

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Perforinexpression bei humanen peripheren
mononukleären Zellen nach anti-CD3 Stimulation –
Zusammenhang mit Zellgröße und Zytotoxizität**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Daniel Tanase

aus

Sathmar/Rumänien

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Dannecker

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Aktivierung von T-Lymphozyten.....	2
1.1.1	Der T-Zell Rezeptor (TCR).....	2
1.1.2	MHC-Moleküle.....	2
1.1.3	Antigenerkennung durch den TCR.....	4
1.1.4	Die primäre Aktivierung von naiven T-Zellen (Priming).....	5
1.1.5	Subpopulationen CD8 ⁺ T-Zellen.....	8
1.2	Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen.....	10
1.2.1	Das Fas/FasL-System.....	12
1.2.1.1	Fas und Fas-Ligand.....	12
1.2.1.2	Die Fas-abhängige Signalkette.....	13
1.2.1.3	Physiologische und pathologische Bedeutung des Fas-Systems.....	16
1.2.2	Das Perforin/Granzym-System.....	17
1.2.2.1	Zytotoxische Granula.....	17
1.2.2.2	Perforin.....	18
1.2.2.3	Granzyme.....	19
1.2.2.4	Physiologische und pathologische Bedeutung des Perforin/Granzym-Systems.....	20
1.3	Zielsetzung.....	21
2.	Material	22
2.1	Antikörper.....	22
2.1.1	Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	22
2.1.2	Für Zytotoxizitätstests verwendete Antikörper.....	22
2.2	Chemikalien.....	23
2.3	Zellen.....	23
2.3.1	Humane Lymphozyten.....	23
2.3.2	Tumorzelllinien.....	23
2.4	Puffer und Lösungen.....	24
2.5	Geräte.....	24

3.	Methoden	25
3.1	Zellkulturen.....	25
3.1.1	Tumorzelllinien.....	25
3.1.2	Humane mononukleäre Zellen.....	25
3.1.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen.....	25
3.1.2.2	Stimulation mit anti-CD3.....	26
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	26
3.1.4	Einfrieren von Zellen.....	26
3.2	Durchflusszytometrie – FACS (Fluorescence activated cell sorting).....	26
3.2.1	Oberflächenfärbung.....	29
3.2.1.1	Direkte Färbung.....	29
3.2.1.2	Indirekte Färbung.....	29
3.2.2	Intrazelluläre Färbung auf Perforin.....	30
3.3	Zytotoxizitätstest.....	31
3.3.1	⁵¹ Cr-Release-Assay.....	31
3.3.2	Blockade-Versuche.....	32
3.3.3	Redirected Lysis.....	32
3.4	MACS – Magnetic Activated Cell Sorting.....	33
4.	Ergebnisse	35
4.1	Versuche mit unselektierten PMNC.....	35
4.1.1	Perforinfärbung.....	35
4.1.2	Zytotoxizitätsversuche.....	37
4.1.2.1	Zytotoxizität von stimulierten und unstimulierten PMNC.....	37
4.1.2.2	Korrelation zwischen Perforin und Zytotoxizität.....	39
4.1.3	Blockadeversuche.....	40
4.2	Versuche mit CD8 ⁺ Lymphozyten.....	43
4.2.1	Perforinfärbung.....	43
4.2.2	Zytotoxizitätsversuche.....	46
4.2.2.1	Zytotoxizität von stimulierten und unstimulierten CD8 ⁺ Zellen.....	46

4.2.2.2	Korrelation zwischen Perforin und Zytotoxizität.....	48
4.2.3	Blockadeversuche.....	50
4.3	Versuche mit CD25 ⁺ und CD25 ⁻ Zellen.....	53
4.3.1	Oberflächenmarker für die Zellgröße.....	53
4.3.2	Perforinfärbung nach MACS auf CD25.....	56
4.3.3	Zytotoxizitätsversuche.....	58
4.3.4	Blockadeversuche.....	60
5.	Diskussion.....	62
5.1.	Veränderungen von T-Zellen nach Aktivierung.....	63
5.1.1	Eintritt in den Zellzyklus und Proliferation.....	63
5.1.2	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen.....	64
5.1.3	Entwicklung von Effektorfunktionen.....	68
5.1.3.1	Lytische Granula.....	68
5.1.3.2	Zeitliche Entwicklung von Effektorfunktionen.....	69
5.1.4	Subpopulationen CD8 ⁺ T-Lymphozyten	71
5.1.4.1	Zusammenhang von Zellzyklusprogression und Entwicklung von Effektorfunktionen.....	72
5.2	Anteil des Fas- und Perforinsystems an der Zytotoxizität von CTL.....	74
5.2.1	In vitro Untersuchungen zu Fas und Perforin beim Menschen.....	75
5.2.2	Physiologische Bedeutung des Fas und Perforin Systems.....	77
5.2.3	Regulation des Fas und Perforin Systems.....	78
5.2.3.1	Regulatorische Wirkung von Zytokinen.....	78
5.2.3.2	Signaltransduktion und Genexpression	79
5.2.3.3	Zusammenhang zwischen Zellzyklusprogression und Expression von Effektormolekülen.....	82
5.3	Schlussfolgerung.....	83
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Literatur.....	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	Activation induced cell death; aktivierungsinduzierter Zelltod
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALPS	Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
AP-1	Transkriptionsfaktor; activator protein 1
APC	Antigen presenting cell; Antigen präsentierende Zelle
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; Apoptose hemmendes Molekül
BID	BH3 interacting domain death agonist
CAD	Caspase aktivierte DNase
Caspase	Cysteine aspartic acid-specific protease
CD	Cluster of differentiation; Klassifikationsschema für Oberflächenantigene
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidyl-Ester
cKrox	Transkriptionsfaktor aus der Familie der Zinkfingerproteine; Krueppel-related zinc finger protein
CMA	Concanamycin A
Cpm	Counts per minute; Zählungen pro Minute
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte; zytotoxischer T-Lymphozyt
Cyt c	Cytochrom c
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritic cell; (interdigitierende) dendritische Zelle
DD	Death domain (des Fas-Rezeptors)
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA-Methylase 1
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid; Äthylendiamintetraessigsäure

Eomes	Transkriptionsfaktor aus der T-box Familie; Eomesodermin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum; fetales Kälberserum
FHL	Familiäre Hämatophagozytische Lymphohistiozytose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like Interleukin-1 β converting enzyme
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreulicht
fyn	Proteinkinase fyn
GA	Golgi Apparat
Gld	generalized lymphoproliferative disease (Mutation)
GvH	graft versus host
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leucocyte antigen
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol-3,4,5-triphosphat
LAT	Adapterprotein LAT
lck	Proteinkinase lck
LZ	Lymphozyt
MACS	Magnetic activated cell sorting
mFasL	membrangebundener Fas-Ligand
MHC	Major histocompatibility complex Haupthistokompatibilitätskomplex
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
mRNA	Messenger RNA
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor kappa B

NGF	Nerve growth factor
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMNC	periphere mononukleäre Zellen
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
sFasL	soluble FasL; gelöster (nicht-membrangebundener) Fas-Ligand
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSC	Side scatter; Seitwärtsstreulicht
STAT-1	Transkriptionsfaktor; signal transducer and activator
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter associated with antigen processing
T-bet	Transkriptionsfaktor aus der T-box Familie; t-box expressed in t-cells
T-box	Transkriptionsfaktorfamilie
T _{CM}	Central memory T-cell; zentrale Gedächtniszelle
TCR	T cell receptor; T-Zell Rezeptor
T _E	Effektor-T-Zelle
T _{EM}	Effector memory T-cell; Effektor-Gedächtniszelle
T _H -Zelle	T-Helferzelle
T _N	naive T-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TZR	T-Zell Rezeptor
ZAP70	Zeta-Ketten assoziierte Proteinkinase 70

1. Einleitung

Das Immunsystem dient dem Schutz des Organismus vor pathogenen Keimen und maligne entarteten Körperzellen und richtet sich gegen Strukturen, die als fremd erkannt werden. Man unterscheidet dabei eine unspezifische und eine adaptive Komponente. Das **unspezifische Abwehrsystem** umfasst physikalische Schutzmechanismen, Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile), Zellen, die Entzündungsmediatoren ausschütten (Mastzellen, Basophile, Eosinophile) und Natürliche Killer Zellen (NK Zellen). Es richtet sich unspezifisch gegen körperfremde Strukturen. Das spezifische oder **adaptive Abwehrsystem** reagiert hingegen in Form einer gezielten Abwehrreaktion auf spezifische Antigene. Charakteristisch ist dabei die Fähigkeit, sich an einmal bekannte Erreger zu erinnern und ein erneutes Eindringen durch eine schnellere Reaktion zu verhindern. Dieses Erinnerungsvermögen wird auch als Immunität bezeichnet. Angeborene und adaptive Mechanismen interagieren auf vielfache Weise.

Das adaptive Immunsystem besteht aus einem humoralen und einem zellvermittelten Teil. Die humorale Immunantwort richtet sich in erster Linie gegen extrazelluläre Mikroorganismen. Träger der humoralen Abwehr sind B-Lymphozyten, die als Plasmazellen Immunglobuline sezernieren. Träger der zellvermittelten Abwehr sind T-Lymphozyten, welche sich gegen intrazelluläre Krankheitserreger richten. Beide Arten von Lymphozyten stammen aus dem Knochenmark. Während B-Lymphozyten im Knochenmark reifen, wandern T-Lymphozyten zur Reifung in den Thymus ein, den sie nach verschiedenen Selektionsvorgängen als sogenannte naive T-Zellen wieder verlassen. Sie zirkulieren zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen, bis sie auf ihr jeweils spezifisches Antigen treffen und zu Effektorzellen aktiviert werden.

1.1 Die Aktivierung von T-Lymphozyten

1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

Nach der Reifung im Thymus exprimieren T-Zellen auf ihrer Zelloberfläche ein antigenbindendes Molekül, den T-Zell-Rezeptor (TCR). Es handelt sich um ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette bzw. aus einer γ - und einer δ -Kette, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Entsprechend werden die Zellen als $\alpha\beta^+$ oder $\gamma\delta^+$ T-Zellen bezeichnet. Der T-Zell-Rezeptor ähnelt dem F_{ab} -Fragment eines Immunglobulins: Jede α -, β -, γ - oder δ -Kette besteht aus einer variablen Domäne, die der Antigenerkennung dient, und einer konstanten Domäne, die den TCR in der Zellmembran verankert.

1.1.2 MHC-Moleküle

T-Lymphozyten erkennen antigene Peptide nur dann, wenn sie an sogenannte MHC-Moleküle gebunden sind (Zinkernagel RM, 1997). MHC-Moleküle sind Glykoproteine auf der Oberfläche jeder Körperzelle, die immunologische Vorgänge regulieren. Sie werden durch eine Gruppe von Genen codiert, die man als Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex) bezeichnet. Der MHC-Genkomplex des Menschen wird auch als HLA (human leucocyte antigen) bezeichnet.

Man unterscheidet zwei Formen von MHC-Molekülen, beide besitzen eine Bindungsstelle für Antigenpeptide. MHC-Moleküle der **Klasse I** (HLA-A, -B, -C, usw.) bestehen aus einer schweren α -Kette und β_2 -Mikroglobulin. In der Tertiärstruktur erkennt man vier Domänen, von denen drei aus der α -Kette gebildet werden. Die peptidbindende Stelle befindet sich an dem Spalt zwischen α_1 - und α_2 - Domäne, die α_3 -Domäne besitzt einen transmembranen Teil und verankert das Molekül in der Zellmembran (Bjorkman et al., 1987). MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen. Pathogene im Zytosol (Viren, intrazytoplasmatische Bakterien und Protozoen) werden von Proteasen gespalten. Durch aktiven Transport werden die 8-10 Aminosäuren langen Peptidfragmente von einem Transportermolekül (TAP-Transporter) ins

Endoplasmatisches Retikulum (ER) gebracht, wo sie fest an MHC-I-Moleküle binden (Goldberg und Rock, 1992). Dieser Komplex wird dann in Golgi-Vesikeln an die Zelloberfläche befördert (Jackson und Peterson, 1993) (Abb. 1). Erkennen zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten den Komplex aus körperfremdem Peptid und MHC-I-Molekül auf einer infizierten Körperzelle, so töten sie die Zelle ab. Neben diesem endogenen Weg der MHC-I-Präsentation, gibt es bei spezialisierten Antigen präsentierenden Zellen (APC) einen sogenannten exogenen Weg der MHC-I-Präsentation, bei dem Antigene von phagozytierten Erregern an MHC-I-Moleküle gebunden und CD8-positiven Lymphozyten präsentiert werden. Im Unterschied zu den übrigen Körperzellen verfügen APCs über kostimulatorische Moleküle, durch die sie naive T-Lymphozyten primär aktivieren und deren klonale Expansion einleiten (Priming).

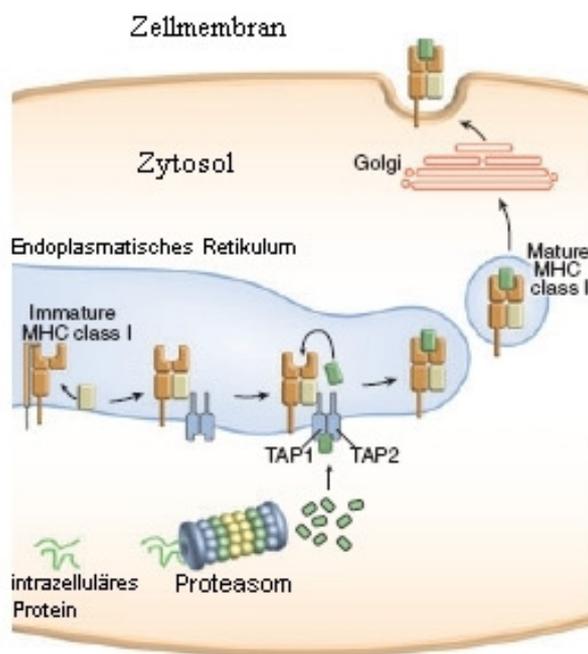


Abb. 1 Antigenprozessierung und Bindung an MHC-Klasse-I-Molekül (modifiziert nach Andersen et al. 2006)

Intrazelluläre Proteine werden durch Proteasomen zu Peptiden abgebaut und durch den TAP-Komplex (transporter associated with antigen processing) zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Dort liegen neu synthetisierte MHC-Klasse-I-

Moleküle vor, die durch Calnexin stabilisiert werden bis β_2 -Microglobulin gebunden wird. Der MHC-I-Komplex interagiert mit dem TAP-Komplex und es kommt zur Bindung des Antigenpeptides an den MHC-Komplex. Der entstandene MHC/Peptid-Komplex wird über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

MHC-Moleküle der **Klasse II** (HLA-DR, -DQ, -DP) bestehen aus zwei verschiedenen transmembranen Untereinheiten, einer α - und einer β - Kette, mit jeweils zwei Domänen. Die Peptidbindungsstelle wird durch die Furche zwischen der α_1 - und β_1 - Domäne gebildet. MHC-II-Moleküle werden nur auf der Zelloberfläche von APCs exprimiert und binden das Antigenpeptid nicht im Endoplasmatischen Retikulum, sondern in Vesikeln des Golgi Apparates (GA) (Peters et al.,1991). Es werden deshalb nur Proteine präsentiert, die aus dem vesikulären System stammen, also Pathogene, die sich in sauren Vesikeln vermehren wie Mykobakterien und Leishmanien, oder aber phagozytisch aufgenommene Erreger (Pieters, 2000). Letztere werden in Phagolysosomen zu Peptidfragmenten abgebaut, an MHC-II-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche CD4-positiven Lymphozyten präsentiert.

1.1.3 Antigenerkennung durch den TCR

Der Kontakt zwischen TCR und MHC/Peptid-Komplex wird durch die variablen Domänen des TCR hergestellt (Garboczi et al., 1996) und löst die zelluläre Immunantwort aus. Für die Bindung des TCR an den Komplex aus Antigenpeptid und MHC-Molekül sind die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 als sogenannte Corezeptoren erforderlich. CD4 dient der Bindung an MHC-II-Moleküle, CD8 der Bindung an MHC-I-Moleküle (Janeway CA Jr., 1992). Die Interaktion von TCR und Corezeptoren mit dem MHC/Peptid-Komplex führt über eine Signalkette zur Proliferation und Differenzierung des Lymphozyten. Ein mit dem TCR assoziierter Molekülkomplex dient der Signalübertragung in die Zelle, da das zytoplasmatische Ende des TCR-Moleküls zu kurz dafür ist (Weiss et al.,1991). Dieser sogenannte CD3-Komplex besteht aus drei Proteinen (γ , δ und ϵ) mit Homologie zu Immunglobulinen und zwei weiteren Proteinen (ζ und η), die sich überwiegend im Zytoplasma befinden und der Signalübertragung dienen (DeFranco et al.,1995). Eine wichtige Rolle spielen dabei zytoplasmatische Tyrosinkinasen. Die Corezeptoren CD4 und CD8 sind mit der Proteintyrosinkinase *Lck*, die zytoplasmatischen Proteine des CD3-Komplexes mit der Proteinkinase *Fyn* assoziiert (Chan et al., 1994). Beide Proteinkinasen stehen am Anfang einer Reaktionskaskade, die letztendlich zur

spezifischen Transkription von Genen führt, die an der Proliferation und Differenzierung des Lymphozyten beteiligt sind.

1.1.4 Die primäre Aktivierung von naiven T-Zellen (Prägung)

Solange T-Zellen noch keinen Kontakt mit ihrem Antigen hatten, bezeichnet man sie als ungeprägte bzw. naive T-Zellen. In diesem Zustand sind sie nicht in der Lage, an der Immunantwort teilzunehmen. Erst nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen, gebunden an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche von APCs, beginnt die Proliferation (klonale Expansion) und Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen (Knight und Stagg, 1993). $CD8^+$ T-Lymphozyten differenzieren zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), $CD4^+$ T-Zellen zu zwei verschiedenen Arten von Helferzellen: inflammatorische T_H1 -Zellen, die Makrophagen aktivieren, und T_H2 -Zellen, die B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen. Die Signale, die zur Aktivierung von CTLs und T_H -Zellen führen, sind ähnlich, zudem beeinflussen sich beide Populationen gegenseitig.

Für die Wechselwirkung zwischen APCs und naiven T-Zellen sind Adhäsionsmoleküle notwendig, die die Bindung der Zellen vermitteln und die Kontaktzeit verlängern. Beim ersten Zusammentreffen von T-Zelle und APC bindet beispielsweise das CD2-Oberflächenmolekül der T-Zelle an CD58 (LFA-3) der APC (Holter et al., 1996). Ähnliche adhäsive Interaktionen finden zwischen dem LFA-1 Oberflächenmolekül von T-Zellen und ICAM-1, -2 und -3 auf der Oberfläche von APCs statt (Kuhlman et al., 1991).

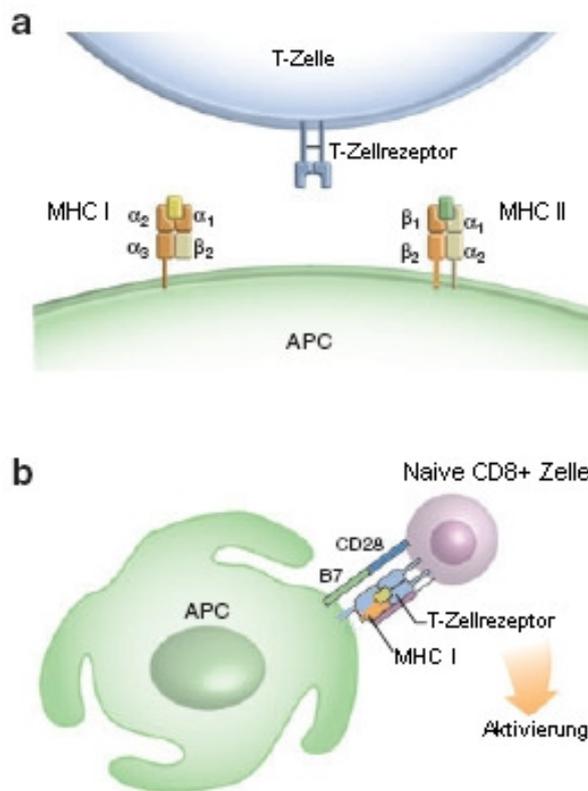


Abb. 2 Antigenerkennung durch den TCR
(modifiziert nach Andersen et al. 2006)

a) Der TCR erkennt an MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II gebundene Antigenproteine. $CD8^+$ T-Lymphozyten binden an MHC-Klasse-I-Moleküle und zerstören daraufhin ihre Zielzelle. $CD4^+$ Lymphozyten binden an MHC-Klasse-II-Moleküle und schütten nach Aktivierung Zytokine zur Regulation der Immunantwort (meist Aktivierung der Zielzelle) aus.

b) Der TCR eines naiven $CD8^+$ Lymphozyten hat an ein MHC-I-Molekül einer APC gebunden. Zusätzlich zur Aktivierung über den TCR sind costimulatorische Signale beispielsweise durch die Bindung von B7 und CD28 nötig, um eine naive T-Zelle zu einer Effektorzelle zu aktivieren.

Zusätzlich zum primären Signal über den TCR und CD4 oder CD8 erfordert die Aktivierung naiver T-Zellen weitere costimulatorische Signale, die der Verstärkung und Modifikation des primären Signals dienen. Eine solche costimulatorische Eigenschaft besitzen die Oberflächenmoleküle CD80 und

CD86 (B7-1 bzw. B7-2) (Greenwald et al., 2005). Sie können sowohl an den stimulatorischen Rezeptor CD28 als auch an den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 (CD152) binden. Die Bindung an CD28 vermittelt Signale zur Aktivierung naiver T-Zellen, während die Interaktion mit CTLA-4 T-Zell-Antworten inhibiert und so zur Regulation der T-Zell-Antwort beiträgt. CD28 wird von naiven T-Zellen exprimiert, die Expression von CTLA-4 wird nach T-Zell-Aktivierung rasch hochreguliert. CD28-Signale verringern die für eine Aktivierung nötige Anzahl an Interaktionen zwischen TCR und MHC/Peptid-Komplexen. Je mehr B7-Moleküle eine APC produziert, umso mehr costimulatorische Eigenschaften hat sie. Ohne costimulatorisches Signal wird die T-Zelle anerg, d.h. sie ist später selbst bei optimaler Stimulation nicht in der Lage, auf ihr spezifisches Antigen zu reagieren.

Wird eine naive T-Zelle durch ihren spezifischen MHC/Antigen-Komplex und costimulatorische Signale aktiviert, beginnt sie den T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin 2 (IL2) und seinen Rezeptor zu exprimieren. Die Bindung von IL2 am Rezeptor leitet die klonale Expansion der T-Zelle sowie die Differenzierung ihrer Nachkommen zu bewaffneten Effektorzellen ein (Malek et al., 2001). Bei der klonalen Expansion im Rahmen der primären Reaktion auf bestimmte Virusinfektionen können Pathogen-spezifische CD8⁺ T-Zellen innerhalb kurzer Zeit bis zu 50% aller CD8⁺ T-Zellen ausmachen (Murali-Krishna et al., 1998; Butz und Bevan, 1998). Nach überstandener Infektion bleibt ein geringer Anteil davon als Antigen-spezifische Gedächtniszellen für viele Jahre, möglicherweise ein Leben lang erhalten (Murali-Krishna et al., 1998). Diese Gedächtniszellen sind in der Lage, bei Reinfektion mit demselben Pathogen eine rasche effektive Immunantwort auszulösen.

Die primäre Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen löst neben der Proliferation ein Genexpressionsprogramm aus, das die Zellen mit einer breiten Palette an Effektorfunktionen ausstattet, darunter die Produktion zytotoxischer Moleküle sowie verschiedener Zytokine und Chemokine. Trifft eine so ausgestattete Effektorzelle auf ihr spezifisches Antigen, gekoppelt an MHC-I Moleküle

infizierter Zellen, werden die Effektormoleküle wirksam. Bei der Reaktivierung von Gedächtniszellen erfolgt die Ausbildung von Effektorfunktionen schneller (Selin und Welsh, 1997; Lalvani et al., 1997), wird durch geringere Antigenpiegel ausgelöst (Ahmed und Gray, 1996) und ist weniger abhängig von costimulatorischen Signalen als bei der primären Aktivierung naiver T-Zellen (Iezzi et al., 1998). Dieser Unterschied kann zum Teil durch verschiedene Isoformen des CD45 Proteins, nämlich CD45RA (naive T-Zellen) und CD45RO (T-Zellen nach Antigenkontakt) erklärt werden. Die beiden Isoformen werden durch alternatives Splicing eines mRNA-Transkriptes gebildet. Die resultierenden Proteine besitzen Phosphatase-Aktivität und dephosphorylieren die Tyrosinkinase *Lck* und *Fyn*, wodurch diese aktiviert werden und weitere Schritte der T-Zell Aktivierung einleiten. CD45RO zeigt eine stärkere Assoziation mit dem TCR und Corezeptoren als CD45RA, sodass die Signalübermittlung effizienter wird (Kilgore et al., 2004).

1.1.5 Subpopulationen CD8⁺ T-Zellen

Im peripheren Blut zirkulierende CD8⁺ Zellen können anhand ihres Differenzierungszustandes in mindestens vier Gruppen unterteilt werden: Naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen und Effektorzellen. Diese Subpopulationen sind mit bestimmten funktionalen und phänotypischen Eigenschaften assoziiert. Verschiedene Oberflächenmarker werden zur Differenzierung der Subpopulationen vorgeschlagen. Eine mögliche phänotypische Klassifikation basiert auf der unterschiedlichen Expression der costimulatorischen Rezeptoren CD27 und CD28 (auf naiven T-Zellen) sowie der Oberflächenproteine CD45RA (naive Zellen) bzw. CD45RO (Gedächtniszellen) (Tomiyama et al., 2002). Auch der Chemokinrezeptor CCR7 gilt als Marker zur Unterscheidung von naiven Zellen (CCR7⁺), zentralen Gedächtniszellen (CCR7⁺), Effektor-Gedächtniszellen (CCR7⁻) und Effektorzellen (CCR7⁻) (Champagne et al., 2001; Tomiyama et al., 2004). Die genauen Zusammenhänge zwischen der Expression bestimmter Oberflächenmarker und dem funktionellen Differenzierungsgrad sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Ebenso werden für Ablauf und Reihenfolge der

Differenzierungsstadien unterschiedliche Modelle diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass die Entwicklung von naiven $CD8^+$ Lymphozyten zu aktiven zytotoxischen Effektorzellen über verschiedene Differenzierungsstufen von Gedächtniszellen abläuft (Abb. 3). Zytokine wie IL2 könnten dabei eine Rolle spielen.

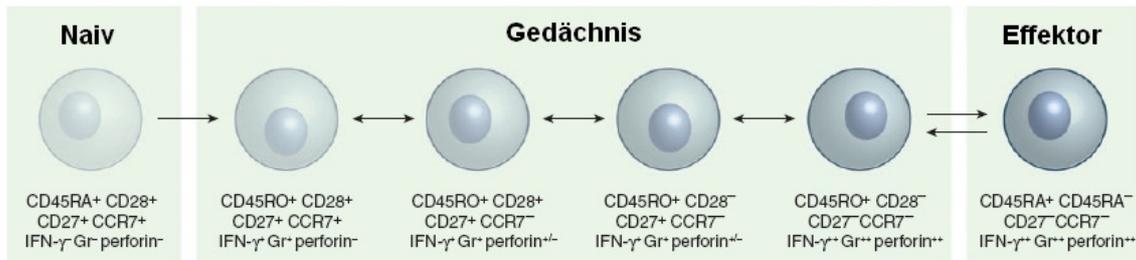


Abb. 3 Differenzierungsstufen $CD8^+$ T-Zellen
(modifiziert nach Andersen et al., 2006)

Anhand der Expression bestimmter Oberflächenantigene wie z. B. CD45RA, CD45RO, CD28, CD27, CCR7 sowie von Proteinen wie IFN- γ , Granzym (Gr) oder Perforin können T-Zellen verschiedenen Entwicklungsstufen zugeordnet werden. Die linear fortschreitende Entwicklung naiver Zellen über verschiedene Stadien von Gedächtniszellen zu voll entwickelten Effektorzellen wird als mögliche Reihenfolge der Differenzierung diskutiert.

