kokultivierten Melanomzellen im Real-time Killing Assay zeigt eine steile Sättigungskurve (Abbildung 25F). So wurde erst mit nur noch 15 % der ursprünglichen MART1-Expression eine Verschlechterung des Killings auf knapp 60 % festgestellt. Diese erst relativ spät beeinträchtigte Zytotoxizität lässt sich vermutlich durch die hohe funktionelle Avidität des verwendeten CTL_{MART1} Klon 3 zum korrespondierenden Antigen erklären (Abbildung 14).

7.2.5 Kritische Betrachtung der Methodik und Ausblick

Das in Abbildung 16 dargestellte Modell bietet eine gute Möglichkeit die Interdependenz der beiden Effektorzelltypen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen beim Töten von Tumorzellen besser zu verstehen. Jedoch gibt es einige Ansatzpunkte, die eine Optimierung des Systems ermöglichen. Zum einen wurde zur Vereinfachung zunächst keine direkte Interaktion zwischen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in der Kokultur mit SK-Mel5 Zellen ermöglicht. Deswegen sollte im nächsten Schritt eine Kokultivierung von Melanomzellen mit CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen durchgeführt werden. Dies könnte einen kooperativen Effekt induzieren, der zu einer effizienteren Bekämpfung der Tumorzellen führt (Courau et al. 2019). Dafür wäre es allerdings von Vorteil, sowohl die CTL_{MART1} als auch die NK-Zellen eines Spenders zu verwenden, um eine allogene Autoimmunreaktion zu vermeiden (Rodriguez-Barboza et al. 2018).

Außerdem wurden in dem System bisher nur SK-Mel5 Zellen als Melanomzelllinie untersucht. Die hier gezeigten Effekte, sowohl durch NK als auch durch CD8⁺ T-Zellen induziert, wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Melanomzellen gezeigt (Balsamo, Vermi, et al. 2012; Neubert et al. 2016). Dennoch wurde das Zusammenspiel von NK und CD8⁺ T-Zellen in einem solchen Kokultur-System noch nicht analysiert. Somit wäre es sinnvoll mit Hilfe des hier vorgestellten Kokultur-Modells weitere Melanomzellen zu untersuchen. Dabei ist neben Melanomzelllinien auch primäres Tumormaterial von besonderem Interesse.

Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt in dem Kokultur-Modell ist der Einsatz von CD8⁺ T-Zellklonen, spezifisch für ein anderes Melanom-assoziiertes Antigen als MART1. In diesem Fall würden sich die im Rahmen dieser Arbeit generierten gp100-spezifischen CTL_{gp100} anbieten, da bereits eine gp100-spezifische Zytotoxizität gegen SK-Mel5 Zellen gezeigt wurde (Abbildung 12). So könnte untersucht werden, ob die CTL_{MART1}-induzierte Resistenz der Melanomzelllinie gegenüber CD8⁺-vermittelter Zytotoxizität MART1-spezifisch ist, oder auch die Lyse durch CTL_{gp100} beeinflusst.

Auch könnten neben den bereits untersuchten Resistenzmechanismen noch weitere Signalkaskaden zu einer *Escape*-Reaktion der SK-Mel5 Zellen vor der NK- bzw. CTL-vermittelten Immunantworten führen. So wurde in Tumorzellen von Leukämiepatienten eine Resistenz gegen die Effektor-vermittelte Lyse durch eine verminderte Perforin-Bindekapazität an der PM hervorgerufen (Lehmann et al. 2000). Auch ist die Sezernierung sogenannter Serpine (Serin Protease Inhibitoren) zur Inaktivierung von Granzym B (Medema et al. 2001) und die

Enzym-vermittelte Degradation von Perforin sind bereits beschriebene Schutzmechanismen von Tumorzellen vor der Effektor-vermittelten Immunantwort (Khazen et al. 2016).

Mikroskopische Aufnahmen der SK-Mel5 Zellen zusammen mit den beiden Effektorzelltypen über die Dauer der Kokultur von 3-4 Tagen würde womöglich die Ausbildung der Resistenzmechanismen der Melanomzellen erklären. So könnte es sein, dass manche Zellen in der Kokultur bereits von Anfang an resistent sind und diese durch den Effektorzell-induzierten Selektionsdruck angereichert werden. Andererseits könnte allein durch die Zytokinausschüttung der Effektorzellen die Resistenz der Melanomzellen gegenüber NK- und CD8⁺-vermittelter Zytotoxizität induziert werden. Es ist bereits bekannt, dass Zytokine wie TNF α , IL-6, TGF- β , IL-10, IL-17 aber auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einen Einfluss auf die Karzinogenese nehmen (Landskron et al. 2014). Allerdings ist zu beachten, dass diese Zytokine hauptsächlich von Makrophagen, Neutrophilen und CD4⁺ T-Zellen im Tumormikromilieu gebildet werden. Der Einfluss dieser Zellen wurde im Rahmen des hier dargestellten Assays jedoch bisher noch nicht berücksichtigt.

Ein Nachteil der hier gezeigten Versuche ist die Verwendung der Melanomzellen in einem Monolayer in Zellkulturflaschen, die das komplexe Abbild eines dreidimensionalen Tumors nicht in allen Aspekten widerspiegeln kann (Katt et al. 2016). Aus diesem Grund werden *in vitro* sogenannte Sphäroide (Abbildung 27D) unter nicht adhärenenten Bedingungen entwickelt, die primären humanen Tumoren sehr ähnlich sind und eine Analyse mit Immunzellen in einem 3D-Modell ermöglichen (Hirt et al. 2014). In 3D Melanomsphäroiden wurde eine höhere Kapazität zur Inhibierung von T-Zellaktivierung und Proliferation verglichen zu 2D Tumor Modellen detektiert. Das weist daraufhin, dass Sphäroide die *in vivo* immunmodulatorische Funktion von Tumoren eher als 2D Kulturen widerspiegeln (Ramgolam et al. 2011). Erst kürzlich haben Courau und Kollegen die Interaktion von NK, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit Sphäroiden aus Zelllinien und primären Zellen aus kolorektalen Tumoren untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass vor allem NK und CD8⁺ T-Gedächtniszellen stark in die Sphäroide infiltrieren und dadurch zum Verlust der Integrität und Verkleinerung des Tumors führen. Außerdem zeigte sich durch die Kokultur mit Immunzellen eine deutliche Erhöhung an apoptotischen Tumorzellen in den Sphäroiden (Courau et al. 2019). Allerdings wurden in dieser Studie CD8⁺ T-Zellen aus dem Blut gesunder Spender isoliert und direkt in der Sphäroiden-Kokultur eingesetzt. Somit finden in diesem Modell hauptsächlich unspezifische Interaktionen zwischen Tumorzellen und CD8⁺ T-Zellen statt. Wahrscheinlich haben aber antigenspezifische Interaktionen zwischen Sphäroiden und CD8⁺ T-Zellen einen größeren Effekt auf die

Eliminierung der Tumorzellen. Somit wäre es sinnvoll Sphäroide aus SK-Mel5 oder anderen Melanomzelllinien zu entwickeln, um den Effekt von CTL_{MART1} und NK-Zellen auf das dreidimensionale Tumorgebilde zu untersuchen. Mit Hilfe der Lightsheet-Mikroskopie wurde bereits eine Interaktion von NK-Zellen mit Sphäroiden der Brustkrebszelllinie MCF-7 in einer 3D-Matrix detektiert (Abbildung 27D). Zur Untersuchung der Apoptose in den Tumorzellen der Sphäroiden wurden die MCF-7 Zellen mit dem FRET-Sensor pCasper3-GR transfiziert (Backes et al., 2018).

Die Expression dieses Sensors wäre auch in SK-Mel5 Zellen von großem Interesse. Leider ist es bisher jedoch nicht gelungen, stabil exprimierende SK-Mel5 pCasper Zellen herzustellen. Eine transiente Transfektion mit dem Apoptosesensor zeigte zwar eine gute Transfektionsrate, die pCasper Expression ging jedoch nach einiger Zeit trotz hohem Selektionsdruck verloren. Womöglich wäre dies in anderen Melanomzellen nicht der Fall. Außerdem könnte neben der hier angewandten Elektroporation auch eine lentivirale Transduktion der SK-Mel5 Zellen vorgenommen werden.

Die Verfügbarkeit von SK-Mel5 pCasper Zellen würde ein weiteres Problem lösen. Wie in Abbildung 26 dargestellt, ist eine direkte Detektion der Apoptose in Calcein-beladenen Zielzellen, wie sie auch im Real-time Killing Assay verwendet werden, nicht möglich. Hier kann der Zielzelltod nur bei einer primären oder sekundären Nekrose durch die direkte Diffusion des Farbstoffs aus der Zielzelle detektiert werden. Es konnte mit Hilfe einer transienten Transfektion der SK-Mel5 Zellen mit dem pCasper3-GR Sensor festgestellt werden, dass durch CTL_{MART1} hauptsächlich Apoptosen induziert werden (Abbildung 28). Das bedeutet, dass alle Real-time Killing Assays, in denen SK-Mel5 als Zielzellen und CTL_{MART1} als Effektorzellen verwendet wurden, nicht den tatsächlichen Anteil toter Zellen innerhalb der 4 h Messzeit widerspiegeln. Dieser Anteil wird in dem Calcein-basierten Assay stets unterschätzt, sodass womöglich Effekte unentdeckt bleiben bzw. erst später beim Eintritt der Sekundärnekrose detektiert werden können. Bei einer verlängerten Messzeit von über 4 h wäre dieser Effekt weniger kritisch, allerdings ist dies aufgrund des aktiven Calcein-Efflux noch lebender Zielzellen durch Pumpenaktivitäten wie der von MRP-1 nicht möglich (Walsh et al. 2010). Es ist jedoch zu beachten, dass die Effektor:Zielzellverhältnisse in mikroskopischen Versuchen bewusst niedriger gewählt wurden (1:1-2:1) als in den Plattenmessgerät-basierten Populationsassays (5:1-20:1). Das bedeutet, dass in den Real-time Killing Assays apoptotische Zellen durch den mechanischen Stress bei erneuten Effektorzell-Kontakt bzw. durch eine höhere Menge an sezerniertem Perforin relativ zeitnah sekundärnekrotisch werden, was zum Verlust des

Farbstoffs Calcein und somit zur Detektion des Zelltodes führt. Eine Analyse alternativer Apoptose-Sensoren ist für mikroskopische Untersuchungen auf Einzelzellebene von hoher Priorität und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht (siehe 7.3).

