

# Charakterisierung der Funktion und Expression des Tetraspanins CD53 in der Immunantwort von T-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Lara Katharina Olejnik**

aus Oberhausen

Düsseldorf, Juni 2023

aus dem Institut für Virologie  
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jörg Timm
2. Prof. Dr. Philipp Lang

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2023

## Zusammenfassung

Tetraspanine sind Transmembranproteine, die über die Bindung ihrer Interaktionspartner die zelluläre Membran organisieren. Innerhalb der sogenannten Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen bilden sie ein Gerüst und bringen somit sowohl Membranproteine als auch zytoplasmatische Signalproteine in räumliche Nähe. Dabei weisen die 33 Tetraspanin-Familienmitglieder sowohl überlappende als auch spezifische Interaktionen auf, mittels welcher sie verschiedenste Ebenen zellulärer Prozesse beeinflussen. Während die meisten Tetraspanine ubiquitär exprimiert werden, findet sich CD53 fast ausschließlich im Immunzellkompartiment wieder und ist somit vermutlich essenziell für die Organisation und Regulation immunzellspezifischer Proteine. In der Vergangenheit wurde CD53 vor allem mit Hilfe von Mausmodellen oder verschiedenen Zelllinien untersucht, sodass bisher ein eher lückenhaftes Bild der funktionalen Rolle von CD53 auf humanen, primären Immunzellen besteht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Charakterisierung des CD53-Proteins auf humanen, primären T-Zellen als Vertreter der adaptiven Immunzellantwort erfolgen.

T-Zellen sind im Gegensatz zu anderen Immunzell-Populationen in der Lage ein Immungedächtnis auszubilden, das dem Körper erlaubt, auf ein bereits bekanntes Pathogen schnell zu reagieren. CD53 akkumuliert dabei besonders stark auf CD8+ Effektor-Gedächtniszellen, welche durch ein hohes zytotoxisches Potenzial gekennzeichnet sind. Diese Zellen haben durch einen wiederholten Antigenkontakt bereits einige Zellteilungen durchschritten und nähern sich einem immunoseneszenten Zustand, welcher u.a. durch die Expression des Markers CD57 charakterisiert wird. CD53 weist auf dieser seneszenten Population eine hohe Grundexpression auf. Somit kennzeichnet CD53 *ex vivo* eine T-Zellpopulation, die häufig durch Antigen-Stimulation aktiviert wurde und sich einem stabilen und terminalen Zellzyklusarrest nähert.

Im Kontext einer solchen Immunzellstimulation wird CD53 auf der Oberfläche von aktivierten CD8+ T-Zellen verstärkt exprimiert und findet sich anschließend in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD38. Dabei beeinflusst es die Stabilität seiner beiden Interaktionspartner CD25 und CD69 während einer Aktivierung positiv und unterstützt darüber hinaus die IFN $\gamma$ -Produktion. Dabei ist CD53 nicht nur während der Aktivierung selbst entscheidend, sondern bestimmt bereits im ruhenden Zustand darüber, wie gut sich eine CD8+ T-Zelle später aktivieren lässt und wie stark sie mit einer IFN $\gamma$ -Produktion reagiert.

Über welche Membranproteine CD53 jedoch die IFN $\gamma$ -Produktion beeinflusst und mit welchen Signalproteinen es interagiert, sollte mit der Aufschlüsselung des intrazellulären CD53-Interaktoms beantwortet werden. Dazu wurde eine CD53-Biotin-Identifikation (BioID) durchgeführt, bei der alle Proteine im 10 nm Umkreis des Fusionskonstruktes aus CD53 und Biotinligase BirA\* biotinyliert werden und nach Isolation und Anreicherung massenspektrometrisch identifiziert werden können. Hierbei

wurden mit CD43, CD98hc, CD147 Membranproteine als interessante Kandidaten ermittelt, die als potenzielle Partnerproteine von CD53 agieren können und möglicherweise erklären, wie CD53 die IFN $\gamma$ -Produktion beeinflusst. Auch das zytoplasmatische Lcp1, welches als Aktin-bindendes Protein u.a. an der Formation der immunologischen Synapse beteiligt ist, wurde als potenzielles CD53-Bindeprotein ermittelt. Diese Interaktion ergänzt nun das Bild der CD53-vermittelten Regulation von CD25 und CD69, da Lcp1 am Transport dieser beiden Aktivierungsmarker zur Plasmamembran beteiligt ist. Neben Lcp1 wurden außerdem eine Vielzahl weiterer Proteine identifiziert, die mit der immunologischen Synapse verknüpft sind. Dies verdeutlicht die zentrale und orchestrierende Rolle von CD53 in der Immunzellaktivierung von T-Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD53 durch ein breites Bindungsspektrum die proinflammatorische Immunantwort von CD8 $^+$  T-Zellen positiv moduliert. Dabei fungiert die CD53-Expression auf ruhenden CD8 $^+$  T-Zellen als Prädiktor für deren spätere Aktivierbarkeit. Dies macht CD53 zu einem interessanten Kandidaten für die Kontrolle chronisch aktivierter T-Zellen. Durch eine pharmakologische Inhibition von CD53, z.B. mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, könnten die CD53-spezifischen Interaktionen und Signalwege gestört oder reduziert werden, was eine ungewollte, überschießende Immunantwort von CD8 $^+$  T-Zellen minimieren würde.

## Abstract

Tetraspanins represent a family of membrane-spanning proteins that organize the cellular membrane by binding their manifold interaction partners. Within the so-called tetraspanin-enriched microdomains, they act as scaffold and thereby bring both membrane proteins and cytoplasmic signaling proteins into spatial proximity. The 33 tetraspanin family members possess both overlapping and specific interactions by which they influence various levels of cellular signaling processes. Whereas most tetraspanins show are ubiquitously expressed, CD53 is found almost exclusively in the immune cell compartment and is thereby thought to be essential for the organization and regulation of immune cell-specific proteins. Because in the past CD53 has been studied mainly by using mouse models or cell lines, its functional role on human primary immune cells has not yet been fully understood. Therefore, this work aimed to characterize the CD53 protein expression and its functional role on human primary T cells as an important part of the adaptive immune cell response.

In contrast to other immune cell populations, T cells are able to form an immune memory that allows the body to react quickly to an already encountered pathogen. CD53 accumulates particularly on CD8<sup>+</sup> effector memory cells, which are characterized by a high cytotoxic potential. Such cells have already undergone several cell divisions because of repeated antigen contact and are entering an immunosenescent state, which is characterized by the expression of the marker CD57. CD53 exhibits a high basal expression on this senescent population. Thus, CD53 *ex vivo* characterizes a T cell population that has been frequently activated by antigen stimulation and is approaching a stable and terminal cell cycle arrest.

In context of such immune cell activation, CD53 expression is increased on the surface of activated CD8<sup>+</sup> T cells and is subsequently found in spatial proximity to the activation markers CD25, CD69, and CD38. Thereby, it positively influences the stability of its two interaction partners CD25 and CD69 during activation and is furthermore required for efficient IFN $\gamma$  production. In addition to this essential role during the activation process, the basal CD53 expression on resting CD8<sup>+</sup> T cells correlates directly with their later activation intensity and how strongly it responds with IFN $\gamma$  production.

To identify which CD53-interacting membrane proteins and intracellular signaling proteins are required for its role in IFN $\gamma$  production, a CD53 biotin identification (BioID) was performed, which results in the biotinylation of all proteins within 10 nm of a fusion construct of CD53 and biotin ligase BirA\*. These biotin-modified proteins then can be analyzed by mass spectrometry after isolation and enrichment. Here, the membrane proteins CD43, CD98hc and CD147 were identified as potential partner proteins of CD53 and may explain how CD53 affects IFN $\gamma$  production. Cytoplasmic Lcp1, which is an actin-binding protein involved in, among other things, the formation of the immunological synapse,

was also recognized as a potential CD53 binding protein. This interaction would fit into a model for the CD53-mediated regulation of CD25 and CD69, as Lcp1 is involved in the transport of these two activation markers to the plasma membrane. In addition to Lcp1, a variety of other proteins that have been linked to the immunological synapse were also enriched in the presence of the fusion construct. This highlights the central and orchestrating role of CD53 in immune cell activation of T cells.

In summary, CD53 was shown to positively modulate the proinflammatory immune response of CD8+ T cells by binding a broad variety of partners. Concordantly, CD53 expression on resting CD8+ T cells acts as a predictor for their subsequent activation potential. Thus, CD53 represents an interesting candidate for the control of chronically activated T cells. Treatment with pharmacological antibodies directed against CD53 could disrupt or reduce CD53-specific interactions and signaling pathways, which would minimize unwanted, exuberant immune responses by CD8+ T cells.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungen.....	IX
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die T-Zell vermittelte Immunität.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Priming</i> von naiven T-Zellen in lymphatischen Organen.....	2
1.1.2. Die immunologische Synapse.....	3
1.1.3. CD8+ T-Effektorzellen: Zytotoxische Abwehr.....	5
1.1.4. Das T-Zell-Gedächtnis.....	5
<b>1.2. Tetraspanine als Organisatoren der immunologischen Plasmamembran.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Strukturelle Merkmale der Tetraspanin-Familie.....	7
1.2.2. Das Tetraspanin CD53.....	9
<b>1.3. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Material &amp; Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1. Geräte, Reagenzien und Puffer.....	8
2.2. Plasmide.....	9
2.3. Patientenproben.....	10
2.3.1. Gesunde Spender.....	10
2.3.2. Therapienaive HIV-Patienten.....	11
2.4. Zelllinien.....	11
2.4.1. Jurkat.....	11
2.4.2. HEK293T.....	11
2.5. Arbeiten mit Zelllinien.....	11
2.5.1. Kultivierung von Zelllinien.....	11
2.6. Arbeiten mit primären Zellen.....	12
2.6.1. Isolation und Kryokonservierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes	12
2.6.2. Auftauen von kryokonservierten PBMCs.....	13
2.6.3. Kultivierung von PBMCs.....	13
2.6.4. Isolation von CD8+ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS®).....	13
2.6.5. Unspezifische Aktivierung von T-Zellen.....	14
2.6.6. Spezifische Aktivierung von T-Zellen.....	15
2.6.7. Expansion CMV-spezifischer T-Zellen.....	15

2.7. Analyse der T-Zell-spezifischen Proteinexpression mittels Durchfluss-zytometrie .....	15
2.7.1. Oberflächenfärbung von Membranproteinen .....	16
2.7.2. Intrazelluläre Proteinfärbung.....	18
2.7.3. Sortierung von CD8+ T-Zellen in CD53 <sup>niedrig</sup> und CD53 <sup>hoch</sup> .....	18
2.8. Identifikation von Protein-Proteininteraktionen.....	19
2.8.1. Duolink® <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	19
2.8.2. Nähe-abhängige Biotin-Identifikation (BioID) .....	21
2.9. Statistische Analyse .....	25
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1. CD53 markiert eine spezifische CD8+ T-Zell-Population .....	26
3.1.1. Basale Oberflächenexpression des Tetraspanins CD53 auf humanen Lymphozyten .....	26
3.1.2. CD53 markiert Antigen-erfahrene CD8+ T-Zellen .....	27
3.1.3. CD53 im Kontext von Viruserkrankungen mit Zunahme der CD57-Frequenz.....	32
3.2. CD53 als Regulator der proinflammatorischen Immunantwort von CD8+ T-Zellen.....	34
3.2.1. Eine Immunzellaktivierung verändert die CD53-Expression .....	34
3.2.2. CD53 wird nur auf den T-Zellen hochreguliert, die auf einen Stimulus reagieren .....	36
3.2.3. CD53 agiert als ein Aktivierungsmarker auf CD8+ T-Zellen .....	42
3.2.4. CD53 befindet sich nach Aktivierung in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker .....	43
3.2.5. CD53 beeinflusst die proinflammatorische Immunantwort.....	46
3.3. Das T-Zell-spezifische CD53-Interaktom .....	47
3.3.1. Potenzielle Interaktionspartner des Tetraspanins CD53 in Jurkat-T-Zellen .....	48
3.3.2. Einfluss einer Interleukin-Stimulation auf das CD53-Proteinnetzwerk .....	53
3.3.3. Einfluss der Proteindomänen auf das CD53-Proteinnetzwerk.....	53
3.4. CD53 als Prädiktor der Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen .....	55
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1. CD53 auf ruhenden, immunoseneszenten CD8+ T-Zellen .....	59
4.2. Die Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen wird durch die CD53-Expression bestimmt .....	61
4.2.1. CD53 reguliert die proinflammatorische Immunantwort .....	62
4.3. CD53 besitzt ein komplexes Proteinnetzwerk in Jurkat T-Zellen .....	64
4.3.1. Zusammenfassender Überblick über das Proteinnetzwerk des Tetraspanins CD53 .....	68
4.4. Ausblick.....	71
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>92</b>
<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>95</b>

Danksagung.....	96
Eidesstattliche Erklärung.....	97

## Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP2B4	Plasmamembran-Calcium-transportierende ATPase 4
BFA	Bredfeldin A
BioID	Biotin Identifikation
BirA*	Biotinligase R118G
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Rinderalbumin
CCR7	C-C-Chemokin-Rezeptor 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD98hc	CD98 <sub>heavy chain</sub> , CD98 <sub>schwere Kette</sub> , <i>Solute Carrier Family 3 Member 2 (SLC3A2)</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i> ; Zytomegalie-Virus
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i> , Coronavirus-Krankheit-2019
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPB41L2	Band 4.1 ähnliches Protein 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-Zwischenkompartiment
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; Fetales Kälberserum
fw	<i>forward</i> , vorwärts
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
Gimap5	GTPase des Immunitäts-assoziierten Proteins 5
GrzB	Granzym B
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IC	Intrazelluläre Schleife
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin

---

kDa	Kilodalton
KLRG1	Killer-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor 1
Lck	Lymphozyten-spezifische Tyrosinkinase
Lcp1	<i>lymphocyte cytosolic protein 1</i> , L-Plastin
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> , Lymphozytenfunktion-assoziertes Antigen 1 (CD11a/CD18)
LiCl	Lithiumchlorid
MACS	Magnetische Zellseparation
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
Na-DOC	Natrium-Deoxycholat
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDZ	Akronym für <i>Postsynaptic density 95</i> , <i>Discs large</i> , <i>Zonula occludens-1</i>
PLA	Proximity Ligation Assay
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTM	Posttranslationale Modifikation
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMAC	Supramolekulares Aktivierungscluster
SNARE	lösliche N-Ethylmaleimid-empfindliche Faktor-Anheftungsprotein-Rezeptor-Proteine
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T <sub>CM</sub>	<i>central memory T cell</i> , Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TEM	Tetraspanin angereicherte Mikrodomäne

TEMED	Tetramethylethyldiamin
T <sub>EMRA</sub>	<i>effector memory T cell re-expressing CD45RA</i> , terminaldifferenzierte Effektor-Gedächtniszelle mit Re-Expression von CD45RA
TFRC	Transferrin-Rezeptor, CD71
TM	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
Zap70	Zeta-Kette der T-Zell-Rezeptor-assoziierten Proteinkinase 70

## 1. Einleitung

### 1.1. Die T-Zell vermittelte Immunität

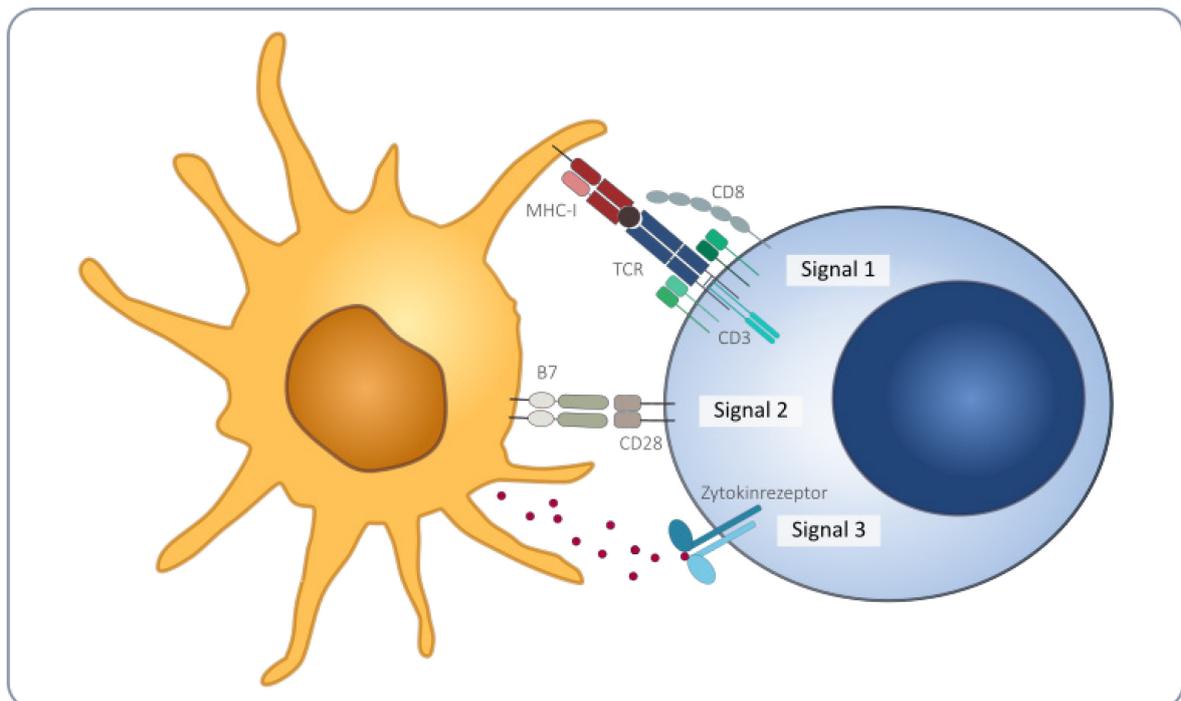
Das humane Immunsystem dient sowohl der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen als auch dem Schutz vor malignen Zellentartungen im Rahmen einer Krebserkrankung. Dabei können Immunzellen und humorale Faktoren des Immunsystems in die angeborene, unspezifische und die adaptive, spezifische Immunität eingeteilt werden. Die Immunzellen der angeborenen Immunität (Granulozyten, NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen) erkennen Pathogenbestandteile innerhalb kürzester Zeit über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren als körperfremd und bilden somit eine erste Verteidigungslinie. Die adaptive Immunität (T- und B-Zellen) reagiert zwar langsamer, ist dafür jedoch sehr spezifisch gegen das Pathogen gerichtet und ermöglicht die Ausbildung eines Immungedächtnisses (Parkin und Cohen 2001; Chaplin 2010).

T-Zellen gehören zur adaptiven Immunität und sind über ihren heterodimeren T-Zellrezeptor (TCR) in der Lage, Fremdpeptide zu erkennen, wobei jede T-Zelle mittels ihres einzigartigen TCRs ein anderes, spezifisches Antigen bindet. Diese einzigartige Spezifität des TCRs entsteht durch somatische Rekombination während der T-Zellreifung im Thymus und ermöglicht eine breite Immunität gegen zahlreiche Pathogene (Kranzel 2009; Market und Papavasiliou 2003). Der TCR selbst besteht aus zwei Ketten (für gewöhnlich  $\alpha$  und  $\beta$  oder, seltener,  $\gamma$  und  $\delta$ ), die über eine Disulfidbrücke verbunden sind und die Membran durchspannen. Um nach Antigenbindung Signale intrazellulär weiterleiten zu können, ist der TCR von der nicht-kovalenten Assoziation mit CD3 abhängig, welches im Gegensatz zum TCR ausgeprägte intrazelluläre Domänen besitzt, die über ihre Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs) eine Signaltransduktion ermöglichen (Samelson 1985; Wegener et al. 1995; Brenner et al. 1985; Wucherpfennig et al. 2010).

Damit eine naive T-Zelle den Organismus vor Pathogenen schützen kann, zirkuliert diese in Abhängigkeit von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz). Innerhalb dieser verweilen die naiven T-Zellen, um hier dendritische Zellen (DCs) auf Fremdpeptide zu kontrollieren und ihr spezifisches Antigen zu finden (Ebert et al. 2005; Butcher und Picker 1996; Banchereau und Steinman 1998; Andrian und Mackay 2000). Die Präsentation des Fremdpeptids erfolgt dabei über Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Moleküle. Diese werden im humanen System auch als HLA-Moleküle (*Human Leucocyte Antigen*, menschliches Leukozytenantigen) bezeichnet.