1.2 Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen

Für die Auslösung des CTL-induzierten Zelltodes sind zwei verschiedene molekulare Mechanismen bekannt, die einen direkten Zellkontakt erfordern: Das Fas/Fas-Ligand System und das Perforin/Granzym B-System (Berke G., 1995; Kaegi et al., 1994). Letzteres wird auch als sekretorischer oder Granula-assoziiertes Mechanismus bezeichnet. Der **Fas-abhängige** zytotoxische Mechanismus wird eingeleitet durch die Interaktion von Fas-Ligand (FasL), der auf der Oberfläche von CTLs exprimiert wird, mit dem Fas-Rezeptor (Fas, CD95) auf der Oberfläche der Zielzelle. Die Fas/FasL-Interaktion triggert die Apoptose durch Auslösung der Caspasen-Kaskade (Nagata S., 1996). Der sekretorische Mechanismus beinhaltet die gerichtete Exozytose von **Perforin und Granzymen** in den interzellulären Spalt zwischen CTL und Zielzelle (Blott und Griffiths, 2002; Lieberman, 2003a). Durch Endozytose werden die zytotoxischen Moleküle von den Zielzellen aufgenommen und führen synergistisch zu deren Apoptose (Trapani und Smyth, 2002).

Neben diesen beiden zytotoxischen Mechanismen wirken CTLs auch über die Ausschüttung von Zytokinen indirekt zytotoxisch. Während der Stimulation des TCR kommt es zur **Ausschüttung von IFN- γ und TNF- α** durch die Effektorzelle. TNF- α triggert nach Interaktion mit seinem Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle die Caspasen-Kaskade, IFN- γ bewirkt in der Zielzelle einerseits die verstärkte Präsentation von Antigenpeptiden auf MHC-I-Molekülen und andererseits die vermehrte Expression des Fas-Rezeptors.

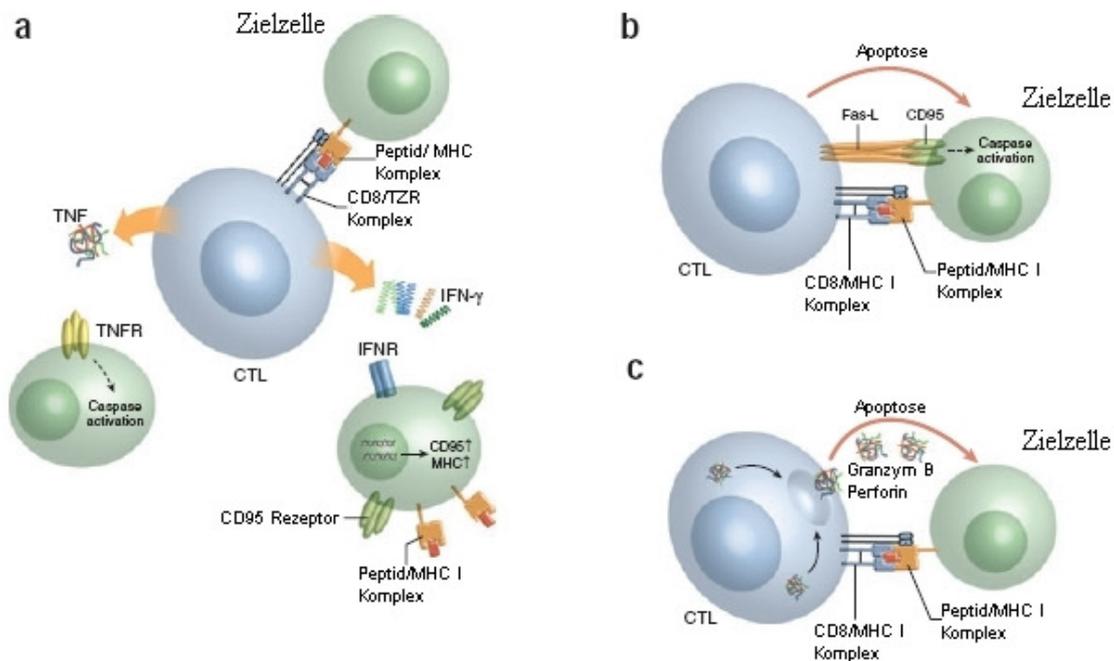


Abb. 4 Zytotoxische Mechanismen von CTL (nach Andersen et al. 2006)

Die Interaktion von Peptid/MHC-Komplex und CD8/TZR-Komplex (T-Zellrezeptor) löst verschiedene Effektormechanismen aus, die die Apoptose der Zielzelle induzieren.

a) TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) und IFN- γ (Interferon γ) wirken an der Zielzelle indirekt zytotoxisch. TNF- α triggert die Caspasen-Kaskade, IFN- γ führt zur verstärkten Präsentation von MHC-I/Peptid-Komplexen und zur Hochregulation des Fas-Rezeptors CD95.

b) Die Interaktion von FasL und CD95 (Fas-Rezeptor) aktiviert in der Zelle die Caspase-Kaskade, die die Apoptose der Zelle einleitet.

c) Perforin und Granzym B werden aus lytischen Granula in den interzellulären Raum freigesetzt und von den Zielzellen aufgenommen. Sie führen synergistisch zur Apoptose der Zielzelle.

1.2.1 Das Fas/FasL-System

1.2.1.1 Fas und Fas-Ligand

Fas (APO-1, CD95), ein Typ-I-Membranprotein, gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und *Nerve Growth Factor* (NGF) Rezeptoren und vermittelt das Signal zum programmierten Zelltod nach Interaktion mit dem Fas-Liganden (FasL) (Nagata und Golstein, 1995; Itoh et al., 1991; Suda et al., 1993). Fas ist ein aus 325 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer transmembranen Region und einer Signalsequenz am NH₂-Terminus und wird auf Chromosom 10 kodiert. Eine etwa 70 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne vermittelt das Apoptose-Signal und wird deshalb als *Death Domain* (DD) bezeichnet (Nagata und Golstein, 1995; Itho und Nagata, 1993). Aktivierte Lymphozyten zeigen eine starke Expression von Fas (Owen-Schaub et al., 1992) während viele andere Gewebe Fas schwach exprimieren. Die Expression von Fas wird durch IFN- γ und TNF- α hochreguliert (Itoh et al., 1991).

FasL (CD95L, Apo-1L, CD178) ist ein Typ-II-Membranprotein aus 281 Aminosäuren, das zur TNF-Familie gehört (Suda et al., 1993). FasL wird auf Chromosom 1 kodiert und von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen zur Zerstörung von virusinfizierten oder maligne transformierten Zellen exprimiert. Auch Monozyten besitzen intrazellulären FasL, der nach Aktivierung freigesetzt wird (Kiener et al., 1997). In vielen weiteren Geweben kann die Expression von FasL durch Stress wie Bestrahlung, Chemotherapeutika oder Virusinfektionen induziert werden (Pinkoski und Green, 1999). Die FasL-Expression wird bei CTLs nach Aktivierung des TCR über Tyrosinkinasen und Calcineurin vermittelt (Nagata und Golstein, 1995) oder experimentell durch PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) und Ionomycin induziert. Verschiedene Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und Cyclosporin A (ein Inhibitor der Calmodulin-abhängigen Protein-Phosphatase Calcineurin) inhibieren die Expression von FasL. Außer der membrangebundenen Form von FasL (mFasL) gibt es eine lösliche Variante (sFasL) (Holler et al., 2003). sFasL kann sowohl durch alternatives Splicing, als auch durch proteolytische Spaltung von mFasL durch Metalloproteasen gebildet werden. Die intrazellulären und transmembranen Abschnitte von FasL fehlen

und die zytotoxische Wirkung ist im Vergleich zu mFasL vermindert. sFasL wurde im Serum von Patienten mit verschiedenen rheumatischen und einer Vielzahl von malignen Erkrankungen sowie bei HIV-positiven Patienten nachgewiesen (Strand et al., 2004), die physiologische oder pathologische Funktion ist aber noch weitgehend unklar.

1.2.1.2 Die Fas abhängige Signalkette

Die Interaktion mit FasL führt zur Trimerisation des Fas-Rezeptors. Das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) bindet daraufhin an der zytoplasmatischen *Death Domains* der Fas-Trimere. Pro-Caspase 8 bindet mit den sogenannten *Death effector domains* (DED) an FADD, was zur Aktivierung von Caspase 8 führt. Die *Death Domains* des Fas-Rezeptors, FADD und Caspase 8 bilden zusammen den *Death inducing signaling complex* (DISC), der die Apoptose-Signalkette einleitet (Sheikh und Huang, 2003) (siehe Abb. 5). Die aktivierte Caspase 8, die auch als FADD-like Interleukin-1 β Converting Enzyme (FLICE) bezeichnet wird, ist eine Initiator-Caspase. Sie wird ins Cytosol freigesetzt und führt dort zur Aktivierung von Caspase 3. Es kommt zur Auslösung weiterer Schritte der sogenannten Caspasen-Kaskade, an deren Ende die Caspase-aktivierte DNase (CAD) steht. Sie zerstört die DNA und leitet den Tod der Zelle ein (Wolf und Green, 1999; Wu et al., 2002).

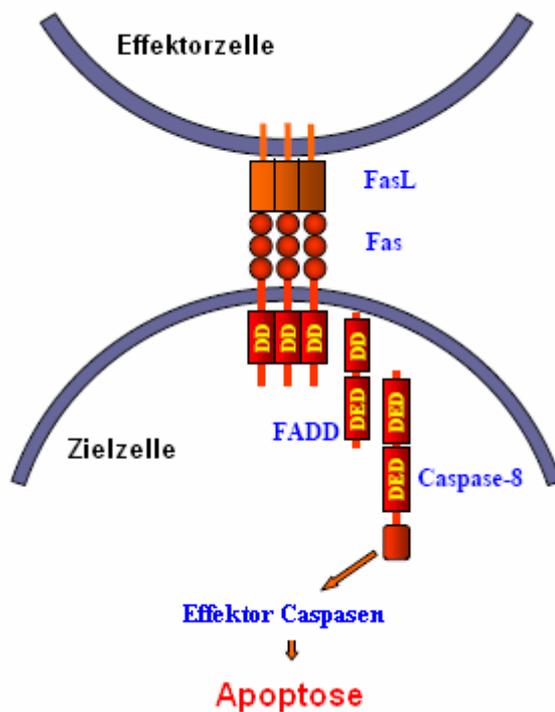


Abb. 5 Das Fas-vermittelte Apoptose-Signal (nach Zhang et al., 2004).

FADD: Fas-associated death domain protein; DD: death domain; DED: death effector domain

Caspasen

Die Apoptose-Signalkette wird durch Cysteinproteasen, die sogenannten Caspasen (cysteine aspartic acid-specific proteases), vermittelt (Chen und Wang, 2002). Genetisch identifiziert wurden bisher die humanen Caspasen 1 bis 10, 12 und 14 (Degterev et al., 2003; Lamkanfi et al., 2004). Funktionell können sie in inflammatorische und apoptotische Caspasen unterteilt werden. Die inflammatorischen Caspasen 1, 4, 5 und 11 spielen bei Entzündungsreaktionen und der Reifung von Zytokinen eine Rolle (Martinon et al., 2000). Apoptotische Caspasen werden weiter unterteilt in *Initiatorcaspasen* (Caspase 2, 8, 9, 10 und 12) und *Effektorcaspasen* (Caspase 3, 6, 7 und 14) (Ho und Hawkins, 2005). Die Initiatorcaspasen werden in der frühen Phase der Apoptose autokatalytisch aktiviert und führen ihrerseits zur Aktivierung von Effektorcaspasen (Boatright et al., 2003). Letztere leiten den apoptotischen Zelltod ein, unter anderem indem sie sekundäre Zielproteine wie CAD

aktivieren. Caspase 3 gilt als Schlüsselenzym für die Auslösung der Apoptose-Kaskade. Es stellt eine Schnittstelle zwischen Fas- und Perforinsystem dar, da eine direkte Aktivierung von Caspase 3 auch durch Granzym B beschrieben wird (Metkar et al., 2003; Adrain et al., 2005).

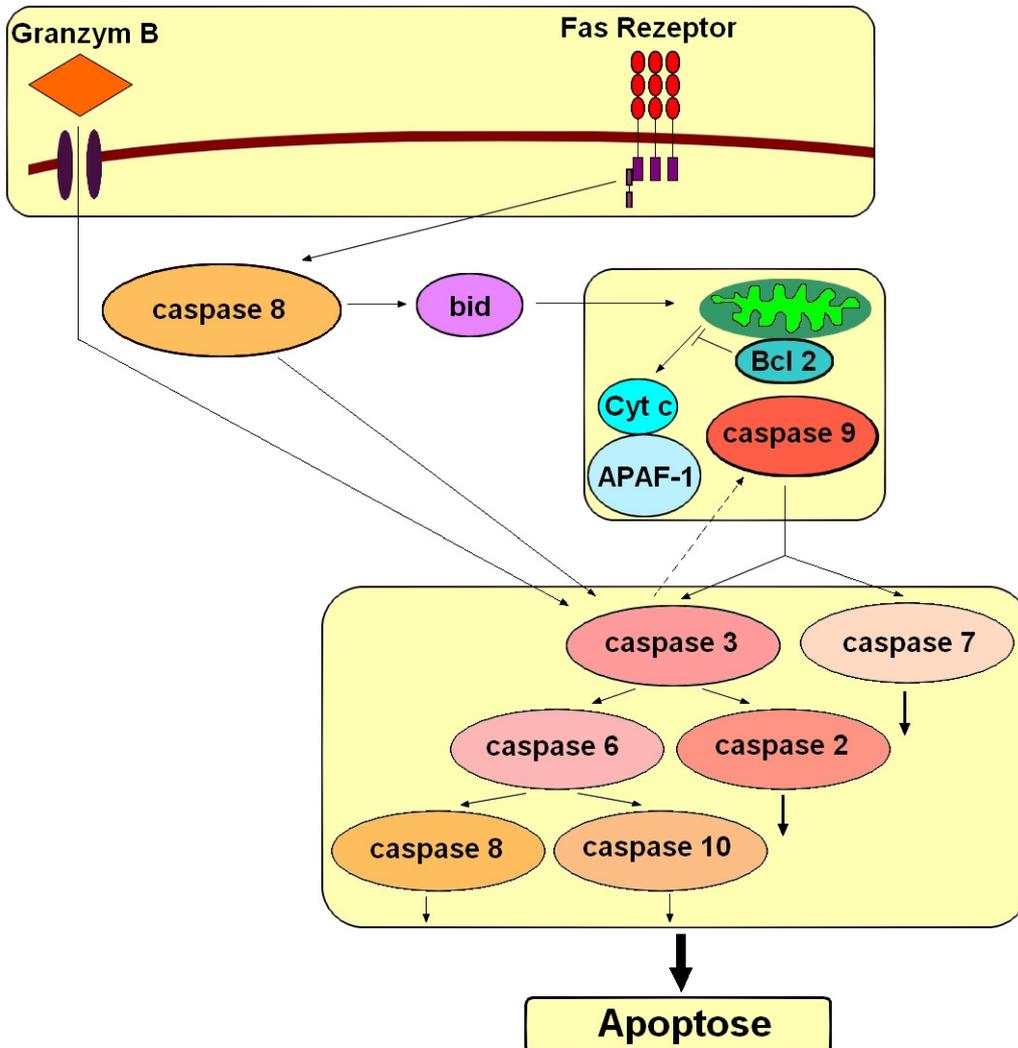


Abb. 6 Die Caspasen-Signalkette (modifiziert nach Slee et al., 1999)

Der aktivierte Fas-Rezeptor löst durch die Aktivierung von Caspase 8 weitere Schritte der Caspasen-Kaskade aus. Dabei kommt es einerseits zu einer direkten Aktivierung der Effektorcaspase 3, zum anderen zur Aktivierung von „bid“, was wiederum die Ausschüttung pro-apoptischer Faktoren aus den Mitochondrien bewirkt. Diese tragen über Caspase 9 ihrerseits zu einer Aktivierung von Caspase 3 bei. Auch Granzym B wirkt aktivierend auf Caspase 3 und löst so die Caspasen-Kaskade aus. Bid: proapoptisches Molekül, bcl-2: antiapoptisches Molekül; APAF-1 aktiviert zusammen mit Cytochrom c (Cyt c) Caspase 9.

1.2.1.3 Physiologische und pathologische Bedeutung des Fas-Systems

Die FasL-induzierte Apoptose spielt nicht nur im Rahmen der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Das Fas-System ist ebenfalls an Selektionsvorgängen während der Lymphozytenreifung und an der Aufrechterhaltung der Lymphozytenhomöostase beteiligt. Neben seiner Rolle als Apoptose-induzierendes Protein, besitzt FasL außerdem costimulatorische Eigenschaften und trägt über ein retrogrades Signal zur Aktivierung von CD8⁺ Zellen bei (Suzuki et al., 2000; Sun et al., 2006).

Lymphozyten durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Selektionsschritte. Vorläufer-T-Zellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus ein, wo sie zu CD4⁺/CD8⁻ oder CD4⁻/CD8⁺ Lymphozyten heranreifen. Nur T-Zellen, die eigene MHC-Moleküle erkennen, überleben, alle anderen werden apoptotisch (positive Selektion). T-Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren, gehen ebenfalls zugrunde (negative Selektion). FasL ist sowohl an der positiven Selektion von Lymphozyten im Thymus (Boursalian TE und Fink PJ., 2003) als auch bei der Elimination autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie (periphere klonale Deletion) beteiligt (Xiao et al., 2004). An der Regulation und Beendigung einer Immunantwort wird dem Fas-System z. B. im Rahmen des AICD (activation induced cell death) eine maßgebliche Rolle zugeschrieben (Krueger et al., 2003).

Auf die Beteiligung des Fas Systems an der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen weisen Untersuchungen an *gld*-Mäusen (generalized lymphoproliferative disease mice) hin. Beim Menschen führen Mutationen im Bereich der Fas-kodierenden Gene zum *Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndrom* (ALPS). Dies ist eine Autoimmunerkrankung, die mit einer pathologischen, durch Lymphozyten vermittelten Apoptose einhergeht. Es kommt zu einer polyklonalen Vermehrung von CD4⁻/CD8⁻-doppelt-negativen T-Zellen, die nur schwach auf Antigene reagieren, zu einer chronisch persistierenden Lymphadenopathie, Hypergammaglobulinämie und in 50% zu

einer Hepatosplenomegalie (Bleesing JJ, 2003). Die klinische Präsentation ist vom zugrundeliegenden Gendefekt abhängig (Rieux-Laucat et al., 2003). In der Literatur sind sowohl homozygote (van der Burg et al., 2000) (Typ 0) wie auch heterozygote (Arkwright et al., 2000) (Typ Ia) Mutationen des FAS-Rezeptors beschrieben. Heterozygote FasL-Defekte findet man in Zusammenhang mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) (Wu et al., 1996) (Typ Ib), allerdings sind auch homozygote FasL-Defekte ohne SLE beschrieben (Del-Rey et al., 2006).

1.2.2 Das Perforin/Granzym-System

Unter den Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen gilt das Perforin/Granzym-System als wichtigster Mechanismus bei der Abwehr von virusinfizierten und maligne transformierten Zellen (Trapani und Smyth, 2002).

1.2.2.1 Zytotoxische Granula

Die zytoplasmatischen Granula von CTL sind Organellen, die der Speicherung und Sekretion zytotoxischer Moleküle dienen. Da sie Eigenschaften besitzen, die typisch für Lysosomen sind, werden sie auch als *sekretorische Lysosomen* bezeichnet (Holt et al., 2006). Das porenbildende Molekül Perforin und verschiedene als *Granzyme* bezeichnete Serinproteasen, werden im Inneren der Granula gespeichert und nach TCR-Aktivierung in einem kalziumabhängigen Exozytosevorgang gemeinsam freigesetzt. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass auch FasL als transmembranes Molekül in den lytischen Granula gespeichert ist (Blott und Griffiths, 2002; Zuccato et al., 2007). Die Aktivierung des TCR führt über molekulare Signalketten zur Fusion der Lysosomen-Membran mit der Zellmembran und so zur Exozytose der gelösten Moleküle sowie zur Expression von membrangebundenem FasL auf der Zelloberfläche. CTLs verfügen über verschiedene Mechanismen um sich selbst vor den freigesetzten zytotoxischen Molekülen zu schützen. So wird beispielsweise Cathepsin B, eine lysosomale Protease, ebenfalls in den lytischen Granula gespeichert und gemeinsam mit den Granzymen und Perforin im Rahmen der Degranulation freigesetzt. An der Zellmembran der Effektorzelle

führt Cathepsin B zur Inaktivierung zurückdiffundierender Perforin-Moleküle (Balaji et al., 2002). An den Zielzellen entfalten Perforin und die Granzyme ihre lytische Wirkung synergistisch. Die Granzyme vermitteln die eigentlichen Apoptose-Signale, benötigen aber Perforin, um ihre Wirkung entfalten zu können.

1.2.2.2 Perforin

Perforin wurden im Laufe der letzten 20 Jahre unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben. Perforinmoleküle polymerisieren in Anwesenheit von Kalzium zu Polyperforin-Poren in der Zellmembran, die den unspezifischen Eintritt von Ionen ermöglichen (Young, Cohn und Podack, 1986). Ursprünglich wurde deshalb angenommen, dass Perforin durch die Bildung von Poren zum nekrotischen Tod der Zielzelle führt. Dieses „lytische Modell“ wurde verlassen, als erkannt wurde, dass Granzyme in Kooperation mit Perforin zur Apoptose der Zielzelle führen. Längere Zeit ging man dann davon aus, dass Granzyme über Perforinporen passiv in die Zielzelle eindringen und dort Apoptose-Signale vermitteln (Darmon, Nicholson und Bleackley, 1995). Auch dieses Modell wurde verlassen, als gezeigt wurde, dass Granzym B unabhängig von Perforin in Zielzellen eindringen kann (Shi et al., 1997; Pinkoski et al., 1998), es aber dennoch nur in Anwesenheit von Perforin zum apoptotischen Zelltod kommt. Zudem wurde gezeigt, dass selbst kleinere Moleküle als Granzym B nicht in der Lage sind Perforinporen zu passieren (Browne et al., 1999), was ebenfalls gegen die Vorstellung einer passiven Diffusion von Granzym B durch Perforinporen spricht.

Derzeit geht man von folgendem Modell aus: Granzyme und Perforin werden in sekretorischen Lysosomen an das Chondroitin-Proteoglycan Serglycin gebunden gespeichert (Raja et al., 2002). Die makromolekularen Granzym/Serglycin-Komplexe werden von CTLs sezerniert und über einen Mechanismus rezeptorabhängiger Endozytose von der Zielzelle internalisiert. Als Rezeptor für Granzym B wurde der Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MPR) identifiziert (Veugelers et al., 2006). Die Granzyme befinden sich intrazellulär

zunächst in Endosomen, aus denen sie durch einen perforinabhängigen Prozess ins Zytoplasma der Zielzelle freigesetzt werden (Metkar et al., 2002; Shi et al., 2005). Neuere Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, dass ein durch Perforinporen bedingter passiver Ca^{2+} -Einstrom in die Zielzelle Membran-Reparaturmechanismen in Gang setzt, die möglicherweise für die Auslösung der Apoptose eine Rolle spielen (Keefe et al., 2005). Die genauen molekularen Mechanismen der Perforinwirkung sind aber nach wie vor nicht aufgeklärt.

1.2.2.3 Granzyme

Bei den Granzymen handelt es sich um verschiedene Serinproteasen mit breiter Substratspezifität. Sie werden als Pro-Enzyme synthetisiert und durch verschiedene lysosomale Proteasen aktiviert. Im Zytoplasma der Zielzellen induzieren sie deren Apoptose zum einen durch Aktivierung von Caspasen, daneben aber auch über Caspasen-unabhängige Mechanismen (Sutton et al., 2000; Waterhouse et al., 2005). Von den fünf bisher bekannten humanen Granzymen A, B, H, K, und M sind die Subtypen A und B am besten untersucht und ihre molekulare Wirkung weitgehend aufgeklärt (Trapani, 2001; Lieberman und Fan, 2003b; Waterhouse et al., 2006).

Für Granzym B wurden über 30 Substrate identifiziert, darunter das Schlüsselsubstrat Caspase 3 (Metkar et al., 2003), ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) (Sharif-Askari et al., 2001) und Bid (Pinkoski et al., 2001), ein proapoptotisches Molekül der Bcl-2-Familie. Die Wirkung von Granzym B ist dabei nicht von einem einzelnen Substrat oder Mechanismus abhängig. Untersuchungen an Caspase 3-, ICAD- und Bid- defizienten Mäusen zeigen dass der apoptotische Prozess jeweils verlangsamt abläuft, jedoch nicht vollständig blockiert wird (Thomas et al., 2000; Waterhouse et al., 2005). Granzym A wirkt Caspase-unabhängig direkt an der Zellkernmembran und an Histonen im Zellkern (Zhang et al., 2001a; Zhang et al., 2001b) sowie am SET-Komplex, dem Inhibitor einer Endonuklease, welche dadurch aktiviert wird und die Doppelstrang-DNA spaltet (Lieberman und Fan, 2003b).

1.2.2.4 Physiologische und pathologische Bedeutung des Perforin/Granzym-Systems

Das Perforin/Granzym-System spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene und maligne transformierter Zellen (Russell und Ley, 2002; Lieberman, 2003a). Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine regulatorische Funktion bei der klonalen Expansion von CD8⁺ Zellen im Rahmen bakterieller und viraler Infekte sowie bei GvH (graft versus host) Reaktionen (Harty und Badovinac, 2002). Auch die erhöhte Inzidenz spontan auftretender B-Zell Lymphome bei Perforin-defizienten Mäusen unterstreicht die Beteiligung von Perforin an der Immunregulation (Smyth et al., 2000).

Beim Menschen führen Mutationen im Perforin-Gen zur autosomal-rezessiv vererbten FHL (Familiäre Hämatophagozytische Lymphohistiozytose). Die Aktivität von CTLs und NK-Zellen ist dabei stark erniedrigt und in lytischen Granula wird kaum oder nur sehr wenig Perforin nachgewiesen (Kogawa et al., 2002). Pathophysiologisch kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung von T-Lymphozyten und Infiltration sämtlicher Gewebe mit aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL6 und IL10 werden dabei überexprimiert (Janka und zur Stadt, 2005).

1.3 Zielsetzung

Lymphozyten aus frisch isolierten PMNC (periphere mononukleäre Zellen) sind morphologisch eine homogene Population, die sich im FACS (fluorescence activated cell sorting) als kleine und niedriggranulierte Zellpopulation darstellt. Diese beinhaltet neben $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die den größten Anteil ausmachen, NK-Zellen und B-Lymphozyten. Eine Perforinexpression ist bei NK-Zellen und Antigen-erfahrenen T-Zellen beschrieben.

Die Stimulation mit anti-CD3 bewirkt eine Aktivierung von T-Zellen. Sowohl naive als auch Antigen-erfahrene Zellen werden zur Proliferation angeregt und entwickeln Effektorfunktionen. Nach Stimulation mit anti-CD3 ist im FACS eine Größenzunahme bei einem Teil der Zellen erkennbar. Diese großen Zellen (Blasten) exprimieren im Unterschied zu kleinen Zellen jedoch kein Perforin. Ausgehend von dieser Beobachtung war es das Ziel dieser Arbeit, die Differenzierungsvorgänge nach Stimulation mit anti-CD3 zu beleuchten und mögliche Zusammenhänge zwischen intrazellulär nachweisbarem Perforin und der Zellgröße aufzudecken. Anhand des Aktivierungsmarkers CD25 sollte der Zusammenhang zwischen Perforinexpression und T-Zell-Aktivierung näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die Bedeutung von Perforin für die zytotoxische Wirkung der untersuchten PMNC bzw. $CD8^+$ Lymphozyten untersucht und der jeweilige Anteil des Fas- bzw. Perforin-Systems durch Hemmungsversuche ermittelt werden.

2. Material

2.1 Antikörper

2.1.1 Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antikörper, die für die Durchflusszytometrie verwendet wurden, waren mit den Fluorochromen Phycoerythrin (PE) bzw. Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gekoppelt. Diese unterscheiden sich in ihren jeweiligen Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 530 nm für FITC bzw. 580 nm für PE.