Auch wäre es interessant die Expressionsprofile der kokultivierten SK-Mel5 Zellen genauer zu untersuchen, um verantwortliche Proteine für die Ausbildung der Resistenz der Melanomzellen gegenüber NK- und CD8⁺-vermittelter Zytotoxizität zu identifizieren. Dafür würde sich ein Proteomik-Screen z. B. mittels Massenspektrometrie anbieten. Allerdings sind bei dieser Methodik entscheidende Nachteile wie die Reproduzierbarkeit in Melanomzellen und die benötigte Menge an Ausgangsmaterial zu nennen (Sabel et al. 2011). Aus diesem Grund wäre zunächst ein mRNA-basierter Microarray eine interessante Option. Auch Neubert et. al führten einen solchen Microarray mit ihren CD8⁺-kokultivierten Melanomzellen durch und fanden dabei 212 Gene, die verglichen zu der unbehandelten Kontrolle, differentiell exprimiert waren (Neubert et al. 2016). Sie haben sich in dieser Veröffentlichung allerdings auf die Identifizierung von Referenzgenen fokussiert, deren Expression durch Koinkubation mit CTL_{MART1} unverändert bleibt und somit zur Normierung zukünftiger Melanom-spezifischer Expressionsanalysen verwendet werden können. Ein weiterer Microarray mit dem Fokus differentiell exprimierte Gene in den NK- und CTL_{MART1}-Kokulturbedingungen zu identifizieren, ist der nächste Schritt, um sogenannte *Driver genes* (dt. Treibergene) zur Ausbildung von Melanom-spezifischer Resistenzmechanismen aufzudecken.

Abschließend kann festgehalten werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Modell zur Untersuchung der dynamischen Interaktion von Tumorzellen mit CD8⁺ T- und NK-Zellen geeignet ist. Aufgrund der geringen Komplexität des Zwei-Komponenten Modells (CD8/Melanom bzw. NK/Melanom) in einer 2D-Kultur, können vereinfacht diverse Parameter verändert und somit deren Auswirkung auf die Ausbildung der Resistenzmechanismen von Melanomzellen analysiert werden. So könnten langfristig auch Fragestellungen adressiert werden, die eine Relevanz für CD8⁺ T- bzw. NK Zell-basierte Immuntherapien von Melanompatienten darstellen.

7.3 Direkter Vergleich von Annexin V und pCasper3-GR als Apoptosensoren

Die Effektorzellen CTL und NK können nach Ausbildung einer IS verschiedene Arten des Zelltodes in ihrer Zielzelle induzieren. Hauptsächlich wird hierbei zwischen dem programmierten Zelltod, der Apoptose, und dem unkontrollierten Aufplatzen der Zelle, der Nekrose, unterschieden. Bis heute gilt der Annexin V-basierte Assay zur Detektion der PS-Translokation an der PM vor allem in der Durchflusszytometrie, aber auch in der mikroskopischen Analyse, als „Goldstandard“ zur Detektion von Apoptose (Vermees et al. 1995). Neben der PS-Externalisierung ist auch die Analyse der Caspasenaktivierung eine renommierte Methode, um den Eintritt der Apoptose zu analysieren. Ein eleganter Ansatz ist hierbei die Verwendung FRET-basierter Konstrukte, vor allem zur Detektion der Aktivierung der Effektor-Caspase 3 (Rehm et al. 2002; Tyas et al. 2000; Albeck et al. 2008; Shcherbo et al. 2009). So hat auch unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe des FRET-basierten pCasper3-GR Konstrukts gezeigt, dass primäre NK-Zellen ihre Zielzellen über Apoptose, Nekrose und gemischte Phänotypen der beiden Zelltodarten abtöten (Backes et al. 2018).

7.3.1 CTL_{MART1} induzieren hauptsächlich Apoptosen in SK-Mel5 Zellen

Wie bereits in Abbildung 15 gezeigt, steht uns mit den SK-Mel5 Zellen eine Zelllinie zur Verfügung, die sowohl von den im Rahmen dieser Arbeit generierten CTL_{MART1} als auch primären NK-Zellen erkannt und getötet wird. Allerdings fanden diese Zellen bisher hauptsächlich in dem Calcein-basierten Real-time Killing Assay Anwendung, der ausschließlich die Detektion primärer und sekundärer Nekrosen erlaubt (Abbildung 26). Die Untersuchung der Art des induzierten Zelltodes auf Einzelzellebene würde eine qualifizierte Analyse der zytotoxischen Aktivität von Effektorzellen erlauben. Aufgrund dessen sollten SK-Mel5 Zellen hergestellt werden, die das pCasper3-GR Konstrukt stabil exprimieren. Dies war im Rahmen der Dissertation jedoch nicht möglich, da die zuerst starke Expression des pCasper Konstrukts nach einiger Zeit trotz Selektion mittels Antibiotika von den SK-Mel5 Zellen herunterreguliert wurde. Es ist bereits bekannt, dass Melanomzellen mittels Hypermethylierung das transkriptionelle Silencing sogenannter Tumor-Suppressorgene als *Escape-Mechanismus* nutzen (Fang et al. 2016). Zudem ist die Methylierung viraler Promotoren wie z. B. des CMV-Promotors, der im pCasper3-GR Vektor kodiert ist, nach *in vitro* Transfektion nachgewiesen (Hsu et al. 2010). Womöglich ist also die Methylierung des CMV-Promotors in den pCasper SK-Mel5 Zellen der Grund für die Herunterregulierung der pCasper-Expression. Allerdings hatte auch der Austausch des Promotors (CMV gegen pGk) nicht den gewünschten Effekt, sodass im Rahmen dieser Arbeit eine Alternative getestet werden sollte. Es wurde Annexin V als Apoptosensor verwendet und

mit dem FRET-basierten pCasper Konstrukt (Abbildung 28) in transient transfizierten SK-Mel5 Zellen verglichen. Interessanterweise wurden alle untersuchten SK-Mel5 Zellen über den apoptotischen Signalweg durch CTL_{MART1} getötet. Das Killing von Melanomzellen ist im Vergleich zu anderen Zelllinien, wie z. B. T2 Zellen, nicht effizient (Caramalho et al. 2009). Dies ist vermutlich durch besondere *Defense*-Mechanismen (dt. Verteidigungsmechanismen), wie z. B. der Sezernierung von Perforin-degradierenden Enzymen, bedingt und erklärt somit die ausbleibenden nekrotischen Killingevents durch CTL_{MART1} (Khazen et al. 2016). Beim direkten Vergleich des Eintritts des pCasper- und Annexin V-Signals nach Ausbildung der IS wurde eine zeitlich sehr starke Diskrepanz festgestellt: Der *Read out* (dt. Auslesen) der Apoptose wurde nach Analyse der pCasper-Signale (vermittelt durch Aktivierung der Caspase 3) nach durchschnittlich 18 min und nach Auswertung der Annexin V Signale (vermittelt durch PS-Externalisierung) erst nach 74 min detektiert (Abbildung 28D). Überraschenderweise war ein starker Anstieg des Annexin V-Signals zu detektieren, sobald die Sekundärnekrose in der Zielzelle induziert wurde (Abbildung 28A bei 175 min). Dies lässt vermuten, dass Annexin V durch die Zerstörung der Zellmembranintegrität in die Zelle diffundieren und die PS somit intrazellulär bindet (Banfalvi 2017). Außerdem war bei einigen untersuchten Killingevents, wie auch im dargestellten Beispiel in Abbildung 28A, der Anstieg des Annexin V-Signals zunächst an der CTL-Kontaktseite zu beobachten. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass nicht membranpermeable Farbstoffe wie PI, zunächst an der Seite der IS in die Zielzelle eindringen (Lopez et al. 2013; Backes et al. 2018; Khazen et al. 2016). Zudem wurde Annexin V bereits von Calderon und Kim zur Detektion der intrazellulären PS verwendet, was die Hypothese über das Eindringen von Annexin V und das Anfärben intrazellulär lokalisierter PS bestärkt (Calderon & Kim 2008).

7.3.2 Der PS-Sensor Annexin V ist zur Unterscheidung zwischen Effektor-induzierten Nekrosen und Apoptosen nicht geeignet

Um auszuschließen, dass der Anstieg des Annexin V-Signals ausschließlich durch den Verlust der PM-Integrität bei Effektorkontakt induziert wird, wurden im nächsten Schritt zwei apoptoseinduzierende Substanzen zur Induktion des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalwegs verwendet. Dafür kam die bereits etablierte Jurkat E6-1 pCasper Zelllinie zusammen mit Staurosporin (induziert intrinsische Signalkaskade durch Induktion von MOMP) bzw. dem anti-CD95 Antikörper Apo1-1 (induziert extrinsische Signalkaskade durch Bindung von FasR) zum Einsatz (Abbildung 29). Auch hier erfolgte in beiden Bedingungen der Anstieg des Annexin V-Signals später als der Farbumschlag des pCasper-Signals. Die Analyse der pCasper-Signale aller Zellen zeigte im Falle der Staurosporin-Behandlung mehr

Sekundärnekrosen als nach der Apo1-1 Zugabe (Abbildung 29B und D). Wie bereits in Abbildung 28 gezeigt, gehen Sekundärnekrosen mit einem abrupten Anstieg der Annexin V-Signale einher. Die zeitliche Diskrepanz zwischen dem pCasper Farbumschlag und dem Annexin V-Anstieg war bei den Staurosporin ($\Delta 52$ min) verglichen zu den Apo1-1 ($\Delta 60$ min) behandelten Zellen folglich kleiner.