### 1.1.1. *Priming* von naiven T-Zellen in lymphatischen Organen

Während die naive T-Zelle eine Antigen-präsentierende Zelle (APC, vor allem dendritische Zellen und Monozyten) auf Fremdpeptide untersucht, sorgt die Interaktion von Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden (z.B. LFA-1 auf T-Zellseite mit ICAM auf APC-Seite, CD2 auf T-Zellseite mit LFA-3 auf APC-Seite) für einen ausreichenden Kontakt zwischen den Zellen. Erkennt jedoch eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen, findet eine Bindung zwischen TCR und dem MHC-Peptid-Komplex statt, welche über die Bindung von CD4 bzw. CD8 an das jeweilige MHC-Molekül stabilisiert wird. Dieses erste Aktivierungssignal führt schließlich zur Konformationsänderung von LFA-1 auf der T-Zelle, sodass die Affinität zum Ligand ICAM auf der APC erhöht wird. Gleichzeitig bewirken Veränderungen des Zytoskeletts die Ausbildung der immunologischen Synapse (1.1.2), um eine effektive intrazelluläre Signalweiterleitung zu erreichen (Smith-Garvin et al. 2009).



**Abbildung 1: *Priming* von naiven T-Zellen (blau) durch Dendritische Zellen (gelb).** Damit es zur Aktivierung einer naiven T-Zelle kommt, werden insgesamt drei Signale benötigt. Die Bindung des MHC-Peptid-Komplexes über den T-Zell-Rezeptor (TCR) leitet die Aktivierung ein. Zusätzlich werden kostimulatorische Signale über die B7-CD28-Interaktion und proinflammatorische Zytokine benötigt.

Für eine vollständige Aktivierung der naiven T-Zelle werden jedoch neben der Antigenbindung noch zwei weitere Signale benötigt (Abbildung 1). Die kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 und CD86 auf APCs interagieren mit dem CD28-Molekül auf T-Zellen, was die Proliferation durch den Eintritt der T-Zelle in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus induziert und in diesen zur Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 führt (Boonen et al. 1999). Zudem wird auf T-Zell-Seite

nun die CD25-Expression induziert. Hierbei handelt sich um die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors, welcher erst durch CD25 in seine hochaffine, heterotrimere Form überführt wird. Die Bindung von IL-2 an diesen Rezeptor führt schließlich über eine Signalkaskade zur Proliferation der T-Zelle (Gaffen 2001; Acuto O 2003). Als drittes Signal fungieren proinflammatorische Zytokine der APC oder der T-Zelle selbst (Curtsinger und Mescher 2010), die die Differenzierung in verschiedene Effektorzellen einleitet. So differenzieren CD4+ T-Zellen in unterschiedliche T-Helfer-Subpopulationen, während naive CD8+ T-Zellen zu zytotoxischen CD8+ T-Zellen werden. All diese Effektorzellen benötigen für eine Aktivierung nun keine weiteren kostimulatorischen Signale mehr, wandern nicht mehr durch periphere lymphatische Organe und exprimieren nun andere Adhäsionsmoleküle, um am Infektionsherd in das entzündete Gewebe eindringen zu können. Beispielsweise werden vermehrt Integrine exprimiert, während L-Selektin und der C-C-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) nicht mehr für eine Lymphknoten-Rezirkulation benötigt werden. (London et al. 2000; Schweitzer und Sharpe 1998; Mora und Andrian 2006).

Da CD8+ T-Zellen als differenzierte Effektorzelle die präsentierende Zelle unmittelbar nach Antigenkontakt durch Einleiten des programmierten Zelltods (Apoptose) eliminieren, benötigen sie vermutlich im Rahmen einiger Viruserkrankungen während des *Primings* mehr kostimulatorische Signale als CD4+ T-Zellen (Andreasen et al. 2000; Seder und Ahmed 2003). Damit das *Priming* von CD8+ T-Zellen hier erfolgreich verlaufen kann, unterstützen CD4+ T-Zellen zusätzlich diesen Prozess. Dies geschieht, indem sie an die gleiche APC binden und zur vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen auf dieser führen. Zudem bilden CD4+ T-Zellen große Mengen IL-2, was zusätzlich die klonale Expansion und Differenzierung der naiven CD8+ T-Zelle unterstützt (Zhang et al. 2009).

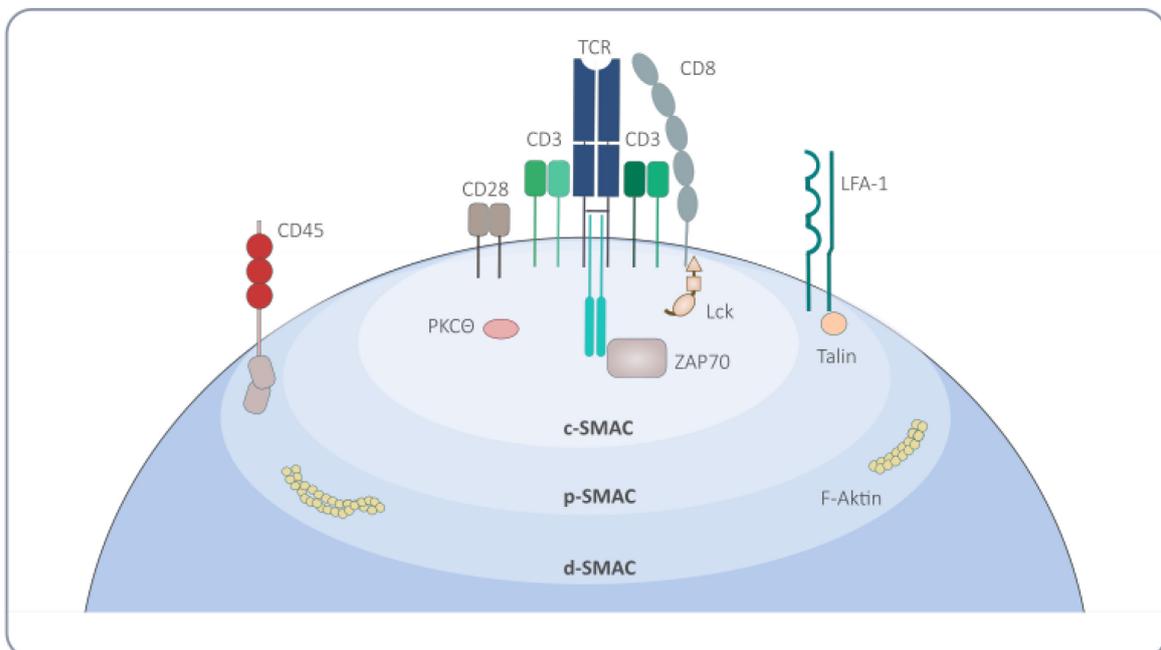
Die erfolgreiche Aktivierung einer naiven T-Zelle über insgesamt drei Signale resultiert somit in der massiven Proliferation von T-Zellen mit „passenden“ pathogen-spezifischen T-Zellrezeptoren – der sogenannten klonalen Expansion. Nach anschließender Differenzierung sind diese in der Lage, ihre spezifischen Effektorfunktionen ohne Kostimulation auszuführen und die Ursache der Infektion zu bekämpfen.

### 1.1.2. Die immunologische Synapse

Die immunologische Synapse stellt die Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle dar, an der nach Bindung des TCRs an den MHC-Peptid-Komplex ein Informationsfluss ähnlich dem zwischen zwei Nervenzellen stattfindet (Dustin und Colman 2002).

Die Ausbildung der immunologischen Synapse beginnt unmittelbar nach TCR-Stimulation und führt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und einer Akkumulation von Aktin, um

Membranproteine und zytoplasmatische Proteine zu polarisieren. So kommt es zur Anreicherung des TCRs im Zentrum des Zellkontaktes, während andere Proteine nach außen verlagert werden (Springer 1990). Dies resultiert in der Bildung eines sogenannten supramolekularen Aktivierungsclusters (SMAC), das aus drei konzentrischen Bereichen besteht (Abbildung 2). Die zentrale Zone (c-SMAC) enthält dabei vor allem die Proteine, die für die aktivierende Signaltransduktion in der T-Zelle benötigt werden. Dazu zählen bspw. der TCR-CD3-Komplex, CD4 bzw. CD8 aber auch die Isoform  $\theta$  der Proteinkinase C (PKC  $\theta$ ) oder die intrazellulären Signalmoleküle Lck (Lymphozyten-spezifische Tyrosinkinase) und Zap70 (Zeta-Kette der T-Zell-Rezeptor-assoziierten Proteinkinase 70). Darauf folgen im peripheren Bereich (p-SMAC) vor allem Adhäsionsmoleküle wie das Integrin LFA-1 zusammen mit intrazellulärem Talin, welches als Adaptorprotein das Aktin-Netzwerk mit Integrinen verbindet. Die Anreicherung der Adhäsionsmoleküle sorgen nun für eine enge Verbindung zur APC. Im distalen Bereich (d-SMAC), welcher besonders viel Aktinfilamente (F-Aktin) aufweist, reichern sich nun Membranproteine mit großen extrazellulären Domänen wie CD45 an (Monks et al. 1997; Monks et al. 1998; Varma et al. 2006; Grakoui et al. 1999; Delon und Germain 2000).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse auf T-Zell-Seite.** Die immunologische Synapse fungiert als Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle. Dabei kommt es zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Plasmamembran, sodass sich ein supramolekulares Aktivierungscluster (SMAC) bildet. Dieses kann wiederum in drei Zonen aufgeteilt werden (c = zentral, p = peripher, d = distal), wobei jede Zone charakteristische Moleküle enthält.

Dieser supramolekulare Adhäsionskomplex ermöglicht somit einen engen und langanhaltenden Kontakt zwischen Immunzelle und APC, ebenso wie eine effektive intrazelluläre Signalweiterleitung, die für die Aktivierung der T-Zelle benötigt wird. Zusätzlich kann eine sehr

gezielte Freisetzung von sekretorischen Granula oder anderen Effektormolekülen stattfinden, bspw. durch zytotoxische CD8+ T-Zellen (Anikeeva et al. 2005; Stinchcombe et al. 2006) (1.1.3). Andere benachbarte Zellen bleiben so unbeeinflusst.

### 1.1.3. CD8+ T-Effektorzellen: Zytotoxische Abwehr

CD8+ T-Zellen erkennen Peptide virusinfizierter oder maligner Zellen, die über das MHC-I-Molekül an sie präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden dabei auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sodass CD8+ T-Zellen eine Vielzahl an infizierten Zelltypen identifizieren können (Yewdell et al. 1999). Um eine bestehende Virusinfektion einzudämmen, sind CD8+ T-Effektorzellen in der Lage, infizierte Zellen kontrolliert zu eliminieren. Dazu setzen sie in calciumabhängiger Weise zytotoxische Granula innerhalb der immunologischen Synapse frei, ohne dass unbeteiligte, benachbarte Zellen beeinflusst werden. Ihre Granula enthält dazu u.a. die zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B, welche schließlich in den Zielzellen Apoptose einleitet (Berke 1995). Zusätzlich vermitteln sie durch die Sekretion des Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) eine direkte antivirale Wirkung, da IFN $\gamma$  beispielsweise sowohl den Viruseintritt als auch die Virusreplikation hemmen kann und gleichzeitig zu einer verstärkten Expression von MHC-I-Molekülen führt (Karupiah et al. 1993; Früh und Yang 1999). Dadurch wird es wahrscheinlicher, dass eine infizierte Zelle virusspezifische Peptide präsentiert und somit von zytotoxischen CD8+ T-Zellen eliminiert werden kann.

Neben diesen direkten Effektorfunktionen erlaubt die Sekretion von Zytokinen wie IFN $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oder Lymphotoxin  $\alpha$  das Erreichen weiterer Zellen. All diese ausgeschütteten Zytokine beeinflussen sowohl die Homöostase und Differenzierung der T-Zellen als auch andere Immunzellen (Salgame et al. 1991; Kumaraguru et al. 2001; A Ratner, W R Clark 1993). So besitzt IFN $\gamma$  nicht nur antivirale Wirkungen, sondern rekrutiert beispielsweise auch weitere Immunzellen an den Infektionsort (Nandi und Behar 2011),

### 1.1.4. Das T-Zell-Gedächtnis

Durch Antigenstimulation einer naiven CD8+ T-Zelle wird die klonale Expansion induziert (1.1.1), sodass zunächst eine große Effektorzellpopulation entsteht, die die bestehende Infektion bekämpft (1.1.3). Unabhängig vom Erfolg der Pathogen-Beseitigung nimmt diese Effektorzellpopulation über selbstregulierende Mechanismen mit der Zeit wieder ab (Kontraktion) (Badovinac und Harty 2006; Kaech et al. 2002). Jedoch werden am Ende einer Immunreaktion nicht alle Effektorzellen durch Apoptose beseitigt. Stattdessen differenzieren etwa 5-10 % der expandierten CD8+ T-Zellen zu T-Gedächtniszellen, um bei einer erneuten Infektion schneller mit einer Immunantwort beginnen zu

können. Dieser generierte T-Gedächtniszellpool bleibt nun stabil und langlebig (Zinkernagel et al. 1996; Ahmed und Gray 1996; Cui und Kaech 2010).

T-Gedächtniszellen können im Allgemeinen in zentrale T-Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ; *central memory*) und Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ; *effector memory*) unterteilt werden. Durch die Expression des C-C-Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) finden sich  $T_{CM}$  wie naive T-Zellen dabei vor allem in den sekundären lymphatischen Organen und zeichnen sich durch ein höheres Expansionspotenzial aus.  $T_{EM}$  sind dagegen durch eine schnelle Zytokinproduktion von IFN $\gamma$ , IL-4 oder IL-5 nach erneuter Aktivierung charakterisiert. Im Gegensatz zu  $T_{CM}$  exprimieren sie kein CCR7 auf der Zelloberfläche. Stattdessen sorgen Integrine und Rezeptoren für ein erleichtertes Eindringen in entzündetes Gewebe (Sallusto et al. 1999b).

## 1.2. Tetraspanine als Organisatoren der immunologischen Plasmamembran

Tetraspanine gehören als kleine, hydrophobe Polypeptide (20 - 50 kDa) zur Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF) und umfassen im humanen System bisher 33 Mitglieder. Sie organisieren als Transmembranproteine über ihre cis-Interaktion (also mit Partner-Proteinen auf der gleichen Zelle) die Membranoberfläche. Dies können sowohl die Plasmamembran als auch Membranen zellulärer Organellen sein. Dazu bilden sie sogenannte Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (*tetraspanin enriched microdomains*, TEMs), in denen sie zusammen mit weiteren Tetraspaninen ein Gerüst für andere Membranproteine sowie intrazelluläre Signal- und Strukturmoleküle bilden. Typischerweise zeigen alle Tetraspanine ein breites Interaktionsspektrum, wobei einige Proteine von zahlreichen Tetraspaninen gebunden werden, während andere Interaktionen spezifisch für ein einzelnes Tetraspanin sind. Die so entstehenden TEMs können dabei in ihrer Zusammensetzung und Ausprägung - abhängig vom Zelltyp und dem Zellstatus - stark variieren (Yáñez-Mó et al. 2009).

Immunzellen besitzen wiederum zahlreiche Proteine, die im Rahmen einer Immunzellaktivierung zum richtigen Zeitpunkt in die Membran rekrutiert und korrekt lokalisiert sein müssen (1.1.2). Tetraspanine fungieren dabei als dynamische Organisatoren für zahlreiche Immunzellrezeptoren, Adhäsions- und Signalproteine wie z.B. MHC-Moleküle, Integrine und PKC (Zhang et al. 2001; Szöllösi et al. 1996a; Berditchevski 2001). Obwohl Tetraspanine üblicherweise keine Rezeptorfunktion ausüben und trans-Interaktionen (d.h. mit Proteinen auf einer anderen Zelle) eine Rarität darstellen, wurden sie im Rahmen von *Crosslinking*-Studien doch oft als kostimulatorische Moleküle beschrieben (Tai et al. 1997; Lagaudrière-Gesbert et al. 1997; Witherden et al. 2000; Hemler 2005). Auch im Rahmen einiger Virusinfektionen wie HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), HCV (Hepatitis-C-Virus) oder HPV (Humanes Papilloma-Virus) werden

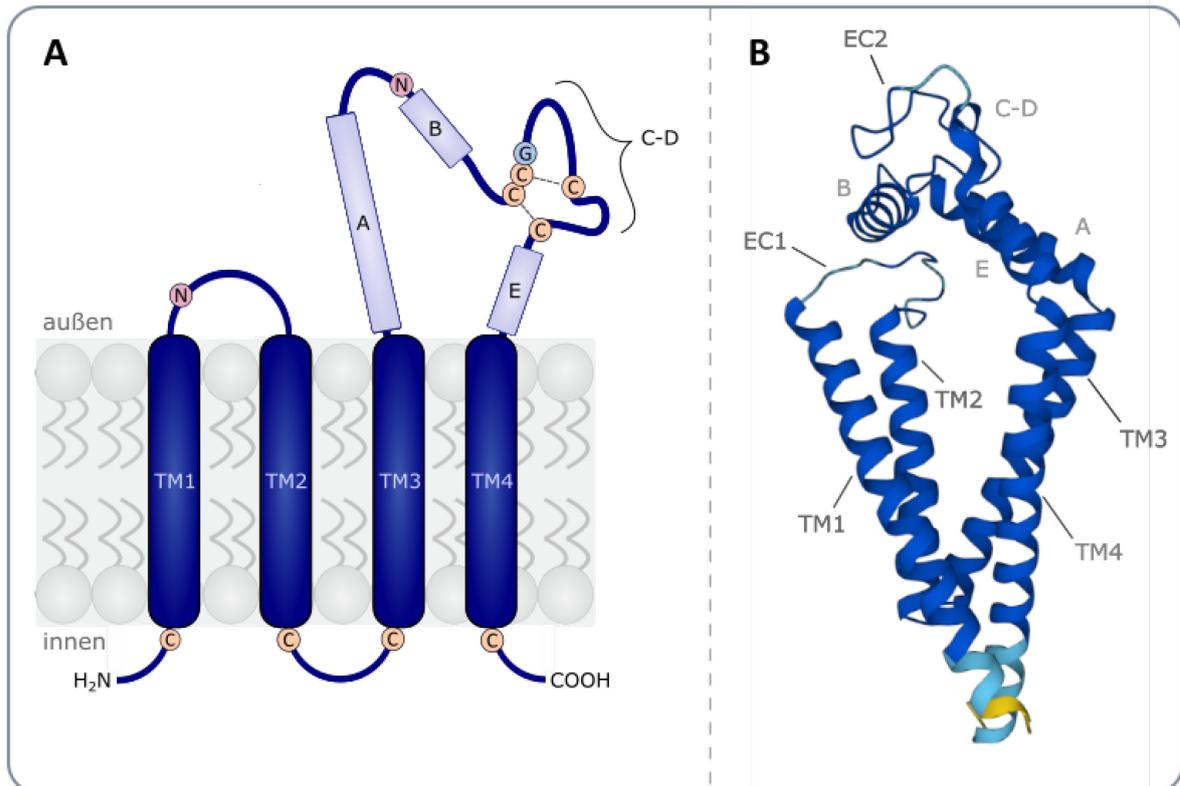
Tetraspanine sowohl für den Viruseintritt (z.B. CD81), als auch die Virussythese und –freisetzung (z.B. CD63, CD151) benötigt (Martin et al. 2005; Florin und Lang 2018).

Darüber hinaus induziert das Fehlen von Tetraspaninen (u.a. CD81 und Tetraspanin 32) in Mausmodellen eine übermäßig starke Proliferation nach T-Zellaktivierung (Miyazaki et al. 1997; Tarrant et al. 2002), aber auch verminderte B-Zellantworten (Maecker und Levy 1997). Dies zeigt, dass die Interaktionen von Tetraspaninen mit Partnerproteinen einen breiten Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse im Rahmen der Immunzellaktivierung nehmen. Diese werden durch zahlreiche strukturelle Charakteristika der Tetraspanin-Familie vermittelt.