<u>Antikörper</u>	<u>Markierung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
anti-CD4	PE / FITC	Becton-Dickinson
anti-CD8	PE / FITC	Becton-Dickinson
anti-CD14	FITC	Becton-Dickinson
anti-CD19	FITC	Becton-Dickinson
anti-CD25	PE / FITC	Becton-Dickinson
anti-CD56	FITC	Becton-Dickinson
anti-CD69	PE	Becton-Dickinson
anti-CD95	PE	Becton-Dickinson
anti-CD95	FITC	Pharmingen
anti-HLA-DR	FITC	Becton-Dickinson
anti-humanes Perforin	FITC	Hölzel
Simultest control γ_1/γ_2	PE / FITC	Becton-Dickinson
Maus IgG2b	PE / FITC	Hölzel
Kaninchen-anti-Maus	unkonjugiert	Dianova

2.1.2 Für Zytotoxizitätstests verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Funktion</u>	<u>Bezugsquelle</u>
NOK1	Blockiert FasL	Becton-Dickinson
ZB4	Blockiert den Fas Rezeptor ohne Apoptose zu induzieren	Millipore

2.2 Chemikalien

⁵¹ Chrom	NEN Life Sciences
Concanamycin A (CMA)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merk
EDTA-Lösung	Universitätsapotheke Tübingen
Fötales Kälberserum (FKS) / Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom
Ficoll 1077 Dichtegradient	Sigma
Glutamin	Biochrom
Heparin	Universitätsapotheke Tübingen
Insulin	Universitätsapotheke Tübingen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Paraformaldehyd (PFA)	Universitätsapotheke Tübingen
Polyglobin	Bayer Vital GmbH
Saponin	Universitätsapotheke Tübingen
Trypanblau	Sigma

2.3 Zellen

2.3.1 Humane Lymphozyten

Humane periphere mononukleäre Zellen (PMNC) wurden durch Dichtegradienten-Separation aus Vollblut von gesunden Spendern gewonnen. CD8⁺ Lymphozyten wurden durch MACS aus der Gesamtheit der PMNC isoliert.

2.3.2 Tumorzelllinien

CCRF-CEM: humane T-ALL Zelllinie (ATCC)

EL-4: murine Lymphom-Zelllinie aus C57BL/6 Mäusen (ATCC)

2.4 Puffer und Lösungen

PBS Phosphatpuffer (Biochrom)

NaCl	8,010 g/L	137 mM
Na ₂ HPO ₄	3,580 g/L	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,408 g/L	3 mM

Zellkulturmedien

RPMI 1640 Medium als Nährmedium für humane Zellen (Biochrom)

DMEM Medium als Nährmedium für murine Zellen (Biochrom)

Den Nährmedien wurden jeweils 10% FKS, 5% Penizillin [1U/ml], 2 mM Glutamin und 100µg/ml Streptomycin hinzugefügt.

2.5 Geräte

Brutschränke	Heraeus
FACS	Becton-Dickinson
Laborzentrifuge	Hettich
MACS Vario [®]	Miltenyi Biotec
Whoretaxer	Eppendorf
γ-Counter COBRA 5000	Packard

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Tumorzelllinien

Als Zielzellen in Zytotoxizitätsversuchen wurden die humane T-ALL-Zelllinie CCRF-CEM und die murine Lymphom-Zelllinie EL-4 verwendet. Beide Zelllinien wurden als Suspensionskulturen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit aufbewahrt und alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurden etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen in 30 ml frischem Medium suspendiert. Nach drei Tagen war die für Versuche erforderliche Zelldichte von etwa 1×10^6 Zellen/ ml erreicht. Humane Zelllinien wurden in RPMI-Medium kultiviert, murine Zelllinien in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Den Nährmedien wurden jeweils 10% FKS, 5% Penizillin [1U/ml], 2 mM Glutamin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Zur Verwendung für Versuche wurde das Kulturmedium abzentrifugiert und die Zellen mit einer Mischung aus PBS und 2% FKS gewaschen.

3.1.2 Humane mononukleäre Zellen

3.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (PMNC) lassen sich von anderen Bestandteilen des Blutes aufgrund unterschiedlicher Dichteverhältnisse trennen. Verwendet wurde dazu ein Dichtegradient (Ficoll) mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/L. Zur Gewinnung von PMNC wurden 15 ml Vollblut mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen über 15 ml Ficolllösung geschichtet. Anschließend wurde bei 2020 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Entsprechend ihres spezifischen Gewichts befinden sich nach dem Zentrifugieren PMNC über der Ficollschicht, schwerere Blutbestandteile wie Granulozyten und Erythrozyten hingegen darunter. Die PMNC-Schicht wurde abpipettiert und zweimal mit 10 ml PBS und 2% FKS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in RPMI-Medium mit 10% FKS aufbewahrt. Die Endkonzentration betrug ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ ml.

3.1.2.2 Stimulation mit anti-CD3

Die Bindung eines aktivierenden anti-CD3-Antikörpers am TCR/CD3-Komplex kann die spezifische Interaktion von TCR und MHC/Antigen-Komplex ersetzen und zur Stimulation der T-Zelle führen (van Wauwe, 1980; Leo, 1987). Für Versuche mit stimulierten Lymphozyten wurden dem Medium 1 µg/ml (Endkonzentration) anti-CD3 zugegeben.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet und alle 16 Felder unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Vitalitätsbestimmung wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl 0,4%ige Trypanblau-Lösung in einem Reaktionsgefäß gemischt und 5 Minuten inkubiert. Intakte Zellmembranen sind undurchlässig für Trypanblau, vitale Zellen erscheinen somit ungefärbt. Zellen mit defekten Membranen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen kräftig blau.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 1 ml 90% FKS und 10% DMSO aufgenommen und zwei Tage lang bei -80°C gelagert, bevor sie in Flüssigstickstoff aufbewahrt wurden. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen im Wasserbad bei +37°C erwärmt, zweimal mit Kulturmedium gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufbewahrt.

3.2 Durchflusszytometrie - FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der strukturellen Eigenschaften von Zellen. Untersuchungsprinzip sind optische Signale, die dadurch zustande kommen, dass eine Zelle beim Passieren eines Laserstrahls Streulicht emittiert oder durch den Laser angeregte Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszenzsignale aussenden. Beruhend auf dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ordnen sich die Zellen oder Partikel in der Mitte einer Kapillare an (Bernoulli-Effekt) und passieren einzeln einen Laserstrahl definierter Wellenlänge. Die Zelle emittiert dabei zum einen

Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC), das durch Beugung des Laserstrahls zustande kommt und als Maß für die Zellgröße dient. Zum anderen wird Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) emittiert, das durch Lichtbrechung zustande kommt, und Aussagen zur Granularität der Zellen ermöglicht (Abb.7). Darüber hinaus können verschiedenste zelluläre Bestandteile gezielt durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden, die in Laserlicht bestimmter Wellenlängen Fluoreszenzimpulse emittieren. Die emittierten Lichtsignale werden über geeignete Filter und Verstärker (Photomultiplier) detektiert, in elektronische Impulse umgewandelt und zur Auswertung in ein Datenprozessionsystem überführt.

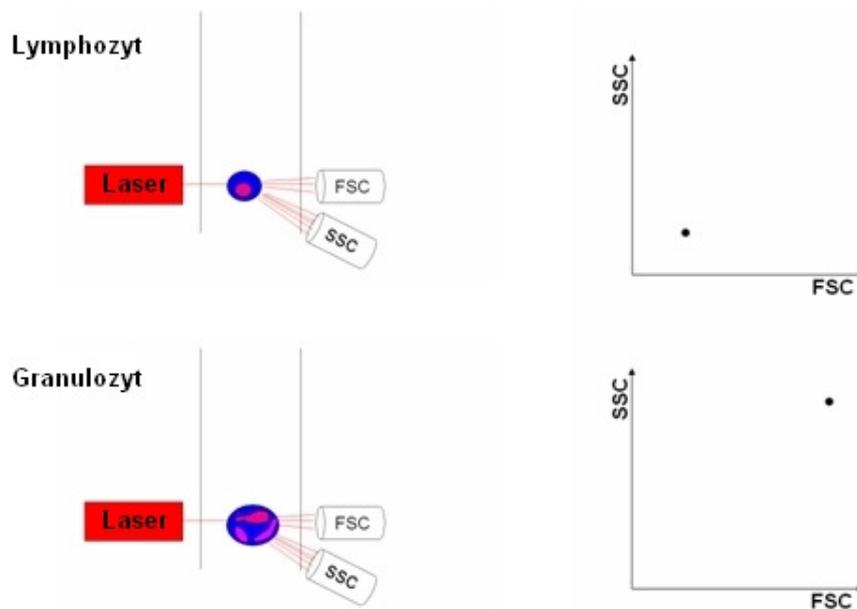


Abb. 7 Prinzip der Durchflusszytometrie

Zellen passieren einzeln einen Laserstrahl, wobei bestimmte Zelleigenschaften unterschiedliche Lichtstreuungseffekte bewirken. Vorwärtsstreulicht (FSC) ist dabei ein Maß für die Zellgröße, Seitwärtsstreulicht (SSC) für die Granularität. Lymphozyten sind kleine und wenig granulierte Zellen. Sie werden im Koordinatensystem durch niedrigere FSC- und SSC- Werte charakterisiert als die größeren und granulierteren Granulozyten, sodass eine Unterscheidung der beiden Zellpopulationen möglich ist.

Durch geeignete Kombination verschiedener Messungen (Multi-Parameter-Messung) kann man sich einen Überblick über bestimmte Zellfunktionszustände verschaffen. Neben Größe, Granularität und unterschiedlichen Antigenen lassen sich auch Parameter wie der DNA- oder RNA-Gehalt der Zellen oder bestimmte Enzymaktivitäten mit Hilfe von Fluoreszenz markierten Substraten bestimmen. Zur Darstellung der gewonnenen Daten verwendet man üblicherweise einen sogenannten Dotplot (Punktdiagramm), in dem zwei gemessene Parameter (z. B. FSC – Größe und SSC – Granularität) in einem Koordinatensystem dargestellt sind. Auf diese Weise kann man Zellpopulationen unterschiedlicher Größe und Granularität voneinander unterscheiden, wie z. B. die größeren und stärker granulierten Monozyten von den Lymphozyten oder lebende von toten Zellen, die anhand des Größen- und Granularitätsverlustes zu erkennen sind (Abb. 8). Analog wird bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen FSC gegen eine bestimmte Fluoreszenz oder zwei Fluoreszenzen (z. B. FL1 und FL2) gegeneinander im Koordinatensystem dargestellt. Bei dem hier verwendeten FACS-Gerät bezeichnet FL1 die Streuungsintensität der detektierten FITC-markierten Fluorochrome und FL2 die der PE-markierten.

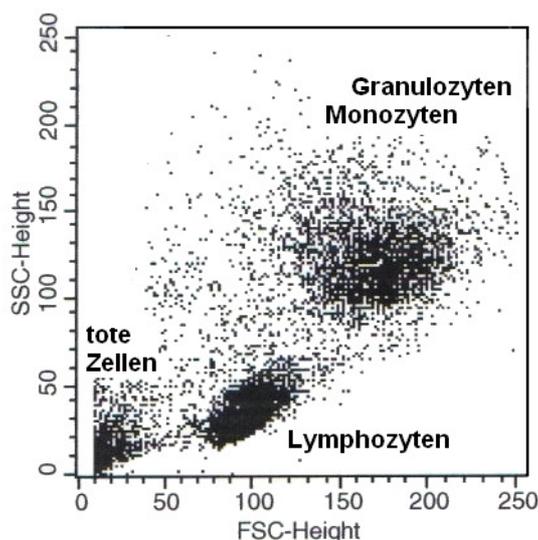


Abb. 8 Darstellung unterschiedlicher Zellpopulationen im FACS

SSC-Height: entspricht der Granularität, FSC-Height: entspricht der Zellgröße

3.2.1 Oberflächenfärbung

Um Oberflächenantigene darzustellen, wurden fluorchrommarkierte monoklonale Antikörper verwendet.

3.2.1.1 Direkte Färbung

Als direkte Färbung bezeichnet man eine Färbung bei der der fluorchrommarkierte AK direkt an Oberflächenstrukturen der Zelle bindet. 250.000-500.000 Zellen je Probenröhrchen wurden mit 2 ml PBS + 2% FKS ein bis zweimal gewaschen und mit dem entsprechenden fluorchrommarkierten Antikörper eine halbe Stunde lang bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 2 ml PBS + 2% FKS gewaschen, um nicht gebundene AK zu entfernen. Da auch unmarkierte Zellen eine gewisse Eigenfluoreszenz haben, wurde immer eine Negativkontrolle zur Eichung der Fluoreszenzmessung mitgeführt. Entweder wurde dazu eine Probe ohne AK oder mit einem unmarkierten irrelevanten AK desselben Isotyps wie der spezifische markierte AK (z. B. unspezifisches IgG) verwendet. Gefärbt wurde in einem Endvolumen von 30-50 µl, die Antikörper wurden dabei in den folgenden Endverdünnungen eingesetzt:

Anti-humanes-Perforin-FITC	1 : 80
Becton-Dickinson-Antikörper	1 : 20
Dianova-Antikörper	1 : 5
Pharmingen-Antikörper	1 : 5

3.2.1.2 Indirekte Färbung

Eine indirekte Färbung funktioniert wie eine direkte, mit dem Unterschied dass der fluorchrommarkierte AK nicht direkt an der Zelloberfläche bindet, sondern an einem vorher gebundenen nicht fluoreszierenden AK. Meist werden als zweite Antikörper FITC markierte Ziege-anti-Maus-IgG verwendet, die unspezifisch an dem F_c-Teil des ersten AK binden. Die Zellen wurden gewaschen und erst mit dem nicht markierten, dann mit dem markierten AK

jeweils eine halbe Stunde in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationen erfolgte ein weiterer Waschschrift, um nicht gebundene AK zu entfernen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem ersten, nicht fluoreszierenden AK inkubiert wurden. Der fluoreszenzmarkierte AK wurde in einer 1 : 20 Verdünnung verwendet.

3.2.2 Intrazelluläre Färbung auf Perforin

Um intrazelluläre Antigene zu färben, muss der markierte AK durch die Zellmembran geschleust werden. Zu diesem Zweck wurde Saponin zugegeben, das Löcher in der Zellmembran verursacht, durch die die markierten AK ins Innere der Zellen eindringen und dort binden konnten. Da die Durchlöcherung der Zellmembran zur Nekrose der Zelle führt, wäre sie somit im FACS nicht mehr auswertbar. Um dies zu verhindern, wurden die Zellen vor der Färbung mit 500µl 2%iger Paraformaldehyd-Lösung (2% PFA) fixiert. Bei einer Doppeldarstellung von Oberflächen- und intrazellulären Antigenen wurden die Zellen vor dem Fixationsschritt mit dem an der Oberfläche bindenden AK inkubiert.

Pro Probenröhrchen wurden wie bei der Oberflächenfärbung ungefähr 250.000-500.000 Zellen verwendet. Nach der PFA-Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS +2% FKS gewaschen und zur Reduktion unspezifischer Bindungen mit 20 µl humanem IgG [250 µg/ml] in 0,1% Saponinlösung 10 Minuten auf Eis vorinkubiert. Die intrazellulären anti-Perforin AK wurden in 80 µl 0,1% Saponinlösung aufgenommen, bei einer 1:80 Verdünnung und anschließend 35 Minuten inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben mit PBS + 1% Saponin gewaschen. Zur Eichung wurden für die extrazellulären AK wiederum unspezifisches IgG und für die Perforinfärbung ein Maus-Isotyp-AK (IgG2b) in der Konzentration 6 µg/ml eingesetzt.

3.3 Zytotoxizitätstest

Die meisten Tests zur Messung der T-Zell vermittelten Zytotoxizität basieren auf der Quantifizierung bekannter Moleküle, die durch den Membran-Integritätsverlust aus den lysierten Zielzellen austreten.

3.3.1 ⁵¹Cr-release-Assay

Beim ⁵¹Chrom-Release-Assay verwendet man radioaktives Chrom zur Messung der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen. Die Zielzellen wurden in einer Zellkonzentration von 1Mio./ml für eine Stunde mit 50 µl ⁵¹Cr (37 mBq/ml) bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Radioaktives Chrom akkumuliert im Zytoplasma und bindet kovalent an Zellproteine, ungebundenes ⁵¹Cr wird durch einen Waschschrift entfernt. Die radioaktiv markierten Zielzellen wurden auf eine Konzentration von 50.000/ml gebracht und auf 96-Loch-Platten verteilt (jeweils 100µl pro Loch). Die Effektorzellen wurden im Verhältnis 30:1 dazugegeben und zusammen 4 Stunden lang inkubiert. Die Schädigung der Zellmembran führt zur Freisetzung von radioaktivem Chrom ins Zellkulturmedium. Die Menge an freigesetztem Chrom ist direkt proportional zum Anteil der lysierten Zellen. Die Radioaktivität wurde in 100 µl Überstand mit einem Szintillationszähler (γ-Counter) gemessen. Da die meisten Zellen eine hohe spontane Freisetzungsrage von Chrom haben, wurde als Negativkontrolle die „Spontanlyse“ (100µl Zielzellen + 100µl Medium) und als Positivkontrolle die „Totallyse“ (100µl Zielzellen + 100µl 1N HCl) bestimmt. Die Zytotoxizität wurde unter Berücksichtigung dieser beiden Parameter nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{cpm Probelyse} - \text{cpm Spontanlyse}}{\text{cpm Totallyse} - \text{cpm Spontanlyse}} \times 100$$

(cpm: counts per minute)

Pro Ansatz wurden jeweils drei identische Ansätze gemessen.

3.3.2 Blockade-Versuche

Die Fas-vermittelte Zytotoxizität wurde sowohl durch Hemmung des Fas-Liganden der Effektorzellen als auch des Fas-Rezeptors der Zielzellen inhibiert. Der monoklonale Antikörper NOK1 neutralisiert FasL und blockiert die FasL induzierte Apoptose (Kayagaki et al., 1995). Die Effektorzellen wurden entsprechend den Herstellerangaben mit NOK1 in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie zu den Zielzellen gegeben wurden. Zur Blockade des Fas-Rezeptors wurden die Zielzellen 30 Minuten mit ZB4 (anti-CD95) in einer Endkonzentration von 5 µg/ml auf Eis inkubiert. Dieser monoklonale Antikörper bindet an den Fas-Rezeptor ohne die Apoptose zu induzieren. Zur Berücksichtigung einer möglicherweise veränderten Spontan- oder Totallyse wurden diese für ZB4 behandelte Zielzellen eigens bestimmt. Concanamycin A (CMA), ein vakuolärer H⁺-ATPase-Inhibitor, hemmt selektiv die Perforin-vermittelte Zytotoxizität ohne die Fas-vermittelte zu behindern (Kataoka et al., 1996). Vor Durchführung der ⁵¹Cr-release-Assays wurden die Effektorzellen für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit CMA inkubiert (1.000.000 Zellen mit 100nM CMA). CMA war im Verhältnis 1:18 in DMSO gelöst, als Negativkontrolle diente DMSO ohne Zugabe von CMA.

3.3.3 Redirected Lysis

Die Fas- wie auch die Perforin-vermittelte Zytotoxizität erfordern einen direkten Zellkontakt zwischen CTL und Zielzelle (Andersen et al., 2006). Unter physiologischen Bedingungen wird dieser durch die spezifische Interaktion von TCR und MHC/Antigen-Komplex hergestellt. Unter experimentellen Bedingungen kann die zytotoxische Wirkung von T-Zellen antigenunabhängig ausgelöst werden. Bei der *redirected lysis* werden Substanzen eingesetzt, die sowohl die Proliferation als auch eine antigenunabhängige zytolytische Wirkung bei Lymphozyten induzieren (Spits et al., 1985). Die Zytotoxizitätsversuche dieser Arbeit wurden als *redirected lysis* mit PHA durchgeführt, wobei das für T-Lymphozyten spezifische Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt wurde. Zum Vergleich wurden die Versuche jeweils auch ohne PHA durchgeführt.

3.4 Magnetic Activated Cell Sorting - MACS

MACS (Magnetic activated cell sorting) ist ein magnetisches Verfahren mit dem man Zellen aus einer heterogenen Population anhand unterschiedlicher Merkmale trennen kann. Die Zellen werden dabei mit magnetischen Partikeln, den sogenannten Micro Beads, markiert und durch ein Magnetfeld geführt, in dem die markierten Zellen zurückgehalten werden. Die Micro Beads mit einem Durchmesser von ca. 50nm reagieren als magnetische AK und binden innerhalb von Minuten an ihre Antigene. Man unterscheidet ein direktes und ein indirektes Markierungsverfahren. Bei der direkten Markierung sind die magnetischen Partikel an monoklonale Antikörper gekoppelt, die mit Antigenstrukturen der Zellen interagieren. Beim indirekten Verfahren werden die Zellen zunächst mit einem nicht magnetischen Antikörper markiert. Dieser kann unkonjugiert, biotinyliert oder fluorchrommarkiert sein. In einem zweiten Schritt erfolgt die magnetische Markierung durch Bindung von anti-Immunglobulin, anti-Biotin oder anti-Fluorochrom Micro Beads.

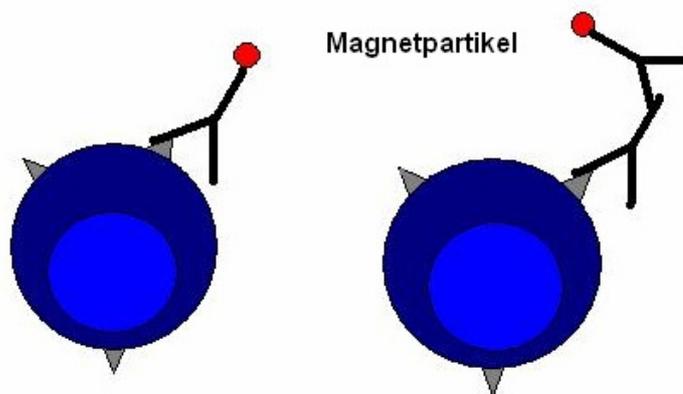


Abb. 9 Magnetische Markierung zur Zellseparation durch MACS: direkt und indirekt gebundene Micro Beads.

Bei der Zellseparation durch MACS spricht man von einer-positiven Selektion, wenn die erwünschten Zellen magnetisch markiert und in der MACS-Säule zurückgehalten werden. Bei der negativen Selektion werden hingegen unerwünschte Zellen magnetisch markiert und zurückgehalten, während die erwünschten Zellen im Überstand verbleiben. Die Separation CD8⁺ Zellen durch MACS wurde als negative Selektion nach indirekter Markierung von CD4, CD14, CD19 und CD56 durchgeführt. Die Separation CD25⁺ Zellen wurde unter Verwendung von FITC-markierten anti-CD25 Antikörpern ebenfalls nach indirekter Markierung, jedoch als positive Selektion durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit PBS + 2% FKS gewaschen und mit 100µl PBS, 200µl Polyglobin und 60µl FITC-markierten AK 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die so präparierten Zellen wurden nacheinander mit zwei verschiedenen Pufferlösungen gewaschen. Puffer I beinhaltete auf 500 ml PBS 10,2 ml 5mM EDTA, Puffer II enthielt zusätzlich 20ml 20%iges humanes Serumalbumin. Die Zellen wurden anschließend in 200µl Puffer II resuspendiert und mit 100µl anti-FITC Micro Beads für 20 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Puffer II wurden die Zellen in 5ml Puffer II aufgenommen und in befeuchtete MACS-Säulen pipettiert. Die Reinheit der Trennung wurde mittels FACS überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Versuche mit unselektierten PMNC

4.1.1 Perforinfärbung

Aus dem Blut gesunder Probanden wurden *periphere mononukleäre Zellen* (PMNC) mittels Dichtegradienten-Separation (Ficoll) isoliert und in Nährmedium aufgenommen. Ein Teil der Zellen wurde für 24 Stunden mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert, der andere Teil blieb unstimuliert. Die so gewonnenen Zellen wurden mit FITC-markiertem anti-Perforin-AK auf intrazelluläres Perforin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Perforinexpression in Abhängigkeit von der Zellgröße bei stimulierten und unstimulierten Zellen dargestellt.

Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für frische unstimulierte (A), 1 Tag alte unstimulierte (B) sowie 1 Tag alte anti-CD3 stimulierte PMNC (C). Die Abbildungen sind repräsentativ für 14 FACS-Analysen mit Zellen von 14 Spendern. Alle Zellen wurden zunächst anhand der Kriterien Granularität (entspricht dem SSC-Wert) und Zellgröße (entspricht dem FSC-Wert) analysiert (linke Spalte) und anschließend die jeweils markierte Subpopulation der Lymphozyten (LZ) auf Perforin (FL1-Wert) untersucht (rechte Spalte). Als Perforin-positiv wurde ein FL1-Wert von mindestens 10^1 definiert. Abb. 11 zeigt den durchschnittlichen Anteil Perforin-positiver Zellen bei frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten Lymphozyten.

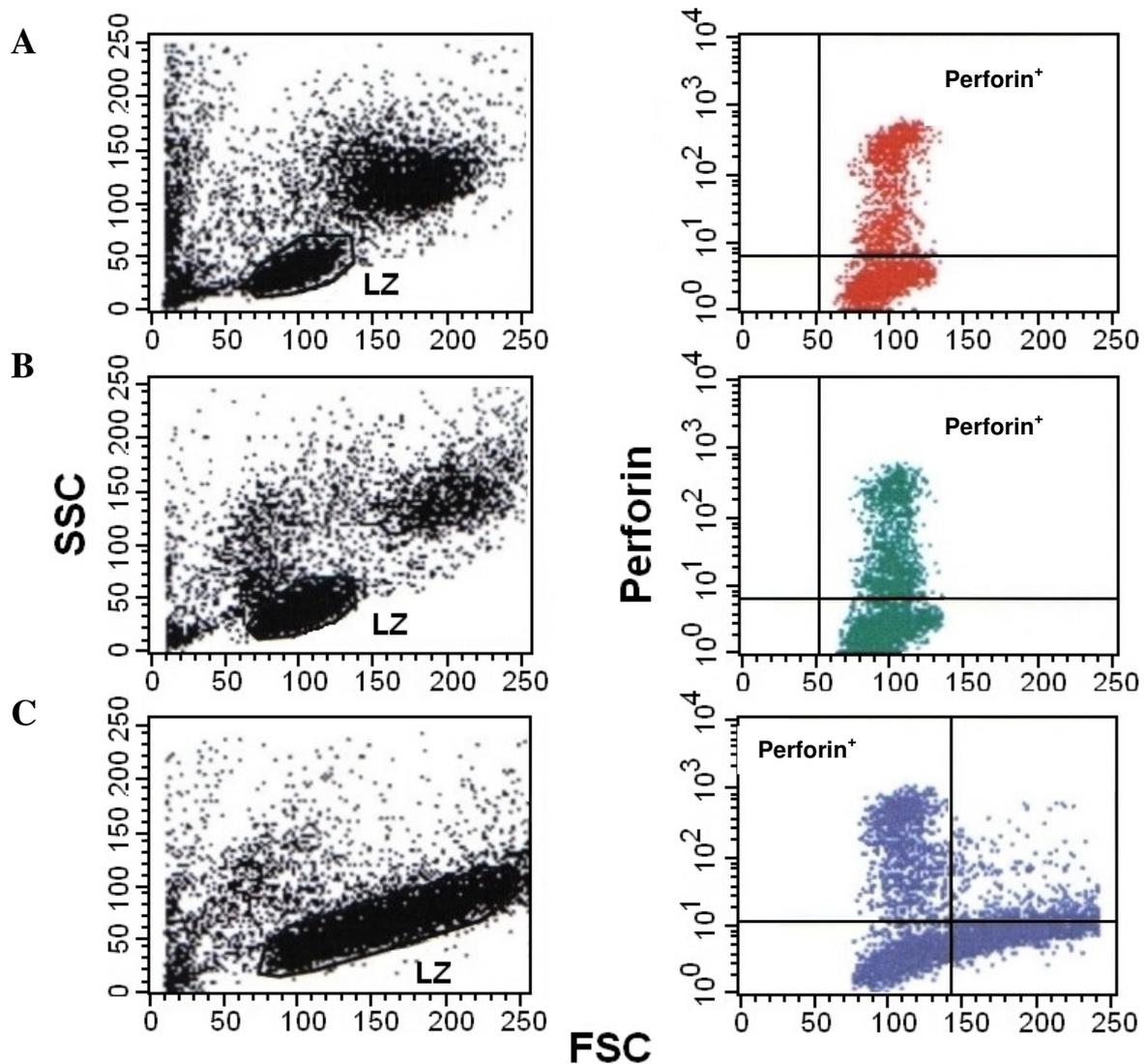


Abb. 10 Expression von Perforin bei frischen unstimulierten (A), ein Tag alten unstimulierten (B) und ein Tag alten anti-CD3 stimulierten (C) PMNC. Dargestellt ist jeweils in der linken Spalte die FACS-Analyse der PMNCs nach Zellgröße (FSC) gegen Granularität (SSC). Markiert ist jeweils die Subpopulation der Lymphozyten (LZ). Für die ausgewählten Lymphozyten-Subpopulationen ist in der rechten Spalte das Punktdiagramm für Zellgröße gegen Perforin (Fluoreszenz durch FITC-markierte Perforin-AK) abgebildet. Die Abbildung ist repräsentativ für 14 FACS-Analysen.