Im Folgenden wurde die zeitliche Differenz vom Auftreten des pCasper-Farbumschlags zum Anstieg des Annexin V-Signals auch bei NK-induzierten Apoptosen der Jurkat E6-1 ($\Delta 47$ min) und K562 Zellen ($\Delta 35,5$ min) detektiert (Abbildung 30 und Abbildung 31 A, B). K562 Zellen sind MHC I negativ und exprimieren zudem hohe Mengen an MIC-A/B, Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D (Lisovsky et al. 2015; Bae et al. 2012). Somit sind K562 Zellen anfälliger für NK-vermittelte Zytotoxizität im Vergleich zu Jurkat E6-1 Zellen (Langhans et al. 2005), die ein hohes Level an MHC I Molekülen exprimieren (Seong Bae & Kwon Lee 2014). Außerdem exprimieren K562-Zellen keinen FasR, sodass der Zelltod hauptsächlich über die Perforation der PM induziert wird (Munker et al. 1997; Backes et al. 2018). Das bedeutet, dass K562 Zellen hauptsächlich nekrotisch oder durch eine phänotypische Mischung aus Apoptose und Nekrose lysiert werden (Abbildung 31C, E). Interessanterweise findet der Anstieg des Annexin V-Signals parallel bzw. tendenziell früher als der Verlust des pCasper-Signals bei Nekrosen und gemischten Phänotypen des Zelltodes der K562- bzw. E6-1-Zellen statt (Abbildung 30 und Abbildung 31G). Annexin V besitzt ein Molekulargewicht von knapp 35 kDa, während das translatierte pCasper Produkt mit 58 kDa größer ist. Das könnte erklären, warum es früher zu einem Anstieg des Annexin V Signals als zu einem Verlust des pCasper-Signals kommt. Außerdem liegt der dynamische Bereich beim Anstieg des Annexin V Signals höher als beim Verlust des pCasper Signals, weshalb der Anstieg der Annexin V Fluoreszenz einfacher als der Verlust des pCasper-Signals zu detektieren ist.

Bei der Betrachtung der kinetischen Darstellung des Eintritts aller NK-vermittelten Killingevents von E6-1 bzw. K562 Zellen (Abbildung 32A, C) wird deutlich, dass unabhängig von der Zelltodart (Apoptose, Nekrose, gemischter Phänotyp) pCasper und Annexin V auf Populationsebene vergleichbare Ergebnisse liefern (Abbildung 32B, D). Interessanterweise spiegelt Annexin V somit nicht ausschließlich apoptotische Signale wider, sondern gibt vor allen Dingen auch Signale bei Nekrosen und gemischten Phänotypen des Zelltodes wieder, indem es in die Zelle eindringt und PS von innen bindet. Dies wird von Goldberg et. al bestätigt. Sie haben eine hohe Korrelation der Zytotoxizität von CTL bzw. NK-Zellen, anhand eines Annexin V- und des Standard Cr⁵¹-release Assays, gezeigt. Dabei konnte jedoch konsistent ein leicht höherer

Prozentsatz an Annexin V⁺ Zielzellen verglichen zur prozentualen Lyse des Cr⁵¹-release Assays detektiert werden. Dies begründeten sie damit, dass der Cr⁵¹-release Assay ausschließlich Zellen mit bereits permeabilisierten Zellmembranen detektiert, während Annexin V sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen bindet (Goldberg et al. 1999). Auch Vermes et al. wiesen bereits bei der Veröffentlichung von Annexin V als frühapoptotischen Marker daraufhin, dass zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose eine Kombination aus Annexin V mit einem nicht zellmembranpermeablen Farbstoff verwendet werden sollte (Vermes et al. 1995). Somit hat sich über die Jahre die nukleininterkalierende Substanz Propidiumiodid (PI) als zusätzlicher Farbstoff zu Annexin V zur durchflusszytometrischen Analyse von Apoptosen und Nekrosen etabliert. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt eine Annexin V/PI-Färbung Staurosporin- bzw. anti-CD95-behandelter E6-1-Zellen durchgeführt und diese parallel durchflusszytometrisch und mikroskopisch analysiert (Abbildung 33). Werden die Zellen separat für die jeweiligen Methoden vorbereitet, wie es laut Hersteller beschrieben wird, ergeben sich in der qualitativen Analyse eindeutige Unterschiede. So werden in den durchflusszytometrischen Analysen, im Vergleich zur Mikroskopie unabhängig des Zeitpunkts und der verwendeten apoptoseinduzierenden Substanz, stets mehr Nekrosen (Annexin V⁺/PI⁺) detektiert. Dies ist vermutlich auf die Handhabung der Zellen zurückzuführen. Während die Zellen ab dem Zeitpunkt 0 h zusammen mit Annexin V-Alexa488, PI und Staurosporin bzw. anti-CD95 (Apo1-1) unter Brutschrankbedingungen im Mikroskop inkubiert wurden, erfolgte eine andere Vorbereitung für die durchflusszytometrischen Analysen. Die Zellen wurden dabei ab dem Zeitpunkt 0 h mit Staurosporin bzw. anti-CD95 behandelt und im Brutschrank inkubiert. Für die Probenvorbereitung mussten die Zellen folglich resuspendiert, gewaschen und mit Annexin V und PI gefärbt werden. So werden bereits apoptotische Zellen durch die in der Vorbereitungsprozedur ausgeübten Scherkräfte vermutlich in die Sekundärnekrose getrieben, sodass der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin V⁺/PI⁻) in der durchflusszytometrischen Analyse unter- und der Anteil nekrotischer (Annexin V⁺/PI⁺) Zellen überschätzt wird. Interessanterweise ist die Summe aus apoptotischen und nekrotischen Zellen in beiden verwendeten Methoden, also der Gesamtanteil toter Zellen, zu den jeweiligen Zeitpunkten vergleichbar. Um auszuschließen, dass die angewendete Messmethode den Unterschied zwischen der durchflusszytometrischen und der mikroskopischen Analysen bedingt, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hier wurden die Zellen in beiden Methoden gleich behandelt, indem die restlichen Zellen der durchflusszytometrischen Messung anschließend mikroskopisch analysiert wurden (Abbildung 34). Dabei wurden, unabhängig der Messmethode, ähnliche Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen festgestellt. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die in Abbildung 33 detektierten Unterschiede auf die verwendete Messmethode

zurückzuführen sind, sondern allein durch die unterschiedliche Handhabung der Zellen bedingt werden.

7.3.3 Kritische Betrachtung der Methodik

In einer gesunden Zelle werden unterschiedliche Phospholipide asymmetrisch zwischen der intra- und extrazellulären Seite der PM verteilt. So befindet sich PS in gesunden Zellen auf der inneren Seite der Membran, was auf die Aktivität der Flippase (katalysiert den Lipidtransport von außen nach innen; spezifisch für PS und Phosphatidylethanolamin) zurückzuführen ist (Folmer et al. 2009). Parallel sind auch die Floppase (katalysiert lipidspezifisch den Lipidtransport von innen nach außen) und die Scramblase aktiv (nicht selektiver, bidirektionaler Transport entlang der Plasmamembran) (Contreras et al. 2010). Die Externalisierung von PS wird über zwei unterschiedliche Wege, reversibel und irreversibel, ermöglicht. Eine langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert sowohl die Inhibierung von Flippasen als auch die Aktivierung von Scramblasen, was zu einer reversiblen PS-Externalisierung führt (Suzuki et al. 2010; Daleke & Lyles 2000; Balasubramanian et al. 2007). Sind jedoch die Effektor Caspasen 3 und 7 aktiv, wird die Scramblase Xkr8 geschnitten und aktiviert, während die Flippase hATP11C durch das Caspasen-vermittelte Spalten inhibiert wird, was eine irreversible PS-Externalisierung zur Folge hat (Segawa et al. 2014; Suzuki et al. 2014). Die PS-Externalisierung wurde lange Zeit als ein Prozess der frühen Apoptose bezeichnet. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass die PS-Translozierung immer nach MOMP (van Delft et al. 2010) und nicht früher sondern parallel bzw. später als die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 (Vorobjev & Barteneva 2017) stattfindet. Somit sollte dieser Prozess eher als Zwischenstufe der Apoptose angesehen werden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass unterschiedliche Ergebnisse in der Analyse des Apoptoseintritts basierend auf dem Caspase 3-Sensor pCasper und des PS-Bindeproteins Annexin V detektiert wurden. Diese Beobachtung wurde auch bereits von Kotwicka et al. 2008 getroffen. Hier wurde die Apoptose von Spermatozoen durch Zugabe von H_2O_2 induziert, die Caspase 3 Aktivität mittels des Caspase 3-Substrats NucView-AlexaFluor488 untersucht und parallel dazu Annexin V zur Detektion externer PS verwendet (Kotwicka et al. 2008). Der prozentuale Anteil an PS-translozierenden Spermatozoen war dabei stets signifikant geringer als der Anteil Caspase 3 aktiver Zellen. Allerdings wurde in dieser Studie Sulforhodamin 101-gekoppeltes Annexin V zusammen mit AlexaFluor488-gekoppeltem NucView verwendet. Diese Fluorophore unterscheiden sich sehr stark in ihrer Intensität. Auch in unserer Studie wurde mit Annexin V-Pacific Blue ein vergleichsweise schwaches Fluorophor zur Annexin V Detektion

gewählt (www.bu.edu 2013), jedoch war in Kombination mit pCasper aufgrund der Spektrenüberlappung, kein anderes Fluorophor mit stärkerer Intensität geeignet.