### **1.2.1. Strukturelle Merkmale der Tetraspanin-Familie**

Die Familie der Tetraspanine zeichnet sich strukturell durch die namensgebenden vier hoch konservierten Transmembrandomänen (TM1-4) aus, die extrazellulär über eine kleine und große Schleife (EC1 & EC2) sowie intrazellulär über eine weitere Schleife (IC) verbunden werden (Abbildung 3A). Während die extrazellulären Domänen Interaktionen mit Membranproteinen vermitteln, sind die Transmembrandomänen – insbesondere TM1 – entscheidend für den Transport des Tetraspanins in die Plasmamembran (Cannon und Cresswell 2001). Die intrazellulären Domänen mit IC, C- und N-Terminus verbinden es hingegen mit zytoplasmatischen Proteinen (Zhang et al. 2001; Zuidsherwoude et al. 2017). Damit sind Tetraspanine nicht nur in der Lage andere Membranproteine zu organisieren, sondern auch intrazelluläre Signalproteine in einer spezifischen Membranregion anzureichern.

Zwischen den Transmembrandomänen im Intermembranraum besitzen die meisten Tetraspanine zudem eine Bindestelle für Lipide wie Cholesterol, welches die Ausrichtung des Membranproteins beeinflusst. So führt gebundenes Cholesterol z.B. bei CD9 oder CD81 zu einer geschlossenen Konformation, bei der die große extrazelluläre Schleife (EC2) nahe an der Plasmamembran liegt und eine Interaktion mit Partnerproteinen erschwert. Eine freie Cholesterol-Bindestelle ermöglicht hingegen eine offene Konformation des Tetraspanins mit einer exponierten, in den Extrazellulärraum ragenden EC2 (Zimmerman et al. 2016). In dieser offenen Ausrichtung übernimmt die kleine EC1 des Tetraspanins CD53 zudem eine stützende Funktion für die EC2 (Yang et al. 2020; Masciopinto et al. 2001). Damit kann man sich gesamte Tetraspanin-Struktur in ihrer Dreidimensionalität als umgekehrter Kegel vorstellen (Abbildung 3B) (Umeda et al. 2020; Yang et al. 2020).



**Abbildung 3: Strukturelle Merkmale der Tetraspanin-Familie.** A: Schematische Darstellung eines C4-Tetraspanins mit vier intrazellulären und membran nahen Cysteinen, die palmitoyliert werden können. B: Dreidimensionale Struktur des C4-Tetraspanins CD53 in offener Konformation (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022)

Während die kleine EC1 als Verbindungselement zwischen TM1 und TM2 somit scheinbar vor allem unterstützende Funktionen für die Proteinausrichtung übernimmt, ist die große EC2 als Verbindungselement von TM3 und TM4 strukturell komplexer aufgebaut (Maecker et al. 1997; Hemler 2005). Sie kann vereinfacht als pilzartige Struktur mit einem Kopf und Stiel betrachtet werden, wobei die  $\alpha$ -Helices A und E den Stiel bilden. Der Kopf wird wiederum durch die  $\alpha$ -Helix B und die variable Region C-D gebildet (Abbildung 3B) (Yang et al. 2020). Im Gegensatz zu den Transmembrandomänen ist insbesondere die variable Region der EC2 in ihrer Aminosäurezusammensetzung und Länge sehr variabel, um für jedes Tetraspanin spezifische Proteininteraktionen zu ermöglichen (Hemler 2005). Dennoch finden sich auch hier mehrere konservierte Cystein-Moleküle, die für die Tetraspanin-typische bilobuläre Faltung der EC2 verantwortlich ist (Abbildung 3B) (DeSalle et al. 2010). Typischerweise ermöglichen die beiden Cysteine des CCG-Motives mit mindestens zwei weiter entfernt liegenden Cysteinen eine Ausbildung von Disulfidbrücken, sodass es zur Formation und Stabilisierung einer weiteren Schleife innerhalb der EC2 kommt (Yang, Y. et al., 2020). Die Cysteine sind dabei in definiertem Abstand zu den Transmembrandomänen TM3 und TM4 platziert (Seigneuret et al. 2001). Je nachdem wie viele Cysteine an der bilobulären EC2-Faltung beteiligt sind, werden Tetraspanine in weitere Subgruppen unterteilt (C4-, C6- und C8-Tetraspanine). So bilden zwei Cysteine gemeinsam mit den Cysteinen des

CCG-Motives im Tetraspanin CD53 Disulfidbrücken aus, was CD53 zu einem C4-Tetraspanin macht. Mit Hilfe dieser konservierten Bereiche wird vermutlich eine Dimerisierung von zwei gleichen Tetraspanin-Molekülen möglich (Kitadokoro et al. 2001). Eine Interaktion mit anderen Proteinen ist jedoch auf die variablen Regionen von EC2 zurückzuführen (Stipp et al. 2003; Yang et al. 2020; Seigneuret et al. 2001; Kitadokoro et al. 2001).

Zwar stellt die EC2 durch ihre große Varianz den Hauptvermittler von spezifischen Proteininteraktionen dar, jedoch können auch weitere Strukturelemente innerhalb der Tetraspanine zu einer Interaktion mit Partnerproteinen beitragen. Über eine Erkennungssequenz für PDZ-Domänen im C-Terminus von Tetraspaninen (Bassani und Cingolani 2012) wird beispielsweise die Bindung von PDZ-Proteinen wie Syntenin ermöglicht. Aber auch Proteininteraktionen mit dem N-Terminus eines Tetraspanins wie zwischen CD53 und der PKC wurden schon beschrieben (Zuidscherwoude et al. 2017).

Neben Strukturelementen haben auch posttranslationale Modifikationen (PTM) Einfluss auf die Interaktionen von Tetraspaninen, wobei neben der N-Glykosylierung die S-Palmitoylierung die zentralste PTM von Tetraspaninen darstellt. So wurde mehrfach gezeigt, dass alle Tetraspanine posttranslational palmitoyliert werden (Charrin et al. 2002; Yang et al. 2002). Bei der S-Palmitoylierung wird Palmitinsäure reversibel an zytoplasmatische Cysteine angehängt, die nahe der Plasmamembran liegen (Bijlmakers 2003). Während das Tetraspanin CD9 an allen Transmembrandomänen (TMs) solche membranahen Cysteine besitzt, weisen andere Tetraspanine nur an einigen TMs solche Stellen auf (Stipp et al. 2003). S-Palmitoylierungen führen in der Regel zur Rekrutierung des modifizierten Proteins in bzw. an einen spezifischen Membranbereich. Im Falle der membranständigen und hydrophoben Tetraspanine moduliert die S-Palmitoylierung jedoch zusätzlich die Interaktion mit anderen Proteinen sowie die eigene subzelluläre Verteilung (Yang et al. 2002; Berditchevski et al. 2002; Cherukuri et al. 2004).

### **1.2.2. Das Tetraspanin CD53**

Die meisten Tetraspanine werden ubiquitär auf allen Körperzellen exprimiert, während es nur wenige Familienmitglieder gibt, die eine gewebespezifische Proteinexpression zeigen. Neben CD37 stellt das Protein CD53 (auch OX44 oder Tetraspanin 25) jedoch eines der Tetraspanine dar, das nahezu ausschließlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Dies deutet bereits eine zentrale Rolle von CD53 für das Immunsystem an. Darüber hinaus wurde 1997 erstmalig von einer seltenen CD53-Defizienz berichtet, welche bei allen betroffenen Familienmitgliedern zu einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber Virose, Bakteriose und Mykosen führte (Mollinedo et al.

1997). Außerdem sind genetische CD53-Polymorphismen mit Erkrankungen wie Asthma oder Tuberkulose assoziiert (Jin et al. 2019; Lee et al. 2013).

Tatsächlich wurde insbesondere in den letzten Jahren gezeigt, dass CD53 verschiedenste Prozesse auf Leukozyten beeinflusst, darunter u.a. Proliferation, Migration und Adhäsion, Zytokinproduktion sowie Redoxpotential und Apoptose der Zelle. Nicht immer ist dabei klar, wie genau CD53 diese Prozesse zu beeinflussen vermag. So ist es denkbar, dass Tetraspanine wie CD53 die Expression ihrer Partnerproteine regulieren, indem sie ihre Stabilität beeinflussen. CD53 stabilisiert beispielsweise das Adhäsionsmolekül L-Selektin, was wiederum für eine Lymphozyten-Rezirkulation in die Lymphknoten benötigt wird. Dies erklärt eine gestörte Zirkulation von Immunzellen in CD53<sup>-/-</sup> Mäusen (Demaria et al. 2020). Außerdem ist es denkbar, dass Tetraspanine über ihre Bindung die Lokalisation ihres jeweiligen Partnerproteins steuern, sodass dieses entweder in eine spezifische Membranregion transportiert oder gar zurückgehalten wird. So wurde bereits für das Tetraspanin CD63 gezeigt, dass das palmitoylierte Partnerprotein Synaptogamin VII in die lysosomale Membran eingebaut wird. Ohne diese posttranslationale Modifikation bleibt Synaptogamin VII im Golgi-Apparat zurück (Flannery et al. 2010). Auch ein Nachweis von Interaktionspartnern kann zumindest erste Hinweise geben, über welche Proteine das Tetraspanin bestimmte zelluläre Prozesse beeinflusst, wie beispielsweise die nachgewiesene Interaktion zwischen CD53 und der gamma-Glutamyltransferase (GGT) (Nichols et al. 1998). Die GGT steht durch die enzymatische Spaltung von Glutathion (GSH) in direktem Zusammenhang mit dem Redoxpotential der Zelle (Lieberman et al. 1995). Auf der anderen Seite ist jedoch nicht abschließend geklärt, wie CD53 die Zytokinproduktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Dunlock et al. 2022; Bos et al. 2010) oder das Zellschicksal Apoptose (Greenberg et al. 2020a; Yunta und Lazo 2003) beeinflusst.

Insgesamt liefern die bisherigen Studien zu CD53 bruchstückhafte Erkenntnisse über das CD53-Interaktom und die damit verbundene Funktionalität dieses Tetraspanins. Auch die Art und Weise, in der CD53 seine Interaktionspartner beeinflusst ist bisher nur unzureichend aufgeschlüsselt. Das Interaktom eines Tetraspanins ist stark abhängig von Spezies und Zelltyp. Die bisherigen Erkenntnisse wurden jedoch auf unterschiedlichen Immunzelltypen von verschiedenen Spezies untersucht, sodass sich kein klares und eindeutiges Bild ergibt. Ein besseres Verständnis der CD53-regulierten Immunzellprozesse auf humanen T-Zellen soll daher Ziel dieser Arbeit (1.3) sein.

### 1.3. Ziele der Arbeit

Durch die Interaktion mit Partnerproteinen organisiert CD53 als Tetraspanin die Membranoberfläche von Immunzellen und kann so regulierend auf verschiedenste Zellprozesse einwirken. Dabei ist weitestgehend unbekannt mit welcher Vielfalt an Proteinen CD53 interagiert. Folglich kann aufgrund der bisher wenigen bestätigten Interaktionspartner nur erahnt werden, welche zellulären Prozesse von CD53 beeinflusst werden und welche Funktionen das Tetraspanin im Rahmen der proinflammatorischen Immunantwort übernimmt.

Bisher durchgeführte CD53-Studien beschränken sich vor allem auf Analysen in verschiedenen Zelllinien und Mausmodellen. Primäre, humane Immunzellen waren hingegen selten Gegenstand der Forschung. Da jedoch jeder Immunzelltyp und jeder Organismus ein anderes Proteom aufweist, lassen sich Erkenntnisse aus anderen Spezies oder einzelnen Zellmodellen nicht zwingend auf andere Zelltypen oder Organismen übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher das Protein CD53 auf primären, humanen Lymphozyten untersucht werden, wobei die Charakterisierung von CD53 auf CD8+ T-Zellen im Fokus stehen wird.

T-Zellen bilden im Gegensatz zu anderen Immunzellen ein Immungedächtnis und können daher in naive T-Zellen und verschiedene Gedächtniszellpopulationen unterteilt werden. Die Gedächtniszellen erlauben eine schnelle Immunantwort bei Infektion mit einem bekannten Pathogen und werden anhand ihrer funktionalen Rolle und Oberflächenmarker-Expression in weitere Subpopulationen eingeteilt. Daher soll analysiert werden, ob die CD53-Menge bereits abhängig von der Differenzierung als reife Gedächtniszelle oder der Funktion der jeweiligen Subpopulation ist. Dieses *ex vivo* Expressionsverhalten könnte weitere Hinweise liefern, welche Aufgaben CD53 während einer Immunzellaktivierung übernimmt. Anschließend soll schließlich das Expressionsverhalten von CD53 auf aktivierten, primären und humanen T-Zellen durch verschiedene Immunzellstimulationen betrachtet werden. Dazu werden aktivierte T-Zellen anhand von Aktivierungsmarkern und Zytokin-Produktion identifiziert und hinsichtlich ihrer CD53-Expression analysiert. Dabei soll auch die funktionale Rolle von CD53 im Rahmen der Immunzellaktivierung umrissen werden.

Um jedoch ein noch deutlicheres Bild über die Funktionen von CD53 zu erhalten, soll das CD53-Interaktom in Jurkat-T-Zellen mit Hilfe der neu etablierten BioID-Methode analysiert werden. Die Identifikation neuer Interaktionspartner – insbesondere intrazellulärer Partnerproteine – erlaubt einen ersten Überblick über molekulare Signalkaskaden, die möglicherweise von CD53 in T-Zellen reguliert werden können. Welche Strukturdomänen und posttranslationalen Modifikationen im CD53-Protein bei der Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen, soll mit Hilfe von CD53-Mutanten in der BioID erörtert werden.

Damit soll diese Arbeit die bereits bestehenden Erkenntnisse der CD53-Funktion durch eine detaillierte Analyse des Tetraspanins auf humanen, primären CD8+ T-Zellen ergänzen. Ein so generiertes umfassendes Bild liefert möglicherweise nicht nur neue Erkenntnisse über noch nicht beschriebene Aufgaben von CD53, sondern bietet zudem ggf. neue Ansatzpunkte für die Therapie proinflammatorischer Erkrankungen.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Geräte, Reagenzien und Puffer

Die folgenden Geräte und Reagenzien wurden für diese Arbeit verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Allegra® X-15R Centrifuge	Beckman Coulter, Deutschland
Inkubator BBD 6620	Thermo Scientific, USA
LSR Fortessa	Becton Dickinson, USA
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific, USA
Stuart SB3 Rotator	Bibby Scientific Ltd, USA
Sysmex XP-300	Sysmex, Japan

**Tabelle 2: Verwendete Medien, Puffer, Zellkulturzusätze und Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
BD FACS™ Clean	Becton Dickinson, USA
BD FACS™ Flow	Becton Dickinson, USA
BD FACS™ Rinse	Becton Dickinson, USA
Bredfeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, USA
Brilliant Stain Puffer	Becton Dickinson, USA
CD8+ T-Zell Isolations-Kit, human	Miltenyi, Deutschland
Cellclean® CL50	Sysmex, Japan
Cellpack®	Sysmex, Japan
<i>Compensation Beads</i>	Becton Dickinson, USA
<i>Cytometer Setup &amp; Tracking Beads Kit (CST beads)</i>	Becton Dickinson, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99.8%	Carl Roth, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 1x (PBS)	Gibco, USA
Duolink® flowPLA Mouse/Rabbit Starter Kit - Far Red	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FCS) superior	Biochrome (Merck), Deutschland
IFN $\gamma$ , human, rekombinant	Pbl assay science, USA
IL-12, human, rekombinant	Reprokine
IL-15, human, rekombinant	Reprokine
IL-18, human, rekombinant	Reprokine
IL-2, human, rekombinant	Roche, Schweiz
Intrazellulärer (IC) Fixierpuffer (1x)	Invitrogen, USA
Ionomycin	Calbiochem
Pancoll human	PAN-Biotech, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x) PenStrep	Gibco, USA
Permabilisierungspuffer (10x)	Invitrogen, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI Medium 1640 1x + GlutaMAX™	Gibco, USA
<i>Ultracomp Beads</i>	Thermo Scientific, USA

Tabelle 3: Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
FACS-Puffer	2 % hitzeinaktiviertes FCS-Superior in PBS	
Einfriermedium	10 % DMSO in hitzeinaktiviertem FCS-Superior	
R10	RPMI Medium 1640 10% FCS-Superior	100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
DMEM	DMEM Medium 10% FCS-Superior	100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
BioID Lysepuffer	0,5 M NaCl 50 mM Tris-HCl 0,2 % SDS	1 mM DTT H <sub>2</sub> O
BioID Waschpuffer 1	2 % SDS H <sub>2</sub> O	
BioID Waschpuffer 2	0,1 % Na-DOC 1 % Triton X-100 0,5 M NaCl	50 mM HEPES (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8) H <sub>2</sub> O
BioID Waschpuffer 3	0,5 % Na-DOC 250 mM LiCl 0,5 % Tween-20	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8) H <sub>2</sub> O
BioID Waschpuffer 4	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) H <sub>2</sub> O	
BioID Elutionspuffer	3,75x SDS-Probenpuffer 0,02 M DTT	4 mM Biotin H <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris pH 6,8, 25 % Glycerin, 20 % SDS	0,5 % β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau
2 mM Biotin	24,4 mg Biotin 50 ml DMEM	Steril-filtriert
Permabilisierungspuffer (1x)	Permeabilisierungspuffer (10x) H <sub>2</sub> O	

## 2.2. Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide eingesetzt, die während der Masterarbeit unter meine Anleitung von Katharina Maria Richter (Katharina Maria Richter 2022) generiert oder über Addgene bezogen wurden.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Nr.	Plasmid	Beschreibung	Resistenz Marker	Herkunft
P261	pWPI/CD53-BirA(R118G)	Lentiviraler Transfervektor mit dem Fusionsgen aus CD53 und BirA*	Puromycin Ampicillin	K. M. Richter 2022

			eGFP	
P269	pWPI-Puro/eGFP-CD53*-BirA* C71A, C80A, C208A	Lentiviraler Transfervektor mit dem Fusionsgen aus CD53* und BirA*, wobei die membrannahen Cysteine C71, C80 und C208 von CD53 so mutiert sind, dass keine Palmitoylierung stattfinden kann.	Puromycin Ampicillin eGFP	K. M. Richter 2022
P270	pWPI-Puro/eGFP-CD53*-BirA* Deletion T216, I217, G218, L219	Lentiviraler Transfervektor mit dem Fusionsgen aus CD53* und BirA*, wobei die TIGL-Sequenz von CD53 deletiert wurde.	Puromycin Ampicillin eGFP	K. M. Richter 2022
P271	pWPI-Puro/eGFP-CD53*-BirA* L43A, F44A, H45A, N46A	Lentiviraler Transfervektor mit dem Fusionsgen aus CD53* und BirA*, wobei vier Aminosäuren der EC1 von CD53 ausgetauscht wurden, sodass ihre Stützfunktion gestört wird.	Puromycin Ampicillin eGFP	K. M. Richter 2022
P272	pWPI-Puro/eGFP-CD53*-BirA* C144A, C145A, C161A, C170A	Lentiviraler Transfervektor mit dem Fusionsgen aus CD53* und BirA*, wobei vier Cysteine der EC2 von CD53 mutiert werden, sodass keine bilobuläre Faltung ausgebildet wird.	Puromycin Ampicillin eGFP	K. M. Richter 2022
P273	pWPI-Puro/eGFP-BirA*	Lentiviraler Transfervektor mit BirA* allein	Puromycin Ampicillin eGFP	K. M. Richter 2022
P3	pCMV8.74	Lentivirales Verpackungsplasmid der 2. Generation mit gag, pol, tat, rev.	Ampicillin	Addgene
P4	pMD2.G	Hüllplasmid mit VSV-G für die Generierung lentiviraler Pseudopartikel	Ampicillin	Addgene

## 2.3. Patientenproben

### 2.3.1. Gesunde Spender

Für die Isolation primärer, humaner Lymphozyten wurden Leukozytenkonzentrate (*Buffy Coats*) gesunder Blutspender in der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf gesammelt. Sollten hingegen gesunde Spender mit Patienten der HIV-Kohorte verglichen werden, wurde EDTA-Blut gesunder Spender verwendet. Dieses wurde im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf gesammelt. Dabei erfolgten alle Entnahmen mit Zustimmung der örtlichen Ethikkommission. Zudem gaben alle Probanden eine schriftliche Einwilligung ab.