Sowohl bei frischen als auch bei 1 Tag alten unstimulierten Lymphozyten ergab sich aus den Daten aller 14 Probanden im Durchschnitt ein Perforin-positiver Anteil von 19 ± 7 %. Bei 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten Lymphozyten betrug der Perforin-positiver Anteil 24 ± 7 % (Abb.11). Der FSC-Wert als Maß für die Zellgröße lag bei unstimulierten Lymphozyten zwischen 70 und 130, und zwar sowohl für Perforin-negative als auch für Perforin-positive Zellen (Abb. 10 A und B). Die Stimulation mit anti-CD3 führte zu einer Größenzunahme bei einem Teil der Zellen, sodass die FSC-Werte nach der Stimulation zwischen 70 und 250 lagen (Abb. 10 C). Auffallend ist, dass Perforin nahezu ausschließlich bei kleinen Zellen (FSC-Werte < 140) nachweisbar ist, während große Zellen Perforin-negativ sind (Abb. 10 C rechts).

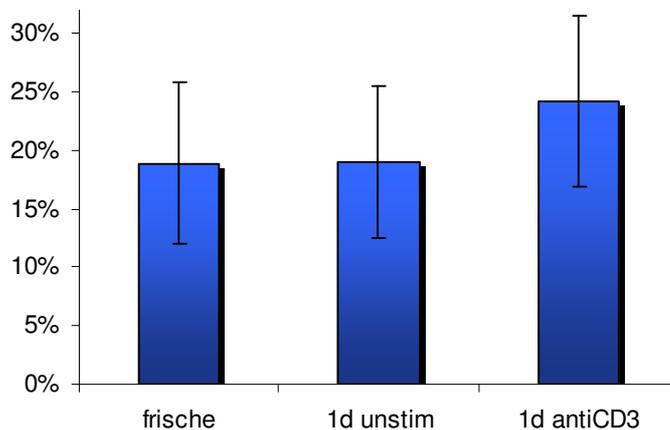


Abb. 11 *Prozentualer Anteil Perforin-positiver Zellen bei frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten Lymphozyten. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 14 quantitativen FACS-Analysen mit PMNCs von insgesamt 14 verschiedenen gesunden Spendern*

4.1.2 Zytotoxizitätsversuche

4.1.2.1 Zytotoxizität von stimulierten und unstimulierten PMNC

Zur Untersuchung des zytotoxischen Potenzials wurden ^{51}Cr -Release Assays mit frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten PMNC durchgeführt. Die Zellen wurden von gesunden Probanden

gewonnen. Als Zielzellen wurden CCRF B-Zell-Lymphomzellen verwendet. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen betrug 30:1, Effektor- und Zielzellen wurden 4 Stunden miteinander inkubiert. Die Hälfte der Versuche wurde unter Zugabe von PHA durchgeführt, die andere Hälfte ohne PHA mit PBS als Negativkontrolle.

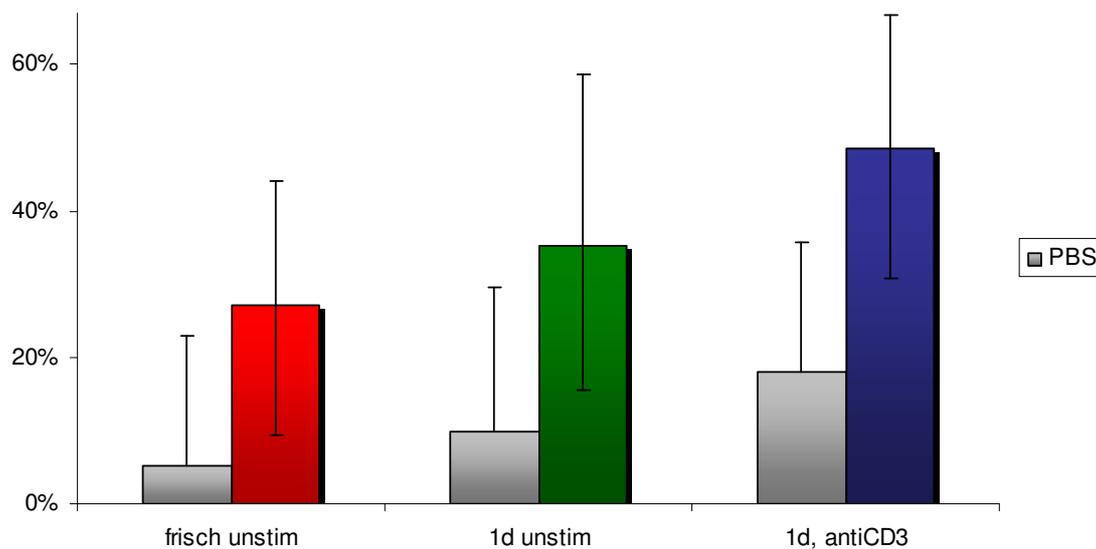
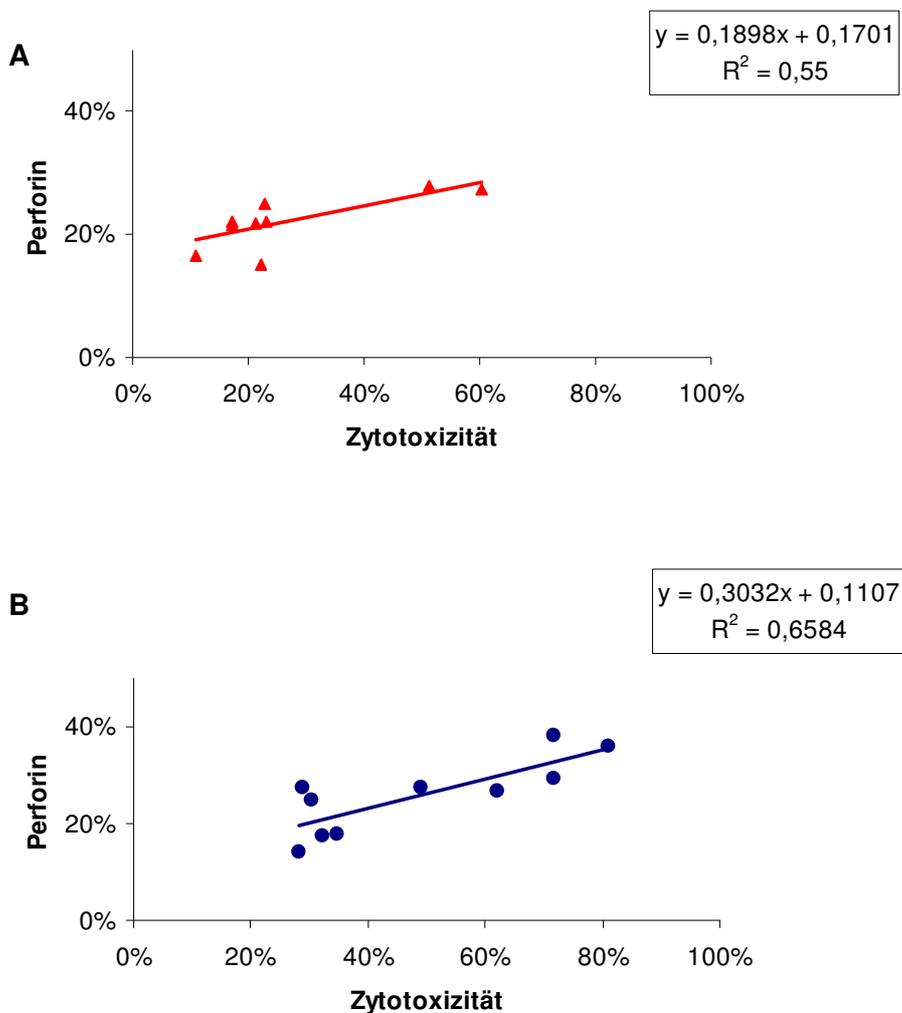


Abb 12: Zytotoxizität durch frische unstimulierte, 1 Tag alte unstimulierte und 1 Tag alte anti-CD3 stimulierte PMNC. Die farbigen Balken zeigen die Zytotoxizität mit PHA, die grauen Balken die Negativkontrollen mit PBS. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 22 voneinander unabhängigen Versuchen, die mit jeweils drei identischen Ansätzen durchgeführt wurden.

Die Zytotoxizität durch frische unstimulierte PMNC in Anwesenheit von PHA betrug 27 ± 17 %, durch 1 Tag alte unstimulierte PMNC 35 ± 23 % und durch 1 Tag alte anti-CD3 stimulierte PMNC 48 ± 18 %. Anti-CD3 stimulierte Zellen besitzen demnach ein um den Faktor 1,8 größeres zytotoxisches Potenzial als frische unstimulierte PMNC. Die Anwesenheit von PHA erhöhte die zytotoxische Wirkung von unstimulierten PMNC um das Vier- bis Fünffache und von stimulierten PMNC um den Faktor 2,6 im Vergleich zur Kontrolle mit PBS.

4.1.2.2 Korrelation zwischen Perforin und Zytotoxizität

Um die Bedeutung von Perforin für die Zytotoxizität von PMNC festzustellen, wurde der Zusammenhang zwischen dem Anteil Perforin-positiver Zellen und der zytotoxischen Wirkung untersucht. Dazu wurde zunächst in ^{51}Cr -Release Assays die Zytotoxizität bestimmt und anschließend Zellen derselben Population auf intrazelluläres Perforin gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist in Abb. 13 die zytotoxische Wirkung in Abhängigkeit vom Anteil Perforin-positiver Zellen sowie der jeweilige Korrelationskoeffizient R^2 für frische unstimulierte (A), einen Tag alte unstimulierte (B) sowie einen Tag alte anti-CD3 stimulierte PMNC (C).



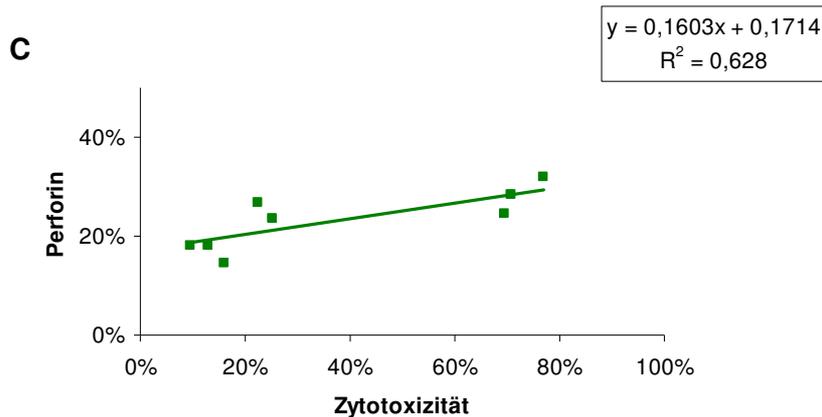


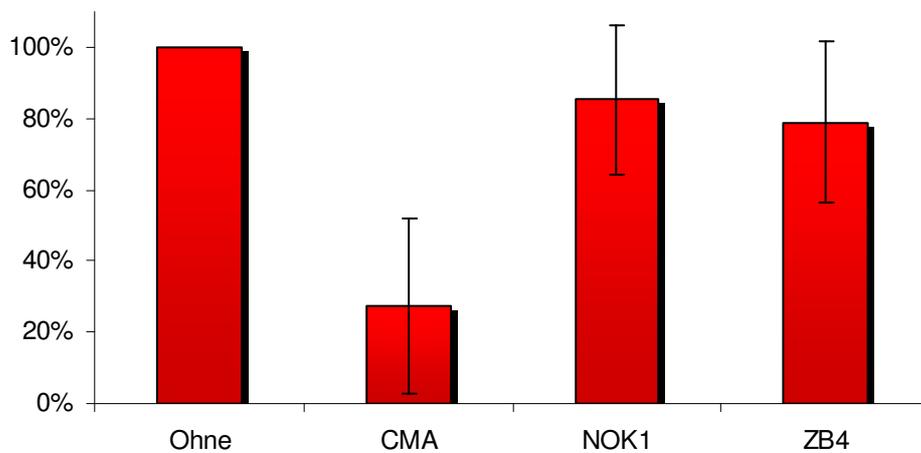
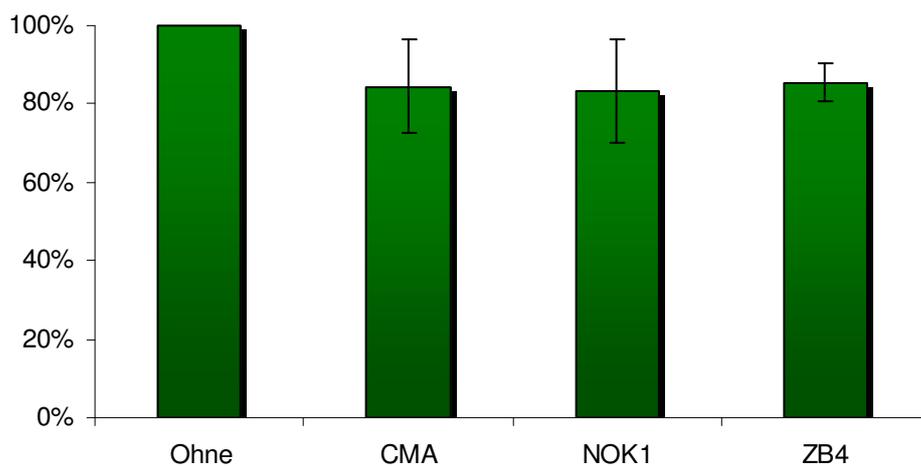
Abb. 13 Zusammenhang zwischen dem Anteil Perforin-positiver Zellen und der Zytotoxizität von frischen unstimulierten (A), 1 Tag alten unstimulierten (B) und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten PMNC (C). Zytotoxizität und Perforinnachweis wurden bei jedem Versuch an drei identischen Probenansätzen ermittelt, jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert aus den drei identischen Ansätzen eines Zytotoxizitätsversuches bzw. einer Perforinfärbung.

Aus den Diagrammen geht hervor, dass eine mittlere Korrelation zwischen dem Anteil Perforin-positiver Zellen und der Zytotoxizität besteht. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei den untersuchten Zellpopulationen zwischen 0,55 und 0,65. Ein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten PMNC zeigte sich nicht.

4.1.3 Blockadeversuche

Durch den Einsatz von CMA als Inhibitor der Perforin-Freisetzung und der monoklonalen Antikörper NOK1 und ZB4 zur Blockade von FAS-Ligand bzw. FAS-Rezeptor wurde der Perforin- bzw. FAS-abhängige Anteil der zytotoxischen Wirkung ermittelt. Dazu wurden ^{51}Cr -Release Assays mit frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten PMNC ohne Inhibitoren und in Anwesenheit von CMA, NOK1 bzw. ZB4 durchgeführt. Als Zielzellen dienten CCRF B-Zell-Lymphomzellen, die den CD95-Rezeptor an ihrer Oberfläche tragen und somit empfänglich für FasL vermittelte Toxizität sind.

Abb. 14 zeigt den Einfluss von CMA, NOK1 und ZB4 auf die zytotoxische Wirkung von frischen unstimulierten (A), 1 Tag alten unstimulierten (B) und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten (C) PMNC. Die zytotoxische Wirkung in Anwesenheit der verschiedenen Hemmstoffe ist relativ zur jeweiligen zytotoxischen Wirkung ohne Hemmstoffe dargestellt, die als Bezugsgröße mit 100% bezeichnet wurde. Ausgewertet wurden jeweils 6 voneinander unabhängige Versuche.

A**B**

C

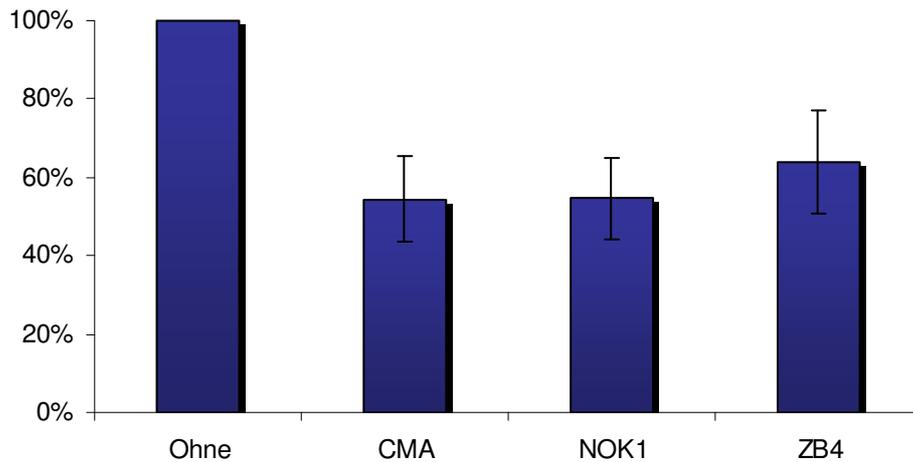


Abb. 14 Zytotoxische Wirkung von frischen unstimulierten A), ein Tag alten unstimulierten B) sowie ein Tag alten anti-CD3 stimulierten C) PMNC in Anwesenheit der Hemmstoffe CMA, NOK1 und ZB4 in Relation zur Zytotoxizität ohne Hemmstoffe (100%). Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs voneinander unabhängigen Versuchen, die jeweils mit drei identischen Ansätzen durchgeführt wurden.

Die zytotoxische Wirkung frischer unstimulierter PMNC betrug in Anwesenheit von CMA 27 ± 25 %, in Anwesenheit von NOK1 85 ± 20 % und in Anwesenheit von ZB4 79 ± 22 % der ungehemmten Zytotoxizität. Bei 1 Tag alten unstimulierten Zellen betrug die Zytotoxizität unter CMA-Einfluss 84 ± 12 %, unter NOK1 83 ± 13 % und unter ZB4 85 ± 5 %. Die Zytotoxizität von 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten Zellen betrug unter CMA 54 ± 11 %, unter NOK1 55 ± 10 % und unter ZB4 64 ± 13 %. CMA reduzierte die Zytotoxizität frischer unstimulierter PMNC somit um rund 70%, während nur rund 15-20% der zytotoxischen Wirkung durch die gegen das FAS-System gerichteten monoklonalen AK inhibiert wurden. Die Zytotoxizität von anti-CD3 stimulierten PMNC wird hingegen zu etwa gleichen Teilen von rund 40-45% durch Perforin- bzw. FAS-abhängige Mechanismen vermittelt. FAS-abhängige Mechanismen scheinen somit im Rahmen der anti-CD3 Stimulation relativ an Bedeutung zu gewinnen.

4.2 Versuche mit CD8⁺ Lymphozyten

PMNC stellen keine einheitliche Zellpopulation dar. Vielmehr handelt es sich um eine Zusammenfassung unterschiedlicher Subpopulationen mit verschiedenen Merkmalen und Funktionen, die sich unter anderem anhand von Oberflächen-Proteinen unterscheiden lassen. Wichtige PMNC-Subpopulationen sind CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen), CD8⁺ T-Lymphozyten, CD14⁺ Monozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten und CD56⁺ NK-Zellen. CD8⁺ T-Lymphozyten gelten als die wichtigsten Effektorzellen der zellgebundenen adaptiven Immunantwort. Sie wurden deshalb durch MACS aus der Gesamtheit der PMNC isoliert und anschließend wurden mit diesen Zellen die gleichen Untersuchungen zum Nachweis von Perforin und der zytotoxischen Wirkung wie mit unselektierten PMNC durchgeführt.

4.2.1 Perforinfärbung

PMNC wurden wie oben beschrieben aus Spenderblut isoliert und ein Teil der Zellen für 24 Stunden mit anti-CD3 stimuliert. Aus frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten PMNC eines Spenders wurden am Versuchstag durch MACS CD4⁺, CD14⁺, CD19⁺ und CD56⁺ Zellen entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden anschließend mit PE-markierten anti-CD8-AK und mit FITC-markierten anti-Perforin-AK gefärbt und im FACS analysiert. Wie für unselektierte PMNC wurde der Zusammenhang zwischen intrazellulär nachweisbarem Perforin und der Zellgröße auch für unstimulierte und stimulierte CD8⁺ Zellen untersucht.

Abb. 15 zeigt die FACS-Bilder für frische unstimulierte (A), 1 Tag alte unstimulierte (B) und 1 Tag alte anti-CD3 stimulierte (C) PMNC nach MACS auf CD8. Dargestellt sind repräsentative FACS-Bilder aus 10 voneinander unabhängigen Versuchen. Die Zellen wurden zunächst anhand der Kriterien Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC) analysiert (linke Spalte) und anschließend die jeweils markierte Subpopulation der Lymphozyten (LZ) als Reinheitskontrolle der MACS-Separation auf CD8 untersucht (mittlere Spalte). Die markierte CD8⁺ Subpopulation wurde dann wiederum auf Perforin

untersucht (rechte Spalte). Als Perforin-positiv wurde ein FL1-Wert von mindestens 10^1 definiert. Tab. 1 zeigt den Anteil der $CD8^+$ Zellen unter den Lymphozyten (Kontrolle der MACS-Separation) sowie den Anteil der Perforin-positiven Zellen unter den $CD8$ -positiven. Abb. 16 veranschaulicht den Anteil Perforin-positiver Zellen unter unstimulierten und stimulierten $CD8^+$ Lymphozyten.

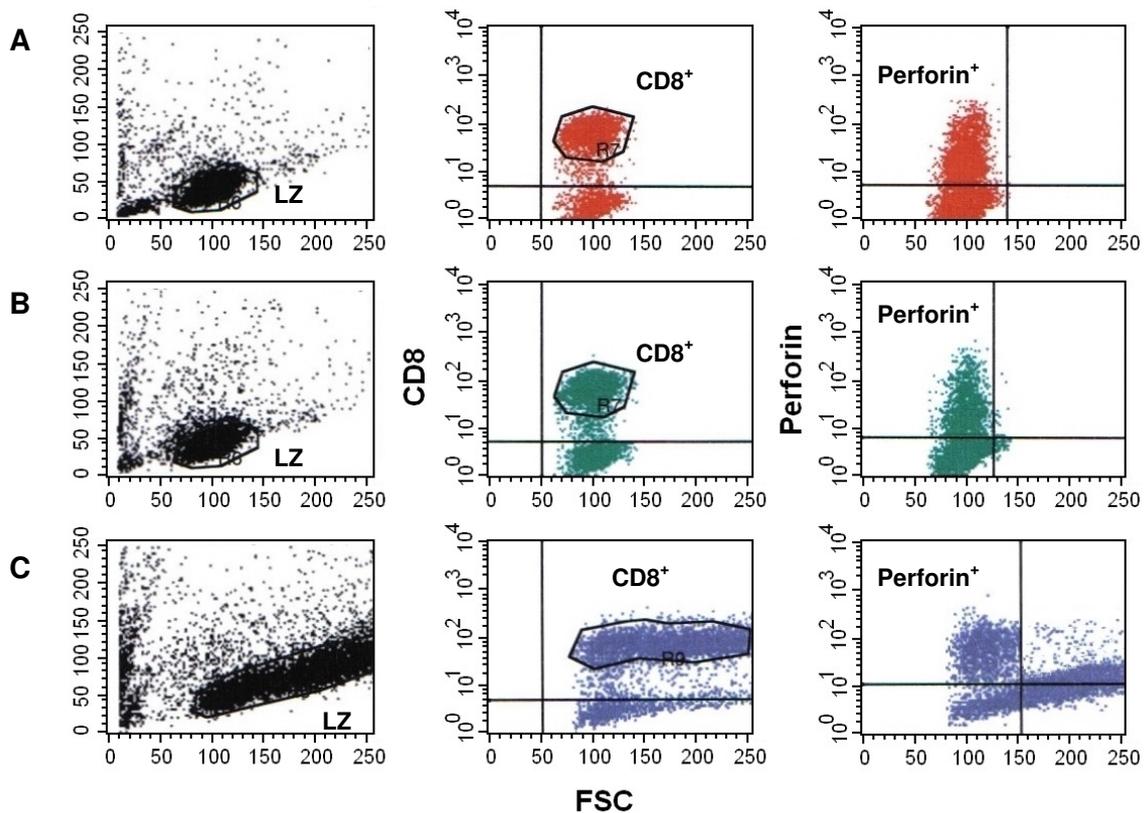


Abb. 15 Nachweis von $CD8$ und Perforin bei frischen unstimulierten (A), ein Tag alten unstimulierten (B) und ein Tag alten anti- $CD3$ stimulierten (C) PMNC nach MACS auf $CD8$.

Dargestellt ist in der linken Spalte die FACS-Analyse der Zellen nach MACS Separation anhand der Kriterien Zellgröße (FSC) gegen Granularität (SSC). Markiert ist jeweils die Subpopulation der Lymphozyten (LZ). In der mittleren Spalte ist für die markierte Lymphozyten-Subpopulation FSC gegen $CD8$ aufgetragen, markiert ist jeweils die Population der $CD8^+$ Zellen. In der rechten Spalte ist FSC gegen Perforin für die ausgewählten $CD8^+$ Zellen dargestellt. Die $CD8$ - bzw. Perforin-Werte entsprechen den Fluoreszenzwerten durch die jeweiligen PE- bzw. FITC-markierten Antikörper.

Tab. 1 Anteil Perforin-positiver Zellen unter CD8⁺ Lymphozyten (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 unabhängigen FACS-Analysen).

	<i>frische unstimulierte Zellen</i>	<i>1 Tag alte unstimulierte Zellen</i>	<i>1 Tag alte Anti-CD3 stimulierte Zellen</i>
CD8⁺ (in % der Lymphozyten)	88,4	80,2	86,1
Perforin-positiv (in % der CD8 ⁺ Lymphozyten)	31,5 ± 12	35,5 ± 16	37,5 ± 21

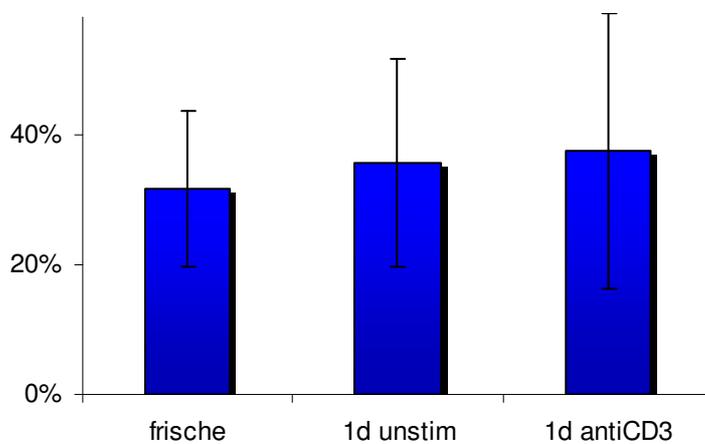


Abb. 16 Anteil Perforin-positiver Zellen bei frischen unstimulierten, 1d alten unstimulierten und 1d alten anti-CD3 stimulierten CD8⁺ Lymphozyten. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 unabhängigen FACS-Analysen

Nach Aussortieren von CD4⁺, CD14⁺, CD19⁺ und CD56⁺ Zellen durch MACS betrug der Anteil CD8⁺ Zellen in der Lymphozytenpopulation 80-88%. Der Anteil Perforin-positiver Zellen unter den CD8-positiven lag zwischen 31,5 und 37,5%, wobei sich stimulierte und unstimulierte Zellen aufgrund der starken Streuung nicht signifikant unterschieden. Die Stimulation bewirkte eine Größenzunahme (Entwicklung zu Blasten) bei einem Teil der Zellen. Auch für CD8⁺ Lymphozyten bestätigte sich die Beobachtung, dass nur kleine Zellen Perforin exprimierten, während sich unter den großen Zellen kaum Perforin-positive nachweisen ließen (Abb. 16).

4.2.2 Zytotoxizitätsversuche

4.2.2.1 Zytotoxizität von stimulierten und unstimulierten CD8⁺ Zellen

Analog zu den vorherigen Versuchen wurden PMNC von gesunden Probanden isoliert und ein Teil der Zellen für 24 Stunden mit anti-CD3 stimuliert. Per MACS wurden CD4⁺, CD14⁺, CD19⁺ und CD56⁺ Zellen entfernt. Die Reinheit der verbleibenden CD8⁺ Lymphozyten betrug mindestens 80% (FACS-Kontrolle). In ⁵¹Cr-Release-Assays mit CCRF-Lymphomzellen als Zielzellen wurde die Zytotoxizität von frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten CD8⁺ Lymphozyten untersucht. In einem Versuchsaarm wurde PHA zugegeben und die Assays als „redirected Lysis“ durchgeführt, im Kontrollarm wurde PBS anstelle von PHA zugegeben. Abb. 17 zeigt die Zytotoxizität von CD8⁺ Lymphozyten in Abhängigkeit vom Zellalter und der Stimulation mit anti-CD3 in An- bzw. Abwesenheit von PHA.