Desweiteren wird empfohlen Annexin V zusammen mit einem nukleininterkalierenden, nichtmembranpermeablen Farbstoff (wie z. B. PI) zu verwenden, um die apoptotischen von nekrotischen Zellen besser unterscheiden zu können (Vermees et al. 1995). Die Verwendung von PI in der herkömmlichen Annexin V/PI Färbung führt allerdings laut Rieger et. al in bis zu 40 % aller Fälle zu falsch positiven Signalen aufgrund der Bindung von PI an die RNA des Zytoplasmas (Rieger et al. 2010). Das könnte vor allem bei dem Effektorzell-induzierten Zelltod ein Problem darstellen, da PI durch die Perforin-induzierten Poren in der PM ins Zytoplasma gelangen und RNA binden kann, ohne dass die Zielzelle tatsächlich nekrotisch ist (Khazen et al. 2016). Dies deckt sich auch mit unseren Beobachtungen. Bei der Verwendung von sehr hohen Konzentrationen an PI (100 μ M) konnte bei dem Effektorzell-induzierten Zelltod z. T. bereits vor Auftreten des Annexin V-Signals und noch intakter PM-Integrität ein partieller Anstieg des PI-Signals detektiert werden (Daten nicht gezeigt). So wäre es sinnvoll, mikroskopische Aufnahmen von Jurkat E6-1 bzw. K562 pCasper Zellen in Anwesenheit von Annexin V-Pacific Blue und PI zu wiederholen. So könnte festgestellt werden, dass Annexin V und PI bei Perforin-vermitteltem Killing (wie es bei der FasR-defizienten K562-Zelllinie ausschließlich möglich ist) zeitgleich die Zielzellmembran passieren. Das würde die Hypothese über das Binden intrazellulär lokalisierter PS von Annexin V unterstützen und Annexin V als adäquaten Apoptoseindikator bei Effektorzell-induziertem Killing ausschließen.

Wird die Apoptose über apoptoseinduzierende Substanzen verursacht, bietet sich die Annexin V/PI Färbung als schnelle und sichere Methode zur Detektion des Zelltodes an. Ist man allerdings an der Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose interessiert, sollte darauf geachtet werden die Zellen mikroskopisch im Live Cell Imaging anstatt in durchflusszytometrischen Analysen zu untersuchen.

7.3.4 Alternative Apoptose-Sensoren zu Annexin V und pCasper-3GR

Als Alternative zu Annexin V als Apoptosemarker finden auch Fluorochrom-gekoppelte Caspase-Substrate wie FLICA, PhiphiLux[®] und NucView[®] Anwendung. Allerdings sind hier bereits Probleme wie unspezifische Bindungen der Substrate und die Diffusion aus der Zelle (auch bei noch intakter PM) gezeigt (Poreba et al. 2013). Soll der Effektorzell-induzierte Zelltod mittels transients Färbungen wie Annexin V und Caspase-Substrate detektiert werden, ergibt sich in beiden Fällen ein weiteres Problem: Der Zielzell-induzierte Zelltod von Effektorzellen. Es

wurde bereits beobachtet, dass sowohl CTL als auch NK-Zellen nach Ausüben ihrer zytotoxischen Funktion selbst z. T. apoptotisch werden (Taga et al. 1996; Bhat et al. 2014). Somit würden sterbende Effektorzellen den Anteil an apoptotischen Zielzellen verfälschen, da es nicht möglich ist diese bei Verwendung von transienten Apoptoseindikatoren zu unterscheiden.

Aus diesem Grund stellt die Analyse der Caspaseaktivität mittels FRET-basierter Konstrukte wie pCasper3-GR eine attraktive Alternative zur Klassifizierung des Effektor-induzierten Zelltodes dar. Neben pCasper3-GR wurden in anderen Studien bereits weitere FRET Konstrukte, sensitiv für die Effektor-Caspase 3, verwendet (Rehm et al. 2002; Albeck et al. 2008; Tyas et al. 2000). Durch Detektion der Caspase 3 Aktivität kann somit der Eintritt der Apoptose detektiert werden, allerdings ist dadurch keine Unterscheidung zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Apoptose möglich. Diese Fragestellung wurde von Carsten Watzls Labor in kürzlich publizierten Studien elegant gelöst (Liesche et al. 2018; Prager et al. 2019). Hier wurden Einfach-Fluoreszenz-Reporterproteine verwendet, die über eine spezifische Proteaseschnittstelle mit einer Nukleus-Export-Lokalisationsdomäne verbunden sind. Ist die dafür spezifische Protease aktiv, wird die Lokalisationsdomäne vom Protein gespalten, was letztendlich zu einer ebenmäßigen Verteilung des Fluoreszenzproteins über die gesamte Zelle (auch im Nukleus) führt. Somit kann beispielsweise ein RFP Fluorochrom (gekoppelt über eine Granzym B spezifische Schnittstelle) mit einem GFP Fluorochrom (gekoppelt über eine Caspase 8 spezifische Schnittstelle) kombiniert werden (Prager et al. 2019). Granzym B induziert mittels Vesikel-vermittelter Lyse die Apoptose (Pinkoski et al. 2001), während Caspase 8 durch die Apoptoseinduktion via Rezeptorbindung aktiviert wird (Kruidering & Evan 2000). Erscheint der Nukleus der Zielzelle nach Effektorzell-Kontakt rot, erfolgte somit eine Vesikel-vermittelte Apoptose, bei einem grün fluoreszierenden Nukleus wurde hingegen die Caspase 8 über den extrinsischen Signalweg aktiviert. Stabil exprimierte fluoreszenzbasierte Konstrukte zur Detektion der Proteasen-Aktivität ermöglichen zudem eine automatisierte Auswertung aller Killingevents auf Populationsebene, da im Gegensatz zu der Verwendung transienter Apoptosemarker ausschließlich Signale der Zielzellen detektiert werden können. Allerdings ist es nicht immer trivial, Zelllinien, die das Konstrukt von Interesse stabil exprimieren, herzustellen. Außerdem ist bei der Verwendung von primären Tumorzellen, die stabile Expression solcher Konstrukte nicht möglich. Zudem wurde bereits gezeigt, dass der dynamische Bereich von FRET Konstrukten mit 1:4 deutlich unter dem der transienten Caspase-Substrate mit 1:100 liegt (Luo et al. 2003; Vorobjev & Barteneva 2017). Somit bleibt es individuell zu entscheiden welcher Apoptosemarker für die einzelne Fragestellung am besten

geeignet ist. Eine Kombination aus mehreren Reportern liefert vermutlich die genauesten Informationen über den Ablauf und die Induktion des Zelltodes.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden verschiedene Apoptosemarker getestet und miteinander verglichen, was eine optimierte Analyse der zytotoxischen Mechanismen von Effektorzellen des Immunsystems ermöglicht. Diese Analysen tragen somit auch zu einem besseren Verständnis der Funktion zytotoxischer Effektorzellen *in vivo* bei, die langfristig die Adressierung tumorbiologischer Fragestellungen und deren Therapieansätze ermöglichen könnten.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- Akamatsu, Y. & Oettinger, M.A., 1998. Distinct roles of RAG1 and RAG2 in binding the V(D)J recombination signal sequences. *Molecular and cellular biology*, 18(8), pp.4670–8.
- Alanio, C. et al., 2010. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*, 115(18), pp.3718–3725.
- Albeck, J.G. et al., 2008. Quantitative Analysis of Pathways Controlling Extrinsic Apoptosis in Single Cells. *Molecular Cell*, 30(1), pp.11–25.
- Ali, Z., Yousaf, N. & Larkin, J., 2013. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *European Journal of Cancer, Supplement*, 11(2), pp.81–91.
- Allen, S. et al., 2011. Shaping the T-cell repertoire in the periphery. *Immunology and Cell Biology*, 89(1), pp.60–69.
- Alves, N.L., Arosa, F.A. & van Lier, R.A.W., 2005. IL-21 Sustains CD28 Expression on IL-15-Activated Human Naive CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(2), pp.755–762.
- Andrade, F. et al., 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspases substrates: Implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 8(4), pp.451–460.
- Anfossi, N. et al., 2006. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity*, 25(2), pp.331–342.
- Arens, R. & Schoenberger, S.P., 2010. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunological reviews*, 235(1), pp.190–205.
- Arstila, T.P., 1999. A Direct Estimate of the Human $\alpha\beta$ T Cell Receptor Diversity. *Science*, 286, pp.958–961.
- ATCC, 2010. Passage Number Effects In Cell Lines. *Tech Bulletin no.7*, 7, pp.1–4.
- Atkinson, E.A. et al., 1998. Cytotoxic T Lymphocyte-assisted Suicide. , 273(33), pp.21261–21266.