### 2.3.2. Therapienaive HIV-Patienten

Für die Isolation humaner Lymphozyten von insgesamt 10 therapienaiven HIV-Patienten wurden EDTA-Blutproben im Leberinfektionszentrum des Universitätsklinikums Düsseldorf gesammelt. Die Blutentnahme fand auch hier mit Zustimmung der örtlichen Ethikkommission und des Patienten statt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der therapienaiven HIV-Kohorte.** Bei einem HIV-Patienten gab es keine Information zum CMV-Status. Ein weiterer Patient zeigte 0 % CD4+ T-Zellen, sodass keine absolute CD4+ T-Zellzahl ermittelt werden konnte.

Weiblich	Männlich	CMV pos.	CMV neg.	Mittlere Viruslast [Kopien/ml]	CD4+ T-Zellzahl [Zellen/ $\mu$ l]	CD4/CD8 Ratio
2 (20 %)	8 (80 %)	7(70%)	2 (20%) 1 x CMV-Status unbekannt	185.279,1 (20.062-279.768)	247,5 (20-775) 1x nicht detektierbar	0,26 (0,1-0,5)

## 2.4. Zelllinien

### 2.4.1. Jurkat

Jurkat Zellen stellen eine humane CD4+ T-Zelllinie dar, die aus einem 14-Jahre alten Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gewonnen wurde (Schneider et al. 1977). Sie dienen heute als Modell-Linie für Signalweganalysen in T-Zellen. Die Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS-Superior, 100 IU/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin kultiviert.

### 2.4.2. HEK293T

Die adhären-wachsenden HEK293T-Zellen wurden aus der humanen embryonalen Nierenzell-Linie HEK293 entwickelt. Durch die Expression eines mutierten SV40 large T-Antigens können sie hohe Mengen eines Proteins, das auf einem Plasmid mit SV40 Replikationsursprung liegt, produzieren (DuBridge et al. 1987). Daher werden sie auch besonders für die Produktion lentiviraler Pseudopartikel eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS-Superior, 100 IU/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin.

## 2.5. Arbeiten mit Zelllinien

### 2.5.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien fand unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) statt. Während Suspensionszellen bei Erreichen ihrer Konfluenz durch Zugabe von frischem

Wachstumsmedium gesplittet wurden, wurde bei adhären-wachsenden Zellen zunächst das Medium entfernt und mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin bei 37 °C wurden die Zellen durch eine enzymatische Reaktion abgelöst, die über erneute Zugabe des Wachstumsmediums abgestoppt wurde. Erst dann erfolgte das Splitten der Zellen.

## 2.6. Arbeiten mit primären Zellen

### 2.6.1. Isolation und Kryokonservierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Um T-Zellen hinsichtlich ihrer Immunfunktion zu analysieren, wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) über einen Dichtegradienten isoliert. Die PBMCs umfassen dabei alle Blutzellen, die einen einzelnen Kern enthalten – also Monozyten und Lymphozyten mit B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen. Erythrozyten und Thrombozyten besitzen hingegen keinen Kern. Granulozyten zeigen wiederum so stark segmentierte Kerne, dass sie nicht mehr zur Gruppe der PBMCs gehören. Eine Auftrennung wird durch die hohe Dichte von Granulozyten und Erythrozyten ermöglicht, welche dazu führt, dass sie durch das Pancoll-Medium mit einer Dichte von 1,077 g/ml diffundieren. Die PBMCs akkumulieren hingegen über dieser Schicht.

Zur Aufreinigung der PBMCs wurde 15 ml Pancoll-Medium in 50 ml-Leucosep-Röhrchen (Greiner) überführt und bei 1.100 x g für 1 min zentrifugiert, sodass sich das Pancoll-Medium nun unter dem Filter befindet. Pro Leucosep-Röhrchen wurden maximal 20 ml Blut langsam auf den Filter gegeben, welches anschließend mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Zur Auftrennung der Blutzellen erfolgte eine Zentrifugation bei 1.100 x g für 10 min. Da der Filter Granulozyten und Erythrozyten zurückhält, kann der Lymphozytenring oberhalb des Filters nach der Zentrifugation durch mehrmaliges auf- und ab- Pipettieren resuspendiert werden. Anschließend wird die Suspension in ein neues 50 ml Falcon überführt und durch Zugabe von 50 ml 1x PBS gewaschen. Zur Präzipitation der Zellen werden diese bei 200 x g für 10 min abzentrifugiert. Um möglichst saubere PBMC-Populationen zu erhalten, wurde dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt erfolgte eine Zellzahlbestimmung am Sysmex XP-300.

Zum Einfrieren der Proben wurden die PBMCs mit Einfriermedium auf eine Konzentration von  $5 \cdot 10^6$  oder  $10 \cdot 10^6$  Zellen/ml für Patientenproben bzw.  $40 \cdot 10^6$  Zellen/ml für Leukozytenkonzentrate (*Buffy coats*) eingestellt und je 1 ml pro Kryo-Röhrchen überführt. Um die Proben schonend und langsam auf -80 °C zu kühlen, wurden die Proben für mindestens 2 h in *Mr. Frosties* im -80 °C Schrank gelagert, bevor sie anschließend für eine dauerhafte Lagerung in den Stickstofftank mit -196 °C überführt wurden.

### 2.6.2. Auftauen von kryokonservierten PBMCs

Für die Kultivierung gefrorener Zellen wurden diese aus der flüssigem Stickstofflagerung entnommen und rasch für etwa ein bis zwei Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Um das im Einfriermedium enthaltene bei Raumtemperatur zytotoxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen in 9 ml PBS aufgenommen und bei 524 x g für 5 min herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das entstandene Zellsediment in 10 ml PBS resuspendiert und die entstandene Suspension anschließend erneut zentrifugiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zählung der Zellen mit Hilfe des Sysmex XP-300, sodass die Zellen anschließend je nach benötigter Zellzahl in der entsprechenden Menge PBS oder Medium aufgenommen wurden. Für eine sich unmittelbar anschließende fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) wurden die Zellen in eine 96er-Rundbodenplatte überführt. Eine längere Kultivierung der Zellen erfolgte stattdessen in Zellkulturflaschen oder -platten.

**Tabelle 6: Aussaat von primären PBMCs je nach angestrebtem Test.**

Analyse/Stimulation	Zellzahl	Volumen/Well	Kultivierungsmittel
PLA-Analyse	$2 \cdot 10^5$	100 $\mu$ l	96er Well-Platte
PMA & Ionomycin Stimulation	$2 \cdot 10^6$	1000 $\mu$ l	24er Well-Platte
IL-12, IL-15, IL-18 Stimulation	$2 \cdot 10^6$	1000 $\mu$ l	24er Well-Platte
CD3/CD28 <i>Dynabeads</i> <sup>TM</sup>	$1 \cdot 10^6$	200 $\mu$ l	96er Well-Platte
Expansion CMV-spezifischer T-Zellen	$2 \cdot 10^6$	1000 $\mu$ l	24er Well-Platte
CD8+ T-Zellisolation	$2 \cdot 10^6$ /ml	-	T75-Flasche

### 2.6.3. Kultivierung von PBMCs

Für die Kultivierung von isolierten PBMCs wurde RPMI 1640 Medium verwendet, welches mit 10 % FCS superior und 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 IU/ml Penicillin, 10 000  $\mu$ g/ml Streptomycin) versetzt wurde (R10). Die Inkubation erfolgte sofern nicht anders angegeben bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

### 2.6.4. Isolation von CD8+ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS®)

Um für eine spätere Sortierung CD8+ T-Zellen aus den gesamten PBMCs anzureichern, erfolgte eine magnetische Zellseparation mit Hilfe des CD8+ T-Zell Isolation-Kits von Miltenyi.

Für die Isolation von CD8+ T-Zellen wurden insgesamt etwa  $10^8$  PBMCs pro Spender ausgesät und über Nacht in R10-Medium kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen nach Ermittlung der Zellzahl bei 300 x g für 10 min sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 40  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^7$  PBMCs resuspendiert, um dann mit einem Biotin-Antikörper-Mix (10

$\mu\text{l}/10^7$  PBMCs) versetzt zu werden. Dieser Biotin-Antikörper-Cocktail bindet an alle anderen PBMCs, sodass die CD8+ T-Zellen unmarkiert bleiben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 4 °C erfolgte nach weiterer Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer pro  $10^7$  PBMCs die Behandlung mit einem *MircoBead*-Mix (20  $\mu\text{l}/10^7$  PBMCs) bei 4 °C für 10 min. Diese magnetischen *Beads* richten sich gegen die Biotin-Antikörper, sodass bei der magnetischen Separation über LS-Säulen alle Zellen magnetisch zurückgehalten werden, die keine CD8+ T-Zellen darstellen. Letztere werden hingegen direkt eluiert und können nun für die Sortierung mittels Durchflusszytometrie eingesetzt werden (2.7.3).

### 2.6.5. Unspezifische Aktivierung von T-Zellen

Um eine breite Zytokinantwort von T-Zellen nach Aktivierung zu erzeugen, bieten sich unspezifische Stimuli wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) mit Ionomycin an. PMA gelangt dabei als kleines Molekül über die Zellmembran ins Zellinnere, wo es als Strukturanalog des Diacylglycerins die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und somit eine Reihe von Signalkaskaden induziert (Newton 2001). Ionomycin transportiert als Ionophor gleichzeitig Calcium-Ionen in das Zytoplasma, sodass es nicht nur die Aktivierung der PKC unterstützt, sondern auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (Morgan und Jacob 1994; Lyakh et al. 1997). Für eine Aktivierung mit PMA und Ionomycin wurden  $2 \cdot 10^6$  PBMCs in vorgewärmten R10 Medium in eine 24er Well-Platte ausgesät und über Nacht ruhen gelassen, um eine Aktivierung der Zellen durch den Auftauprozess auszuschließen. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml PMA und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ionomycin für 4 h. Sollte die Sekretion von Proteinen analysiert werden, wurde zusätzlich für die gesamte Stimulationsdauer 10 ng/ml Brefeldin A (BFA) zugegeben. BFA führt dabei zu einem rückwärtsgerichteten Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), sodass hier die Proteine akkumulieren, anstatt sekretiert zu werden.

Neben der Stimulation mit PMA und Ionomycin, können auch Interleukine für eine Aktivierung sorgen. So konnte gezeigt werden, dass IL-12 und IL-18 in T-Zellen auf synergistische Weise zu einer IFN $\gamma$ -Antwort führen, ohne dass ihr TCR stimuliert wird (Yoshimoto et al. 1998). IL-15 wiederum induziert die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8+ T-Gedächtniszellen (Liu et al. 2002; Zhang et al. 1998). Für eine TCR-unabhängige Stimulation über Interleukine wurden ebenfalls  $2 \cdot 10^6$  PBMCs in vorgewärmten R10 Medium in eine 24er Well-Platte ausgesät und nach einer kurzen Ruhephase für 16 h bis 24 h mit 10 ng/ml IL-12, 100 ng/ml IL-15 und 50 ng/ml IL-18 stimuliert. Für die Analyse von sekretierten Proteinen wurde in den letzten 2 h bis 4 h BFA zu den Zellen gegeben.

### 2.6.6. Spezifische Aktivierung von T-Zellen

Im Gegensatz zur unspezifischen Stimulation, die auch andere Leukozyten wie NK-Zellen aktiviert, hat die spezifische Aktivierung ausschließlich T-Zellen als Ziel. Hierzu wurden *Dynabeads™ humaner T-Activator CD3/CD28* von Gibco™ verwendet.

Die *Dynabeads™* stellen dabei 4,5 µm kleine magnetische *Beads* dar, die zusätzlich kovalent gebundene anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper tragen. Somit induzieren sie ähnlich wie eine APC sowohl Signal 1 über die Aktivierung von CD3 als auch kostimulatorische Signale über Bindung von CD28 in der T-Zelle (1.1). Für diese spezifische Stimulation wurde die benötigte Menge *Dynabeads™* mit 1 ml PBS gewaschen, wobei das PBS durch Platzieren auf einem Magneten für 1 bis 2 min abpipettiert werden kann. Anschließend wurden die *Dynabeads™* in einem Verhältnis von 1:1 mit R10-Medium gemischt. Je 2 µl gewaschene *Beads* wurden zu den zuvor ausgesäten PBMCs ( $1 \cdot 10^6$  PBMCs in 200 µl) gegeben und für 24 h bis 72 h inkubiert. Bevor weitere Analysen stattfinden konnten, wurden die *Beads* mit Hilfe eines Magneten entfernt und die Zellen in ein neues Gefäß überführt.

### 2.6.7. Expansion CMV-spezifischer T-Zellen

Um die klonale Expansion von virusspezifischen T-Zellen zu induzieren, wurden  $2 \cdot 10^6$  PBMCs von CMV-positiven Spendern für 10 Tage in Anwesenheit von humanem IL-2 (25 IU/ml) und 1 µg/ml CMV-Peptid (Sequenz: NLVPMVATV) stimuliert. Die verwendete Peptidsequenz gehört zum Phosphoprotein pp65 von CMV, welches während der Infektion ein wichtiges Ziel für CD8+ T-Zellen darstellt (McLaughlin-Taylor et al. 1994).

Um die Proliferation der CMV-spezifischen T-Zellen zu unterstützen, wurden diese nach 7 Tagen mit frischem R10-Medium mit 25 IU/ml IL-2 versorgt. Nach 10 Tagen wurden schließlich 250 µl der expandierten Zellen in eine 96er Well-Platte überführt und mit 10 µg/ml Peptid für 4 h restimuliert, um eine IFN $\gamma$ -Antwort zu bewirken. Damit intrazellulär-produziertes IFN $\gamma$  anschließend nachgewiesen werden konnte, erfolgte neben der Peptidstimulation eine gleichzeitige Behandlung mit 10 ng/ml BFA.

## 2.7. Analyse der T-Zell-spezifischen Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie

Um T-Zellen hinsichtlich ihres Proteinprofils zu charakterisieren und in den Zusammenhang mit dem Membranprotein CD53 zu bringen, wurden Lymphozyten über fluoreszenzmarkierte Antikörper durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.7.1. Oberflächenfärbung von Membranproteinen

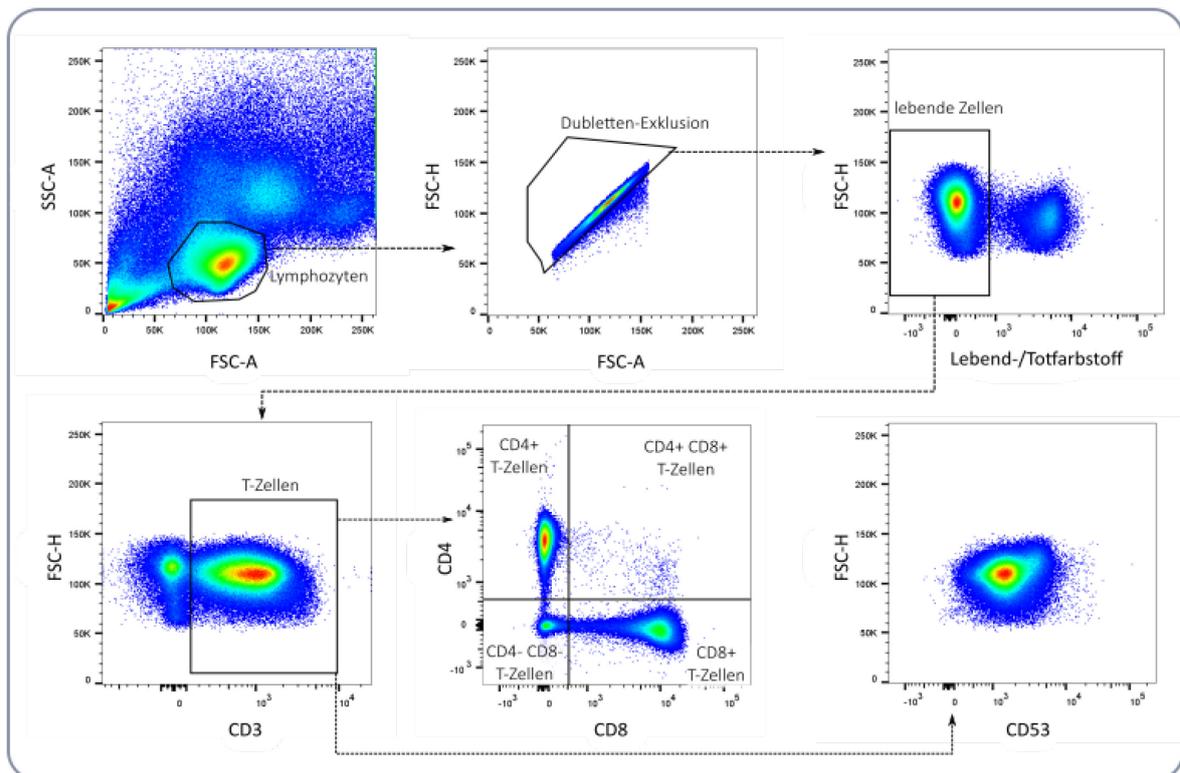
Für die Färbung von Plasmamembranproteinen wurden bis zu  $5 \cdot 10^6$  PBMCs pro Vertiefung einer 96er Well-Platte vorgelegt und bei  $750 \times g$  für 3 min sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen nach Verwerfen des Überstandes durch Vortexen aufgelockert und ggf. mit 200  $\mu$ l PBS und erneute Zentrifugation bei  $750 \times g$  für 3 min gewaschen.

Sollte eine Identifikation CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen erfolgen, wurde zunächst eine Färbung mit einem Tetramer für 20 min bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Das Tetramer setzt sich dabei aus Fluorophor-gekoppelten HLA-A2-Molekülen zusammen, die das CMV-Peptid NLVPMVATV gebunden haben (HLA-A2\*0201/NLVPMVATV).

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Oberflächenfärbung mittels Durchflusszytometrie.**

Antigen	Fluorochrom	Klon	$\mu$ l/1 · 10 <sup>6</sup>	Hersteller
CCR7	BV650	G043H7	5	Biologend
CD14	eFluor 506	61D3	1	eBioscience
CD147	APC	HIM6	2	Biologend
CD16	BV786	3G8	0,5	Biologend
CD19	PE-Cy7	HIB19	0,5	eBioscience
CD25	APC	BC96	2	Invitrogen
CD25	FITC	BC96	2	Biologend
CD3	APC eF780	OKT3	2	eBioscience
CD3	BV605	HIT3a	2	BD
CD3	PerCP-Cyanine5.5	OKT3	1	eBioscience
CD38	PE-Cy7	HIT2	2	eBioscience
CD4	BV786	RPA-T4	0,5	BD
CD4	APC	OKT4	0,25	Biologend
CD45RA	APC	HI100	2	Invitrogen
CD53	PE	HI29	2	Biologend
CD53	FITC	QA19A07	5	Biologend
CD53	FITC	MEM53	20	Invitrogen
CD56	BV421	HCD56	2	Biologend
CD56	FITC	TULY56	1	eBioscience
CD57	PE-CF594	NK-1	0,5	BD
CD57	BV421	NK-1	2	BD
CD57	FITC	TB01	1	eBioscience
CD69	PE/Dazzle™ 594	FN50	0,5	Biologend
CD69	APC	FN50	2	Biologend
CD8	BV421	SK1	0,5	Biologend
CD8a	BV650	RPA-T8	0,5	Biologend
CD8a	BV510	RPA-T8	1	Biologend
CD99	BV421	3B2/TA8	1	Biologend
Fixable Viability Dye	eFluor™ 506	-	0,1	eBioscience
Fixable Viability Dye	eFluor™ 780	-	0,02	eBioscience
HLA A/B/C	FITC	W6/32	2	Biologend
Tetramer <sub>(NLVPMVATV)</sub>	PE	-	1	Immudex

Um später nur lebende Zellen in die Analyse mit einzuschließen, erfolgte eine Färbung mit je 100 µl eines Vitalitätsfarbstoff-Mastermix bei 4 °C für 15 min. Dieser fixierbare Farbstoff erkennt intrazelluläre Proteine und kann nur über eine defekte Membran ins Zellinnere gelangen, sodass tote Zellen irreversibel markiert werden. Durch einmaliges Waschen mit 100 µl FACS-Puffer wurde nicht gebundener Farbstoff entfernt, sodass die Oberflächenfärbung angeschlossen werden konnte. Da bei allen verwendeten Antikörperzusammensetzungen (sog. *Panels*) mehrere *Brilliant Violet™* Fluorochrome verwendet wurden, wurde für den Oberflächen-Mastermix der *Brilliant Stain* Puffer im Verhältnis 1:1 mit FACS-Puffer gemischt, um anschließend darin alle benötigten Antikörper zu lösen. Dieser soll unspezifische Fluorochrominteraktionen verhindern, die bei Gebrauch mehrerer *Brilliant Violet™* Fluorochrome auftreten können. Die Färbung erfolgte dann mit je 100 µl des Mastermixes für 15 min bei 4 °C. Nach Waschen mit 100 µl FACS-Puffer wurden die Zellen in intrazellulärem Fixierpuffer resuspendiert und erneut für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die fixierten Zellen wurden abschließend mit 100 µl PBS gewaschen, zur durchflusszytometrischen Analyse in 100 µl PBS aufgenommen und am BD LSR Fortessa Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 4: Identifikation von CD8+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.** Nach Auswahl der Lymphozytenpopulation wurden Dubletten mit Hilfe des FSC-H (Forward-Scatter-Height) und FSC-A (Forward-Scatter-Area) ausgeschlossen, um anschließend die lebenden Zellen auszuwählen. Über den Marker CD3 wurden alle T-Zellen identifiziert, welche durch die Expression von CD4 und CD8 weiter klassifiziert werden konnten. Alle T-Zellen tragen dabei den Marker CD53.