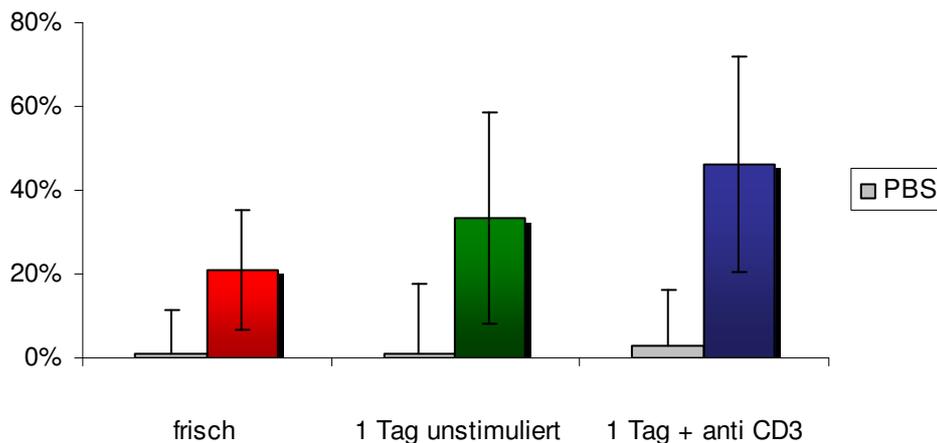
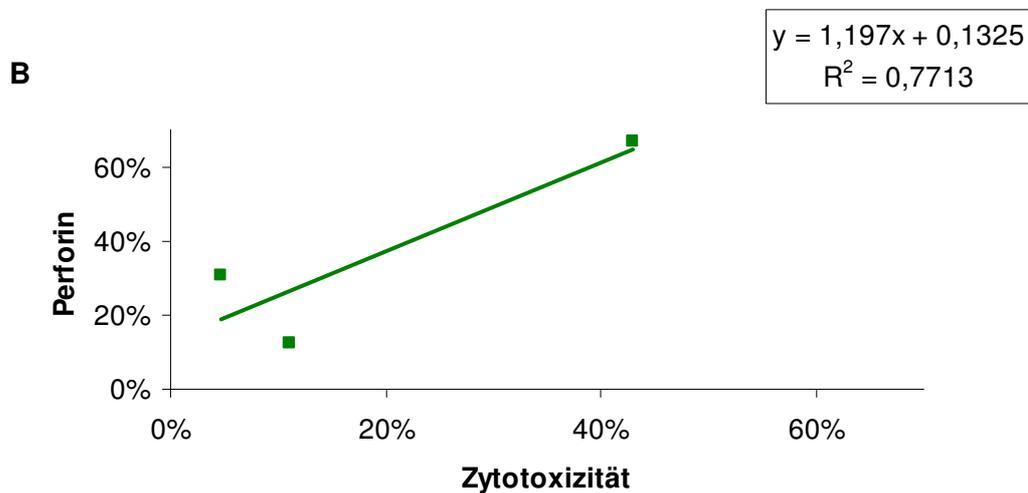
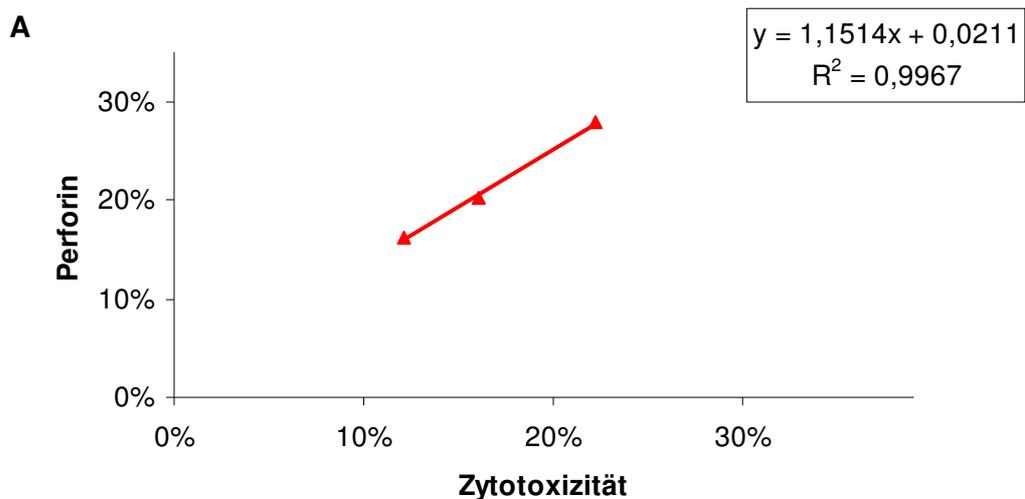


Abb. 17 Zytotoxizität von frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten CD8⁺ Zellen. Die Versuche wurden als „redirected lysis“ mit PHA durchgeführt (farbige Balken), links daneben die Negativkontrollen mit PBS (grau). Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht unabhängigen Versuchen mit jeweils drei identischen Ansätzen

Die zytotoxische Wirkung von frischen unstimulierten CD8⁺ Lymphozyten betrug in Anwesenheit von PHA 21 ± 14 %, von 1 Tag alten unstimulierten 33 ± 25 % und von 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten 46 ± 26 %. Die Zytotoxizität in Abwesenheit von PHA lag bei allen CD8⁺ Zellen bei 1-3 % und unterschied sich nicht signifikant von der Spontanlyse der Zielzellen. Im Vergleich zu den 1 Tag alten unstimulierten Zellen war die zytotoxische Wirkung von 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten Zellen um den Faktor 1,4 größer, obgleich sich der Anteil Perforin-positiver Zellen nicht signifikant unterschied (Tab. 1 und Abb. 17).

4.2.2.2 Korrelation zwischen Perforin und Zytotoxizität

Analog zu unselektierten PMNC wurde auch für CD8⁺ Zellen der Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und dem Anteil Perforin-positiver Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.



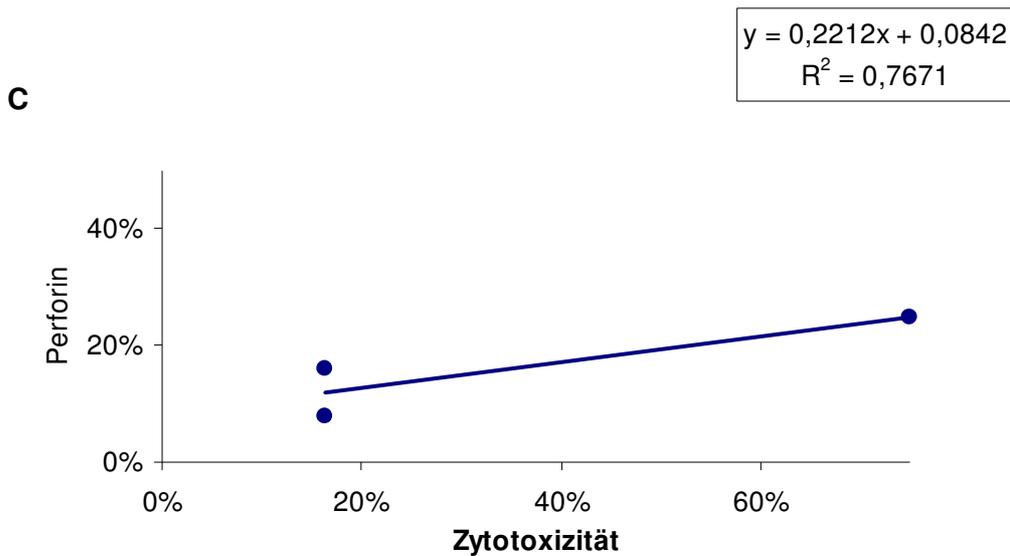


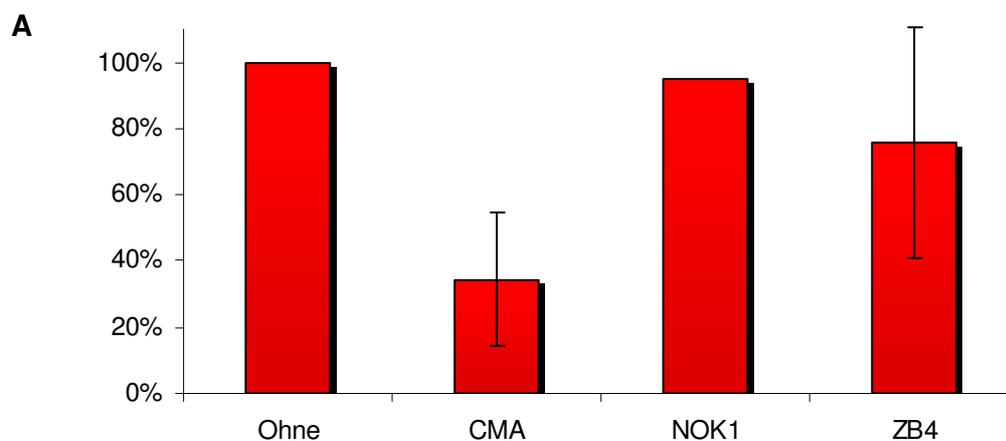
Abb. 18 Zusammenhang zwischen dem Anteil Perforin-positiver Zellen und der Zytotoxizität bei frischen unstimulierten (A), 1 Tag alten unstimulierten (B) und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten (C) CD8⁺ Lymphozyten. Zytotoxizität und Perforinnachweis wurden bei jedem Versuch an drei identischen Probenansätzen ermittelt, jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert aus den drei identischen Ansätzen eines Zytotoxizitätsversuches bzw. einer Perforinfärbung.

Bei frischen unstimulierten CD8⁺ Lymphozyten korrelierte die zytotoxische Wirkung stark mit dem Anteil Perforin-positiver Zellen (Koeffizient 0,99), während bei 1 Tag alten Zellen unabhängig von der Stimulation die Korrelationskoeffizienten lediglich 0,77 betragen. Perforin scheint somit bei den frischen unstimulierten Zellen der dominierende Zytotoxizitäts-Faktor zu sein, während die Bedeutung für die Zytotoxizität älterer und stimulierter Zellen geringer ist. Der Anteil Perforin-positiver Zellen korrelierte bei CD8⁺ Lymphozyten insgesamt stärker mit der zytotoxischen Wirkung als bei unselektierten PMNC.

4.2.3 Blockadeversuche

Analog zu 4.1.3 wurde durch den Einsatz von Inhibitoren der Perforin- bzw. Fas-abhängige Anteil der zytotoxischen Wirkung von CD8⁺ Lymphozyten ermittelt. CMA diene als Inhibitor für das Perforin-System, der monoklonale Antikörper NOK1 zur Blockade von FAS-Ligand und der monoklonale Antikörper ZB4 zur Inhibition des FAS-Rezeptors. ⁵¹Cr-Release Assays wurden mit frischen unstimulierten, 1 Tag alten unstimulierten und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten CD8⁺ Lymphozyten durchgeführt, als Zielzellen dienten CCRF B-Zell-Lymphomzellen. Die CD8⁺ Lymphozyten wurden wie bereits beschrieben aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen, indem mittels MACS CD4⁺, CD14⁺, CD19⁺ und CD56⁺ PMNC entfernt wurden. Die Reinheit der CD8⁺ Lymphozyten betrug mindestens 80% (FACS-Kontrolle).

Abb. 19 zeigt den Einfluss von CMA, NOK1 und ZB4 auf die zytotoxische Wirkung von frischen unstimulierten (A), 1 Tag alten unstimulierten (B) und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten (C) CD8⁺ Lymphozyten. Die zytotoxische Wirkung in Anwesenheit der verschiedenen Hemmstoffe ist relativ zur jeweiligen zytotoxischen Wirkung ohne Hemmstoffe dargestellt, die als Bezugsgröße als 100% definiert wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen mit CMA und ZB4, die Hemmung des Fas-Liganden (NOK1) wurde nur einmal durchgeführt.



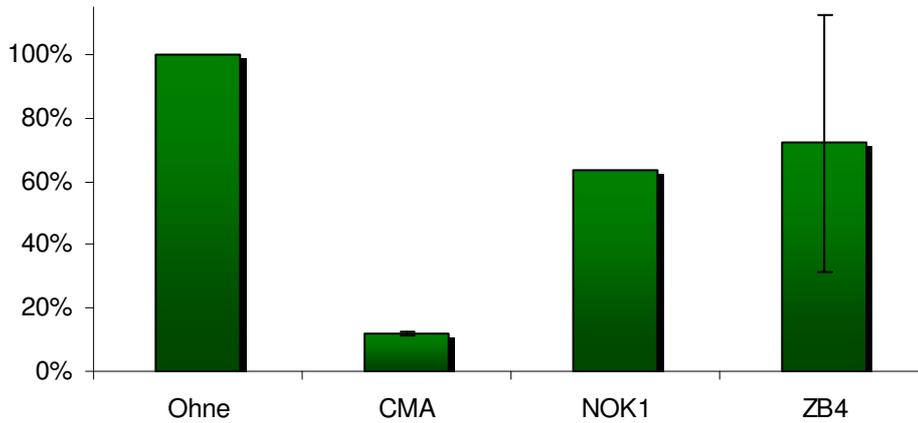
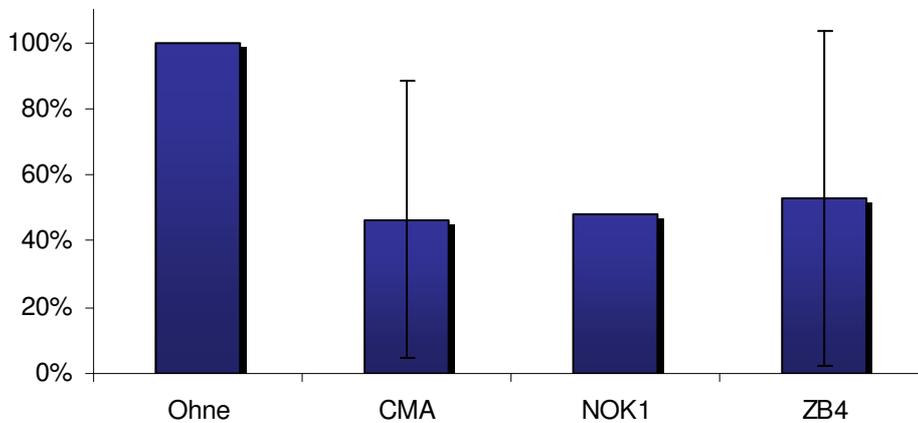
B**C**

Abb. 19 Zytotoxische Wirkung von frischen unstimulierten A), 1 Tag alten unstimulierten B) und 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten C) CD8⁺ Lymphozyten in Anwesenheit der Hemmstoffe CMA, NOK1 und ZB4 in Relation zur Zytotoxizität ohne Hemmstoffe (100%). Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit CMA und ZB4, die Hemmung des Fas-Liganden (NOK1) wurde nur einmal durchgeführt.

Die Zytotoxizität frischer unstimulierter CD8⁺ Lymphozyten betrug unter dem Einfluss von CMA 36 ± 20 % der ungehemmten Zytotoxizität, unter NOK1 95 % und unter ZB4 76 ± 35 %. Die zytotoxische Wirkung 1 Tag alter unstimulierter CD8⁺ Zellen betrug unter CMA 12 ± 1 %, in Anwesenheit von NOK1 63 % und in Anwesenheit von ZB4 72 ± 40 %. Die zytotoxische Wirkung 1 Tag alter anti-CD3 stimulierter Zellen reduzierte sich in Anwesenheit aller drei Inhibitoren auf rund 50% der ungehemmten Zytotoxizität (CMA: 46 ± 41 %; NOK1: 48 %; ZB4: 53 ± 50 %).

Die Ergebnisse für CD8⁺ Zellen entsprechen weitgehend den Ergebnissen für unselektierte PMNC. Die zytotoxische Wirkung unstimulierter Zellen lässt sich hauptsächlich (zu rund 70-90%) durch CMA inhibieren, während die gegen das FAS-System gerichteten monoklonalen AK NOK1 und ZB4 eine deutlich geringere Hemmwirkung zeigen. Im Gegensatz dazu wurde die Zytotoxizität stimulierter Zellen sowohl durch CMA als auch durch beide FAS-Inhibitoren um jeweils 50% verringert, was darauf hinweist, dass die FAS-abhängige Zytotoxizität im Rahmen der Aktivierungsvorgänge relativ an Bedeutung zunimmt.

4.3 Versuche mit CD25⁺ und CD25⁻ Zellen

4.3.1 Oberflächenmarker für die Zellgröße

Die Aktivierung von T-Lymphozyten bewirkt außer der Induktion der Zellproliferation und der Entwicklung von Effektorfunktionen auch eine veränderte Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle. Einige davon gelten als charakteristische Aktivierungsmarker. Die Versuche mit PMNC und CD8⁺ Lymphozyten bestätigten mehrfach, dass die 24-stündige Stimulation mit anti-CD3 zu einer Größenzunahme bei einem Teil der Zellen führte, dass aber unter diesen großen Zellen (Blasten), im Unterschied zu kleinen, nahezu keine Perforin-positiven Zellen nachweisbar waren. Zur genaueren Charakterisierung und Trennung stimulierter PMNC sollte daher ein Oberflächenprotein gesucht werden, welches mit der Zellgröße assoziiert ist, das also beispielsweise selektiv von großen, nicht aber von kleinen Zellen exprimiert wird.

Untersucht wurden dazu verschiedene Oberflächenproteine, die als Aktivierungsmarker bekannt sind: CD25 (α -Kette des IL2-Rezeptors), CD69 (ein frühes Aktivierungsantigen), CD95 (Apo1/Fas) und HLA-DR (ein Subtyp des MHC-II-Rezeptors). PMNC wurden mittels Ficoll aus dem Blut gesunder Probanden isoliert und ein Teil der frischen unstimulierten Zellen mit PE-markierten AK gegen CD25, CD69 und CD95 bzw. mit FITC-markierten AK gegen HLA-DR gefärbt und im FACS analysiert. Die restlichen Zellen wurden mit anti-CD3 stimuliert und die Oberflächenfärbungen am ersten, zweiten und dritten Folgetag durchgeführt. Abb. 20 zeigt die Expression von CD25, CD69, CD95 und HLA-DR bei frischen unstimulierten PMNC sowie nach ein-, zwei- bzw. dreitägiger Stimulation mit anti-CD3 in Abhängigkeit von der Zellgröße (FSC-Wert). Tab. 2 gibt die prozentuale Verteilung in den verschiedenen Quadranten wieder.

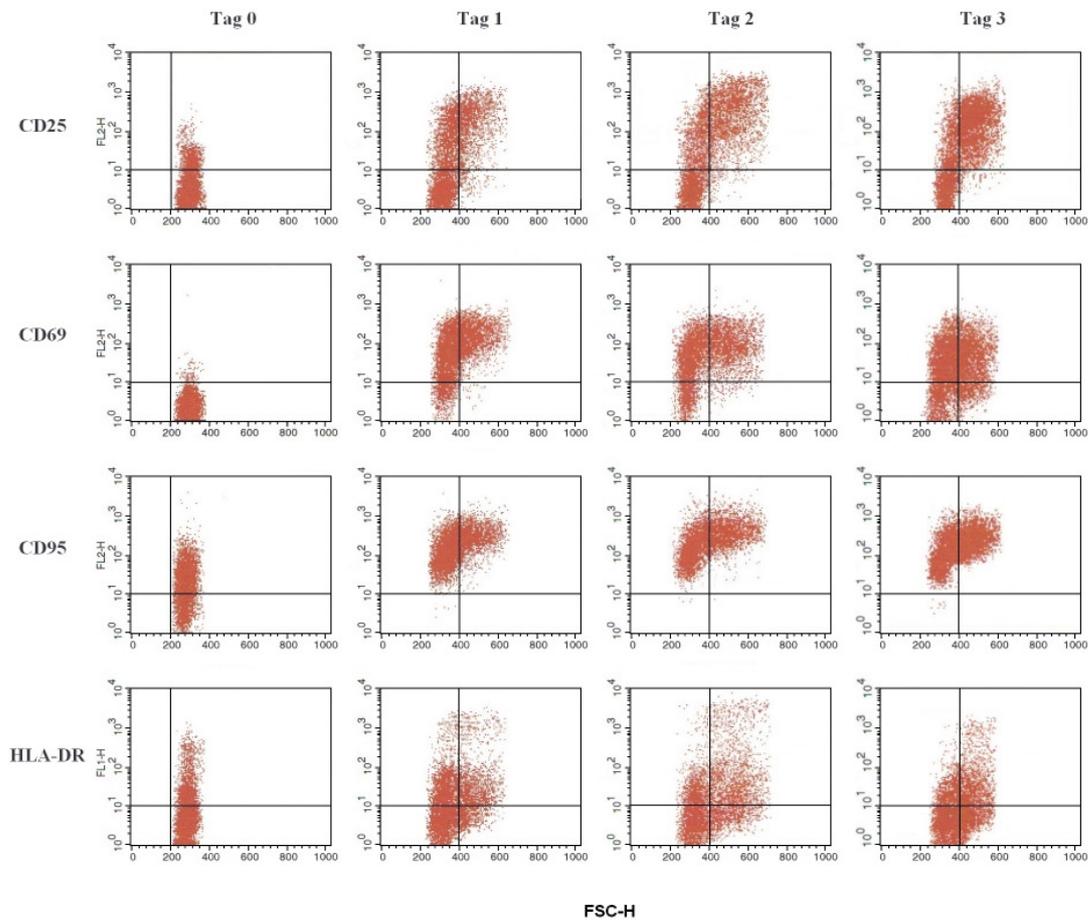


Abb. 20 Expression von CD25, CD69, CD95 und HLA-DR (Fluoreszenz durch markierte AK) in Abhängigkeit von der Zellgröße (FSC) bei frischen unstimulierten PMNC und nach ein-, zwei-, und dreitägiger Stimulation mit anti-CD3. FACS-Analyse mit PMNC eines gesunden Spenders.

Tab. 2 Expression von CD25, CD69, CD95 und HLA-DR nach ein-, zwei- und dreitägiger Stimulation mit anti-CD3 (quantitative Auswertung der vier Quadranten der in Abb. 20 dargestellten FACS-Analyse, die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen in den vier Quadranten). *UL*: upper left (oberer linker Quadrant); *UR*: upper right (oberer rechter Quadrant); *LL*: lower left (unterer linker Quadrant); *LR*: lower right (unterer rechter Quadrant)

	Tag 1				Tag 2				Tag 3			
	CD25	CD69	CD95	HLA-DR	CD25	CD69	CD95	HLA-DR	CD25	CD69	CD95	HLA-DR
UL	30,0	58,2	70,4	32,6	24,7	43,3	62,3	24,1	26,3	37,1	51,1	21,6
UR	26,1	29,4	29,6	23,1	36,8	39,7	37,1	28,1	47,8	33,7	48,7	30,4
LL	41,7	11,9	0,1	34,4	36,9	14,8	0,5	32,5	24,4	17,6	0,2	30,3
LR	2,3	0,4	0,0	9,9	1,6	2,2	0,1	15,3	1,5	11,6	0,1	17,7

Aus Abb. 20 geht hervor, dass die frischen unstimulierten PMNC alle klein (FSC < 400) und negativ bezüglich CD69 sind. CD25 und CD95 werden von einem Teil der unstimulierten Zellen in geringem Maß exprimiert, HLA-DR zeigt bereits ein ähnliches Verteilungsmuster wie nach Stimulation. Nach 24-stündiger Stimulation sind etwa 56% der Zellen CD25-positiv, nach 2 Tagen 60% und nach 3 Tagen über 70%. CD69 wird nach 1 Tag bereits von über 80% der Zellen exprimiert und praktisch alle Zellen sind nach 1 Tag CD95-positiv. Die Expression von HLA-DR verändert sich durch die Stimulation kaum und liegt relativ konstant bei etwa 50%.

Bei allen vier Oberflächenfärbungen ist eine Größenzunahme eines Teils der Zellen erkennbar. Der Anteil großer Zellen (FSC > 400) liegt initial bei 0%, nach 24-stündiger Stimulation bei 30%, nach zweitägiger Stimulation bei 40% und nach dreitägiger Stimulation bei knapp 50%. Unter den CD25-positiven Zellen finden sich nach einem Tag etwa zu gleichen Teilen kleine und große Zellen, nach zwei Tagen beträgt der Anteil großer Zellen 60% und nach drei Tagen 65%. CD25-negative Zellen sind zu 95% klein, während große Zellen zu über

97% CD25-positiv sind. Auch unter den CD69 und CD95-positiven Zellen nimmt der Anteil großer Zellen nach der Stimulation kontinuierlich zu, liegt aber auch am dritten Tag nach Stimulationsbeginn erst bei knapp 50%, sodass von den untersuchten Oberflächenproteinen CD25 die besten Rückschlüsse auf die Zellgröße ermöglicht.

4.3.2 Perforinfärbung nach MACS auf CD25

Der in den vorangegangenen Versuchen festgestellte mögliche Zusammenhang zwischen Perforinnachweis und Zellgröße bei unselektierten PMNC und CD8⁺ PMNC wurde anhand des CD25-Oberflächenproteins näher charakterisiert. Wie oben gezeigt wurde, besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD25 und der Zellgröße, wonach drei Tage nach Stimulationsbeginn 65% der CD25-positiven Zellen groß und 95% der CD25-negativen Zellen klein sind. Um den Zusammenhang von CD25-Expression und Perforin zu untersuchen, wurden drei Tage alte, anti-CD3 stimulierte PMNC mittels MACS in CD25-positiv und CD25-negativ Zellen getrennt und Doppelfärbungen auf CD25 und Perforin durchgeführt. Zur Markierung wurden FITC-markierte Perforin-AK und PE-markierte CD25-AK verwendet. Abb. 21 zeigt den Zusammenhang zwischen Perforinexpression und Zellgröße bei CD25⁻ und CD25⁺ Zellen. Tab. 3 gibt die prozentuale Verteilung in den vier Quadranten der FACS-Analyse wieder.

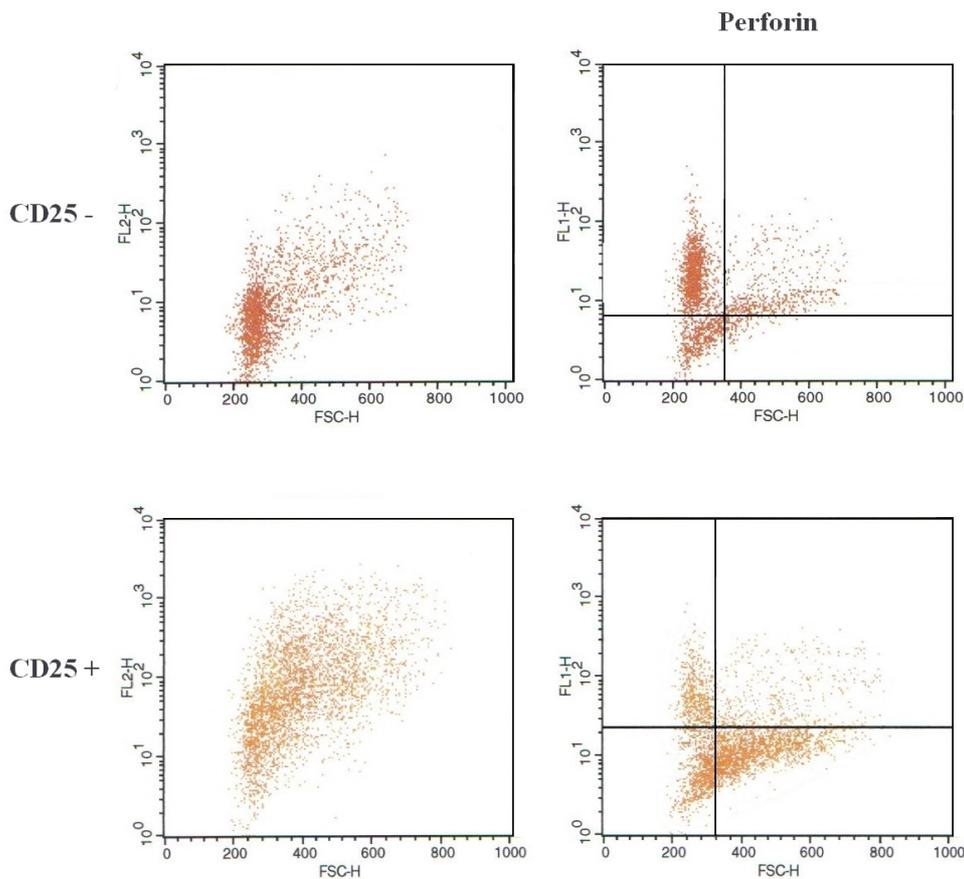


Abb. 21 FACS-Analyse nach Fluoreszenz-Markierung von CD25 und Perforin bei 3 Tage alten, anti-CD3 stimulierten PMNC nach Separation von CD25-negativen (oben) und CD25-positiven Zellen durch MACS. Aufgetragen ist jeweils FSC (Zellgröße) gegen die jeweilige Antikörperfluoreszenz. In der linken Spalte ist die Markierung von CD25 (FL2-Height) dargestellt, rechts die Markierung von Perforin (FL1-Height). Die Bilder sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige FACS-Analysen.