-
- Backes, C.S. et al., 2018. Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification and modulation of apoptosis, necrosis and mixed forms. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20), p.jbc.RA118.004549.
- Bae, D.S., Hwang, Y.K. & Lee, J.K., 2012. Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cellular Immunology*, 276(1-2), pp.122-127.
- Bakker, A.B. et al., 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 179(3), pp.1005-9.
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B. & Schroit, A.J., 2007. Regulated Externalization of Phosphatidylserine at the Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), pp.18357-18364.
- Balsamo, M., Vermi, W., et al., 2012. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *European Journal of Immunology*, 42(7), pp.1833-1842.
- Balsamo, M., Pietra, G., et al., 2012. Melanoma immunoediting by NK cells. *Oncology*, 1(9), pp.1607-1609.
- Banfalvi, G., 2017. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), pp.306-323.
- Beatty, G. & Paterson, Y., 2000. IFN- γ Can Promote Tumor Evasion of the Immune System In Vivo by Down-Regulating Cellular Levels of an Endogenous Tumor Antigen. *Journal of immunology*, 165(10), pp.5502-5508.
- Benson, D.M. et al., 2011. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood*, 118(24), pp.6387-91.
- Bergwelt-Baildon, M.S. et al., 2002. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood*, 99(9), pp.3319-3325.
- Besser, M.J. et al., 2013. Development of Allogeneic NK Cell Adoptive Transfer Therapy in

-
- Metastatic Melanoma Patients: In Vitro Preclinical Optimization Studies. *PLoS ONE*, 8(3), pp.1–11.
- Bhat, P. et al., 2014. The kinematics of cytotoxic lymphocytes influence their ability to kill target cells. *PLoS ONE*, 9(5), p.e95248.
- Bjorkman, P.J. et al., 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329(6139), pp.506–512.
- Blum, J.S. et al., 2013. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol.*, 31, pp.443–473.
- Boon, T. et al., 2005. Human T Cell Responses Against Melanoma. *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp.175–208.
- Bossi, G. & Griffiths, G.M., 1999. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature Medicine*, 5(1), pp.90–96.
- Brenchley, J.M. et al., 2002. Expansion of activated human naïve T-cells precedes effector function. *Clinical and experimental immunology*, 130(3), pp.432–40.
- van der Bruggen, P. et al., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038), pp.1643–1647.
- Brunner, K.T. et al., 1968. Quantitative Assay of the Lytic Action of Immune Lymphoid Cells on 5¹ Cr-Labelled Allogeneic Target Cells In vitro ; Inhibition by Isoantibody and by Drugs. *Immunology*, 14, pp.181–196.
- Buckley, B. & Russell, L., 1988. The measurement of ionised calcium in blood plasma. *Ann Clin Biochem*, 25, pp.477–465.
- Calderon, F. & Kim, H.-Y., 2008. Detection of intracellular phosphatidylserine in living cells. *Journal of Neurochemistry*, 104(5), pp.1271–1279.
- Cappello, S., 2015. NK cell Mediated Killing of Melanoma. , (August).
- Caramalho, Í. et al., 2009. Visualizing CTL/melanoma cell interactions: multiple hits must be delivered for tumour cell annihilation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9b),

pp.3834–3846.

- Carrega, P. et al., 2009. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PLoS ONE*, 4(12), pp.9–11.
- Carretero, R. et al., 2008. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics*, 60(8), pp.439–447.
- Chang, C.-C. et al., 2005. Immune Selection of Hot-Spot β 2-Microglobulin Gene Mutations, HLA-A2 Allospecificity Loss, and Antigen-Processing Machinery Component Down-Regulation in Melanoma Cells Derived from Recurrent Metastases following Immunotherapy. *Journal of immunology*, 174(3), pp.1462–1471.
- Chang, G.Y. et al., 2011. Cytotoxic T lymphocyte responses against melanocytes and melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), p.122.
- Chen, Y. et al., 2012. The melanosomal protein PMEL17 as a target for antibody drug conjugate therapy in melanoma. *The Journal of biological chemistry*, 287(29), pp.24082–91.
- Cho, H. Il, Lee, Y.R. & Celis, E., 2011. Interferon γ limits the effectiveness of melanoma peptide vaccines. *Blood*, 117(1), pp.135–144.
- Contreras, F.X. et al., 2010. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Letters*, 584(9), pp.1779–1786.
- Cormier, J.N. et al., 1997. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *The cancer journal from Scientific American*, 3(1), pp.37–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072306> [Accessed March 22, 2019].
- Cormier, J.N. et al., 1999. Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an *In vitro* melanoma model. *International Journal of Cancer*, 80(5), pp.781–790.
- Coulie, P.G. et al., 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *Journal of Experimental Medicine*, 180(1),

pp.35–42.

- Coulie, P.G. et al., 2014. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), pp.135–146.
- Courau, T. et al., 2019. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), p.74.
- Daleke, D.L. & Lyles, J. V., 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486(1), pp.108–127.
- Dauer, M. et al., 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *Journal of immunology*, 170(8), pp.4069–4076.
- van Delft, M.F. et al., 2010. Apoptosis and non-inflammatory phagocytosis can be induced by mitochondrial damage without caspases. *Cell Death & Differentiation*, 17(5), pp.821–832.
- Dörr, K., 2015. *Regulation von Kalziumsignalen im Immunsystem*.
- Du, J. et al., 2003. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *American Journal of Pathology*, 163(1), pp.333–343.
- Dutoit, V. et al., 2002. Degeneracy of Antigen Recognition as the Molecular Basis for the High Frequency of Naive A2/Melan-A Peptide Multimer + CD8 + T Cells in Humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(2), pp.207–216.
- Eggermont, A.M.M. & Robert, C., 2018. Melanoma: Immunotherapy in Advanced Melanoma and in the Adjuvant Setting. In *Oncoimmunology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 579–591.
- Eggermont, A.M.M., Spatz, A. & Robert, C., 2014. Cutaneous melanoma. *Lancet (London, England)*, 383(9919), pp.816–27.
- Elhanati, Y. et al., 2018. Predicting the spectrum of TCR repertoire sharing with a data-driven model of recombination. *Immunological Reviews*, 284(1), pp.167–179.

Evrogen, 2008. Caspase-3 apoptosis sensor Casper3-GR. *Company Data Sheet*.

Fadok, V.A. et al., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), pp.2207–16.

Fang, M. et al., 2016. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(5), pp.1250–1255.

Folmer, D.E., Elferink, R.P.J.O. & Paulusma, C.C., 2009. P4 ATPases - Lipid flippases and their role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1791(7), pp.628–635.

Förster, T., 1948. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 6(2), pp.55–75.

Friedmann, K.S., Bozem, M. & Hoth, M., 2019. Calcium signal dynamics in T lymphocytes: Comparing in vivo and in vitro measurements. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, p.pii: S1084-9521(18)30055-7.

Gandini, S. et al., 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer*, 41(1), pp.45–60.

Garboczi, D.N. et al., 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 384, pp.134–141.

Garrido, F. et al., 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunology Today*, 14(10), pp.491–499.

Garrido, G. et al., 2017. Upregulation of HLA Class I Expression on Tumor Cells by the Anti-EGFR Antibody Nimotuzumab. *Frontiers in Pharmacology*, 8, p.595.

Gerosa, F. et al., 2002. Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(3), pp.327–333.

Gidlund, M., Örn, A. & Wigzell, H., 1978. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature*, 273(June), pp.759–761.

-
- Goldberg, J.E., Sherwood, S.W. & Clayberger, C., 1999. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 224(1-2), pp.1-9.
- Green, D.R., 2005. Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell*, 121(5), pp.671-674.
- Green, D.R. & Llambi, F., 2015. Cell Death Signaling. *Cell Death Signaling*, 7(12), pp.1-24.
- Hagerling, C., Casbon, A.-J. & Werb, Z., 2014. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol.*, 25(4), pp.214-220.
- Hanabuchi, S. et al., 2001. Regression of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated lymphomas in a rat model: peptide-induced T-cell immunity. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(23), pp.1775-83.
- Harlin, H. et al., 2006. Tumor progression despite massive influx of activated CD8+ T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(10), pp.1185-1197.
- Hart, M. et al., 2019. miR-34a: a new player in the regulation of T cell function by modulation of NF- κ B signaling. *Cell Death and Disease*, 10(2), pp.1-14.
- Hassin, D. et al., 2011. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*, 133(2), pp.190-196.
- Hickman, H.D. et al., 2008. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature Immunology*, 9(2), pp.155-165.
- Hirt, C. et al., 2014. "In vitro" 3D models of tumor-immune system interaction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79-80, pp.145-154.
- Ho, W.Y. et al., 2006. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire. *Journal of immunological methods*, 310(1-2), pp.40-52.
- Hoashi, T. et al., 2005. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp.14006-14016.

-
- Hodi, F.S. et al., 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), pp.711–723.
- Hoth, M., 2016. CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp.1408–1417.
- Houot, R. et al., 2015. T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunology Research*, 3(10), pp.1115–1122.
- Hsu, C.C. et al., 2010. Targeted methylation of CMV and E1A viral promoters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(2), pp.228–234.
- Ioannidou, K. et al., 2017. Heterogeneity assessment of functional T cell avidity. *Scientific Reports*, 7(March), pp.1–11.
- Ishida, Y. et al., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11), pp.3887–95.
- Jardetzky, T.S. et al., 1994. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 368(6473), pp.711–718.
- Jenkins, M.K. & Moon, J.J., 2012. The Role of Naive T Cell Precursor Frequency and Recruitment in Dictating Immune Response Magnitude. *The Journal of Immunology*, 188, pp.4135–4140.
- Joffre, O.P. et al., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), pp.557–569.
- Johnson, L. a et al., 2009. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114(3), pp.535–46.
- Johnson, L.A. & June, C.H., 2017. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Research*, 27(1), pp.38–58.
- Jonuleit, H. et al., 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology*, 27(12), pp.3135–42.

-
- Jost, P.J. et al., 2009. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), pp.1035–1039.
- Kärre, K. et al., 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319, pp.675–678.
- Katt, M.E. et al., 2016. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, p.12.
- Kawakami, Y. et al., 1994. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), pp.3515–9.
- Kawakami, Y. et al., 1997. Production of recombinant MART-1 proteins and specific anti-MART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: Use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *Journal of Immunological Methods*, 202(1), pp.13–25.
- Kawakami, Y. et al., 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(8), pp.3961–8.
- Keefe, D. et al., 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23(3), pp.249–262.
- Kern, F. et al., 1999. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *Journal of virology*, 73(10), pp.8179–84.
- Khazen, R. et al., 2016. Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nature communications*, 7, p.10823.
- Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K., 2007. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. *Immunology*, 121(1), pp.1–14.
- Knörck, A. et al., 2018. Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion*.