Für die Analyse von CD8+ T-Zellen wurden nach Auswahl der Lymphozyten zunächst Dubletten und tote Zellen ausgeschlossen. Über die Expression von CD3 konnten alle T-Zellen identifiziert werden, welche dann durch die Marker CD4 und CD8 in weitere Populationen aufgeteilt werden konnten. Da alle T-Zellen positiv für das Protein CD53 sind, wurde für die Analyse der Expressionsstärke hier die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt.

### 2.7.2. Intrazelluläre Proteinfärbung

Sollten neben der Expression von Plasmamembranproteinen auch intrazelluläre Proteine wie Zytokine oder Signalproteine betrachtet werden, wurde der Oberflächenfärbung eine intrazelluläre Proteinfärbung angeschlossen. Dazu wurden die Zellen nach der Fixierung zweimal mit kaltem Permeabilisierungspuffer (1x) gewaschen. Durch die vorherige Fixierung sind die Proteine vernetzt, was nun eine Porenbildung in der Membran ohne deren Freisetzung durch den Permeabilisierungspuffer erlaubt, sodass Antikörper in die Zelle gelangen können. Für die intrazelluläre Färbung wurden die entsprechenden Antikörper in kaltem Permeabilisierungspuffer (1x) angesetzt und je 100 µl dieses Mastermixes zu den Zellen gegeben, um diese für 20 min bei 4 °C zu färben. Darauf wurden die gefärbten Zellen mit 100 µl PBS gewaschen und abschließend für die Analyse am BD LSR Fortessa Durchflusszytometer in 100 µl PBS resuspendiert.

**Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Proteinfärbung mittels Durchflusszytometrie.**

Antigen	Fluorochrom	Klon	µl/1 · 10 <sup>6</sup>	Hersteller
IFNγ	BV421	4S.B3	2	BD
IFNγ	FITC	4S.B3	2	Invitrogen
Granzym B	PE/Dazzle™ 594	QA16A02	2	Biolegend
TNFα	APC	MAb11	2	Invitrogen
Perforin	APC	B-D48	2	Biolegend

### 2.7.3. Sortierung von CD8+ T-Zellen in CD53<sup>niedrig</sup> und CD53<sup>hoch</sup>

Um CD8+ T-Zellen in je eine Population mit hoher und niedriger CD53-Expression zu sortieren, wurden die magnetisch isolierten CD8+ T-Zellen (2.6.4) in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen und anschließend mit Lebend-Totfarbstoff Fixable Viability Dye eF780 gefärbt. Um später ausschließlich CD8+ T-Zellen zu sortieren, erfolgte trotz der bereits durchgeführten Anreicherung eine Färbung mit CD3 PerCP-Cyanine5.5, CD4 APC, CD8 BV421 und CD53 PE (Tabelle 7). Das Sortieren wurde schließlich durch die Zentrale Durchflusszytometrie-Einrichtung am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika am Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt. Dabei wurden die CD8+ T-Zellen in 1 ml FCS sortiert, anschließend in R10 gewaschen und schließlich

in 200 µl R10 in eine 96er-Well Platte überführt. Hier erfolgte eine Stimulation mit PMA und Ionomycin bzw. IL-12, IL-15 und IL-18 wie zuvor beschrieben für 16 h.

## 2.8. Identifikation von Protein-Proteininteraktionen

### 2.8.1. Duolink® *Proximity Ligation Assay*

Um potenzielle Interaktionspartner von CD53 zu identifizieren und zu bestätigen, wurde das flowPLA-System (Sigma Aldrich) etabliert, welches die qualitative Detektion von Protein-Proteininteraktion mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Hierbei werden ausschließlich Interaktionen innerhalb der Plasmamembran untersucht, da hier keine Permeabilisierung der Zellen stattfindet.

Für die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen wurden zunächst 200.000 PBMCs in 100 µl R10 Medium pro Vertiefung einer 96er-Rundbodenplatte ausgesät und ruhen gelassen. Am folgenden Tag erfolgte die Fixierung der Zellen mit intrazellulärem Fixierpuffer für 10 min bei 4 °C. Um unspezifische Bindungen der Primärantikörper und der PLA-Sonden zu verhindern, wurden die Zellen mit einer Blockierlösung des Herstellers für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nicht gebundene Bestandteile dieser wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit dem PLA-Waschpuffer entfernt. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten wurde dazu bei 400 x g für 5 min und RT durchgeführt. CD53 und seine potenzielle Interaktionspartner wurden nachfolgend mit Hilfe von Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C markiert, wobei ein Maus-Antikörper das Tetraspanin CD53 und ein Kaninchen-Antikörper den potenziellen Interaktionspartner von CD53 erkennt. Dies ermöglicht schließlich nach Entfernen ungebundener Primärantikörper eine erfolgreiche Bindung der PLA-in-Situ-Sonde PLUS (anti-Maus) und der PLA-in-Situ-Sonde MINUS (anti-Kaninchen) für 1 h bei 37 °C (Abbildung 5 links).

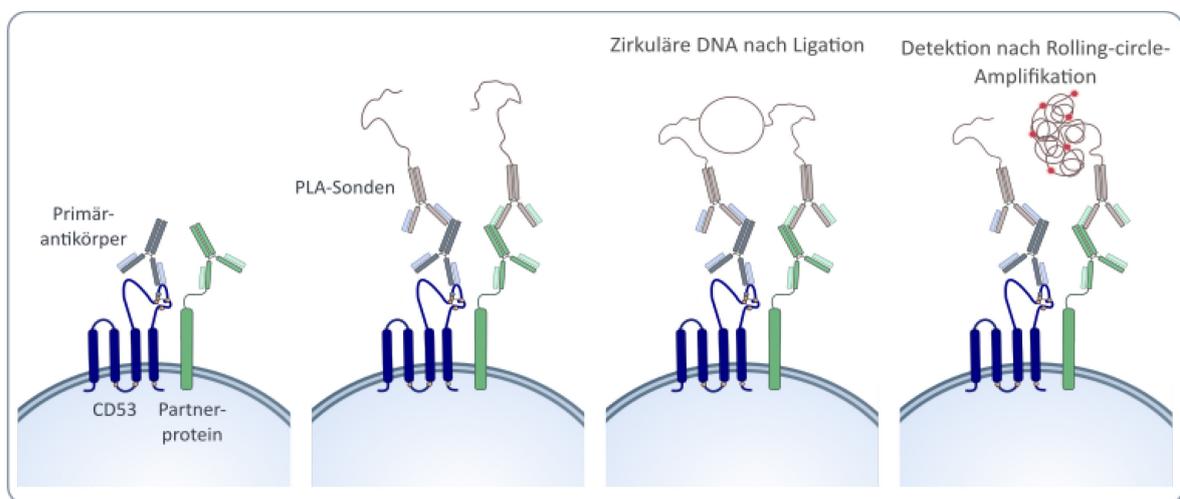
**Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für PLA**

Antigen	Klon	Spezies	µl/200.000	Hersteller
CD53	MEM53	Maus	4	BioRad
CD2	118	Kaninchen	0,5	Invitrogen
CD38	JE29-35	Kaninchen	1	Invitrogen
CD69	Polyklonal	Kaninchen	5	Invitrogen
CD25	216	Kaninchen	0,5	Invitrogen

Jede PLA-Sonde besitzt einen kurzen, sequenzspezifischen DNA-Strang. Nachdem nicht gebundene Sonden durch zweimaliges Waschen entfernt wurden, können diese Oligonukleotide mit Hilfe einer Ligase sowie weiteren Oligonukleotiden zu einem zirkulären DNA-Strang verbunden

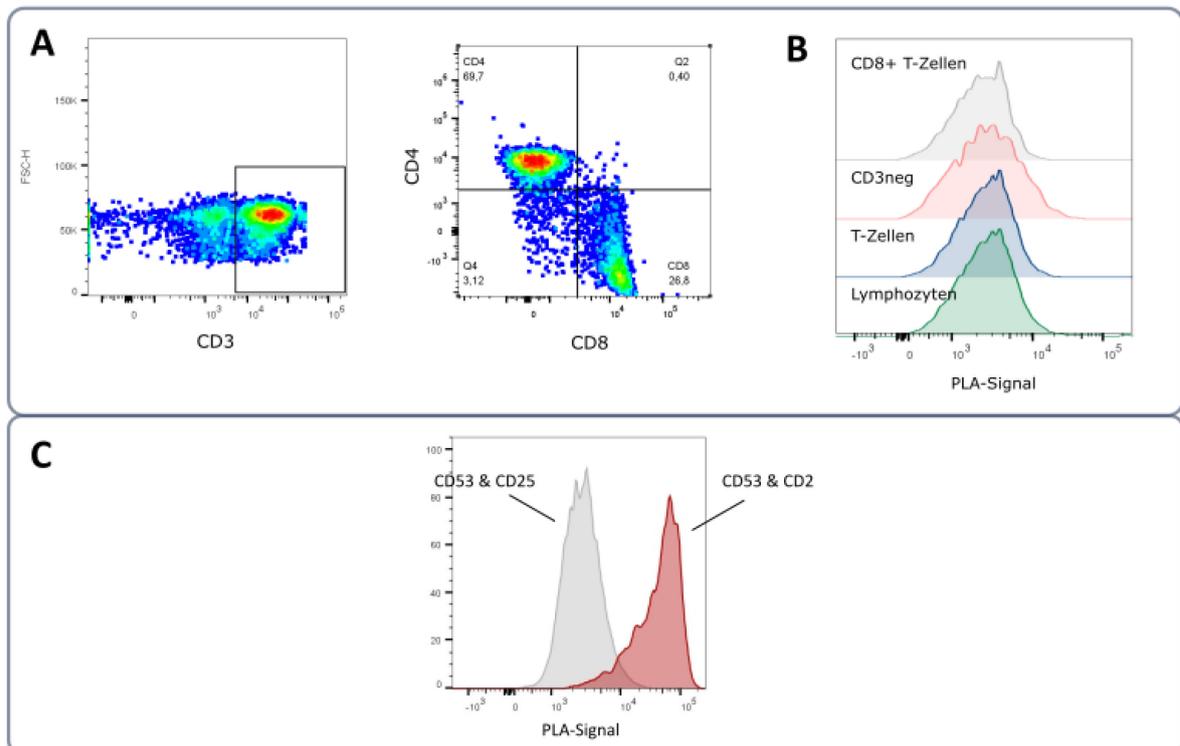
werden. Eine solche Ligation ist nur dann möglich, wenn die Primärantikörper mit den gebundenen Sonden nicht mehr als 40 nm voneinander entfernt liegen. Nach 30 min Ligation bei 37 °C werden die Zellen erneut zweimal gewaschen. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase kann die zirkuläre DNA nun vervielfältigt werden. Die Amplifikation findet hierfür über Nacht bei 37 °C statt (Abbildung 5 Mitte).

Zuletzt wurden der zirkulären DNA komplementäre Oligonukleotide hinzugegeben, die zudem mit einem Fluorochrom markiert sind. Erfolgte eine Amplifikation der zirkulären DNA, können diese nun an die DNA binden und somit zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führen (Abbildung 5 rechts). Diese wurde mittels Durchflusszytometrie nach 30 min Inkubation mit dem Detektionsreagenz und abschließendem Waschen nachgewiesen.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des *Proximity Ligation Assays* (PLA) zum Nachweis von Interaktionspartnern des Proteins CD53. Die PLA-Sonden können nur dann miteinander über eine zirkuläre DNA-Struktur verknüpft werden, wenn sie sich in räumlicher Nähe befinden. Nach Amplifikation der DNA können sich komplementäre und Fluorochrom-markierte Oligonukleotide an die vervielfältigte DNA anlagern.

Um die Fluoreszenzsignale einordnen zu können, wurde als Negativkontrolle die Nähe zwischen CD53 und CD25 im ruhenden Zustand auf CD8+ T-Zellen betrachtet, da diese erst nach Stimulation das Protein CD25 exprimieren. Dazu erfolgte eine Oberflächenfärbung nach Abschluss des PLA-Systems (Abbildung 6A). Bei der Analyse des PLA-Signals zeigte sich für alle Lymphozyten-Populationen eine vergleichbare Signalintensität für CD25 und CD53 im ruhenden Zustand, sodass die Negativkontrolle auch auf alle anderen Populationen zusätzlich zu CD8+ T-Zellen angewendet werden kann (Abbildung 6B). Zudem wurde für jedes durchgeführte Experiment mindestens eine Positivkontrolle mitgeführt. Dazu wurde die bereits beschriebene Interaktion zwischen CD2 und CD53 auf Lymphozyten analysiert (Bell et al. 1992) (Abbildung 6C).



**Abbildung 6: PLA-Signal der Negativkontrolle auf Lymphozyten-Populationen nach Oberflächenfärbung.** A: Oberflächenfärbung mit den Markern CD3, CD4 und CD8 nach Abschluss des PLA-Systems. B: PLA-Signal von CD25 und CD53 als Negativkontrolle auf verschiedenen Lymphozyten-Populationen im ruhenden Zustand der Zellen. C: PLA-Signal der Negativkontrolle (CD53 & CD25) und der Positivkontrolle (CD53 & CD2).

### 2.8.2. Nähe-abhängige Biotin-Identifikation (BioID)

Die Nähe-abhängige Biotin-Identifikation (kurz BioID) erlaubt die Markierung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. Dazu wird das Zielprotein mit einer mutierten Version der Biotin-Ligase (BirA R118G, kurz: BirA\*) aus *E. coli* gekoppelt. Die eingeführte Aminosäuresubstitution an Position 118 (R118G) führt dazu, dass das Enzym eine ausgeprägte Biotin-Ligase-Aktivität zeigt und nach externer Biotinzugabe alle Proteine in einem Radius von ca. 10 nm biotinyliert (Roux et al. 2012; Choi-Rhee et al. 2004). Die so markierten Proteine können anschließend isoliert und weiter analysiert werden. Damit stellt die BioID eine gute Methode dar, um Interaktionsnetzwerke und Signalkomplexe zu identifizieren und Proteinfunktionen aufzudecken.

Die Etablierung der BioID für CD53 sowie für vier weitere CD53-Mutanten erfolgte durch Katharina Maria Richter, die ich während ihrer Masterarbeit (Katharina Maria Richter 2022) betreut habe. Somit wurden alle BioID Experimente von ihr durchgeführt, während die Planung und Betreuung des BioID-Projekts sowie die finale Auswertung der MS-Analysen von mir übernommen wurden.

### Generierung stabiler Jurkat-Zelllinien

Um das Interaktom von CD53 in Jurkat-Zellen analysieren zu können, wurde das Fusionsgen aus CD53 und der Biotinligase mittels lentiviraler Transduktion in die Suspensionszellen eingebracht und schließlich stabil exprimiert. Zunächst wurden hierfür in leicht transfizierbaren HEK293T lentivirale Pseudopartikel erstellt, die schließlich den Gentransfer per Transduktion in die schwerer transfizierbaren Jurkat-Zellen ermöglichen (Abbildung 7).

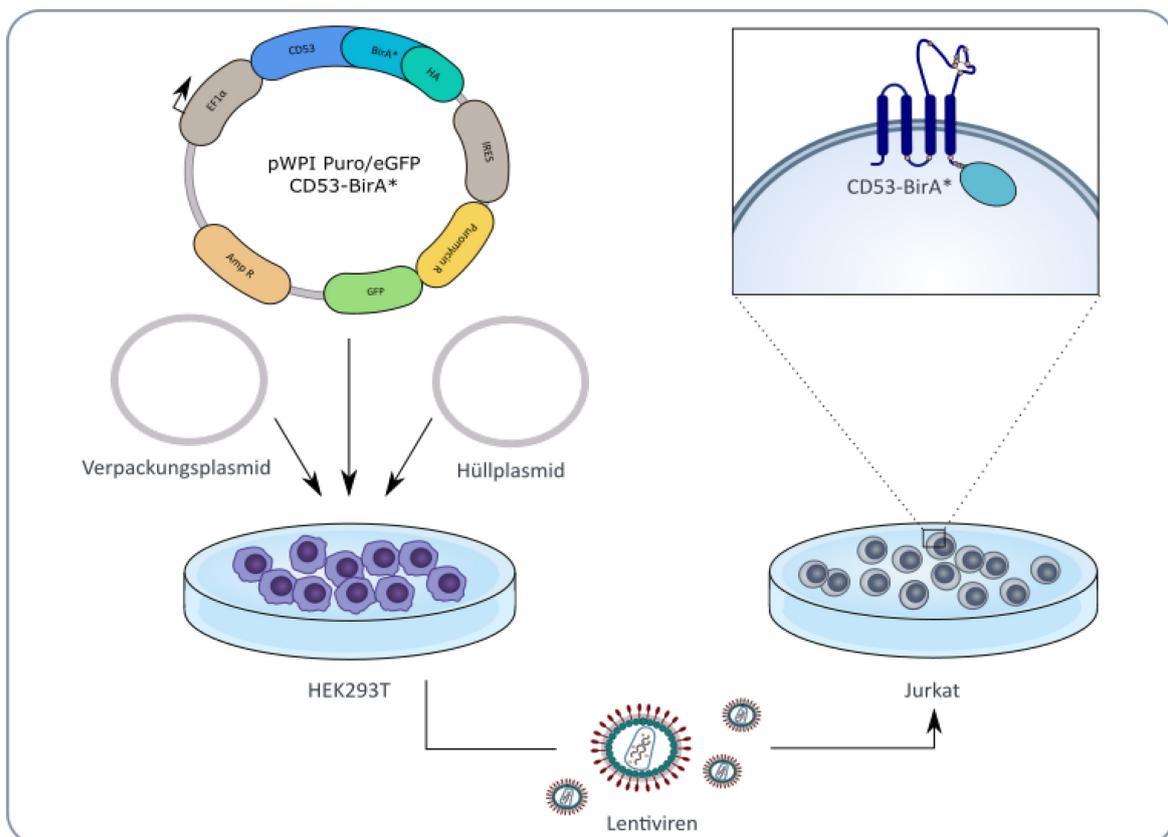


Abbildung 7: Prozess der Generierung stabiler Jurkat-Zelllinien mit dem Fusionskonstrukt CD53-BirA\*.