Tab. 3 Zusammenhang zwischen Perforin und Zellgröße bei CD25-positiven und -negativen Zellen (quantitative Auswertung der FACS-Analyse in Abb. 21, rechte Spalte; die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen in den vier Quadranten) *UL: upper left (oberer linker Quadrant); UR: upper right (oberer rechter Quadrant); LL: lower left (unterer linker Quadrant); LR: lower right (unterer rechter Quadrant)*

	CD25-	CD25+
UL	44,1	14,2
UR	7,9	6,8
LL	29,6	35,1
LR	18,4	43,8

Sowohl bei CD25-negativen als auch bei CD25-positiven Zellen ist in Abb. 21/ rechte Spalte im linken oberen Quadranten eine Population kleiner Perforin-positiver Zellen erkennbar. Die geringfügig erhöhten FL-1 Werte bei großen Zellen (oberer rechter Quadrant) lagen nur knapp über der Grundfluoreszenz und wurden nicht zu den Perforin positiven Zellen gerechnet. Die Population der Perforin positiven Zellen macht bei CD25-negativen Zellen 44%, bei CD25-positiven Zellen 14% der Gesamtpopulation aus (Tab. 3). Fehlende Expression von CD25 geht somit im Vergleich zu CD25-positiven Zellen mit einem rund dreifach höheren Anteil Perforin-positiver Zellen einher. Es bestätigt sich außerdem erneut, dass Perforin auch drei Tage nach Stimulation nur bei kleinen Zellen nachgewiesen werden kann.

4.3.3 Zytotoxizitätsversuche

In ⁵¹Cr-Release-Assays wurde die Zytotoxizität von CD25-positiven und CD25-negativen Zellen untersucht. PMNC wurden aus dem Blut gesunder Probanden isoliert, in Nährmedium aufgenommen und mit anti-CD3-AK stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen durch MACS in eine CD25-positive bzw. -negative Population getrennt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Bindung von

anti-CD25-MicroBeads, wie sie für MACS verwendet werden, keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hat (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Zielzellen dienten CCRF-Lymphomzellen und das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen betrug 30:1. Die Hälfte der Versuche wurde unter Zugabe von PHA als „Redirected Lysis“ durchgeführt, die andere Hälfte ohne PHA unter Zugabe von PBS als Negativkontrolle. Abb. 22 zeigt die zytotoxische Wirkung von CD25-negativen und CD25-positiven PMNC drei Tage nach Stimulation mit anti-CD3 in An- bzw. Abwesenheit von PHA.

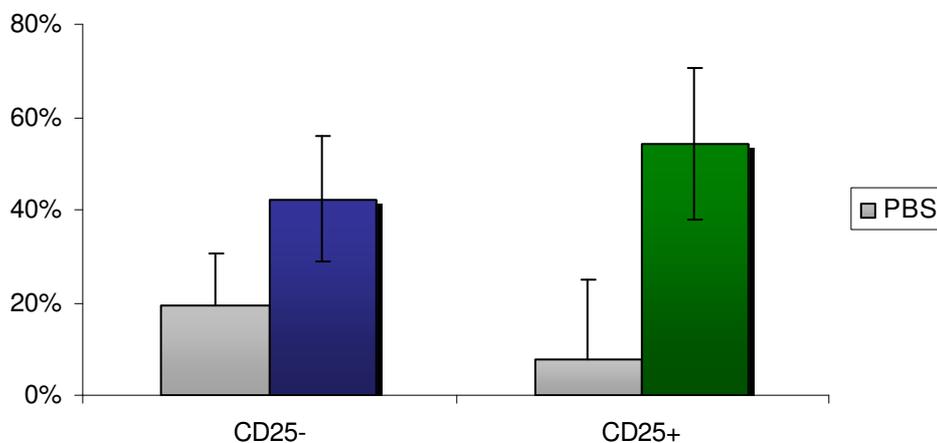


Abb. 22 Zytotoxizität von CD25⁺ und CD25⁻ PMNC nach dreitägiger Stimulation mit anti-CD3. Farblich gekennzeichnet sind die mit PHA durchgeführten Versuche, grau die Negativkontrollen mit PBS. Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Versuchen mit jeweils drei identischen Ansätzen.

Die zytotoxische Wirkung von CD25-negativen Zellen betrug in Anwesenheit von PHA 42 ± 14 %, die zytotoxische Wirkung von CD25-positiven Zellen 54 ± 16 %. Trotz des geringeren Anteils Perforin-positiver Zellen unter den CD25⁺ Zellen war die zytotoxische Wirkung um rund 10% höher als bei CD25⁻ Zellen, was darauf hindeutet, dass bei CD25-positiven Zellen Perforin-unabhängige zytotoxische Mechanismen im Vordergrund stehen.

4.3.4 Blockadeversuche

Durch Blockade der Perforinfreisetzung durch CMA sowie Blockade der FAS-/FAS-Ligand-Interaktion durch die monoklonalen AK NOK1 und ZB4 wurde der jeweilige Anteil Perforin- bzw. FAS-abhängiger Mechanismen an der Zytotoxizität von CD25-positiven und -negativen PMNC untersucht. Effektorzellen waren drei Tage alte anti-CD3 stimulierte PMNC nach MACS auf CD25, als Zielzellen dienten CCRF B-Zell Lymphomzellen. Die Cr-Release-Assays wurden unter Zugabe von PHA als redirected lysis durchgeführt. Abb. 23 zeigt die Zytotoxizität CD25-negativer (A) und CD25-positiver (B) PMNC unter der Wirkung der Inhibitoren CMA, NOK1 und ZB4 in Relation zur Zytotoxizität ohne Hemmstoffe.

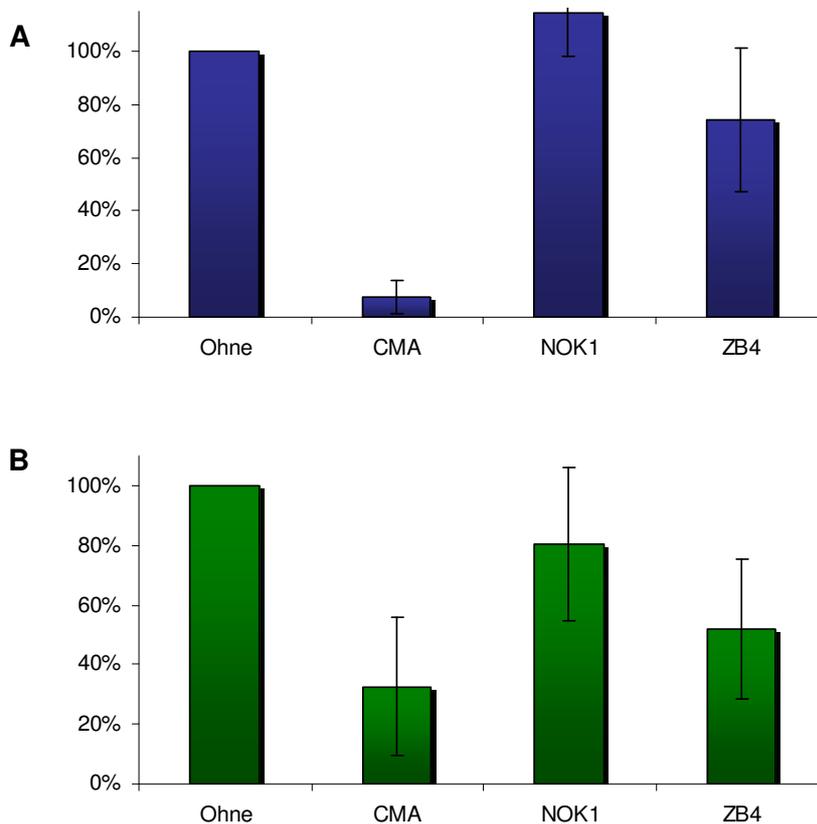


Abb. 23 Zytotoxische Wirkung von drei Tage alten anti-CD3 stimulierten CD25⁻ A) und CD25⁺ B) PMNC in Anwesenheit der Hemmstoffe CMA, NOK1 und ZB4 in Relation zur Zytotoxizität ohne Hemmstoffe (100%). Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Versuchen, die mit jeweils drei identischen Ansätzen durchgeführt wurden.

Unter CMA verringerte sich die zytotoxische Wirkung von CD25-negativen PMNC auf 7 ± 6 %, unter ZB4 auf 74 ± 27 %, NOK1 zeigte keine inhibitorische Wirkung. Bei CD25-positiven Zellen betrug die Zytotoxizität in Anwesenheit von CMA 33 ± 23 %, in Anwesenheit von NOK1 80 ± 25 % und in Anwesenheit von ZB4 52 ± 24 %. Bei CD25-negativen PMNC wurde durch CMA eine durchschnittliche Hemmwirkung von über 90% erzielt, die Hemmwirkung des FAS-Rezeptor-AK ZB4 war mit etwa 25% deutlich geringer. Obgleich nur 20% der CD25-positiven Zellen Perforin-positiv waren, entfaltete CMA auch bei diesen Zellen eine Hemmwirkung von durchschnittlich 70%. Die Wirkung der FAS-AK war mit 20% (NOK1) bzw. 50% (ZB4) stärker als bei CD25-negativen Zellen. Beim direkten Vergleich mit den Ergebnissen der Blockadeversuche mit 1 Tag alten anti-CD3 stimulierten PMNC ohne MACS-Sort (Abb. 14 C) fällt eine stärkere Hemmwirkung von CMA sowohl bei CD25-negativen, als auch bei CD25-positiven Zellen auf. Diese Diskrepanz beruht möglicherweise auf der unterschiedlichen Versuchsanordnung, die einen direkten Vergleich, auch vor dem Hintergrund der bestehenden Standardabweichungen, nur bedingt zulässt.

5. Diskussion

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind die wichtigsten Effektorzellen der zellvermittelten adaptiven Immunantwort. Ihre Hauptfunktion im Rahmen der Immunabwehr besteht in der Lyse von virusinfizierten und maligne transformierten Körperzellen. Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lymphozyten-Homöostase. Durch spezifischen Antigenkontakt aktivierte CTL verfügen über zwei verschiedene molekulare Mechanismen, mit denen sie die Apoptose von Zielzellen auslösen: Das Fas/FasL-System und das Perforin/Granzym-System. Die primäre Aktivierung naiver $CD8^+$ T-Lymphozyten durch Kontakt mit ihrem spezifischen MHC/Antigenpeptid-Komplex und weiteren kostimulatorischen Signalen führt zur Proliferation der Zellen (klonalen Expansion) und damit einhergehend zu Differenzierungsvorgängen, an deren Ende bewaffnete Effektorzellen stehen. Die Veränderungen auf funktionaler Ebene gehen einher mit Veränderungen der morphologischen und phänotypischen Eigenschaften der aktivierten Zellen. Die Aktivierung des TCR löst in der T-Zelle eine Signalkaskade aus, an der verschiedene Protein-Tyrosinkinassen (PTK) beteiligt sind (Dustin, 2002). Diese setzen eine Reihe komplexer Veränderungen in Gang, die zur Proliferation, Ausbildung von Effektorfunktionen und einer veränderten Expression verschiedener Oberflächenproteine führen. Der genaue Ablauf der Differenzierungsvorgänge und die damit verbundenen molekularen Veränderungen sind erst teilweise aufgeklärt.

Dieser Arbeit liegt die Beobachtung zu Grunde, dass bei PMNC und $CD8^+$ Lymphozyten möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Zellgröße und Perforinexpression besteht. Nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD3 beginnt ein Teil der Zellen zu proliferieren und es kommt zur Entwicklung von Blasten. Diese sind Perforin-negativ, während ein Teil der kleinen Zellen Perforin exprimiert. Es stellt sich somit die Frage, welcher Zusammenhang zwischen der Blastenbildung und der Entwicklung von Effektorfunktionen, insbesondere der Perforinexpression, besteht.

5.1. Veränderungen von T-Zellen nach Aktivierung

Mononukleäre Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden isoliert und mit anti-CD3 aktiviert. Die Aktivierung bewirkte sowohl morphologische (Entwicklung zu Blasten) und phänotypische (Expression von Oberflächenantigenen wie CD25, CD69 und HLA-DR) als auch funktionelle Veränderungen (zytotoxische Wirkung).

5.1.1 Eintritt in den Zellzyklus und Proliferation

Die Mehrzahl der naiven peripheren Blutlymphozyten verharrt in der inaktiven G₀-Phase des Zellzyklus. Die Aktivierung über den TCR in Verbindung mit einer CD28-Kostimulation bewirkt sowohl ein Fortschreiten im Zellzyklus als auch die Entwicklung von Effektorfunktionen. Die Weiterentwicklung von einer ruhenden zu einer proliferierenden T-Zelle erfordert den Übertritt aus der G₀-Phase des Zellzyklus in die G₁-Phase und dann weiter über die S- und G₂-Phase zur Mitose. Das Fortschreiten im Zellzyklus beinhaltet die Entwicklung der Zellen zu Blasten. Diese sind charakterisiert durch einen Anstieg der RNA- und Proteinsynthese, ein Zunehmen der Zellgröße und eine Verringerung der Zelldichte. Bereits beim Verlassen der G₀-Phase und Übergang in die G₁-Phase nimmt der Protein- und RNA-Gehalt der Zellen zu und eine kritische Zellgröße ist Voraussetzung für den Eintritt in die S-Phase und die Zellteilung (Mitchison, 2003).

Der Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Blastenbildung wurde unter anderem von Munitic et al., 2005 beleuchtet. CD4⁺ Lymphozyten wurden dort für 5 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Nach einer 18-stündigen Stimulationspause wurde anhand des DNA- und RNA-Gehaltes der Zellen ihre Phase im Zellzyklus bestimmt. Die Zellen wurden in niedrig granulierte Blasten, Zellen mit intermediärer Granularität und Zellen mit hoher Granularität unterteilt. Blasten befanden sich im Zellzyklus bereits kurz vor der S-Phase, Zellen mit intermediärer Granularität in der G₁-Phase und Zellen mit hoher Granularität in G₀. Durch weitere kontinuierliche Stimulation über 15 oder 25 Stunden erreichten auch hoch granulierte Zellen die G₁-Phase und alle Zellen, die die

G1-Phase erreicht hatten, produzierten IL2 und teilten sich später. In meiner Arbeit war einen Tag nach Stimulation mit anti-CD3 eine Größenzunahme bei rund 30% der Zellen feststellbar. Drei Tage nach Stimulation betrug der Anteil großer Zellen knapp 50%. Die Größenzunahme wurde als Zeichen für den Eintritt in den Zellzyklus und die Transformation zu Blasten gewertet.

5.1.2 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen

Im Rahmen der physiologischen Aktivierung oder einer experimentellen Stimulation mit PHA oder anti-CD3 kommt es zur Expression bestimmter Aktivierungsmarker an der Zelloberfläche. Der frühe Aktivierungsmarker CD69 kann zwei Stunden nach Beginn einer Stimulation nachgewiesen werden und erreicht nach zwei Tagen die maximale Expression. Die Expression von CD25 (α -Kette des IL2-Rezeptors) beginnt nach 12 Stunden und die Expression von HLA-DR nach 3 Tagen (Amlot et al., 1996). Ebenfalls werden der CD95-Rezeptor (Fas-Rezeptor) und der CD95-Ligand (FasL) bereits während der frühen Aktivierungsphase auf der Oberfläche von CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert (Krueger et al., 2003).

In meiner Arbeit wurde die Expression von CD25, CD69, CD95 und HLA-DR im Verlauf einer dreitägigen Stimulation mit anti-CD3 untersucht. Vor Stimulation waren bereits 25% der untersuchten Zellen CD25-positiv, nach 24-stündiger Stimulation 50% und nach drei Tagen 75%. Alle unstimulierten Zellen waren negativ bezüglich CD69 während nach 24-stündiger Stimulation 87% der Zellen diesen Aktivierungsmarker exprimierten. Der Anteil HLA-DR-positiver Zellen lag bei unstimulierten Zellen bei 30%, und stieg früher als von Amlot beschrieben bereits nach 24-stündiger Stimulation auf rund 50%. Bereits vor Stimulation war CD95 bei 80% der Zellen auf niedrigem Niveau nachweisbar. Dies steht im Einklang mit Publikationen zur Gewebeverteilung des Fas-Rezeptors, wonach dieser in geringem Umfang von zahlreichen Geweben, darunter auch humane Thymozyten, exprimiert wird (Nagata und Golstein, 1995). Einen, zwei und drei Tage nach Stimulation exprimierten alle Zellen CD95.

Viele Publikationen beschäftigen sich mit der Expression von Aktivierungsmarkern bei stimulierten Lymphozyten, die Ergebnisse sind jedoch nicht einheitlich. Relativ aktuelle Daten stammen von Musabak et al., 2004, der die Expression von CD25, CD69 und HLA-DR bei PMNC vor und nach einer 24-stündigen Stimulation mit PHA untersuchte. Vor Stimulation exprimierten 4,6% und nach Stimulation 17% der Zellen CD25. Der Anteil der CD69-positiven Zellen stieg von 2% auf 41%, während sich der Anteil der HLA-DR-positiven Zellen kaum veränderte (5,4% vor Stimulation vs. 6,4% danach). Die von Musabak beschriebenen Zahlen zur Expression derselben Oberflächenmoleküle sind erheblich niedriger als in meiner Arbeit, was kaum allein durch die unterschiedliche Stimulation mit PHA bzw. anti-CD3 erklärt werden kann. Im Einklang mit meinen Ergebnissen stehen hingegen die Ergebnisse von Amlot, der bei unstimulierten PMNC ebenfalls bereits 25% CD25-positive und 21% HLA-DR-positive Zellen beschreibt. In allen drei Arbeiten wurden PMNC mittels Ficoll aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. Möglicherweise variiert die Zusammensetzung der auf diese Weise gewonnenen Lymphozyten, sodass die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle bereits vor der experimentellen Stimulation nicht einheitlich ist. Insbesondere die Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 bei unstimulierten Zellen weist darauf hin, dass sich möglicherweise bereits antigenerfahrene Zellen in der unstimulierten Population befinden.

In dieser Arbeit sollte auch der Verlauf der Expression bestimmter Aktivierungsmarker im Zusammenhang mit der Zellgröße festgestellt werden. Es zeigte sich, dass von den untersuchten Oberflächenmolekülen CD25 die meisten Rückschlüsse auf die Zellgröße ermöglicht, denn über 97% der Zellen, die sich nach der Stimulation vergrößert hatten, exprimierten CD25, während CD25-negative Zellen auch nach dreitägiger Stimulation zu 95% klein waren. Unter den CD25-positiven Zellen waren nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD3 50% der Zellen und nach drei Tagen 65% der Zellen groß (Blasten). Für die Expression keines der untersuchten Oberflächenmoleküle ist die Blastenbildung eine Voraussetzung, denn alle wurden auch von einem Teil der

kleinen Zellen exprimiert. Umgekehrt weist der hohe Anteil CD25-positiver Blasten darauf hin, dass die CD25-Expression zeitlich der Blastenbildung vorausgeht und möglicherweise eine Voraussetzung dafür ist.

Der Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Expression von Oberflächenantigenen wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht. Oehen und Brduscha-Riem untersuchten die Expression von CD25 bei CD8⁺ Lymphozyten nach Kontakt mit spezifischem Antigen in vivo und in vitro (Oehen und Brduscha-Riem, 1998). Naive Zellen waren dort vorwiegend CD25-negativ. In vivo wurde CD25 erst nach der dritten Zellteilung nachgewiesen, hingegen exprimierte der größte Teil der in-vitro-stimulierten Zellen bereits vor der ersten Zellteilung CD25. Praktisch alle Zellen, die sich ein- oder mehrmals geteilt hatten, exprimierten ebenfalls CD25. Da die Zunahme der Zellgröße ein Zeichen für den Eintritt in den aktiven Zellzyklus ist und der Zellteilung vorausgeht (s.o.), bestätigen die bei Oehen und Brduscha-Riem für in-vitro-stimulierte Zellen beschriebenen Verhältnisse meine Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Zellgröße und CD25 Expression.

Der Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wurde ebenfalls von Lea et al., 2003 untersucht. Seine Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von CD25, CD69 und CD44 bei stimulierten PMNC unabhängig vom Eintritt der Zellen in den Zellzyklus hochreguliert wird. CD62L (L-Selectin Ligand) wird als charakteristisches Oberflächenantigen für naive Zellen im Rahmen der Entwicklung zu Effektorzellen herunterreguliert. Durch Unterbrechung proliferatorischer Signale auf molekularer Ebene zeigten Lea et al., dass eine drei- bis fünfstündige Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 nötig ist, damit PMNC die G0-Phase verlassen und in den Zellzyklus eintreten. Zellen, bei denen das proliferatorische Signal vorher unterbrochen wurde, exprimierten die Aktivierungsmarker und zeigten einen Rückgang der CD62L Expression. Sie traten aber nicht in den Zellzyklus ein und proliferierten nicht, während Zellen, bei denen das proliferatorische Signal erst nach dem kritischen Zeitpunkt

unterbrochen wurde, 30-48 Stunden später in die S-Phase eintraten und sich teilten.

Auch Munitic et al., 2005 untersuchte die Expression der Oberflächenmarker CD62L und CD44 im Zusammenhang mit der Entwicklung von Blasten und der Zellzyklusphase. Zellen mittlerer und hoher Granularität, die sich in der G0- bzw. G1-Phase des Zellzyklus befanden, waren CD62L-hoch-positiv, während die Expression bei den im Zellzyklus bereits weiter fortgeschrittenen Blasten vermindert war. Die Expression von CD44 war bei Blasten hoch-positiv, bei Zellen mittlerer Granularität mäßig und bei stark granulierten Zellen gering. Die Veränderung der Expression beider Oberflächenmarker scheint sich demnach während des Fortschreitens im Zellzyklus zu manifestieren, ob die veränderte Expression vom Erreichen einer bestimmten Zellzyklusphase abhängig ist, kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden.

P- und E-Selectin-Ligand (CD62P bzw. CD62E) werden von Effektorzellen, nicht aber von naiven Zellen exprimiert. Syrbe et al. 2004 zeigten, dass die Hochregulation und Induktion der an der Expression von CD62P und CD62E beteiligten Glykosyltransferasen bei naiven T-Zellen vom Eintritt in den Zellzyklus abhängig ist. Zellen, bei denen der Zellzyklus mit Mitose-Inhibitoren in der G1- oder G1/S-Phase gestoppt wurde, konnten weder die mRNA der Glykosyltransferasen hochregulieren noch P- oder E-Selectin-Ligand exprimieren. Zellen, deren Zellzyklus in einer späteren Phase (S oder G2/M) gestoppt wurde, exprimierten die Liganden ebenso wie Zellen ohne Mitose-Inhibitoren. Die Autoren schlossen daraus, dass die Chromatin-Umstrukturierung in der S-Phase notwendig für die Freischaltung der P- und E-Selectin-Ligand-Gene bei naiven Zellen ist und dass die Gene bei Effektorzellen freigeschaltet bleiben und jederzeit zugänglich für die Transkription sind. Auch die Expression von CD25 wurde untersucht. Im Gegensatz zur Expression der P- und E-Selectin-Liganden wurde sie von Mitose-Inhibitoren jedoch nicht beeinträchtigt (Syrbe et al., 2004).

Die Daten weisen darauf hin, dass die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD44 unabhängig vom Eintritt in den Zellzyklus sind (Lea et al., 2003; Syrbe et al., 2004). Die Transformation zu Blasten setzt hingegen den Eintritt in den Zellzyklus voraus, da gezeigt wurde, dass Blasten bereits die G1 Phase überschritten haben und kurz vor dem Eintritt in die S-Phase stehen (Munitic et al., 2005). Diese Aussagen sind im Einklang mit meinen Ergebnissen, wonach die Expression von CD25 der Blastenbildung vorausgeht.

Die Expression von CD62E und CD62P, die als Marker für Effektorzellen gelten, scheint hingegen abhängig vom Erreichen der S-Phase des Zellzyklus zu sein (Syrbe et al., 2004). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch die Entwicklung von Effektorfunktionen direkt vom Chromatin-Umbau in der S-Phase abhängt, mit anderen Worten, dass die Entwicklung von Effektorfunktionen direkt vom Durchlaufen des Zellzyklus und der Zellteilung abhängig sein könnte.

5.1.3 Entwicklung von Effektorfunktionen

5.1.3.1 Lytische Granula

Die gezielte Sekretion von Makromolekülen aus spezialisierten Zellorganellen, den sogenannten lytischen Granula, ist ein wichtiger Mechanismus zytotoxischer T-Zellen zur Zerstörung virusinfizierter und maligne transformierter Zellen (Dell'Angelica, 2000). Seit einigen Jahren ist bekannt, dass lytische Granula, die lange Zeit ausschließlich als charakteristische Elemente der Perforin/Granzym-vermittelten Zytotoxizität beschrieben wurden, eine Schnittstelle zwischen Perforin/Granzym- und Fas/FasL-System darstellen. Die lytischen Granula zytotoxischer T-Zellen enthalten nämlich außer Perforin und verschiedenen Granzymen auch membrangebundenen Fas-Ligand. Während Perforin und die Granzyme durch Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran exozytotisch freigesetzt werden, wird FasL an der Außenseite der Zellmembran eingebaut (Kojima et al., 2002). Die Granula haben charakteristische Eigenschaften von Lysosomen, weshalb sie auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet werden. Sie enthalten lysosomale

Proteine wie Cathepsin B und -D, β -Hexosaminidase sowie Lysosomen-assoziierte Membranproteine LAMP-1 (CD107a), LAMP-2 (CD107b) und LAMP-3 (CD63) (Blot und Griffiths, 2002). β -Hexosaminidase, ein Lysosomen-spezifischer Degranulationsmarker, wird nur von bereits geprägten, nicht aber von naiven T-Zellen als Antwort auf eine sekundäre Stimulation mit anti-CD3 exprimiert (Shen et al., 2006).

5.1.3.2 Zeitliche Entwicklung von Effektorfunktionen

Die primäre Aktivierung von Lymphozyten führt zur Bildung von Lysosomen, wobei eine direkte Korrelation zwischen der Biogenese von Lysosomen und der Zytotoxizität der Zellen besteht (Shen et al., 2006). Die Fähigkeit zur Degranulation als Antwort auf eine Stimulation mit anti-CD3 beginnt nach 24 Stunden, erreicht ihren Höhepunkt nach 48 Stunden und fällt nach 3 Tagen wieder auf Werte entsprechend naiver Zellen ab. Auch die Expression von Perforin und Granzym B korreliert mit der Zytotoxizität der Zellen (Shen et al., 2006). Perforin und Granzym B wurden bei Shen et al., 2006 frühestens 16 Stunden nach Stimulation naiver Splenozyten mit anti-CD3 nachgewiesen. Nach 42 Stunden waren die meisten Zellen Perforin- und Granzym B-positiv, danach nahm die Expression wieder ab und sank nach 72 Stunden auf Werte wie bei naiven Zellen.

Kelso et al. 2002 beschreibt eine andere zeitliche Entwicklung von Effektorfunktionen bei primär aktivierten naiven T-Zellen. Anhand der mRNA-Expression wurde gezeigt, dass Perforin, die Granzyme A-C sowie $\text{INF}\gamma$ von naiven CD8^+ T-Zellen (CD44^{low} , $\text{CD62L}^{\text{high}}$), die mit anti-CD3, anti-CD8, Anti- $\text{CD11}\alpha$ (LFA-1 α) und IL2 über 7 Tage in Kultur gehalten wurden, mit unterschiedlicher Kinetik exprimiert werden. Als Antwort auf die Stimulation teilten sich die Zellen nach ein bis zwei Tagen zum ersten Mal und anschließend alle 6-8 Stunden. mRNA für Perforin, Granzym B und $\text{INF}\gamma$ wurde erst ab dem zweiten Tag und mit einem Maximum am fünften Tag nachgewiesen. Die mRNA für Granzym A und C war in geringen Mengen ab dem ersten Tag mit einem Peak nach 7 Tagen nachweisbar. In

Zytotoxizitätsversuchen korrelierte die lytische Aktivität mit der Expression von Perforin und Granzym B. Die unterschiedliche Kinetik der Perforin- und Granzym B Expression nach Stimulation naiver T-Zellen bei Shen bzw. Kelso könnte durch die unterschiedliche Definition von naiven Zellen in den beiden Arbeiten begründet sein. Während Shen naive Zellen mit frisch isolierten Splenozyten gleichsetzt, wurden naive Zellen bei Kelso anhand der Kriterien $CD8^+CD44^{low}CD62L^{high}$ definiert und per FACS-Sort gewonnen.