-
- Kotwicka, M. et al., 2008. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *RBM online*, 16(54), pp.657–663.
- Krebs, P. et al., 2009. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood*, 113(26), pp.6593–602.
- Kroemer, G. et al., 2009. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), pp.3–11.
- Kruidering, M. & Evan, G., 2000. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”? *IUBMB Life*, 50(2), pp.85–90.
- Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), pp.459–65.
- Kummerow, C. et al., 2014. A simple, economic, time-resolved killing assay. *European Journal of Immunology*, 44(6), pp.1870–1872.
- Kunert, A. et al., 2013. TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors: Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. *Frontiers in Immunology*, 4, p.363.
- Lam, K.M.C. & Crawford, D.H., 1995. Method for generation of human B lymphoblastoid cell lines using Epstein-Barr virus. *Methods in Cell Science*, 17(2), pp.67–74.
- Landskron, G. et al., 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014, p.149185.
- Langhans, B. et al., 2005. Comparative study of NK cell-mediated cytotoxicity using radioactive and flow cytometric cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 306(1–2), pp.161–168.
- Lanier, L.L., 1998. NK CELL RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 16(1), pp.359–393.
- Lehmann, C. et al., 2000. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*, 96(2), pp.594–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887123>.

-
- Lennicke, C. et al., 2017. Modulation of MHC class I surface expression in B16F10 melanoma cells by methylseleninic acid. *Oncoimmunology*, 6(6), p.e1259049.
- Leonardi, G.C. et al., 2018. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology*, 52(4), pp.1071–1080.
- Lettau, M. et al., 2007. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunology Letters*, 108(1), pp.10–19.
- Li, H. et al., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), pp.491–501.
- Li, J. et al., 2014. Real-Time Detection of CTL Function Reveals Distinct Patterns of Caspase Activation Mediated by Fas versus Granzyme B. *The Journal of Immunology*, 193(2), pp.519–528.
- Li, Y., Bleakley, M. & Yee, C., 2005. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(4), pp.2261–9.
- Liesche, C. et al., 2018. Single-Fluorescent Protein Reporters Allow Parallel Quantification of Natural Killer Cell-Mediated Granzyme and Caspase Activities in Single Target Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(August), p.1840.
- Lisovsky, I. et al., 2015. Functional analysis of NK cell subsets activated by 721.221 and K562 HLA-null cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(4), pp.761–767.
- Liu, G. et al., 2004. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Research*, 64(14), pp.4980–4986. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606397> [Accessed March 29, 2019].
- Llewelyn, M. et al., 2006. The TCR V b signature of bacterial superantigens spreads with stimulus strength. , 18(10), pp.1433–1441.
- Lopez, J.A. et al., 2013. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), pp.2659–68.

-
- Lundegaard, C. et al., 2008. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), pp.509–512.
- Luo, K.Q. et al., 2003. Measuring dynamics of caspase-8 activation in a single living HeLa cell during TNF α -induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), pp.217–222.
- Luo, X. et al., 1998. Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, 94, pp.481–490.
- Lyubchenko, T.A., Wurth, G.A. & Zweifach, A., 2001. Role of Calcium Influx in Cytotoxic T Lymphocyte Lytic Granule Exocytosis during Target Cell Killing. *Immunity*, 15, pp.847–859.
- Maul-Pavacic, A. et al., 2011. ORAI1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), pp.3324–9.
- McLaren, J.E. et al., 2015. Naive CD8 + T-cell precursors display structured TCR repertoires and composite antigen-driven selection dynamics. *Immunology and Cell Biology*, 93(7), pp.625–633.
- Medema, J.P. et al., 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), pp.11515–11520.
- Meidenbauer, N. et al., 2002. Survival and Tumor Localization of Adoptively Transferred Melan-A-Specific T Cells in Melanoma Patients. *The Journal of Immunology*, 170(4), pp.2161–2169.
- Mescher, M.F. et al., 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 211(1), pp.81–92.
- Miller, J.F.A.P., 1999. DISCOVERING THE ORIGINS OF IMMUNOLOGICAL COMPETENCE. *Annu. Rev. Immunol*, 17, pp.1–17. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.17.1.1> [Accessed

April 15, 2019].

- Miller, J.F.A.P., 1962. Immunological Significance of the Non-Antigenicity of Synthetic. *Nature*, 195, pp.1318–1319.
- Miller, J.F.A.P. & Mitchell, G.F., 1967. The Thymus and the Precursors of Antigen Reactive Cells. *Nature*, 216(5116), pp.659–663.
- Mittal, D. et al., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, pp.16–25.
- Möller, P. & Hämmerling, G.J., 1992. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumour immunity. *Cancer surveys*, 13, pp.101–27.
- Mombaerts, P. et al., 1992. RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes. *Cell*, 68, pp.869–877.
- Moretta, A. et al., 2001. ACTIVATING RECEPTORS AND CORECEPTORS INVOLVED IN HUMAN NATURAL KILLER CELL-MEDIATED CYTOLYSIS. *Annual Review of Immunology*, 19(1), pp.197–223.
- Morgado, S. et al., 2011. NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *Journal of Innate Immunity*, 3(4), pp.365–373.
- Müller, I. et al., 2016. Tumor antigen-specific T cells for immune monitoring of dendritic cell-treated glioblastoma patients. *Cytotherapy*, 18(9), pp.1146–1161.
- Munker, R. et al., 1997. Expression of CD95(FAS) by gene transfer does not sensitize K562 to Fas-killing. *Hematology and cell therapy*, 39(2), pp.75–8.
- Murphy, K. & Weaver, C., 2018. Grundbegriffe der Immunologie. In *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–46.
- Neller, M. a. et al., 2014. High Efficiency Ex Vivo Cloning of Antigen-Specific Human Effector T Cells. *PLoS ONE*, 9(11), p.e110741.

-
- Neubert, N.J. et al., 2016. A Well-Controlled Experimental System to Study Interactions of Cytotoxic T Lymphocytes with Tumor Cells. *Frontiers in Immunology*, 7, p.326.
- Ohashi, T. et al., 2002. Correlation of major histocompatibility complex class I downregulation with resistance of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells to cytotoxic T-lymphocyte killing in a rat model. *Journal of virology*, 76(14), pp.7010–9.
- Orange, J.S., 2008. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), pp.713–725.
- Pallmer, K. & Oxenius, A., 2016. Recognition and Regulation of T Cells by NK Cells. *Frontiers in Immunology*, 7, p.1.
- Pardo, J. et al., 2002. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control. *European Journal of Immunology*, 32(10), pp.2881–2886.
- Parkhurst, M.R. et al., 1996. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(6), pp.2539–48.
- Parrish-Novak, J. et al., 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408(6808), pp.57–63.
- Peterson, A.C., Harlin, H. & Gajewski, T.F., 2003. Immunization with melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(12), pp.2342–2348.
- Pinkoski, M.J. et al., 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), pp.12060–7.
- Pipkin, M.E. & Lieberman, J., 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology*, 19(3), pp.301–8.
- Platzman, I. et al., 2013. Artificial Antigen-Presenting Interfaces in the Service of Immunology. *Israel Journal of Chemistry*, 53(9-10), p.n/a-n/a.

-
- Le Poole, I.C. et al., 2002. Interferon-gamma reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *The American journal of pathology*, 160(2), pp.521-8.
- Poreba, M. et al., 2013. Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5. Available at: www.cshperspectives.org [Accessed March 14, 2019].
- Pradelli, L.A., Bénétteau, M. & Ricci, J.-E., 2010. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), pp.1589-1597.
- Prager, I. et al., 2019. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *The Journal of Experimental Medicine*, p.jem.20181454.
- Prager, I. & Watzl, C., 2019. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), pp.1319-1329.
- Prieto, P.A. et al., 2012. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(7), pp.2039-47.
- Ramgolam, K. et al., 2011. Melanoma Spheroids Grown Under Neural Crest Cell Conditions Are Highly Plastic Migratory/Invasive Tumor Cells Endowed with Immunomodulator Function B. E. Rich, ed. *PLoS ONE*, 6(4), p.e18784.
- Rasmussen, M. et al., 2014. Uncovering the Peptide-Binding Specificities of HLA-C: A General Strategy To Determine the Specificity of Any MHC Class I Molecule. *The Journal of Immunology*, 193(10), pp.4790-4802.
- Rehm, M. et al., 2002. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *The Journal of biological chemistry*, 277(27), pp.24506-14.
- Restifo, N.P. et al., 1996. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(2), pp.100-8.
- Restifo, N.P. et al., 1993. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition:

- immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*, 14(3), pp.182–90.
- Riddell, S.R. & Greenberg, P.D., 1990. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *Journal of immunological methods*, 128, pp.189–201.
- Rieger, A.M. et al., 2010. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods*, 358(1–2), pp.81–92.
- Rivoltini, L. et al., 1995. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer research*, 55(14), pp.3149–57.
- Rizzuto, G.A. et al., 2009. Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine*, 206(4), pp.849–66.
- Rodriguez-Barboza, J.I. et al., 2018. NK Cells Regulate CD8 T Cell-Mediated Allogeneic Rejection in Immunocompetent Recipients across an MHC Class I Mismatched Barrier. *Transplantation*, 102, pp.694–695.
- Romero, P. et al., 2002. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunological Reviews*, 188(6), pp.81–96.
- Rosa, C. La & Diamond, D.J., 2013. The immune response to human CMV. *Future Virol*, 7(3), pp.279–293.
- Rosenberg, J. & Huang, J., 2018. CD8+ T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr Opin Chem Eng*, 19, pp.9–20.
- Rosenberg, S.A. et al., 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*,

17(13), pp.4550–4557.

Rosenberg, S.A. et al., 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*, 4(3), pp.321–327.

Röth, A. et al., 2003. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. *Blood*, 102(3), pp.849–857.

Sabel, M.S., Liu, Y. & Lubman, D.M., 2011. Proteomics in melanoma biomarker discovery: great potential, many obstacles. *International journal of proteomics*, 2011, p.181890.

Saikali, S. et al., 2007. Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *Journal of neuro-oncology*, 81(2), pp.139–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17004103> [Accessed May 22, 2013].

de Saint Basile, G., Ménasché, G. & Fischer, A., 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews. Immunology*, 10(8), pp.568–79.