Für die Generierung lentiviraler Pseudopartikel wurde ein DNA-Mix aus 8 µg Verpackungsplasmid, 8 µg Hüllplasmid und 12 µg Expressionsplasmid, welches die Sequenz für das Fusionsprotein CD53-BirA\* enthält, in 1,5 ml DMEM<sup>FCS-frei</sup> erstellt. Dieser wurde zusammen mit 48 µl TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz in 1,5 ml DMEM<sup>FCS-frei</sup> nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT vermischt. Nachdem innerhalb von 20 min eine spontane Komplexbildung aus DNA und Transfektionsreagenz erfolgt ist, wurde das Gemisch zu  $3 \cdot 10^6$  HEK293T in 3 ml DMEM<sup>FCS-frei</sup> pipettiert und in T75 Flaschen ausgesät. Um eine bessere Adhäsion der HEK293T-Zellen zu gewährleisten, wurden die verwendeten Zellkultur-Flaschen zuvor mit 3 ml Poly-L-Lysin beschichtet. 16 h nach der Transfektion erfolgte ein Medium-Wechsel, bei dem die HEK293T nun mit 10 ml DMEM inkl. 10 %

FCS-Superior versorgt wurden. Die von den HEK293T freigesetzten lentiviralen Pseudopartikel wurden an den beiden folgenden Tagen durch Abnahme des Zellkultur-Überstandes geerntet und bis zur Infektion bei 4 °C gelagert. Um mögliche zelluläre Verunreinigungen zu beseitigen, wurde der Überstand jeweils steril filtriert (0,2 µm Filter).

Für die Erstellung einer stabilen Jurkat-Linie wurden nun  $2 \cdot 10^6$  Jurkat-Zellen in 200 µl R10 zusammen mit 7 ml Virus-Überstand für 30 min bei 115 x g zentrifugiert. Nach dem so unterstützten Viruseintritt wurden die Zellen erneut in R10 resuspendiert und zunächst für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um in dieser Zeit sowohl das Fusionsprotein als auch die auf dem Plasmid kodierte Puromycin-Resistenz auszubilden. Anschließend erfolgte die Selektion mit Puromycin in R10-Medium.

Neben dem Fusionskonstrukt aus CD53-WT und BirA\* wurden zusätzlich weitere CD53-Mutanten BirA\*-exprimierender Jurkat-Zellen generiert. Um später unspezifische Interaktionen ausschließen zu können, wurde ebenfalls die Biotinligase BirA\* allein in Jurkat-Zellen exprimiert (s. Tabelle 10). Alle Linien wurden im Rahmen der Masterarbeit von Katharina Richter hinsichtlich ihrer Biotinylierung und Expression der Konstrukte mit Hilfe eines Western-Blots überprüft.

**Tabelle 10: Generierte Jurkat-Zelllinien im Rahmen der CD53-BioID.** Mit Hilfe der etablierten mutierten CD53-BirA\*-Linien soll die Rolle spezifischer Strukturelemente und posttranslationaler Modifikationen bei der Interaktion mit Partnerproteinen untersucht werden. Das CD53-WT-BirA\*-Konstrukt schlüsselt hingegen das gesamte CD53-Interaktom auf.

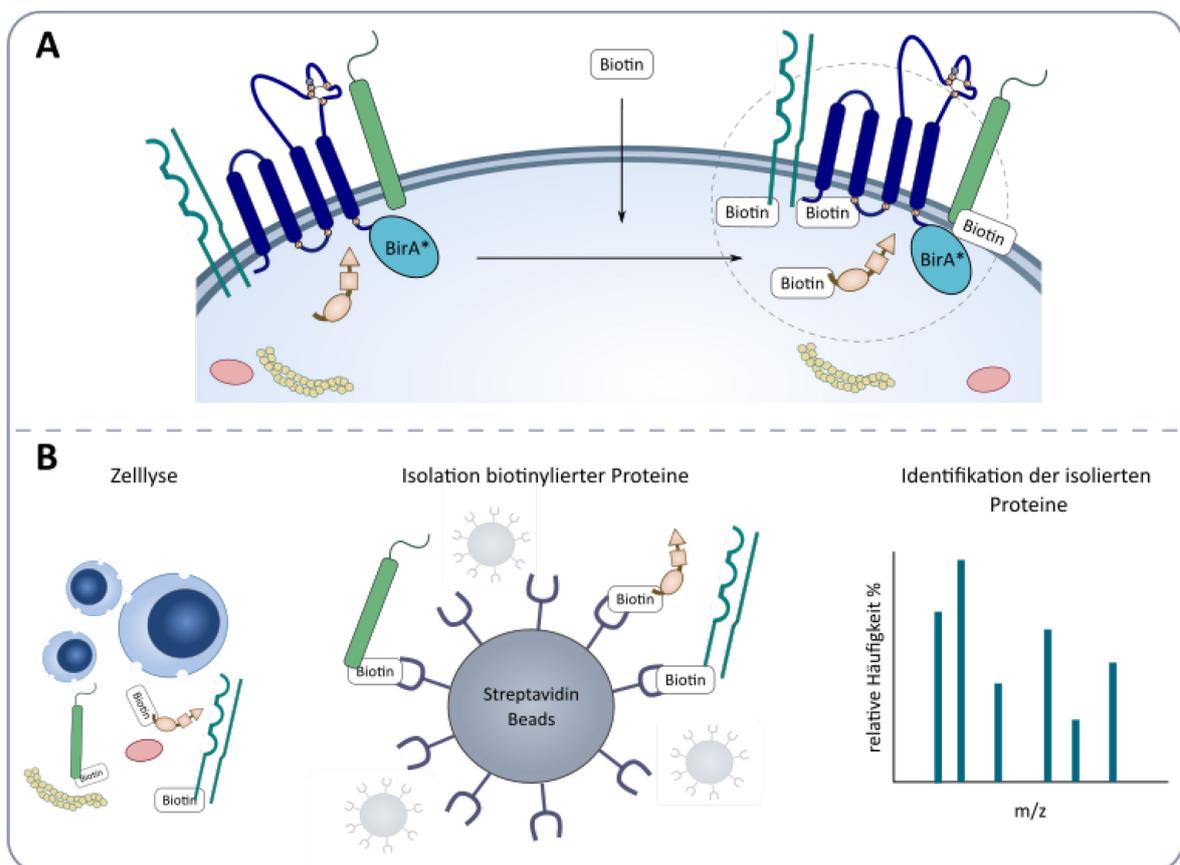
Zelllinie	Abkürzung	Mutation in CD53	Konsequenz/Funktion
CD53-BirA*	WT	keine	Analyse des CD53-Interaktoms
CD53(EC1*)-BirA*	EC1	Substitutionen an L43A, F44A, H45A und N46A	Stützfunktion der EC1 wird gestört bzw. aufgehoben
CD53(EC2*)-BirA*	EC2	Substitutionen an C144A, C145A, C161A und C170A	Auflösung der bilobulären EC2-Struktur
CD53(Palm*)-BirA*	Palm	Substitutionen an C71A, C80A und C208A	Verhinderte Palmitoylierung von CD53
CD53(ΔPDZ)-BirA*	ΔPDZ	Deletion der TIGL-Sequenz am C-Terminus	Deletion des Erkennungsmotives für PDZ-Proteine am C-Terminus von CD53
BirA*	BirA*	Deletion von CD53	Identifizierung unspezifisch-biotinylierter Proteine

### Biotinylierung von CD53-räumlich nahen Proteinen

Für die Analyse des CD53-Interaktoms wurden  $20 \cdot 10^6$  Jurkat-Zellen mit dem entsprechenden Fusionsprotein in 35 ml DMEM kultiviert. Da das eigentlich für Jurkat-Zellen verwendete R10-Medium bereits Biotin enthält und so zu einer permanenten Biotinylierung von Proteinen in

räumlicher Nähe des CD53-BirA\*-Konstruktes führen würde, wurde hier für die Kultivierung stattdessen DMEM verwendet. Die Viabilität der Zellen wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Um die BirA\*-Aktivität in den Zellen zu induzieren, wurden diese mit 50  $\mu\text{M}$  Biotin behandelt und für eine maximale Biotinylierung 48 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert (Abbildung 8 A).

Für die spätere Isolation biotinylierter Proteine wurden die Zellen sedimentiert, zweimal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und schließlich durch Zugabe von 260  $\mu\text{l}$  BioID-Lysepuffer, 26  $\mu\text{l}$  Triton X-100 und 400  $\mu\text{l}$  BioID Waschpuffer 4 permeabilisiert. Durch zusätzliches Vortexen wurde die Lyse der Zellen unterstützt. Um schließlich den entstandenen Zelldetritus von den extrahierten Proteinen zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 21700 x g für 10 min bei 4 °C.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufes der BioID.** A: Durch Zugabe von Biotin kann die an CD53-gekoppelte BirA\* Proteine im Umkreis von ca. 10 nm biotinylieren. B: Durch Lyse der Jurkat-Zellen werden alle Proteine freigesetzt. Aufgrund der starken Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin können anschließend alle biotinylierten Proteine isoliert werden. Die Identifikation der so isolierten Proteine erfolgt mittels Massenspektrometrie.

Zeitgleich erfolgte die Äquilibrierung der Streptavidin-Beads, wobei 100  $\mu\text{l}$  Beads zweimal mit 1 ml Waschpuffer 4 gewaschen wurden. Nun wurde der Protein-Überstand vom präzipitierten Zelldetritus abgenommen und nach Abnahme eines 20  $\mu\text{l}$  Aliquotes für eine Western-Blot-Analyse

komplett zu den äquilibrierten *Beads* gegeben. Während der einstündigen Inkubation auf dem Rotator (40 rpm) erfolgte die Bindung biotinylierter Proteine an Streptavidin-*Beads*, sodass anschließend nicht gebundene Proteine entfernt werden können. Hierzu erfolgte eine Zentrifugation bei 500 x g für 8 min, um nachfolgend den Überstand zu verwerfen. In sich anschließenden Waschschritten wurden wiederum unspezifische Bindungen mit stringenten Puffern (8 min bei 40 rpm und RT) beseitigt. Hierzu wurde zweimal mit BioID-Waschpuffer 1, einmal mit Waschpuffer 2, einmal mit Waschpuffer 3 und abschließend mit Waschpuffer 4 (Zusammensetzung s. Tabelle 3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte schließlich mit Hilfe eines Biotin-Überschusses im BioID Elutionspuffer bei 900 rpm und 98 °C für 20 min. Nach kurzer Zentrifugation bei 16.000 x g wurden die Proben im Elutionspuffer bei -20 °C gelagert. Die Identifikation der so isolierten Proteine erfolgte über Massenspektrometrie und wurde als Auftrag durch das Molecular Proteomics Labor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt (Abbildung 8 B).

## 2.9. Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe von GraphPad PRISM 9.0 durchgeführt. Da es sich um humane Patientenproben handelt, wurde eine Normalverteilung angenommen. Der jeweils durchgeführte statistische Test wird in dieser Arbeit unter jeder Abbildung aufgeführt. Die Nullhypothese wurde verworfen und ein signifikanter Unterschied angenommen, wenn der p-Wert kleiner 0,05 war.

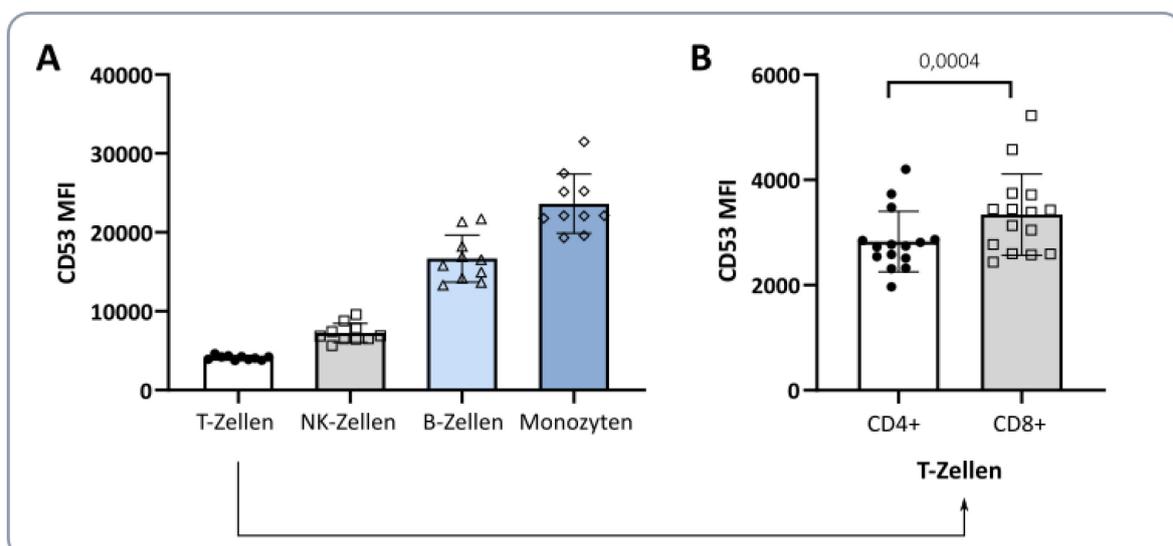
Für die Ermittlung von Korrelationen zwischen zwei Parametern wurde der Pearson Korrelationskoeffizient  $r$  berechnet. Werte zwischen  $|0,3|$  und  $|0,5|$  wurden dabei als moderate Korrelation gewertet, während Werte über  $|0,5|$  einen starken Zusammenhang markieren. Für kleinere Werte unter  $|0,3|$  wurde kein korrelativer Zusammenhang angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. CD53 markiert eine spezifische CD8+ T-Zell-Population

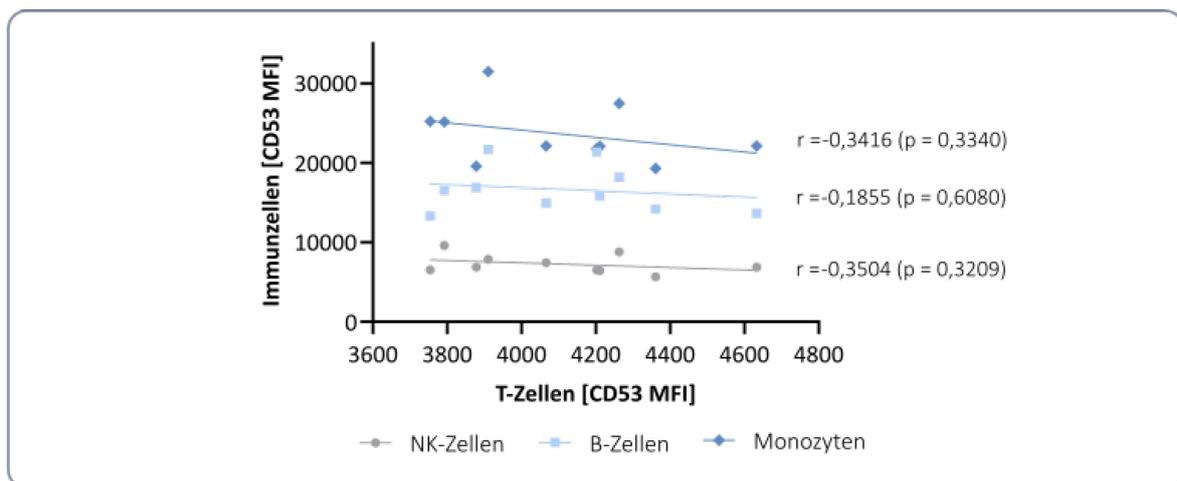
##### 3.1.1. Basale Oberflächenexpression des Tetraspanins CD53 auf humanen Lymphozyten

Da sich die CD53-Expression überwiegend auf das Immunzellkompartiment beschränkt, scheint dieses Tetraspanin eine zentrale Rolle im immunologischen System zu spielen. Wie Olweus et. al bereits 1993 mit Hilfe der CD53-Antikörperklone MEM53 und HD77 gezeigt haben, besitzen humane Monozyten und B-Zellen die stärkste CD53-Oberflächenexpression. NK-Zellen und T-Zellen zeigen dagegen deutlich weniger CD53 auf ihrer Zelloberfläche, wobei T-Zellen insgesamt die niedrigsten CD53-Menge aufweisen (Abbildung 9A, (Olweus et al. 1993b)). Dies kann in dieser Arbeit noch einmal auf primären Immunzellen von gesunden, humanen Spendern mit dem CD53-Antikörperklon HI29 bestätigt werden. Unterteilt man die humanen T-Zellen des peripheren Blutes weiter in ihre beiden Untergruppen, zeigen CD8+ T-Zellen eine signifikant höhere CD53-Oberflächenexpression als CD4+ T-Zellen (Abbildung 9B). Dies deutet eine besondere funktionale Rolle des Tetraspanins für humane CD8+ T-Zellen an. Diese wurden bisher hinsichtlich ihrer CD53-Expression und der funktionellen Bedeutung von CD53 im humanen System kaum untersucht. Somit ist eine Analyse von CD8+ T-Zellen in primären, humanen Zellen besonders interessant.



**Abbildung 9: Oberflächenexpression des Tetraspanins CD53 auf humanen Immunzellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern.** Die Oberflächenfärbung und durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) erfolgt mit Hilfe des monoklonalen CD53-Antikörperklons HI29. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. A: Analyse der CD53-Oberflächenexpression von 10 Probanden mittels Durchflusszytometrie auf verschiedenen Immunzellpopulationen. T-Zellen und NK-Zellen zeigen eine geringere Expression als B-Zellen und Monozyten. B: Analyse der CD53-Expression auf der Oberfläche von T-Zellen 15 gesunder Spender in einem T-Zell-Panel. CD8+ T-Zellen besitzen mehr CD53 auf ihrer Zelloberfläche als CD4+ T-Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test.

Zur Untersuchung, ob die CD53-Oberflächenexpression auf T-Zellen mit der Expression auf den übrigen Immunzellen korreliert, erfolgt eine neue Analyse der Daten aus Abbildung 9A. Eine hohe CD53-Expression auf T-Zellen geht dabei nicht mit einer hohen Expression auf den übrigen Immunzellpopulationen (NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten) einher (Abbildung 10). Dies deutet darauf hin, dass die CD53-Expression auf T-Zellen unabhängig von den übrigen Immunzellpopulationen kontrolliert und reguliert wird. Daher ist es umso bedeutsamer der funktionalen Rolle von CD53 auf T-Zellen als zentrale Effektoren der adaptiven Immunantwort nachzugehen.

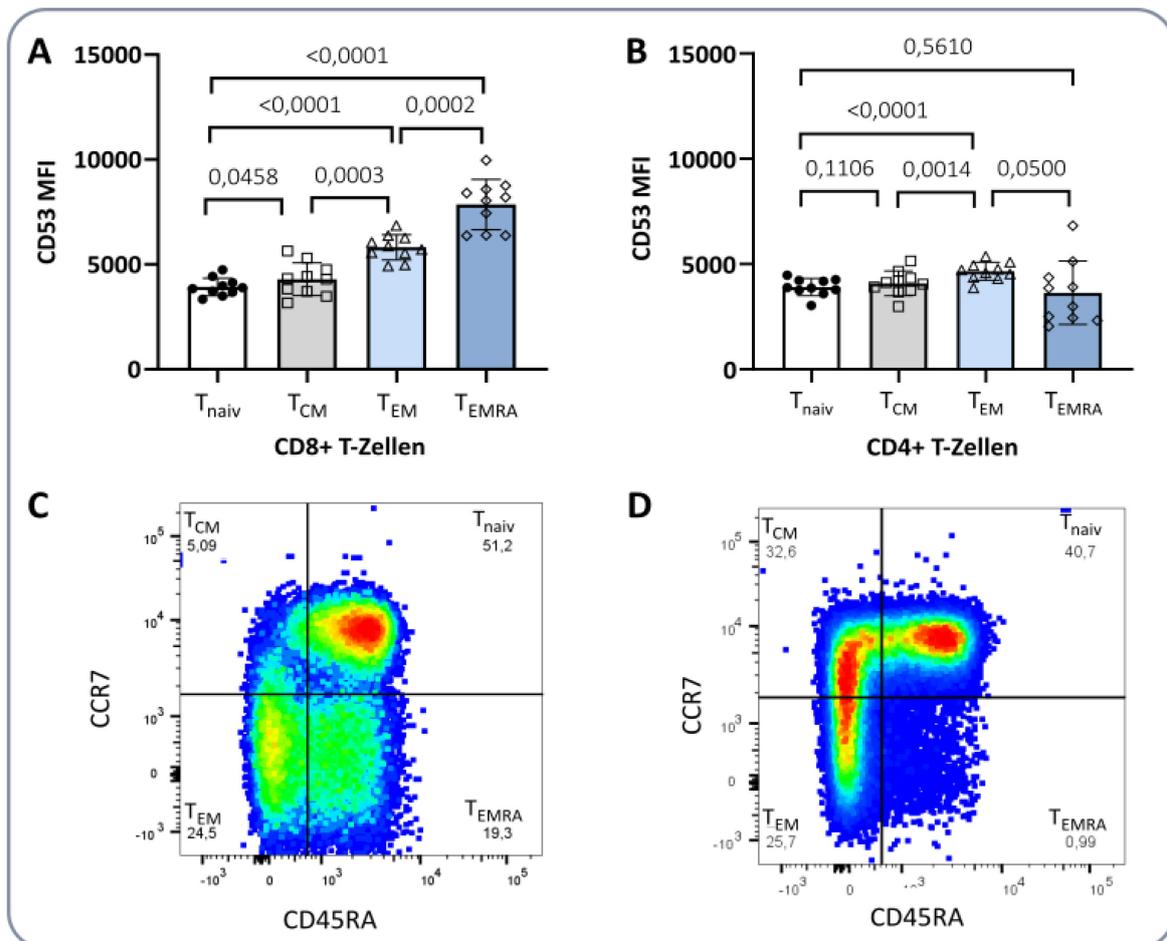


**Abbildung 10: Die CD53-Expression auf T-Zellen ist unabhängig von der auf anderen Immunzellpopulationen.** Reanalyse der Daten aus Abbildung 9A. Es zeigt sich kein korrelativer Zusammenhang zwischen der CD53-Menge auf T-Zellen mit den CD53-Mengen auf NK-Zellen (grau), B-Zellen (hellblau) oder Monozyten (dunkelblau). Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  mit beidseitigem Hypothesentest.