Meine Ergebnisse stimmen mit diesen Arbeiten insofern überein, als die zytotoxische Wirkung von $CD8^+$ Lymphozyten mit dem Anteil Perforin-positiver Zellen korreliert (Korrelationsfaktoren zwischen 0,77 und 0,99). Beide Autoren charakterisieren naive Zellen jedoch gleichermaßen als Perforin- und Granzym B-negativ und ohne lytische Aktivität. In meiner Arbeit exprimierten rund 20% der unstimulierten PMNC und etwa 30% der unstimulierten $CD8^+$ Lymphozyten Perforin und besaßen in PHA-redirected ^{51}Cr -Release Assays eine zytotoxische Wirkung von 27% bzw. 21%. Daraus lässt sich schließen, dass die Population unstimulierter frisch isolierter Zellen neben naiven Zellen auch Perforin-positive Gedächtniszellen beinhaltete, die zytotoxisch wirkten. Nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD3 erhöhte sich der Perforin-positive Anteil unter den Lymphozyten und $CD8^+$ Zellen jeweils nur geringfügig um 5-6%, während sich die Zytotoxizität verdoppelte. Die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung steht dabei möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Verstärkung von Effektorfunktionen bei Gedächtniszellen.

Die Ergebnisse von Wolint et al., 2005 untermauern diese These. In seiner Arbeit vergleicht er naive T-Zellen mit Effektor- und Gedächtniszellen bezüglich der zeitlichen Entwicklung ihrer Degranulationsfähigkeit, der Granzym B-Expression und der Zytotoxizität als Reaktion auf eine spezifische Stimulation. Fünf Stunden nach Stimulationsbeginn konnten naive T-Zellen weder degranulieren, noch wurde bei ihnen Granzym B nachgewiesen und sie konnten spezifische Zielzellen nicht lysieren. Im Gegensatz zu naiven Zellen zeigten Effektor- und Gedächtniszellen bereits fünf Stunden nach

Stimulationsbeginn eine signifikante Zunahme von Granzym B und IFN γ und waren in der Lage zu degranulieren. Die Expression von Granzym B und IFN γ spiegelte sich in der zytotoxischen Wirkung wieder, wobei Effektorzellen deutlich zytotoxischer waren als Gedächtniszellen.

5.1.4 Subpopulationen CD8⁺ T-Lymphozyten

Die im peripheren Blut zirkulierenden Gedächtniszellen lassen sich in zentrale Gedächtniszellen (central memory cells) T_{CM} und Effektor-Gedächtniszellen (effector memory cells) T_{EM} unterteilen (Tomiyama et al., 2002; Rufer et al., 2003; Salusto et al., 2004). Naive Zellen exprimieren CD45RA sowie die „Homing“-Rezeptoren für Lymphgewebe CCR7 und CD62L. Effektorzellen sind CCR7- und CD62L negativ, exprimieren aber verschiedene Effektormoleküle wie IFN γ und Perforin. Nach Meng et al., 2006 teilen sich die einzelnen T-Zellpopulationen im peripheren Blut gesunder Spender wie folgt auf: 13.9–58.7% naive T-Zellen (T_N), 12.2–26.9% Effektorzellen (T_E), 16.9–31.5% Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und 5.68–27.7% zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}). Die Bedeutung der verschiedenen Untergruppen von Gedächtniszellen und ihre Unterscheidung anhand von Oberflächenmarkern sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Nach Aktivierung naiver T-Zellen kommt es mehreren Publikationen zufolge zunächst zu einer Proliferationsphase, danach zur Entwicklung von Effektorfunktionen. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass die Entwicklung naiver Zellen linear über T_{CM}-Zellen und T_{EM}-Zellen zu Effektorzellen fortschreitet. T_{CM}-Zellen repräsentieren nach dieser Vorstellung Zwischenstadien der Differenzierung, bei denen CCR7 und CD62L noch erhalten sind, während die Remodellierung von Effektorgenen wie IL-4, IL-5, IFN γ und Perforin noch nicht abgeschlossen ist. T_{EM}-Zellen besitzen hingegen voll ausgebildete Effektorfunktionen.

Schwendemann et al. untersuchte CD8⁺ Gedächtniszellen auf ihre proliferative Kapazität und die Expression von Perforin und IFN γ als Zeichen für Effektorfunktionen. T_{CM} Zellen sind demnach Perforin-negativ, weisen jedoch

hohe Proliferationsraten auf. T_{EM} Zellen proliferieren im Unterschied dazu nur gering, sind aber zu 30% Perforin- und $IFN\gamma$ -positiv (Schwendemann et al. 2005). Schwendemann widerlegt in seiner Arbeit die Vorstellung von einer linearen Entwicklungsfolge naiver T-Zellen über T_{CM} zu T_{EM} -Zellen und Effektorzellen, indem er zeigte, dass bereits ausdifferenzierte T_{EM} -Zellen nach Reaktivierung mit anti-CD3 und anti-CD28 auch wieder Eigenschaften von T_{CM} -Zellen annehmen können wie die Expression von CCR7 einhergehend mit einer starken Proliferation bei geringem Effektorpotenzial. Nach der Proliferation verloren die meisten dieser Zellen die CCR7-Expression wieder und zeigten erneut Eigenschaften von Effektor-Gedächtniszellen. Ein kleiner Teil der Zellen behält dauerhaft die Eigenschaften von T_{CM} -Zellen und dient möglicherweise der Aufrechterhaltung des Gedächtniszell-Pools. Schwendemann schließt daraus, dass Gedächtniszellen dynamisch die Eigenschaften von proliferierenden T_{CM} -Zellen oder zytotoxischen T_{EM} -Zellen annehmen können.

5.1.4.1 Zusammenhang von Zellzyklusprogression und Entwicklung von Effektorfunktionen

Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei Blasten um proliferierende Zellen handelt, entsprechen Schwendemanns Ergebnisse genau meiner Beobachtung, wonach Blasten Perforin-negativ sind, während Perforin-positive Zellen klein sind bzw. nicht proliferieren. Es stellt sich somit die Frage, welcher zeitliche und regulatorische Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Effektorfunktionen und der Zellproliferation besteht.

Nach Meng et al. 2006 ist die Expression von Granzym B sowohl bei naiven als auch bei Ag-erfahrenen Zellen vom Durchlaufen des Zellzyklus abhängig. Ferner korreliert die Expression von Granzym B mit der zytotoxischen Wirkung. Da er eine Koexpression von Granzym B und Perforin nachweist, sind die Ergebnisse auf Perforin übertragbar. Nur 0,9-2,84% der im Blut zirkulierenden $CD8^+$ Zellen waren in seiner Untersuchung Granzym B-positiv, diese gehörten der T_E und T_{EM} Zellpopulation an. 18,4% der frisch isolierten T_{EM} Zellen und 24,6% der T_E Zellen waren Granzym B-positiv. Nach fünftägiger Stimulation mit

anti-CD3 und anti-CD28 kam es sowohl bei naiven (CD45RA-positiv) als auch bei Ag-erfahrenen Zellen (CD45RA negativ) zu einem signifikanten Anstieg der Granzym-B-Expression. Dies war sowohl bei naiven als auch bei Gedächtniszellen abhängig vom Durchlaufen des Zellzyklus, was durch Experimente mit dem Mitoseinhibitor Mimosine, der zu einem Stopp in der G1/S Phase führt, wie auch durch Färbung mit CFSE (Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester; markierte Zellen verlieren nach durchgemachter Zellteilung 50% ihrer Fluoreszenz) gezeigt wurde. Nur Zellen, die sich geteilt hatten, exprimierten Granzym B. T_{EM}-Zellen, die bereits vor der Stimulation Granzym B exprimiert hatten, teilten sich hingegen nicht mehr und erwarben auch kein zusätzliches Granzym B.

Der Aktivierungsmarker CD25 entspricht der α -Kette des IL2-Rezeptors und ist eine Voraussetzung für den Beginn der Zellproliferation. Die Population der CD25 positiven Zellen ist keine homogene Population. Sowohl CD8 wie auch CD4 positive T-Zellen exprimieren teilweise CD25. Insbesondere wird eine starke, von einer Stimulation mit anti-CD3 unabhängige, CD25 Expression von regulatorischen doppelpositiven CD4 CD25 Zellen beschrieben (Smyth et al., 2004). In meinen Ergebnissen exprimierten nach dreitägiger Stimulation über 70% der Zellen CD25, 50% davon waren groß und zu 90% Perforin-negativ. Dabei handelt es sich möglicherweise zu einem großen Teil um CD4 positive Zellen. Bei CD8 positiven Zellen der CD25 positiven Population könnte es sich um primär aktivierte naive Zellen handeln, die sich zu Blasten weiterentwickelt aber noch nicht geteilt und daher in Übereinstimmung mit Meng et al. 2006 noch kein Perforin gebildet haben. In der Population der CD25 negativen Zellen waren 44% der Zellen Perforin positiv. Es handelt sich dabei vermutlich um zytotoxische CD8 positive Zellen. In Übereinstimmung damit konnte eine vollständig perforinabhängige Zytotoxizität der CD25 negativen Zellen nachgewiesen werden, während die zytotoxische Wirkung der CD25 positiven Zellen lediglich zu etwa 60% perforinabhängig war.

Die Ergebnisse von Kelso et al., 2002 zeigen, dass naive T-Zellen erst am zweiten Tag nach Stimulationsbeginn Perforin exprimieren. Syrbe et al., 2004 und Meng et al., 2006 postulieren darüber hinaus, daß die Entwicklung von Effektorfunktionen vom Durchlaufen des Zellzyklus, speziell vom Erreichen der S-Phase abhängig ist. Es ist daher anzunehmen, dass 24 Stunden nach Stimulationsbeginn mit anti-CD3 in meiner Arbeit noch kein Perforin bei primär aktivierten naiven T-Zellen nachweisbar war, während reaktivierte Gedächtniszellen möglicherweise bereits Effektorfunktionen entwickelt hatten. Die Entwicklung von Effektorfunktionen bei Gedächtniszellen wird kontrovers diskutiert. Meng et al., 2006 beschreibt auch für die Granzym-B-Expression von Ag-erfahrenen CD8⁺ Zellen eine Stimulationsdauer von mindestens drei Tagen. Dies steht im Kontrast zu anderen Publikationen, in denen eine Hochregulation von Granzym B bei Gedächtniszellen bereits wenige Stunden nach Reaktivierung nachgewiesen wurde (Wolint et al. 2005). Im Einklang mit den Ergebnissen von Meng könnte jedoch die Frage, warum Blasten kein Perforin exprimieren, damit beantwortet werden, dass es sich dabei um Zellen handelt, die durch die Stimulation aktiviert wurden und in den Zellzyklus eingetreten sind, aber erst nach erfolgter Zellteilung Perforin exprimieren. Die Entwicklung zytotoxischer Granula ist vermutlich multifaktoriell an den Ablauf des Zellzyklus gekoppelt.

5.2 Anteil des Fas- und Perforinsystems an der Zytotoxizität von CTL

Die 24-stündige Stimulation mit anti-CD3 bewirkte bei PMNC und CD8⁺ Lymphozyten eine Verdoppelung der Zytotoxizität, obgleich der Anteil Perforin-positiver Zellen nur geringfügig um etwa 5% zunahm. Es stellt sich somit die Frage, welchen Anteil Perforin abhängige bzw. unabhängige Mechanismen an der zytotoxischen Wirkung vor und nach der Stimulation hatten.

Die Zytotoxizität frischer unstimulierter PMNC und CD8⁺ Lymphozyten ließ sich zu 70-90% durch CMA hemmen, jedoch nur zu rund 15-20% durch die gegen das FAS-System gerichteten inhibitorischen Antikörper NOK1 und ZB4. Da es sich bei unstimulierten zytotoxischen Zellen möglicherweise um T_{EM} handelt

(s.o.), scheint die Zytotoxizität dieser Zellen hauptsächlich durch Perforin vermittelt zu sein. Die Zytotoxizität korrelierte bei CD8⁺ Lymphozyten generell stärker mit dem Anteil Perforin-positiver Zellen als bei unselektierten PMNC. Insbesondere bei frischen unstimulierten CD8⁺ Zellen betrug der Korrelationskoeffizient 0,99. Durch die 24-stündige Stimulation mit anti-CD3 nahm der Anteil des Fas-Systems zu und war etwa gleich groß wie der Anteil des Perforin-Systems. Die zytotoxische Wirkung von stimulierten PMNC und CD8⁺ Lymphozyten wurde nämlich sowohl durch CMA als auch durch beide Fas-Inhibitoren um jeweils etwa 50% inhibiert. Die relativ verstärkte Bedeutung des Fas-Systems nach Stimulation könnte durch einen Verdünnungseffekt der perforinpositiven Zellen bedingt sein, falls sich Fas-positive perforinnegative Zellen nach der Stimulaton stärker vermehren als perforinpositive Zellen, wodurch ein relatives Übergewicht perforinnegativer Zellen zustande kommen könnte.

5.2.1 In vitro Untersuchungen zu Fas und Perforin beim Menschen

Die Bedeutung des Perforin- und des Fas-Systems für die Zytotoxizität von T-Zellen wurde im murinen System mit Hilfe von „knockout“ Mäusen intensiv erforscht. Hingegen gibt es nur wenige Publikationen über die Rolle der beiden zytotoxischen Mechanismen beim Menschen. Erst seit der Beschreibung von humanen Perforingendefekten (Stepp et al., 1999; Janka und zur Stadt, 2005) sowie von Gendefekten betreffend den Fas-Liganden (Wu et al., 1996; Bi et al., 2007) oder den Fas-Rezeptor (Fischer et al., 1995; van der Burg et al., 2000) wurde der wissenschaftliche Rahmen für entsprechende Untersuchungen geschaffen.

Yasukawa et al., 2000 etablierte durch Bestrahlung maligne veränderte B-Lymphozyten eines Patienten mit homozygotem Fas-Rezeptor-Defekt und seinen diesbezüglich heterozygoten Eltern mit normaler Fas-Expression. Alloantigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ CTLs zeigten sowohl gegenüber Fas-positiven als auch negativen B-Lymphomzellen das gleiche zytotoxische Potenzial. Obwohl die Effektorzellen nach Stimulation sowohl mRNA für

Perforin- und Granzym B als auch für FasL synthetisierten, ließ sich die Zytotoxizität durch EGTA und CMA nahezu vollständig blockieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Lyse der Lymphomzellen durch CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten hauptsächlich Perforin-abhängig war. In einer Arbeit von Yanai et al., 2003 wurden die Ergebnisse für CD8⁺ Zellen bestätigt. Die Arbeitsgruppe etablierte B-Lymphoblastoid Zelllinien einer Patientin mit homozygoter Fas-Rezeptor-Gendefizienz und von ihren Eltern, die diesbezüglich heterozygot waren. Zusätzlich wurden CTL von einer Patientin mit Perforindefizienz und ihrem gesunden Vater isoliert. Durch Koinkubation der CTLs mit den B-Lymphoblastoid-Zellen wurden alloantigen-spezifische CTLs generiert und in späteren Zytotoxizitätsassays verwendet. Die zytotoxische Wirkung der untersuchten Lymphozyten war nahezu vollständig Perforin abhängig, denn Perforin negative T-Lymphozyten konnten im Gegensatz zu Perforin-positiven Zellen weder Fas-positive noch negative Zielzellen lysieren.

Beide Arbeiten sprechen für eine Dominanz der Perforin-vermittelten Zytotoxizität bei der Lyse von B-Lymphomzellen durch humane CD8⁺ Zellen. Im Gegensatz dazu ließ sich zwar aus meinen Ergebnissen eine überwiegende Rolle der Perforin-vermittelten Lyse von T-ALL Zellen durch unstimulierte CD8⁺ Zellen ableiten, nach 24-stündiger Stimulation war die zytotoxische Wirkung hingegen zu etwa gleichen Teilen Fas- und Perforin-vermittelt. Es stellt sich die Frage, ob der erhöhte Anteil des Fas-Systems an der Zytotoxizität stimulierter Zellen durch eine unterschiedliche Aktivierungskinetik beider Effektormechanismen bedingt ist. Falls die De-Novo-Synthese von Perforin erst zwei Tage nach Stimulationsbeginn eintritt (Kelso et al., 2002), FasL hingegen schneller exprimiert würde, könnte die im Vergleich zu den Ergebnissen von Yasukawa und Yanai größere Bedeutung des Fas Systems nach 24-stündiger Stimulation ein vorübergehender Effekt sein. Möglicherweise führte aber auch die Antigen-spezifische Aktivierung der Effektorzellen bei Yasukawa und Yanai zu einer stärkeren Aktivierung des Perforin-Systems als die in dieser Arbeit durchgeführte unspezifische Stimulation mit anti-CD3.

5.2.2 Physiologische Bedeutung des Fas und Perforin Systems

Das Perforin/Granzym-System wird in mehreren Arbeiten als hauptsächlichster Mechanismus bei der Infekt- und Tumorabwehr beschrieben, während die Hauptfunktion des Fas-Systems in der Regulation der Lymphozyten-Homöostase liegt (Trapani und Smyth, 2002; Lieberman, 2003a; Fas et al., 2006). Vor allem neuere Publikationen weisen jedoch darauf hin, dass sich in vielen Bereichen beide Systeme funktionell ergänzen.

Experimente mit virusinfizierten „knockout“ Mäusen zeigen, daß bei der Elimination von Viren die Zytotoxizität durch CD8⁺ Zellen den wichtigsten Abwehrmechanismus darstellt, dabei aber weder das Perforin- noch das Fas-System dominiert (Harty et al., 2000). Wie die Untersuchung von de Vries et al., 2007 zeigt, ist das Fas-System an der Lyse von Tumorzellen beteiligt, wenn diese nicht vollständig durch Perforin und Granzym B eliminiert worden sind (de Vries et al., 2007). Durch Versuche mit Perforin- und FasL-defizienten bzw. mit doppelt negativen CD4⁺ Effektorzellen wurde die Beteiligung beider Effektormechanismen an Graft-versus-Host Reaktionen (GVHD) nachgewiesen (Jiang et al., 2001). Die pathophysiologische Wirkung ist jedoch komplex, da beide zytotoxischen Mechanismen sowohl an der gegen Empfängerewebe gerichteten Zytotoxizität, als auch an der Regulation der T-Zell-Antwort beteiligt sind (Maeda et al., 2005; Marks et al., 2004). Fehlfunktionen des AICD spielen bei der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen eine Rolle. Die Fas-vermittelte Apoptose gilt als Hauptmechanismus des AICD (Zhang et al., 2004). Andere Arbeiten weisen jedoch auch auf eine Beteiligung des Perforin-Systems, beispielsweise im Rahmen des „fratricide“ (Lyse von CTLs durch CTLs), hin (Su et al., 2004). Untersuchungen an Fas-Rezeptor defizienten T-Zellen von ALPS Patienten geben Hinweise darauf, dass Perforin-abhängige Mechanismen die Fas-Defizienz bei der Aufrechterhaltung der Lymphozytenhomöostase im Rahmen des AICD teilweise kompensieren (Mateo et al., 2007).

Beide zytotoxischen Mechanismen sind mit jeweils unterschiedlicher Gewichtung sowohl an der Infekt- und Tumorabwehr als auch an der

Lymphozytenhomöostase beteiligt. Eine klare funktionelle Trennung ist somit nicht möglich, zumal sich beide Systeme gegenseitig beeinflussen, wie die von Mateo beschriebene kompensatorische Verstärkung des Perforinsystems bei Fas-Defizienz vermuten lässt. Ob ähnliche Effekte auch unter in-vitro-Bedingungen auftreten, ist fraglich. Die Hemmung eines Systems könnte jedoch eine kompensatorische Verstärkung des jeweils anderen Systems bewirken und auf diese Weise zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen.

5.2.3 Regulation des Fas und Perforin Systems

5.2.3.1 Regulatorische Wirkung von Zytokinen

Bei der Regulation der Effektormechanismen scheinen unter anderem extrazelluläre Faktoren eine Rolle zu spielen. So gibt es Hinweise auf eine organabhängige Dominanz des Fas-Systems bei der Elimination Adenovirus-infizierter muriner Hepatozyten. Bei FasL-defizienten Mäusen kommt es zu einer verspäteten Elimination von Adenoviren speziell aus der Leber, während ähnliches in anderen Organen nicht beobachtet wird (Kafrouni et al., 2001). Unterschiede der lokalen Zytokinexpression könnten dabei eine Rolle spielen.

Die wichtige Rolle von Zytokinen bei der T-Zell Aktivierung wird auch durch die Tatsache unterstrichen, dass unter experimentellen Bedingungen bestimmte Zytokine T-Zellen unabhängig von einer Stimulation über den TCR aktivieren können (Alves et al., 2003; Tamag et al., 2006). Alves et al. zeigte, dass die alleinige Stimulation mit IL15 bei naiven ($CD27^{high}/CD45RA^{high}/CD28^{+}/CCR7^{+}/CD62L^{+}$) T-Zellen zur Herunterregulation ihrer charakteristischen Oberflächenmarker und zur Synthese von Effektorproteinen ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, Perforin und Granzym B) führt. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse von Tamang et al., 2006, der außer für IL15 auch für IL2 eine TCR unabhängige Aktivierung belegt. Nach alleiniger Stimulation mit IL2 bzw. IL15 exprimierten nach drei Tagen 80% bzw. 77% der $CD8^{+}$ Zellen Granzym B und waren bereits bei einer E:T Ratio von 1:1 stark zytotoxisch. Beendigung der Stimulation führte zum Verlust der Zytotoxizität und der Granzym B-Expression binnen 24 Stunden.

Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Zytokine mit einer selektiven Aktivierung des Fas- oder Perforinsystems in Zusammenhang stehen. So führt zum Beispiel IL4 zur Expression von FasL, einhergehend mit einer Zunahme der Fas-vermittelten Zytotoxizität (Aung und Graham, 2000). IL2 beeinflusst hingegen dosisabhängig die Expression von Perforin und der Granzyme A-C bei CD8⁺ Zellen. Diese IL2-Wirkung ist unabhängig von der Wirkung auf die Zellproliferation (Janas et al., 2005). Im Gegensatz zu anderen Publikationen wurde in meiner Arbeit zur Stimulation der Zellen lediglich anti-CD3 aber kein IL2 zugegeben. Auch dies könnte ein Grund für die geringe Zunahme der Perforin-positiven Zellen nach Stimulation sein.

Wie IL2 induziert auch IL27 sowohl die Expression von Granzym B (in geringerem Maße auch von Perforin) als auch die Proliferation der Zellen (Morishima et al., 2005). Auch dabei werden Zellproliferation und Granzym B-Expression unabhängig voneinander reguliert. Experimente mit T-Zellen von STAT-1 und T-bet defizienten Mäusen belegen die Beteiligung beider Transkriptionsfaktoren an der IL27-vermittelten Expression von Granzym B, während die Zellproliferation davon unabhängig davon ist. Da die Wirkung von Zytokinen meist an bestimmte Transkriptionsfaktoren gekoppelt ist, die wiederum bestimmte Gene aktivieren oder supprimieren, weist die Beteiligung unterschiedlicher Zytokine an der Aktivierung des Fas- bzw. Perforinsystems, darauf hin, dass beide Systeme auf Transkriptionsebene unabhängig reguliert werden können.

5.2.3.2 Signaltransduktion und Genexpression

Die Stimulation des TCR löst über die Aktivierung der Proteinkinasen Ick und ZAP70 (Zeta-Ketten assoziierte Proteinkinase 70) eine molekulare Signalkette aus, die über das Adapterprotein LAT zur Rekrutierung der „second messenger“ Inositol-3,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) führt. IP3 bewirkt über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und über Calcineurin die Dephosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor AT). DAG aktiviert unter anderem die Proteinkinase C (PKC) (Lin und

Weiss, 2001). PKC θ , eine Unterart der PKC, ist an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NF-AT und AP-1 beteiligt (Manicassamy et al., 2006). Die Daten weisen darauf hin, dass die Signalkette von der Stimulation des TCR bis zur Aktivierung von DAG und der PKC für beide Effektormechanismen gleich verläuft. Ab der PKC scheint ein Signalweg abzuzweigen, der über PKC θ zur FasL-Expression führt.

Für verschiedene Transkriptionsfaktoren wurden Bindungsstellen in den Promoter- und Enhancerregionen der Effektorprotein-Gene nachgewiesen. Zytokine sind an der Regulation der Genexpression beteiligt, indem sie die Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Yamamoto et al., 2002; Zhou et al., 2002). Für die Expression von FasL wies Contini et al., 2005 eine durch CD8 initiierte Signalkette nach, an deren Ende die Bindung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B in der Promoterregion des FasL-Gens stehen. Die Bildung des NF-AT/DNA-Komplexes ist von Calmodulin-Kinase II abhängig, während die PKC θ an der Bildung des NF- κ B/DNA-Komplexes beteiligt ist. Beide DNA-Komplexe wurden etwa eine Stunde nach Bindung des CD8-Rezeptors etabliert. Auch die Ergebnisse von Kaminski et al., 2007, weisen auf eine wichtige Rolle der PKC θ bei der Regulation der FasL-Expression hin. Die Arbeitsgruppe beschreibt die intrazelluläre Signalkette beginnend vom TCR-Komplex über die PKC θ , die zur Hochregulation der FasL-mRNA eine Stunde nach Bindung von anti-CD3 bei restimulierten Zellen führt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen berichten Prado et al., 2003 über die vollständige Hemmung der FasL-Expression durch spezifische Hemmung der PKC θ . Im Gegensatz dazu führten klassische Proteinkinase C-Inhibitoren zu einer vollständigen Hemmung der Perforin-Expression, während sie die Expression von FasL nur minimal inhibierten.

Bindungsstellen für NF- κ B befinden sich nicht nur am FasL-Gen, sondern auch in den Promoterregionen des Perforin- (Zhou et al., 2002) und Granzym B-Gens (Huang et al., 2006). Während die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem FasL-Gen von der PKC θ abhängt (Contini et al., 2005), beeinflusst IL2 die

Bindung von NF- κ B am Perforin (Zhou et al., 2002). Neuere Untersuchungen weisen auf die Existenz weiterer Transkriptionsfaktoren hin, die an der Regulation der Perforin- und Granzym B-Expression beteiligt sind. Sullivan et al., 2003 beschreibt die Rolle von T-bet, einem Transkriptionsfaktor aus der T-box Familie, bei der Differenzierung von CD8⁺ Effektorzellen. T-bet defiziente Effektorzellen weisen im Vergleich zum Wildtyp normale Proliferationsraten auf, können aber spezifische Zielzellen nicht lysieren. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wies die Arbeitsgruppe von Morishima et al., 2005 nach, dass T-bet defiziente Mäuse als Antwort auf eine IL27-Stimulation weder Perforin noch Granzym B exprimieren. Versuche an STAT1 defizienten Mäusen zeigten darüber hinaus, dass diese weder den Transkriptionsfaktor T-bet noch Perforin oder Granzym B hochregulieren konnten. Dies impliziert, dass bei der Regulation der Perforin- und Granzym B-Expression STAT1 dem T-bet vorgeschaltet ist.

Eine ebenfalls regulatorische Funktion im Rahmen der CD8⁺-Differenzierung wird Eomesodermin (Eomes), einem Transkriptionsfaktor aus der T-box Familie, zugeschrieben (Pearce et al., 2003). Eomes wird in allen Effektorzellen exprimiert und ist an der Induktion der Expression von IFN- γ , Perforin und Granzym B beteiligt. Eomes selbst wird unter anderem durch cKrox (zinc finger Transkriptionsfaktor) reguliert, der auch in der Enhancerregion des CD8-Gens bindet und somit an der Regulation der CD8- Expression beteiligt ist (Jenkinson et al., 2007).

Obwohl die vollständige Aufdeckung der regulatorischen Signalwege noch Gegenstand aktueller Forschung ist, gibt es Hinweise dafür, dass die Genexpression der Effektormoleküle beider zytotoxischen Mechanismen sowohl durch gemeinsame, als auch durch voneinander unabhängige Faktoren reguliert wird. Für die Expression von FasL scheint dabei PKC θ , für die Expression von Perforin IL2 eine Schlüsselrolle zu spielen. Es ist somit zumindest theoretisch möglich, dass die in dieser Arbeit durchgeführte 24-

stündige Stimulation mit anti-CD3 zu einer unterschiedlich schnellen bzw. unterschiedlich starken Aktivierung des Perforin- bzw. Fas-Systems führte.