Salter, R.D. & Cresswell, P., 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in mutant TxB cell hybrid a HLA -A HLA-B. *The EMBO Journal*, 5(5), pp.943–949.

Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), pp.676–82.

Schwartzentruber, D.J. et al., 2009. A phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100: 209–217(210M) peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(18S), pp.CRA9011-CRA9011.

Schwarz, E.C., Qu, B. & Hoth, M., 2013. Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(7), pp.1603–11.

Segawa, K. et al., 2014. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188), pp.1164–1168.

-
- Seong Bae, D. & Kwon Lee, J., 2014. Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line.
- Serra, P. et al., 2002. RAG-dependent peripheral T cell receptor diversification in CD8+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), pp.15566–71.
- Sharma, P. et al., 2013. Characterization of the Staphylococcal enterotoxin A: V β receptor interaction using human receptor fragments engineered for high affinity. *Protein Engineering, Design and Selection*, 26(12), pp.781–789.
- Shcherbo, D. et al., 2009. Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC Biotechnology*, 9, pp.1–6.
- Shinkai, Y. et al., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5), pp.855–867.
- Slezak, S.L. et al., 2007. CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. *Journal of translational medicine*, 5, p.17.
- Smith, M.B. et al., 2011. Interactive, computer-assisted tracking of speckle trajectories in fluorescence microscopy: Application to actin polymerization and membrane fusion. *Biophysical Journal*, 101(7), pp.1794–1804.
- Solana, R. et al., 2007. Lymphocyte activation in response to melanoma: Interaction of NK-associated receptors and their ligands. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(1), pp.101–109.
- van Stipdonk, M.J.B., Lemmens, E.E. & Schoenberger, S.P., 2001. Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nature Immunology*, 2(5), pp.423–429.
- Strengell, M. et al., 2003. IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN- Production in Human NK and T Cells. *The Journal of Immunology*, 170(11), pp.5464–5469.
- Suhoski, M.M. et al., 2007. Engineering Artificial Antigen-presenting Cells to Express a Diverse Array of Co-stimulatory Molecules. *Molecular Therapy*, 15(5), pp.981–988.

-
- Suzuki, J. et al., 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468(7325), pp.834–838.
- Suzuki, J., Imanishi, E. & Nagata, S., 2014. Exposure of phosphatidylserine by Xkrelated protein family members during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), pp.30257–30267.
- Sykulev, Y. et al., 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, 4(6), pp.565–571.
- Sykulev, Y. et al., 1994. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity*, 1, pp.15–22.
- Sylwester, A.W. et al., 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine*, 202(5), pp.673–85.
- Taga, K. et al., 1996. Target-Induced Death by Apoptosis in Human Lymphokine-Activated Natural Killer Cells. *Blood*, 87(6).
- Tan, C. et al., 2014. Phenotypes of Th lineages generated by the commonly used activation with anti-CD3/CD28 antibodies differ from those generated by the physiological activation with the specific antigen. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(3), pp.305–313.
- Tarazona, R., Duran, E. & Solana, R., 2016. Natural killer cell recognition of melanoma: New clues for a more effective immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), pp.1–10.
- Theos, A.C. et al., 2005. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Research*, 18(5), pp.322–336.
- Thiery, J. et al., 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature immunology*, 12(8), pp.770–7.
- Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M., 2015. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), pp.451–461.

-
- Topham, N.J. & Hewitt, E.W., 2009. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? *Immunology*, 128(1), pp.7–15.
- Trickett, A. & Kwan, Y.L., 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, 275(1–2), pp.251–255.
- Tyas, L. et al., 2000. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports*, 1(3), pp.266–270.
- Vankayalapati, R. et al., 2004. NK Cells Regulate CD8+ T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(1), pp.130–137.
- Vermes, I. et al., 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184, pp.39–51.
- Vesely, M.D. et al., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp.235–271.
- Viganò, S. et al., 2012. Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clinical & developmental immunology*, 2012.
- Vitale, M. et al., 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*, 106(2), pp.566–571.
- Vorobjev, I.A. & Barteneva, N.S., 2017. Multi-parametric imaging of cell heterogeneity in apoptosis analysis. *Methods*, 112, pp.105–123.
- Voskoboinik, I. et al., 2005. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.8426–34.
- Wallace, B. & Atzberger, P.J., 2017. Förster resonance energy transfer: Role of diffusion of fluorophore orientation and separation in observed shifts of FRET efficiency. *PLoS ONE*, 12(5), p.e0177122.
- Walsh, J.G. et al., 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(35), pp.12815–12819.

Walsh, N. et al., 2010. Membrane transport proteins in human melanoma: Associations with tumour aggressiveness and metastasis. *British Journal of Cancer*, 102(7), pp.1157–1162.

Wang, W. et al., 2018. CD8+ T Cells in Immunotherapy, Radiotherapy, and Chemotherapy. In *Oncoimmunology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 23–39.

Wehner, R. et al., 2011. The Bidirectional Crosstalk between Human Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity*, 3(3), pp.258–263.

Weidmann, E. et al., 1995. Lactate dehydrogenase-release assay: a reliable, nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia. *Annals of hematology*, 70(3), pp.153–8.

Weng, N.P. et al., 1995. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), pp.11091–4.

West, W.H. et al., 1977. Natural Cytotoxic Reactivity of Human Lymphocytes Against a Myeloid Cell Line : Characterization of Effector Cells. *J Immunol*, 118, pp.355–361.

Willcox, B.E. & Willcox, C.R., 2019. $\gamma\delta$ TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery. *Nature Immunology*, 20(2), pp.121–128.

Wills, M.R. et al., 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *Journal of virology*, 70(11), pp.7569–79.

Wölfel, M. & Greenberg, P.D., 2014. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nature protocols*, 9(4), pp.950–66.

Woo, M. et al., 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes and Development*, 12(6), pp.806–819.

www.bu.edu, 2013. Fluorochromes Brightness Chart. Available at: <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2013/06/Fluorochromes-Brightness-Chart.pdf>.

- Yee, C. et al., 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp.16168–73.
- Zarnitsyna, V.I. et al., 2013. Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire. *Frontiers in Immunology*, 4(DEC), pp.1–11.
- Zhang, Y. et al., 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Nature Publishing Group*, 28, pp.9–21.
- Zhou, F., 2009. Molecular mechanisms of IFN- γ to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International Reviews of Immunology*, 28(3–4), pp.239–260.
- Zhou, X. et al., 2018. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Journal of Physiology*, 596(14), pp.2681–2698.
- Zippelius, A. et al., 2004. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Research*, 64(8), pp.2865–2873.
- Zippelius, A. et al., 2002. Thymic Selection Generates a Large T Cell Pool Recognizing a Self-Peptide in Humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(4), pp.485–494.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Drei unterschiedliche <i>in vitro</i> Stimulationen von CD8 ⁺ T-Zellen.....	12
Abbildung 2: Zytotoxische Mechanismen von CTL und NK.....	18
Abbildung 3: NK-vermittelte Zytotoxizität der PBMC.....	49
Abbildung 4: Ca ²⁺ -abhängige Zytotoxizität von CTL- und NK.....	51
Abbildung 5: Funktionelle Analyse pp65-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellklone.....	53
Abbildung 6: SK-Mel5 ist eine geeignete Zielzelllinie zur Untersuchung der Zytotoxizität von CTL _{MART1}	54
Abbildung 7: Generierung dendritischer Zellen und Isolation naiver CD8 ⁺ T-Zellen.....	55
Abbildung 8: Analyse MART1-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	56
Abbildung 9: Funktionelle Analyse der generierten MART1-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklone.....	57
Abbildung 10: Funktionelle Analyse CD8 ⁺ T-Zellen nach der DC/T-Zell-Kokultur unter verschiedenen Bedingungen..	60
Abbildung 11: Funktionelle Analyse der generierten MART1-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklone.....	62
Abbildung 12: Funktionelle Analyse der generierten gp100-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklone.....	63
Abbildung 13: CTL _{MART1} in unterschiedlichen Expansionen.....	64
Abbildung 14: Die mittlere funktionelle Avidität des MART1-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklons 3.....	66
Abbildung 15: <i>In vitro</i> kultivierte SK-Mel5 Zellen entwickeln eine Passage-abhängige Resistenz.....	67
Abbildung 16: Untersuchung einer wechselseitigen Abhängigkeit der Zytotoxizität von CTL _{MART1} und NK-Zellen.....	69
Abbildung 17: Eine NK-Kokultur führt zu einer Resistenz der Melanomzelllinie SK-Mel5 gegen NK.....	70
Abbildung 18: Die normierte Lyseeffizienz primärer NK-Zellen ist unabhängig von der Passage von SK-Mel5 Zellen..	71
Abbildung 19: Nach einer Kokultur mit CTL _{MART1} entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen NK.....	72
Abbildung 20: Die normierte Lyseeffizienz primärer NK-Zellen von SK-Mel5 Zellen kokultiviert mit CTL _{MART1}	73
Abbildung 21: Die Kokultur von SK-Mel5 mit NK-Zellen hat keinen Effekt auf die CTL _{MART1} vermittelte Zytotoxizität..	74
Abbildung 22: Die Lyseeffizienz durch CTL _{MART1} von SK-Mel5 Zellen kokultiviert mit primären NK-Zellen.....	75
Abbildung 23: Nach einer CTL _{MART1} -Kokultur entwickeln SK-Mel5 Zellen eine Resistenz gegen CTL _{MART1}	75
Abbildung 24: Die normierte Lyseeffizienz durch CTL _{MART1} von SK-Mel5 Zellen, kokultiviert mit CTL _{MART1}	76
Abbildung 25: Rescue der Resistenz gegen CTL _{MART1} durch exogene Beladung der SK-Mel5 Zellen.....	77
Abbildung 26: Während der Apoptose bleibt die Membranintegrität der Zielzellmembran intakt.....	79
Abbildung 27: Expression des Apoptoseindikators Casper3-GR zeigt den Eintritt der Apoptose.....	80
Abbildung 28: Die Annexin V-Signale erscheinen später als pCasper-Signale.....	82
Abbildung 29: Das Annexin V-Signal erscheint später als das pCasper Signal bei Apoptoseinduktion in Jurkat E6-1....	83
Abbildung 30: NK-induzierter Zelltod in Jurkat E6-1 Zellen.....	85
Abbildung 31: NK-induzierte Apoptose in K562 Zellen wird durch Annexin V später detektiert als durch pCasper.....	87
Abbildung 32: Annexin V detektiert nicht nur Apoptosen sondern auch Nekrosen.....	88
Abbildung 33: Mittels Annexin V/PI Färbung wird der Anteil an Nekrosen überschätzt.....	90
Abbildung 34: Vergleichbare Ergebnisse in durchflusszytometrischen und mikroskopischen Untersuchungen.....	91