### 3.1.2. CD53 markiert Antigen-erfahrene CD8+ T-Zellen

*Ex vivo* zeigen T-Zellen bereits einen Unterschied in der CD53-Menge anhängig von ihrer Funktion als T-Helferzelle (CD4+ T-Zelle) oder als zytotoxische T-Zelle (CD8+ T-Zelle). T-Zellen können jedoch zusätzlich mit Hilfe von Differenzierungsmarkern in naive und Gedächtnis-T-Zellen unterteilt werden (Abbildung 11 C und D). Während naive T-Zellen vor allem durch den Marker CD45RA gekennzeichnet sind, fehlt dieser auf zentralen Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) und Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ). Die Gedächtniszellen unterscheiden sich wiederum durch die Expression von CCR7, welcher es den  $T_{CM}$  erlaubt, in die sekundären lymphatischen Organe wie die Lymphknoten einzuwandern, aber von den  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  nicht benötigt wird und hier fehlt (siehe auch 1.1.4). Die sogenannten terminaldifferenzierten Effektor-Gedächtniszellen mit Re-Expression von CD45RA ( $T_{EMRA}$ ) bilden eine Untergruppe, welche besonders bei CD8+ T-Zellen vertreten ist (Sallusto et al. 1999a; Sallusto et al. 2004). Die  $T_{EMRA}$ -Frequenz bei CD4+ T-Zellen ist dagegen individuell verschieden und kann stark schwanken (Burel et al. 2017). Somit verändern sich auf dem Weg der Differenzierung

von einer naiven T-Zelle über eine  $T_{CM}$  zu  $T_{EM}$  und schließlich zu  $T_{EMRA}$  die Expression der Oberflächenproteine CCR7 und CD45RA. Gleichzeitig erwirbt oder verliert die Zelle mit der Differenzierung auch spezifische Funktionen wie Zytotoxizität oder Lokalisation in Geweben (Mahnke et al. 2013).

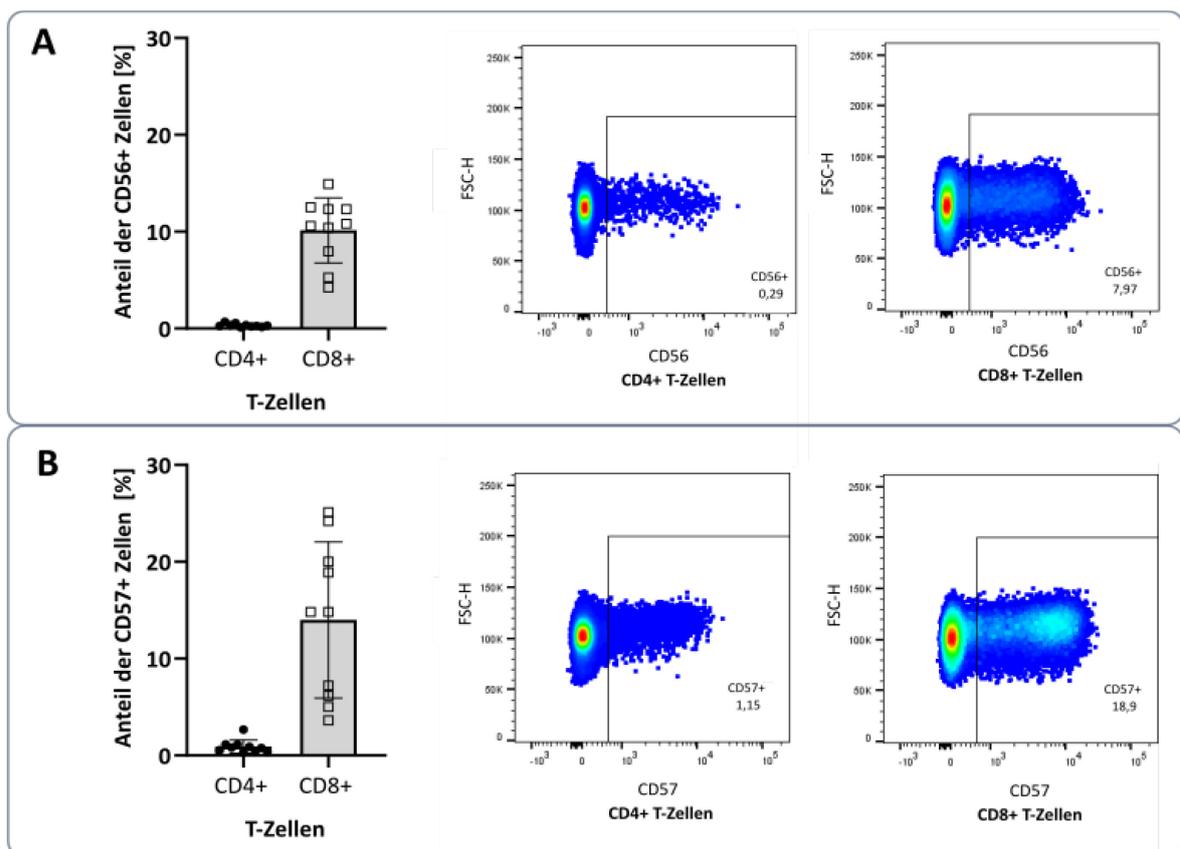


**Abbildung 11: CD53-Expression auf der Oberfläche von naiven und Gedächtnis-T-Zellen.** Insgesamt werden 10 gesunde Spender durchflusszytometrisch analysiert. A und B: CD8+ T-Zellen (A) zeigen eine stufenartige Erhöhung der CD53-Expression von naiven T-Zellen hin zu terminal-differenzierten Gedächtnis-T-Zellen mit Re-Expression von CD45RA ( $T_{EMRA}$ ). CD4+ T-Zellen (B) zeigen keine Veränderung der CD53-Expression. Die statistische Analyse erfolgt mittels gepaartem t-Test. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. C und D: Strategie zur durchflusszytometrischen Identifikation von naiven und Gedächtnis-T-Zellen bei CD8+ T-Zellen (C) und CD4+ T-Zellen (D). Gezeigt ist jeweils das Punktdiagramm eines repräsentativen Spenders.

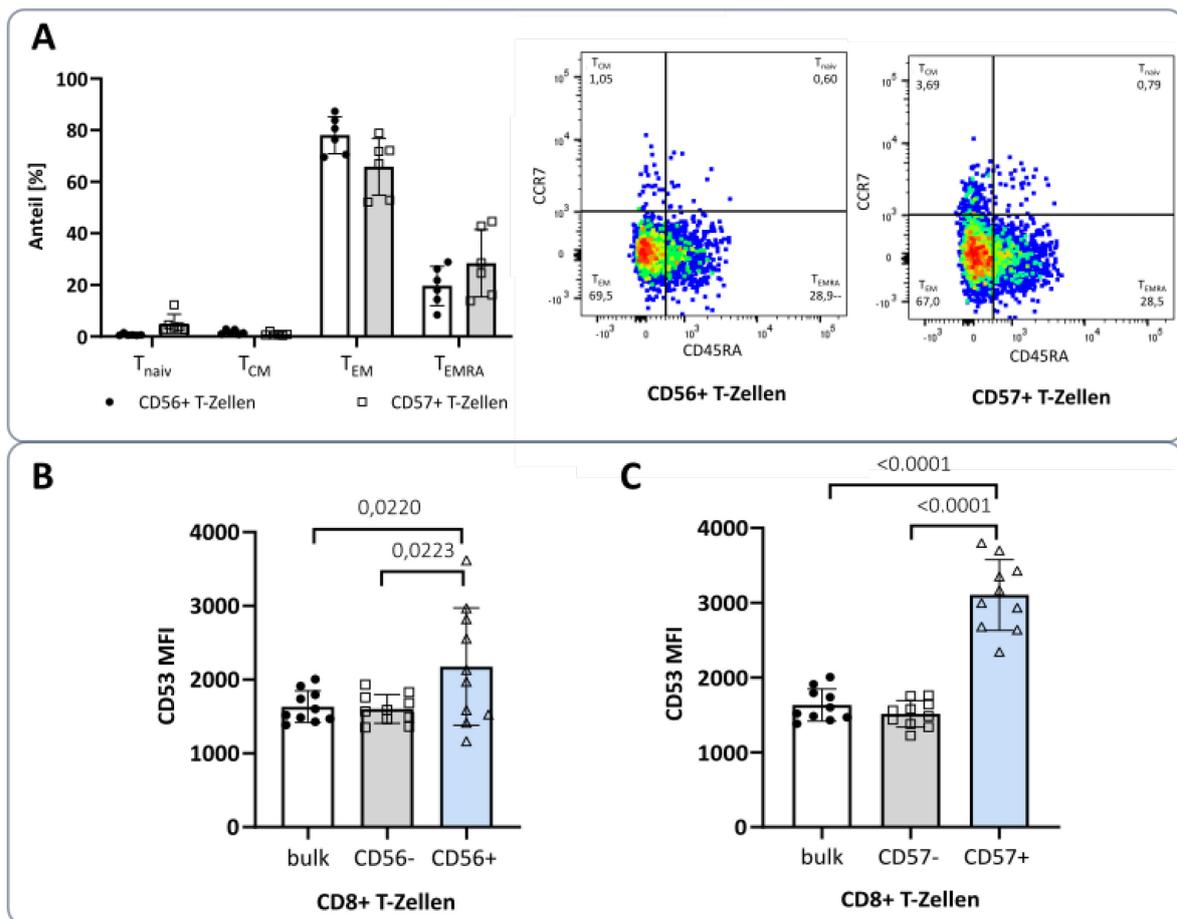
Betrachtet man das Vorkommen von CD53 auf der Zelloberfläche dieser einzelnen Populationen in gesunden Spendern, kann erneut ein Unterschied zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 11A und B). Auf CD8+ T-Zellen nimmt die CD53-Expression mit zunehmender Differenzierung zu: Naive CD8+ T-Zellen zeigen somit die geringste CD53-Menge, welche über  $T_{CM}$  zu  $T_{EM}$  hin zu  $T_{EMRA}$  signifikant stufenweise zunimmt. Die CD4+ Subpopulationen weisen hingegen alle eine sehr ähnliche CD53-Expression auf. Zwar zeigen hier die  $T_{EM}$  eine höhere

CD53-Expression, jedoch ist der Anstieg von  $T_{CM}$  zu  $T_{EM}$  deutlich schwächer ausgeprägt. Außerdem besitzen  $T_{EMRA}$  hier sogar eine geringere CD53-Menge im Vergleich zu den  $T_{EM}$  und  $T_{naiv}$  auf (Abbildung 11B). Somit ist die hohe CD53-Expression auf  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  für CD8+ T-Zellen spezifisch.

Nicht nur die Einteilung in naive und Gedächtnis-T-Zellen erlaubt eine Aussage über den Differenzierungsstatus einer T-Zelle. So wird CD57 als Marker später Differenzierung und replikativer Seneszenz (irreversibler Zellzyklusarrest aufgrund verkürzter Telomere) beschrieben, wobei CD57+ T-Zellen im Laufe des Alters oder durch chronische Antigen-Stimulation im Rahmen verschiedener Erkrankungen akkumulieren (Brenchley et al. 2003; Kared et al. 2016; Wood et al. 2009). Auch der NK-Zell-Marker CD56 wurde auf T-Zellen schon mit replikativer Seneszenz in Verbindung gebracht (Lemster et al. 2008). Darüber hinaus markieren sowohl CD57 als auch CD56 jene T-Zellen mit hohem zytotoxischem Potenzial und finden sich überwiegend auf  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  (Le Priol et al. 2006; Romero-Olmedo et al. 2021; Pittet et al. 2000; Verma et al. 2017).



**Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der CD56+ und CD57+ Populationen auf T-Zellen.** Analysiert werden insgesamt 10 gesunde Spender mittels Durchflusszytometrie. Expression von CD56 (A) oder CD57 (B) auf CD4+ und CD8+ T-Zellen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Rechts sind die Punktdiagramme jeweils eines repräsentativen Spenders aus der FACS-Analyse dargestellt.



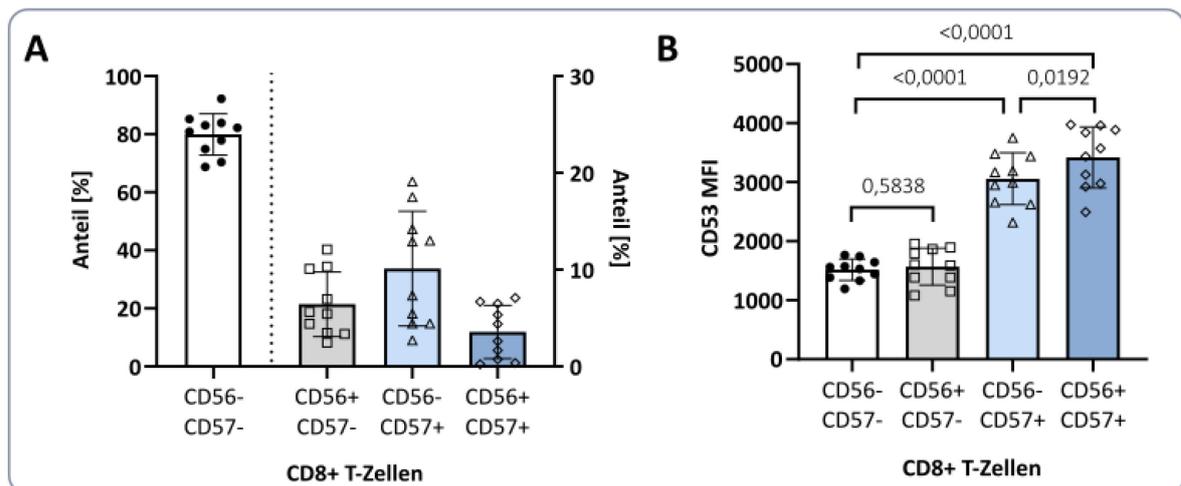
**Abbildung 13: CD56+ und CD57+ T-Zellen stellen vor allem Effektor-Gedächtnis-T-Zellen dar und weisen eine erhöhte CD53-Expression auf.** A: Durchflusszytometrische Einteilung von CD56+ oder CD57+ T-Zellen in naive und Gedächtniszellen anhand der CCR7- und CD45RA-Expression. Analysiert werden sechs gesunde Spender. Rechts ist je ein repräsentatives Punktdiagramm dargestellt. B und C: CD53 Expression auf CD56+/- (B) sowie CD57+/- CD8+ T-Zellen (C) von 10 gesunden Spendern in durchflusszytometrischer Analyse. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Es erfolgt ein gepaarter t-Test.

Bei der Analyse dieser beiden speziellen T-Zellpopulationen finden sich CD56+ und CD57+ Populationen vor allem unter den CD8+ T-Zellen. Unter den CD4+ T-Zellen machen diese Populationen hingegen einen verschwindend geringen Anteil aus (Abbildung 12). Betrachtet man des Weiteren, wie sich CD56+ und CD57+ CD8+ T-Zellen in naive und Gedächtniszellen aufteilen, stellen sie wie in der Literatur beschrieben (Verma et al. 2017; Le Priol et al. 2006; Romero-Olmedo et al. 2021; Pittet et al. 2000) vor allem  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  dar (Abbildung 13A). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, handelt es sich nur bei CD8+- $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  um die Zellgruppen mit der höchsten CD53-Expression (Abbildung 11), nicht aber bei CD4+ T-Zellen. Da CD56+ und CD57+ Zellen nur in der Gruppe der CD8+ T-Zellen nennenswert vorkommen, könnten diese verantwortlich für die hohe CD53-Expression auf CD8+  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  sein. Daher soll für CD8+ T-Zellen zusätzlich die CD53-Menge auf der Zelloberfläche von CD56+ und CD57+ Zellen analysiert werden. Erwartungsgemäß

zeigen CD56+ CD8+ T-Zellen bzw. CD57+ CD8+ T-Zellen eine signifikant höhere CD53-Expression im Vergleich zu ihrem negativen Pendant oder der gesamten CD8+ T-Zellpopulation (*bulk*) (Abbildung 13B und C).

Zusammenfassend handelt es sich bei CD56+ und CD57+ T-Zellen um eine Zellpopulation mit hoher CD53-Expression, die vor allem dem Effektor-T-Gedächtnispool ( $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$ ) entstammt. Als ein eigenes Phänomen der CD8+ T-Zellpopulation liefert sie eine Erklärung für die CD8+ T-Zell-spezifische hohe CD53-Expression auf  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$ .

Um zu verifizieren, ob CD56+ und CD57+ CD8+ T-Zellen gleichermaßen für eine hohe CD53-Expression verantwortlich sind, soll im nächsten Schritt die Einzel- und Doppelsexpression der beiden Marker analysiert werden. Rund 20 % der CD8+ T-Zellen trägt mindestens einen der beiden Marker, wobei hier der geringste Teil doppelt positiv ist. Am häufigsten finden sich stattdessen CD56- CD57+ CD8+ T-Zellen. Bei Analyse der CD53-Expression wird deutlich, dass sich CD56+ CD57- CD8+ T-Zellen nicht von CD56- CD57- CD8+ T-Zellen unterscheiden. Erst bei Koexpression von CD57 sind signifikant höhere CD53-Mengen nachweisbar. Dabei weisen doppelt positive CD8+ T-Zellen die stärkste CD53-Expression auf. Folglich geht die hohe CD53-Expression ausschließlich auf CD57+ CD8+ T-Zellen zurück. CD53 findet sich *ex vivo* also vor allem auf stark differenzierten CD8+ T-Zellen ( $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$ ), die darüber hinaus ein besonderes zytotoxisches Potenzial besitzen und sich vermutlich der replikativen Seneszenz annähern (CD57+).