5.2.3.3 Zusammenhang zwischen Zellzyklusprogression und Expression von Effektormolekülen

Die Arbeitsgruppe von Meng et al., 2006 postuliert, dass das Durchlaufen des Zellzyklus eine notwendige Voraussetzung für die Biosynthese von Perforin und Granzym B ist. Es stellt sich daher die Frage, welche Mechanismen die Zellzyklusprogression mit der Genexpression von Effektormolekülen verknüpfen.

Bei der Entwicklung von CD4⁺ Lymphozyten ist das Fortschreiten im Zellzyklus mit Veränderungen der DNA verknüpft, die die Zugänglichkeit verschiedener Zytokingene verändern und so die Differenzierung in T_{H1} bzw. T_{H2}-Zellen steuern (Grogan et al., 2001). Möglicherweise wird bei naiven CD8⁺ Lymphozyten in Analogie dazu die Freischaltung der Promoterregionen von Effektorprotein-Genen abhängig vom Zellzyklus reguliert.

Während der Entwicklung zu Effektorzellen kommt es vermutlich zu einer Modifikation der Genorte für Perforin und Granzym B, wodurch diese für die Transkription zugänglich werden. Lu et al., 2003 zeigte, dass die Perforinexpression außer über Transkriptionsfaktoren ebenfalls über Methylierungsprozesse an der DNA reguliert wird. Methylierungsprozesse führen über eine Modifikation der Histone zur Kondensation des Chromatins, wodurch dieses für Transkriptionsfaktoren unzugänglich wird (Attwood et al., 2002). Bei PHA stimulierten CD8⁺ Zellen wurde eine deutlich geringere Methylierung der Promoter- und Enhancerregionen des Perforin-Gens nachgewiesen als bei frisch isolierten Zellen (Lu et al., 2003). Außerdem führte eine irreversible Hemmung der Methylierung zur vermehrten Perforinexpression. Kishikawa, et al, 2003 zeigte, dass die DNA-Methylase DNMT1 in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert wird.

5.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Perforin nach 24-stündiger Stimulation von PMNC und CD8⁺ Lymphozyten zwar bei einem Teil der kleinen Zellen, nicht jedoch bei großen Blasten nachweisbar ist. Die fehlende Perforinexpression bei Blasten kann damit begründet werden, dass Blastenbildung und Zellteilung nach Aktivierung von T-Lymphozyten der Perforinexpression zeitlich vorausgehen oder sogar eine Voraussetzung dafür sind. Bei den kleinen Perforin-positiven Zellen könnte es sich demnach um Zellen handeln, die die Zellteilung bereits durchlaufen und Effektorfunktionen entwickelt haben (frisch differenzierte Effektorzellen). Eine weitere Publikation beschreibt, dass eine mindestens zweitägige Stimulation für die Expression von Perforin durch primär aktivierte CTLs notwendig ist (Kelso et al., 2002). Es ist somit wahrscheinlicher, dass es sich bei den kleinen Perforin-positiven Zellen um Gedächtniszellen handelt, die bereits vor der experimentellen Stimulation Perforin exprimierten (T_{EM}-Zellen) und sich laut mehreren Publikationen nach einer Re-Stimulation in Übereinstimmung mit meinen Daten nicht mehr zu Blasten entwickeln.

Für diese These spricht ebenfalls der in meiner Arbeit erbrachte Nachweis von etwa 30% Perforin-positiven Zellen in der Population der frisch isolierten unstimulierten Zellen sowie die Tatsache, dass sich der Anteil Perforin-positiver Zellen durch die Stimulation nicht signifikant veränderte. Bei den frisch isolierten unstimulierten Zellen in meiner Arbeit handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um eine einheitliche Population naiver Zellen. T_{EM}-Zellen könnten für die zytotoxische Wirkung der unstimulierten Zellen verantwortlich sein. Diese war zu über 90% Perforin-abhängig, während das Fas-System eine untergeordnete Rolle spielte. Da T_{EM} Zellen eine wichtige Rolle für die Infektabwehr, nicht jedoch bei der Aufrechterhaltung der vorwiegend Fas-abhängig regulierten Lymphozytenhomöostase spielen, wäre eine Dominanz des Perforin-System und eine geringere Bedeutung des Fas-Systems zudem mit der physiologischen Funktion dieser Zellen vereinbar.

Nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD3 war die Zytotoxizität im Vergleich zur unstimulierten Population verdoppelt und zu jeweils 50% Fas- und Perforin-abhängig. Die im Vergleich zu unstimulierten Zellen verstärkte Bedeutung des Fas-Systems bei stimulierten Zellen könnte dadurch bedingt sein, dass FasL im Rahmen der Aktivierungsvorgänge möglicherweise früher exprimiert wird als Perforin. Da unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Expression der Effektormoleküle beschrieben sind, ist eine unabhängige Regulation beider Systeme unter Umständen möglich. Auch das Zytokinmilieu, insbesondere ein im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen niedriger IL2-Spiegel, könnte für die verstärkte Bedeutung des Fas-Systems eine Rolle spielen.

Die zeitlichen und kausalen Zusammenhänge zwischen morphologischen Veränderungen von T-Zellen nach Aktivierung, der Expression bestimmter Oberflächenantigene und der Entwicklung von Effektorfunktionen sind jedoch komplex. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 kann als Zeichen des Ansprechens auf die durchgeführte Stimulation gewertet werden und geht zeitlich der Blastenbildung voraus. Zwar war der Anteil Perforin-positiver Zellen unter CD25-negativen höher als unter Zellen, die den Aktivierungsmarker exprimierten, ein eindeutiger Zusammenhang mit der Expression von Perforin ergab sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch nicht. Ebenso ist eine definitive Zuordnung Fas- und Perforin-vermittelter Mechanismen zu bestimmten CD8⁺ Subpopulationen nicht möglich, da beide Systeme auf mehreren Ebenen interagieren und sich funktionell ergänzen.

6. Zusammenfassung

Nach Stimulation von PMNC und CD8⁺ Lymphozyten mit anti-CD3 kann Perforin nur bei kleinen Zellen, nicht aber bei großen Blasten nachgewiesen werden. Basierend auf dieser Beobachtung war es das Ziel dieser Arbeit, mögliche Zusammenhänge zwischen der Blastenbildung und der Expression von Perforin festzustellen, und den Anteil der perforinabhängigen Zytotoxizität bei stimulierten und unstimulierten Zellen zu ermitteln.

Mononukleäre Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden isoliert und mit anti-CD3-Antikörpern aktiviert. Die Aktivierung bewirkte eine Größenzunahme bei einem Teil der Zellen, die als Zeichen für deren Eintritt in den Zellzyklus und die Transformation zu Blasten gewertet wurde. Diese Zellen waren Perforin-negativ. Die Oberflächenantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR, die als Aktivierungsmerkmale bekannt sind, wurden auf einen möglichen Zusammenhang mit der Zellgröße untersucht. Für die Expression keines der untersuchten Oberflächenmoleküle war die Blastenbildung eine Voraussetzung, denn alle wurden auch von einem Teil der kleinen Zellen exprimiert. Umgekehrt weist der hohe Anteil CD25-positiver Blasten darauf hin, dass die CD25-Expression der Blastenbildung zeitlich vorausgeht.

Da CD25 nicht von naiven Lymphozyten exprimiert wird, ist der erbrachte Nachweis von CD25 positiven Zellen in der Population der unstimulierten PMNC ein Zeichen dafür, dass sich darunter bereits antigenerfahrene Zellen befanden. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass in der unstimulierten Population ebenfalls Perforin-positive Zellen nachweisbar waren, die eine zytotoxische Wirkung auf Zielzellen hatten. Die Zytotoxizität dieser Zellen war zu 90% Perforin-abhängig, während das Fas-System eine untergeordnete Rolle spielte.

Im Einklang mit anderen Publikationen, wonach das Durchlaufen des Zellzykluses direkte Voraussetzung für die Entwicklung von Effektorfunktionen

ist, und die Expression von Perforin frühestens zwei Tage nach Stimulationsbeginn erfolgt, kann die Frage, warum Blasten kein Perforin exprimieren, damit beantwortet werden, dass diese in den aktiven Zellzyklus eingetreten sind, aber erst nach erfolgter Zellteilung Perforin exprimieren. Bei den kleinen Perforin-positiven Zellen nach anti-CD3-Stimulation könnte es sich um diejenigen Zellen handeln, die bereits den Zellzyklus durchlaufen haben und deswegen Perforin exprimierten.

Obgleich die 24-stündige Stimulation mit anti-CD3 bei PMNC und CD8⁺ Lymphozyten nur eine geringfügige Zunahme des Anteils Perforin-positiver Zellen bewirkte, kam es zu einer Verdoppelung der Zytotoxizität. Durch selektive Hemmung von Perforin- bzw. Fas-System zeigte sich, dass die Zytotoxizität stimulierter Zellen von beiden Systemen zu jeweils gleichen Teilen vermittelt wurde. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen gewann das Fas-System somit im Rahmen der Stimulation an Bedeutung. Als mögliche Ursache kommt eine stärkere Proliferation perforinnegativer, Fas-positiver Zellen in Frage, was zu einem relativen Übergewicht Fas-vermittelter Zytotoxizität führen könnte.

In der Literatur werden unterschiedliche Signalwege für die Genexpression der verschiedenen Effektormoleküle beschrieben. Dies und die Tatsache, dass FasL auf der einen Seite bzw. Perforin und Granzym B auf der anderen Seite durch unterschiedliche Zytokine hochreguliert werden, weist darauf hin, dass ihre Synthese unabhängig voneinander reguliert werden kann. Für die Expression von FasL scheint dabei PKC θ , für die Expression von Perforin IL2 eine Schlüsselrolle zu spielen. Es ist somit zumindest theoretisch möglich, dass die in dieser Arbeit durchgeführte 24-stündige Stimulation mit anti-CD3 zu einer unterschiedlich schnellen bzw. unterschiedlich starken Aktivierung des Perforin- bzw. Fas-Systems führte. Eine klare funktionelle Trennung ist allerdings nicht möglich, zumal sich beide Systeme gegenseitig beeinflussen und ergänzen.

7. Literatur

Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. (2005). Molecular Ordering of the Caspase Activation Cascade Initiated by the Cytotoxic T Lymphocyte/Natural Killer (CTL/NK) Protease Granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 4663–4673.

Ahmed R., Gray D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60.

Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, van Lier RA. (2003). IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood* **102**, 2541-2546.

Amlot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. (1996). Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue *Clin Exp Immunol.***105**, 176-182.

Andersen MH, Schrama D, Straten P, Becker J C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 32–41.

Arkwright PD, Rieux-Laucat F, Le Deist F, Stevens RF, Angus B, Cant AJ. (2000). Cytomegalovirus infection in infants with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 353–357.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 241-257.

Aung S, Graham BS. (2000). IL-4 diminishes perforin-mediated and increases Fas ligand-mediated cytotoxicity In vivo. *J Immunol.* **164**, 3487-3493.

Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med.* **196**, 493-503.

Berke G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* **81**, 9–12.

Bi LL, Pan G, Atkinson TP, Zheng L, Dale JK, Makris C, Reddy V, McDonald JM, Siegel RM, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. (2007). Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet.* **8**, 41-55.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512.

Bleesing JJ. (2003). Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Curr Pharm Des.* **9**, 265-278.

Blott EJ, Griffiths GM. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 122–131.

Boatright KM, Renshaw M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green D, Salvesen GS. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell.* **11**, 529-541.

Boursalian TE, Fink PJ. (2003). Mutation in Fas Ligand Impairs Maturation of Thymocytes Bearing Moderate Affinity T Cell Receptors. *The Journal of Experimental Medicine* **198**, 349-360.

Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, Trapani JA. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol.* **19**, 8604-8615.

Butz EA, Bevan MJ. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* **8**, 167-175.

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Förster R, Rowland-Jones S, Sékaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106-111.

Chan AC, Desai DM, Weiss A. (1994). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol.* **12**, 555-592.

Chen M, Wang J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **7**, 313-319.

Contini P, Ghio M, Merlo A, Poggi A, Indiveri F, Puppo F. (2005). Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *J Immunol.* **175**, 7244-7254.

Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**, 446-448.

de Vries JF, von dem Borne PA, van Luxemburg-Heijs SA, Heemskerk MH, Willemze R, Falkenburg JH, Barge RM. (2007). Differential activation of the death receptor pathway in human target cells induced by cytotoxic T lymphocytes showing different kinetics of killing. *Haematologica*. **92**, 1671-1678.

DeFranco AL. (1995). Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr Opin Cell Biol*. **7**,163-175.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* **22**, 8543–8567.

Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB Journal* **14**, 1265-1278.

Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, Calleja S, Gomez-Rial J, Roldan E, Morales P, Serrano A, Anel A, Paz-Artal E, Allende LM. (2006). A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **108**, 1306-1312.

Dustin ML. (2002). Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *J. Clin. Invest.* **109**, 155-160.

Fas SC, Fritzsching B, Suri-Payer E, Krammer PH. (2006). Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun.* **9**, 1-17.

Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. **81**, 935-946.

Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC (1996). Structure of the complex between human T cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134–141.

Goldberg AL, Rock KL. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**, 375-379.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* **23**, 515–548.

Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* **14**, 205-215.

Harty JT, Badovinac VP. (2002). Influence of effector molecules on the CD8⁺ T cell response to infection. *Curr. Opin.Immunol.* **14**, 360–365.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW., (2001). CD8⁺ T Cell Effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 275-308.

Ho P, Hawkins CJ. (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS Journal* **272**, 5436–5453.

Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1428–1440.

Holt OJ, Gallo F, Griffiths GM. (2006). Regulating secretory lysosomes. *J Biochem.* **140**, 7-12.

Holter W, Schwarz M, Cerwenka A, Knapp W. (1996). The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production. *Immunol Rev.* **153**, 107-122.

Huang C, Bi E, Hu Y, Deng W, Tian Z, Dong C, Hu Y, Sun B. (2006). A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription. *J Immunol.* **176**, 4173-4181.

Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89-95.

Itoh N, Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* **268**, 10932-10937.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233–243.

Jackson MR, Peterson PA. (1993). Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules. *Annu Rev Cell Biol.* **9**, 207-235.

Janas ML, Groves P, Kienzle N, Kelso A. (2005). IL2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8⁺ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol.* **175**, 8003-8010.

Janeway CA Jr. (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* **10**, 645-674.

Janka G, zur Stadt U. (2005). Familial and Acquired Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 82-88.

Jenkinson SR, Intlekofer AM, Sun G, Feigenbaum L, Reiner SL, Bosselut R. (2007). Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation. *J Exp Med.* **204**, 267-272.

Jiang Z, Podack E, Levy RB. (2001). Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4(+) donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis. *Blood* **98**, 390-397.

Kafrouni MI, Brown GR, Thiele DL. (2001). Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms. *J Immunol.* **167**, 1566-1574.

Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528-530.

Kaminski M, Kiessling M, Süss D, Krammer PH, Gülow K. (2007). Novel role for mitochondria: protein kinase C theta-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol.* **27**, 3625-3639.

Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, Takaku K, Kondo S, Yonehara S, Nagai K. (1996). Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* **156**, 3678-3586.

Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura, and H. Yagita. (1995). Metalloproteinase mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* **182**, 1777-1783.

Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman L. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* **23**, 249–262.

Kelso A, Costelloe EO, Johnson BJ, Groves P, Buttigieg K, Fitzpatrick DR. (2002). The genes for perforin, granzymes A-C and IFN-gamma are differentially expressed in single CD8(+) T cells during primary activation. *Int Immunol.* **14**, 605-613.

Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC, Liles WC. (1997). Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J. Immunol.* **159**, 1594–1598.

Kilgore NE, Ford ML, Margot CD, Jones DS, Reichardt P, Evavold BD (2004). Defining the parameters necessary for T cell recognition of ligands that vary in potency. *Immunol Res.* **29**, 29–40.

Kishikawa S, Murata T, Ugai H, Yamazaki T, Yokoyama KK. (2003). Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. *Nucleic Acids Res Suppl.* **3**, 307-308.

Knight SC, Stagg AJ. (1993). Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol.* **5**, 374-382.

Knox PG, Milner AE, Green NK, Eliopoulos AG, Young LS. (2003). Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. *J Immunol.* **170**, 677-685.

Kogawa K, Lee SM, Villanueva J, Marmer D, Sumegi J, Filipovich AH. (2002). Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood.* **99**, 61-66.

Kojima Y, Kawasaki-Koyanagi A, Sueyoshi N, Kanai A, Yagita H, Okumura K. (2002). Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* **296**, 328-336.

Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev.* **193**, 58-69.

Kuhlman P, Moy VT, Lollo BA, Brian AA. (1991). The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation. *J Immunol.* **146**, 1773-1782.

Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ (1997). Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 859-865.

Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P. (2004). Caspase- 12: an overview. *Cell Death Differ.* **11**, 365–368.

Lea NC, Orr SJ, Stoeber K, Williams GH, Lam EW, Ibrahim MA, Mufti GJ, Thomas NS. (2003). Commitment point during G0-->G1 that controls entry into the cell cycle. *Mol Cell Biol.* **23**, 2351-2361.

Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 1374-1378.

Lieberman J. (2003a). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* **3**, 361-370.

Lieberman J, Fan Z. (2003b). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol.* **15**, 553-559.

Lin J, Weiss A. (2001). T cell receptor signalling. *J Cell Sci.* **114**, 243-244.

Lu Q, Wu A, Ray D, Deng C, Attwood J, Hanash S, Pipkin M, Lichtenheld M, Richardson B. (2003). DNA methylation and chromatin structure regulate T cell perforin gene expression. *J Immunol.* **170**, 5124-5132.

Maeda Y, Levy RB, Reddy P, Liu C, Clouthier SG, Teshima T, Ferrara JL. (2005). Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8⁺ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood.* **105**, 2023-2027.

Malek TR, Yu A, Scibelli P, Lichtenheld MG, Codias EK. (2001). Broad programming by IL2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol.* **166**, 1675-1683.

Manicassamy S, Gupta S, Sun Z. (2006). Selective function of PKC-theta in T cells. *Cell Mol Immunol.* **3**, 263-270.

Marks L, Altman NH, Podack ER, Levy RB. (2004). Donor T cells lacking Fas ligand and perforin retain the capacity to induce severe GvHD in minor histocompatibility antigen mismatched bone-marrow transplantation recipients. *Transplantation* **77**, 804-812.

Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J. (2000). Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF- κ B-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett.* **468**, 134–136.

Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, André N, Florin B, le Deist F, Picard C, Fischer A, Rieux-Laucat F. (2007). Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood* **110**, 4285-4292.

Meng Y, Harlin H, O'Keefe JP, Gajewski TF. (2006). Induction of cytotoxic granules in human memory CD8⁺ T cell subsets requires cell cycle progression. *J Immunol.* **177**, 1981-1987.

Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA, Froelich CJ. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* **16**, 417-428.

- Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee JY, Raja MS, Froelich CJ (2003). Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **160**, 875–885.
- Mitchison JM. (2003). Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol.* **226**, 165-258.
- Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T. (2005). Augmentation of effector CD8⁺ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL27. *J Immunol.* **175**, 1686-1693.
- Munitic I, Ryan PE, Ashwell JD. (2005). T cells in G1 provide a memory-like response to secondary stimulation. *J Immunol.* **174**, 4010-4018.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. (1998). Counting antigen-specific CD8⁺ T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187.
- Musabak U, Sengul A, Oktenli C, PayS, Yesilova Z, Kenar L, Sanisoglu SY, Inal A, Tuzun A, Erdil A, Bagci S. (2004). Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol.* **138**, 526–533.
- Nagata S, Golstein P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449–1456.
- Nagata S. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* **406**, 119-124.
- Oehen S, Brduscha-Riem K. (1998). Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: Correlation of effector function with phenotype and cell division. *J. Immunol.* **161**, 5338-5346.
- Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump WL 3rd, Grimm EA. (1992). DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* **140**, 197-205.
- Pardo J, Buferne M, Martínez-Lorenzo MJ, Naval J, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C, Anel A. (2003). Differential implication of protein kinase C isoforms in cytotoxic T lymphocyte degranulation and TCR-induced Fas ligand expression. *Int Immunol.* **15**, 1441-1450.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao CA, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. (2003). Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041-1043.

Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**, 669-676.

Pieters J. (2000). MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol.* **2000**, 159-208.

Pinkoski MJ, Green DR. (1999). Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ.* **6**, 1174–1181.

Pinkoski MJ, Hobman M, Heibein JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, Froelich CJ, Bleackley RC. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* **92**, 1044-1054.

Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC, Green DR. (2001). Granzyme B-mediated Apoptosis Proceeds Predominantly through a Bcl-2-inhibitable Mitochondrial Pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 12060-12067.

Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K, Metkar SS, Froelich CJ. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem.* **277**, 49523-49530.

Rieux-Laucat F, Le Deist L, Fischer A (2003). Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation* **10**, 124–133.

Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini JC, Leyvraz S, Roosnek E, Nabholz M, Romero P. (2003). Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood.* **102**, 779-787.

Russell JH, Ley TJ. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* **20**, 323-370.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* **22**, 745-763.

Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P. (2005). Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ effector memory T cells. *J Immunol.* **175**, 1433-1439.

Selin LK, Welsh RM. (1997). Cytolytically active memory CTL present in lymphocytic choriomeningitis virus-immune mice after clearance of virus infection. *J Immunol.* **158**, 5366-5373.

Sharif-Askari E, Alam A, Rhéaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J, Sékaly RP. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* **20**, 3101-3113.

Sheikh MS, Huang Y. (2003). The FADD is going nuclear. *Cell Cycle.* **2**, 346-347.

Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S. (2006). Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4⁺ and CD8⁺ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol.* **80**, 827-837.

Shi L, Keefe D, Durand E, Feng H, Zhang D, Lieberman J. (2005). Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J Immunol.* **174**, 5456-5461.

Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med.* **185**, 855-866.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **6**, 1067-1074.

Smith KA. (2004). The quantal theory of how the immune system discriminates between "self and non-self". *Med Immunol.* **3**, 3.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755–760.

Spits H, Yssel H, Leeuwenberg J, De Vries JE. (1985). Antigen-specific cytotoxic T cell and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal antibodies against T3. *Eur J Immunol.* **15**, 88-91.

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V. (1999). Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* **286**, 1957-1959.

Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR, Strand D. (2004). Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene* **23**, 3732-3736.

Su MW, Pyarajan S, Chang JH, Yu CL, Jin YJ, Stierhof YD, Walden P, Burakoff SJ. (2004). Fratricide of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing. *Eur J Immunol.* **34**, 2459-2470.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169–1178.

Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, von Herrath M, Glimcher LH. (2003). Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 15818-15823.

Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ (2006). The Cytoplasmic Domain of Fas Ligand costimulates TCR Signals. *J Immunol.* **177**, 1481–1491.

Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med.* **192**, 403-414.

Suzuki I, Martin S, Boursalian TE, Beers C, Fink PJ. (2000). Fas Ligand Costimulates the In Vivo Proliferation of CD8⁺ T Cells. *J Immunol.* **165**, 5537-5543.

Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. (2004). Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4⁺ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood* **104**, 3243-3248.

Tamang DL, Redelman D, Alves BN, Vollger L, Bethley C, Hudig D. (2006). Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL2 or IL-15 without antigens: multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal. *Cytokine* **36**, 148-159.

Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* **12**, 621-632.

Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. (2002). Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol.* **168**, 5538-5550.

Tomiyama H, Takata H, Matsuda T, Takiguchi M. (2004). Phenotypic classification of human CD8⁺ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur J Immunol.* **34**, 999-1010.

Trapani JA., 2001. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* **2**, 3014.1-3014.7.

Trapani JA, Smyth MJ. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* **2**, 735–747.

van der Burg M, de Groot R, Comans-Bitter WM, den Hollander JC, Hooijkaas H, Neijens HJ, Berger RM, Oranje AP, Langerak AW, van Dongen JJ. (2000). Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease? *Pediatr. Res.* **47**,336–343.

Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG. (1980). OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol.* **124**, 2708-2713.

Veugelers K, Motyka B, Goping IS, Shostak I, Sawchuk T, Bleackley RC. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell.* **17**, 623-633.

Waterhouse NJ, Sedelies KA, Browne KA, Wowk ME, Newbold A, Sutton VR, Clarke CJ, Oliaro J, Lindemann RK, Bird PI, Johnstone RW, Trapani JA. (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **280**, 4476-4482.

Waterhouse NJ, Sedelies KA, Trapani JA. (2006). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol.***84**, 72-78.

Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA. (1991). Signal transduction by the T cell antigen receptor. *Semin Immunol.* **3**,313-324.

Wolf BB, Green DR. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* **274**, 20049-20052.

Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. (2004). Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* **199**, 925-936.

Wu D, Ingram A, Lahti JH, Mazza B, Grenet J, Kapoor A, Liu L, Kidd VJ, Tang D. (2002). Apoptotic Release of Histones from Nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **277**, 12001-12008.

Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. (1996). Fas Ligand Mutation in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus and Lymphoproliferative Disease. *J.Clin.Invest.* **98**, 1107–1113.

Xiao S, Zhang X, Mann KK, Jodo S, Li L, Jarjour WN, Marshak-Rothstein A, Sherr DH, Ju ST. (2004). Changes in sensitivity of peripheral lymphocytes of autoimmune gld mice to FasL-mediated apoptosis reveal a mechanism for the preferential deletion of CD4-CD8-B220⁺ T cells. *International Immunology* **16**, 759-766.

Yamamoto K, Shibata F, Miyasaka N, Miura O. (2002). The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **297**, 1245-1252.

Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaito M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M. (2003). Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4⁺ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. *J Immunol.* **170**, 2205-2213.

Yasukawa M, Ohnishi H, Arai J, Kasahara Y, Ishida Y, Fujita S. (2000). Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. *Blood.* **95**, 2352-2355.

Young JD, Cohn ZA, Podack ER. (1986). The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* **233**, 184-190.

Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. (2001a) Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5746-5751.

Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J. (2001b). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J. Biol. Chem.* **276**, 3683-3690.

Zhang J, Xu X, Liu Y. (2004). Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol.* **1**, 186-192.

Zhou J, Zhang J, Lichtenheld MG, Meadows GG. (2002). A role for NF-kappa B activation in perforin expression of NK cells upon IL2 receptor signaling. *J Immunol.* **169**, 1319-1325.

Zinkernagel RM. (1997). The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Scand J Immunol.* **46**, 421-436.

Zuccato E, Blott EJ, Holt , Sigismund S, Shaw M, Bossi G, Griffiths GM. (2007). Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *Journal of Cell Science* **120**, 191-199.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Günther Dannecker bedanken, ohne dessen Hilfe diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Für die geduldige Unterstützung, raschen Rückmeldungen und schnelle Korrektur gilt ihm ein besonderes Dankeswort. Besonderer Dank gilt auch Luciana Dannecker für die unermüdliche Motivationsarbeit und Einweisung im „liebvollen Umgang“ mit Zellkulturen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die schöne Zeit und die netten Gespräche bedanken.

Recht herzlich gedankt sei auch allen Personen, die Blut für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums, meinen Schwiegereltern für die Kinderbetreuung während der Fertigstellung und besonders meiner Frau für die geduldige Ermutigung und tatkräftige Unterstützung.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Tanase, Daniel
Geburtsdatum/-ort:	04.07.1974 in Sathmar (Rumänien)
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung:

1980-1984	Grundschule in Sathmar (Rumänien)
1984-1988	Gymnasium in Sathmar
1988-1994	Collegium Augustinianum Gaesdonck – Bischöfliches Gymnasium mit Internat bei Goch (Deutschland)

Praktische Erfahrungen:

08/ 1994 – 11/ 1995	Zivildienst im Bürgerhospital Stuttgart
12/ 1995 - 03/ 1996	Beschäftigung als Pflegehelfer im Bürgerhospital Stuttgart

Studium:

05/ 1996	Aufnahme des Medizinstudiums an der Eberhard- Karl-Universität Tübingen
03/ 1999	1. Staatsexamen
04/ 2002	2. Staatsexamen
04/ 2003	3. Staatsexamen

Beruf:

07/ 2003 – 06/ 2004	Assistenzarzt am Oberwalliser Kantonspital Brig auf der pädiatrisch/ gynäkologischen Station
06/2004 – 12/ 2005	Assistenzarzt am Oberwalliser Spitalzentrum Schwerpunkt-Standort für Pädiatrie und Geburtshilfe Visp
seit 02/2006	Assistenzarzt am Hegau-Bodensee-Klinikum Singen Klinik für Kinder und Jugendliche

Hilzingen, 22.02.2009