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper	26
Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper	26
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Stimulation	26
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	27
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturlösungen und-medien.....	31
Tabelle 6: Verwendete Filter im Cell Observer und ImageXpress Micro XLS System.....	32
Tabelle 7: Verwendete Geräte	32
Tabelle 8: Verwendete Kits.....	33
Tabelle 9: Verwendetes Verbrauchsmaterial	34
Tabelle 10: Auflistung der getesteten Bedingungen der DC/T-Zell-Kokultur	59

8.4 Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Englisch	Deutsch
AnV	Annexin V	Annexin V
APC	Antigen-presenting cell	Antigen-präsentierende Zelle
BCA	bicinchonin acid	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine serum albumin	Bovines Serum-Albumin
B-Zelle	Bone-marrow-derived antibody producing cell	Knochenmark-abstammende Antikörper-produzierende Zelle
Ca²⁺	Calcium	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation	“Unterscheidungsgruppen”
CMV	Cytomegalovirus	Zytomegalievirus
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Zytotoxische T-Zelle
Ctrl	Control	Kontrolle
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DISC	death-inducing signaling complex	Tod-induzierender Signal-Komplex
DLMW	Dahlmeier (female)	Dahlmeier (weiblich)
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
E:T	Effector:Target	Effektor:Zielzelle
EBV-LCL	Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines	Epstein-Barr Virus-transformiert lymphoblastoide Zelllinie
ECL	enhanced chemi luminescence	Verstärkte Chemilumineszenz
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren
FADD	Fas-associated death domain protein	Fas-assoziiertes Protein der Todes-Domäne
FasL	Fas ligand	Fas Ligand

Anhang

FasR	Fas receptor	Fas Rezeptor
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälber-Serum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gp100	Glycoprotein 100	Glykoprotein 100
h	Hour	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HLA	Human Leukocyte Antigens	Humane Leukozytenantigene
Human AB	Human serum, Type AB	Humanes Serum, Typ AB
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleukin
IS	Immunological synapse	Immunologische Synapse
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor	Killerzell-Immunglobulinähnlicher Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
LRS	Leukocyte reduction chamber	Leukozyten-Reduktionskammern
MART1	Melanoma Antigen Recognized by T-cells	Melanom-Antigen erkannt von T-Zellen
MEM	minimum essential media	minimal essentielles Medium
MFI	Median fluorescence intensity	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute	Minute
MOMP	Mitochondria outer membrane permeabilization	Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran

Anhang

MTOC	Microtubule organizing center	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NK	Natural killer cell	Natürliche Killer Zelle
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	Periphere Mononukleäre-Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PI	Propidium iodide	Propidiumiodid
PM	Plasmamembrane	Plasmamembran
pp65	Phosphoprotein 65	Phosphoprotein 65
PS	Phosphatidylserine	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
Rag	Recombinant activating gene	Rekombinante Aktivierungs-Gen
RFP	Red fluorescent protein	Rot fluoreszierendes Protein
RT	Room temperature	Raumtemperatur
s	Second	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
SEA	Staphylococcal enterotoxin A	Staphylokokken Enterotoxin A
TAA	Tumor-associated antigens	Tumor assoziierter Antigene
TAP	Transporter associated with antigen processing	Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung
TBS	Tris-buffered saline	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	T cell receptor	T- Zell-Rezeptor
TEMED	tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylendiamin
TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes	Tumor-infiltrierenden T Lymphozyten
TNF	Tumor necrosis factor	Tumor Nekrose Faktor
T-Zelle	thymus-derived helper cell	Thymus-abstammende Zelle
WB	Western blot	Western Blot

Danksagung

Mit der Abgabe dieser Arbeit geht eine lange, intensive und prägende Zeit meines Lebens zu Ende, was ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht ansatzweise möglich geworden wäre.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Markus Hoth danken: Deine offene Art sowie deine Begeisterung für Wissenschaft haben mich in diese Arbeitsgruppe geführt und dafür werde ich dir ewig dankbar sein. Danke für die jahrelange Förderung, fachliche Diskussionen und moralische Unterstützung!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine wissenschaftliche Betreuerin Dr. Eva Schwarz, die mich nun seit vielen Jahren an der Backe hat und mit mir schon verschiedene Hochs und Tiefs durchleben durfte. Deine stetige Unterstützung und dein Beistand über all die Jahre, sowohl fachlich als auch menschlich, sind von unschätzbarem Wert für mich.

Auch Carsten Kummerow danke ich von ganzem Herzen. Dein nie enden wollendes Fachwissen, deine unermüdliche Geduld sowie dein immer offenes Ohr für Probleme und Problemchen haben die Arbeit in dieser Form erst ermöglicht.

Außerdem danke ich den „Klonkriegern“ Cora Hoxha und Arne Knörck. Ein (Labor-)Alltag ohne euch und eure Freundschaft ist für mich kaum vorstellbar. Ihr seid großartig!

Auch Danke an Gertrud Schwär! Deine unendliche Expertise und dein diszipliniertes Arbeiten (vor allen Dingen in Sachen nerviger Killing Assays) haben auf ewig selbst gebackene Kuchen verdient.

Ein großes Dankeschön geht an Kathrin Förderer, Carmen Hässig, Sandra Janku und Susanne Renno für die großartige technische Unterstützung. Auch möchte ich mich bei Sylvia Zöphel und Lea Kaschek für ihre stetige Hilfsbereitschaft und immer währende Unterstützung ganz herzlich bedanken!

Danke an Maik, Adrian, Kathrin und Anni: bessere Bürokollegen bzw. -exkollegen hätte ich mir nicht wünschen können. Auch Anna-Maria, Sarah und Katharina danke ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Durch diese Arbeitsgruppe habe ich all eure Freundschaften gewonnen, weshalb ich mich sehr glücklich schätze.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei „Rosenkavalier-Robin“ bedanken. Danke, dass du mir den Rücken stärkst und ich dich immer auf meiner Seite zählen kann. Du bist mein Ruhepol und der beste Teampartner, den ich mir wünschen könnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie: Meine Mutter, mein Vater, „Bruder-Robin“, Omas und Opas. Ohne euren immer währenden Rückhalt und Unterstützung wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin. Ich hoffe ihr wisst wie unendlich dankbar ich euch bin und wie lieb ich euch habe!

Veröffentlichungen

Friedmann KS, Cappello S, Bogeski I, Hoth M, Schwarz EC, Kummerow C. 2019. Interdependent CTL and NK cytotoxicity against melanoma. In Vorbereitung.

2019

Martin H, Walch-Rückheim B, **Friedmann KS**, Rheinheimer S, Tänzer T, Glombitza B, Sester M, Lenhof HP, Hoth M, Schwarz EC, Keller A, Meese E. 2019. miR-34a: a new player in the regulation of T cell function by modulation of NF- κ B signalling. *Cell Death Differ.* 10(2):46. doi: 10.1038/s41419-018-1295-1.

Friedmann KS*, Bozem M*, Hoth M. 2019. Calcium signal dynamics in T lymphocytes: Comparing in vivo and in vitro measurements. *Semin Cell Dev Biol* doi: 10.1016/j.semcdb.2019.01.004. Epub ahead of print

2018

Backes CS, **Friedmann KS**, Mang S, Knörck A, Hoth M, Kummerow C. 2018. Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification and modulation of apoptosis, necrosis and mixed forms. *J Biol Chem* 293(42):16348-16363. doi: 10.1074/jbc.RA118.004549.

Knörck A, **Friedmann KS***, Marx S*, Zöphel S, Lieblang L, Hässig C, Müller I, Pilch J, Sester U, Hoth M, Eichler H, Sester M, Schwarz EC. 2018. Quantity, quality and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion* 58(6):1516-1526. doi: 10.1111/trf.14616.

Zhou X, **Friedmann KS**, Lyrmann H, Zhou Y, Schoppmeyer R, Knörck A, Mang S, Hoxha C, Angenendt A, Backes CS, Mangerich C, Zhao R, Cappello S, Schwär G, Hässig C, Neef M, Bufe B, Zufall F, Kruse K, Niemeyer BA, Lis A, Qu B, Kummerow C, Schwarz EC, Hoth M. 2018. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *J Physiol* 596(14):2681-2698. doi: 10.1113/JP274964.

2016

Bhat SS, **Friedmann KS***, Knörck A*, Hoxha C, Leidinger P, Backes C, Meese E, Keller A, Rettig J, Hoth M, Qu B, Schwarz EC. 2016. Syntaxin 8 is required for efficient lytic granule trafficking in cytotoxic T lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863 (7), 1653–1664. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.014.

Müller I, Dominik A, Eyrich M, Flesch B, **Friedmann KS**, Ketter R, Oertel, Schwarz EC, Technau A., Urbschat S, Eichler H. 2016. Tumor antigen-specific T cells for immune monitoring of DC treated