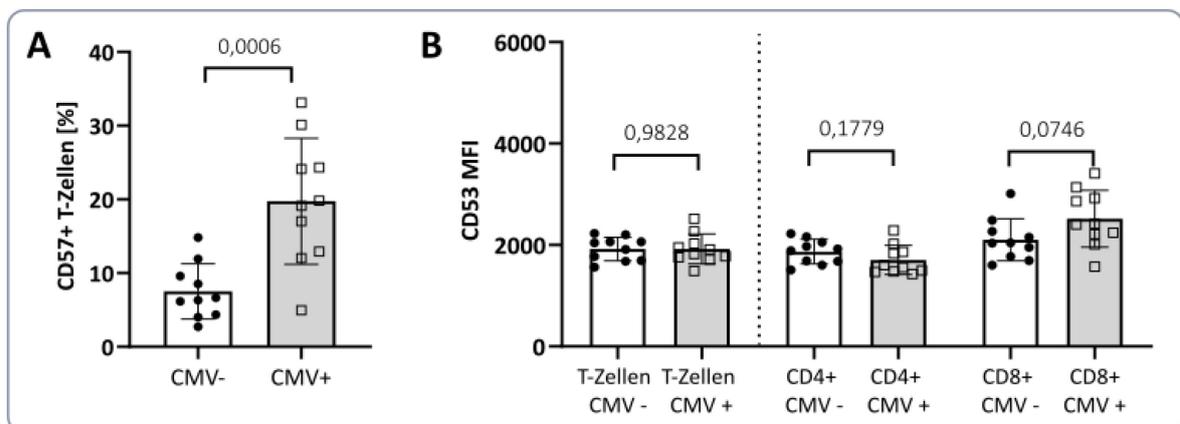


**Abbildung 14: Koexpression von CD56 und CD57 auf CD8+ T-Zellen.** Insgesamt werden 10 gesunde Spender durchflusszytometrisch betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. A: Prozentualer Anteil der einzelnen CD8+ T-Zell-Populationen. 80 % zeigen keine Expression von CD56 und CD57 (linke y-Achse). Die übrigen 20 % teilen sich auf in CD56+ CD57-, CD56- CD57+ und doppelt positiv (rechte y-Achse). B: CD53-Expression der einzelnen CD8+ T-Zell-Populationen. CD8+ T-Zellen mit Expression von CD57 zeigen eine erhöhte CD53-Menge auf der Zelloberfläche, während CD56+ CD57- CD8+ T-Zellen keinen Unterschied zu CD56- CD57- CD8+ T-Zellen zeigen. Die statistische Analyse erfolgt über einen gepaarten t-Test.

### 3.1.3. CD53 im Kontext von Viruserkrankungen mit Zunahme der CD57-Frequenz

Der Anteil CD57+ T-Zellen nimmt nicht nur mit fortschreitender replikativer Seneszenz als gewöhnliche Alterserscheinung zu, sondern auch durch chronische Antigenstimulation – beispielsweise im Rahmen einiger Viruserkrankungen. So wurde eine Zunahme von CD57+ T-Zellen im Rahmen einer chronischen Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) oder dem Zytomegalievirus (CMV) beschrieben (Dock und Effros 2011; Focosi et al. 2010). Da CD53 genau diese Antigen-erfahrenen und potenziell seneszenten CD8+ T-Zellen markiert, wurde die Expression des Tetraspanins sowohl auf T-Zellen von CMV-positiver Spendern als auch von therapie-naiven HIV-positiven Patienten analysiert.

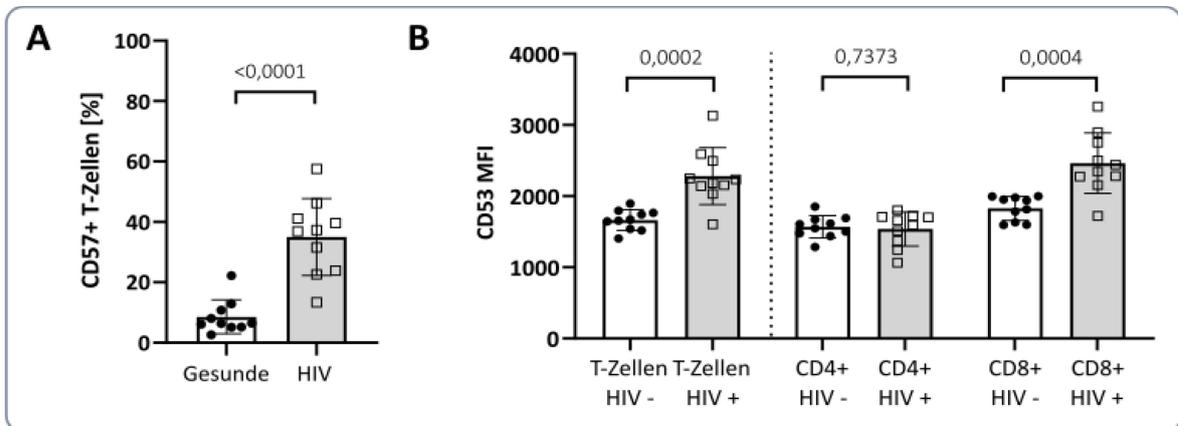
Im Rahmen einer CMV-Infektion kommt es zwar zu einer deutlichen Zunahme der CD57+ T-Zellen (Abbildung 15A), jedoch unterscheidet sich die CD53-Expression auf der Zelloberfläche von T-Zellen nicht signifikant von der CMV-negativer Spender. Für CD8+ T-Zellen von CMV-infizierten Patienten zeigte sich lediglich ein Trend für eine höhere Expression von CD53 im Vergleich zu CD8+ T-Zellen CMV-negativer Spender (Abbildung 15B).



**Abbildung 15: CD53-Expression auf T-Zellen CMV-positiver Patienten im Vergleich zu CMV-negativen Patienten.** Pro Gruppe werden 10 Probanden durchflusszytometrisch untersucht. Für die statistische Analyse erfolgt ein nicht-gepaarter t-Test. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. A: CMV ist mit einer erhöhten CD57-Expression auf T-Zellen assoziiert. Dargestellt ist der Anteil CD57+ T-Zellen. B: Analyse der CD53-Expression auf T-Zellen inkl. CD4+ und CD8+ T-Zellen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Durch eine HIV-Infektion nimmt der Anteil CD57+ T-Zellen ebenfalls deutlich zu (Abbildung 16A). Während bei einer CMV-Infektion durchschnittlich 20 % der T-Zellen CD57+ sind, weisen rund 34 % der T-Zellen von HIV-Patienten das Molekül auf ihrer Oberfläche auf. Betrachtet man nun die CD53-Expression bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern, zeigt sich im Gegensatz zu einer CMV-Infektion bereits auf T-Zellen eine signifikant erhöhte CD53-Expression. Werden die T-Zellen weiter in CD4+ und CD8+ Populationen aufgeteilt, wird ersichtlich, dass dieser

Anstieg der CD53-Menge wieder ausschließlich auf CD8+ T-Zellen, nicht aber auf CD4+ T-Zellen zu beobachten ist (Abbildung 16B).



**Abbildung 16: CD53-Expression auf T-Zellen von HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (HIV-).** Pro Gruppe werden 10 Probanden durchflusszytometrisch untersucht. Für die statistische Analyse erfolgt ein nicht-gepaarter t-Test. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. A: HIV ist mit einer erhöhten CD57-Expression auf T-Zellen assoziiert. Dargestellt ist der Anteil CD57+ T-Zellen. B: Analyse der CD53-Expression auf T-Zellen inkl. CD4+ und CD8+ T-Zellen. Die erhöhte Expression auf T-Zellen von HIV-positiven Patienten spiegelt sich in den CD8+ T-Zellen, jedoch nicht in den CD4+ T-Zellen wider.

Eine HIV-Infektion hat somit scheinbar einen größeren Einfluss auf die CD57- und CD53-Expression als CMV. Daher soll für HIV-Patienten zusätzlich betrachtet werden wie sich CD53 auf CD57+ und CD57- T-Zellen verhält. Wie bereits zuvor gezeigt, weisen CD57+ T-Zellen generell mehr CD53 auf als ihr negatives Pendant. Dies gilt auch für HIV-Patienten (Abbildung 17). Überraschenderweise besitzen CD57+ T-Zellen von HIV-positiven Patienten jedoch signifikant weniger CD53 als die Zellen von gesunden Spendern (Abbildung 17). Durch das vermehrte Vorkommen von CD57+ T-Zellen bei einer HIV-Infektion reichern sich somit jene Zellen an, die besonders viel CD53 besitzen. Obwohl CD57+ T-Zellen von HIV-positiven Patienten weniger CD53 aufweisen, erklärt die starke Anreicherung dieser Population dennoch die höhere CD53-Menge auf T-Zellen als Gesamtpopulation. Was die geringere CD53-Menge auf CD57+ T-Zellen bei einer HIV-Infektion für Auswirkungen hat, kann hier nicht beantwortet werden. Damit stellt sich die Frage, welche Rolle CD53 generell im Rahmen einer Immunabwehr übernimmt und wie eine erhöhte oder verminderte CD53-Expression funktionell einzuordnen ist. Diese Frage soll im folgenden Teil der Arbeit weiter erörtert werden.

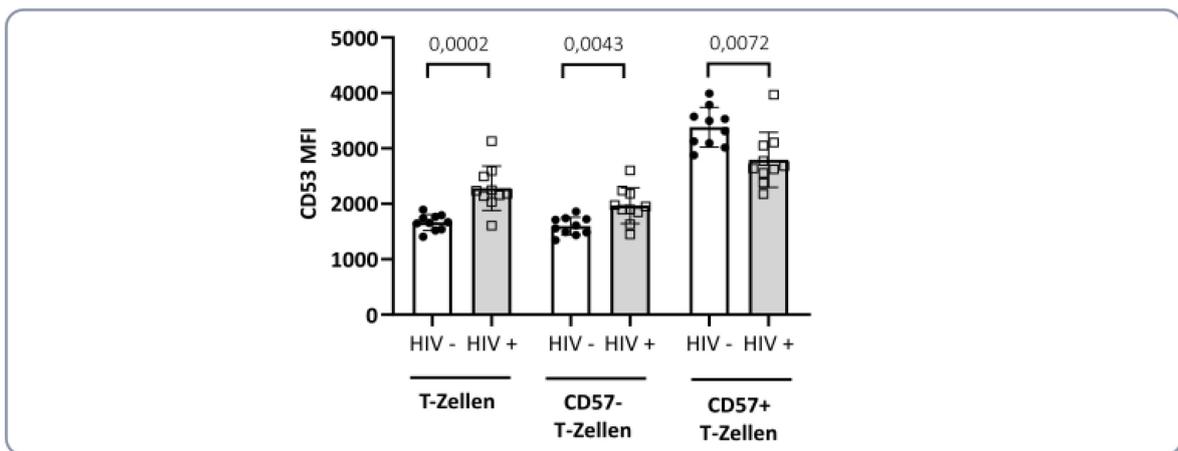


Abbildung 17: CD53-Expression auf CD57- und CD57+ T-Zellen von HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (HIV-). Pro Gruppe werden je 10 Probanden durchflusszytometrisch betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Ein nicht gepaarter t-Test wird für die statistische Analyse herangezogen.

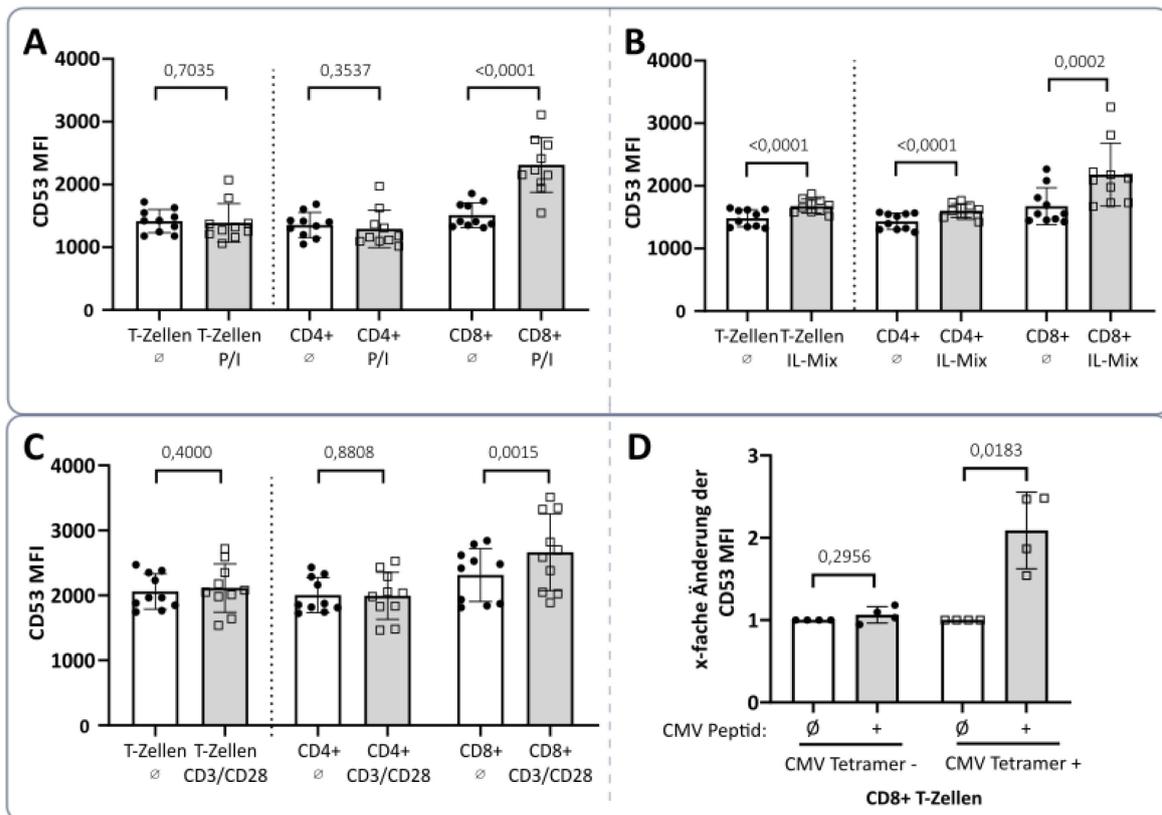
## 3.2. CD53 als Regulator der proinflammatorischen Immunantwort von CD8+ T-Zellen

### 3.2.1. Eine Immunzellaktivierung verändert die CD53-Expression

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD53 bereits *ex vivo* eine Untergruppe von CD8+ T-Zellen markiert, die nicht nur Antigen-erfahren ( $T_{EMRA}$ ) ist, sondern als CD57+ Zelle auch durch ein hohes zytotoxisches Potenzial gekennzeichnet ist (s. 3.1). Darüber hinaus stellt sich die Frage, welche Funktionen CD53 auf humanen, primären T-Zellen innehat. Daher sollte analysiert werden, wie sich die Oberflächenexpression von CD53 durch Aktivierung humaner, primärer T-Zellen verändert.

Dazu werden PBMCs von Blutspendern mit unspezifischen und spezifischen Immunzellstimuli aktiviert. Eine unspezifische T-Zell-Aktivierung fand dabei entweder mit PMA & Ionomycin für 4 h (Abbildung 18A) oder mit einem Interleukin-Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 für 24 h (Abbildung 18B) statt. Interleukine wie IL-12, IL-15 und IL-18 werden im Rahmen einer Immunantwort von vielen verschiedenen Zellen produziert und können ebenfalls T-Zellen beeinflussen (Yoshimoto et al. 1998; Zhang et al. 1998; Liu et al. 2002). PMA und Ionomycin wirken hingegen durch Calcium-Influx und PKC-Aktivierung auf die intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Morgan und Jacob 1994; Lyakh et al. 1997). Eine spezifische Aktivierung von T-Zellen erfolgte wiederum mit Hilfe von CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> über drei Tage (Abbildung 18C) oder durch Restimulation mit dem CMV-Peptid NLVPMVATV nach 10-tägiger klonaler Expansion. CMV-spezifische CD8+ T-Zellen wurden nach der Expansion mit Hilfe eines Tetramers (HLA-A2\*0201/NLVPMVATV) identifiziert und hinsichtlich ihrer CD53-Expression

untersucht (Abbildung 18D). Diese beiden spezifischen Stimuli bewirken somit eine Aktivierung über den TCR bzw. über kostimulatorische Proteine.

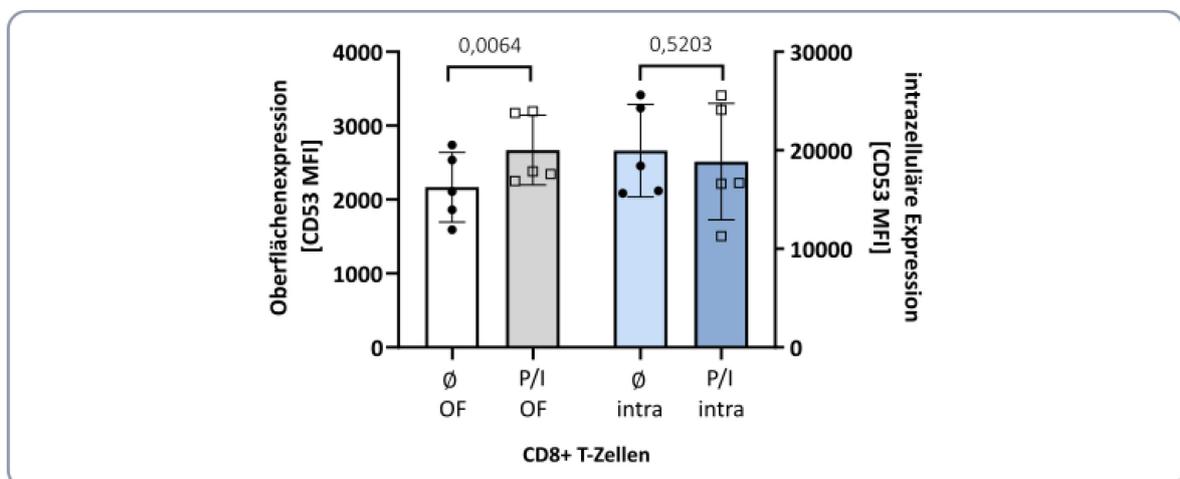


**Abbildung 18:** Die CD53-Oberflächenexpression wird auf CD8+ T-Zellen nach Immunzellaktivierung hochreguliert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. A: Unspezifische Stimulation der PBMCs von 10 Spendern mit PMA und Ionomycin für 4 h. B: Unspezifische Stimulation der PBMCs von 10 Spendern mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 für 24 h. C: Spezifische T-Zell-Aktivierung mittels CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> für 3 Tage. Analysiert werden die T-Zellen von 10 Spendern mittels Durchflusszytometrie. D: Spezifische Stimulation nach 10-tägiger klonaler Expansion CMV-spezifischer T-Zellen durch Restimulation mit CMV-Peptid für 4 h. Für die Stimulation werden vier CMV-positive Spender verwendet. CMV-spezifische CD8+ T-Zellen werden über ein Tetramer (HLA-A2\*0201/NLVPMVATV) identifiziert. CD53 nimmt auf CD8+ T-Zellen unabhängig vom Stimulus signifikant zu. Die statistische Analyse erfolgt mittels gepaartem t-Test.

Unabhängig vom verwendeten Stimulus induziert die Immunzellaktivierung auf CD8+ T-Zellen eine signifikante Hochregulation der CD53-Oberflächenexpression (Abbildung 18). Dies ist für CD4+ T-Zellen nur nach Stimulation mit den unterschiedlichen Interleukinen zu beobachten. Allerdings nimmt die CD53-Menge auf den CD4+ T-Zellen im Vergleich mit CD8+ T-Zellen nach Aktivierung deutlich schwächer zu (Abbildung 18B). Darüber hinaus zeigt sich im Rahmen der CMV-Peptid-Restimulation, dass ausschließlich CMV-spezifische CD8+ T-Zellen nach Restimulation mehr CD53 auf ihrer Oberfläche aufweisen. CD8+ T-Zellen, die nicht für dieses CMV-Peptid spezifisch sind, reagieren hier nicht mit einer veränderten CD53-Menge in der Plasmamembran. CD53 scheint somit für die Immunzellaktivierung von CD8+ T-Zellen eine spezifische Rolle zu spielen, die in dieser

Ausprägung bei CD4+ T-Zellen nicht zu beobachten ist. Daher werden im weiteren Verlauf der Arbeit vor allem CD8+ T-Zellen hinsichtlich ihrer CD53-Expression analysiert.

Um zu überprüfen, ob die verstärkte CD53-Expression auf der Zelloberfläche auf einen erhöhten Transport des intrazellulären CD53-Gehaltes zur Plasmamembran zurückzuführen ist, soll nun zusätzlich intrazelluläres CD53 während einer Immunzellstimulation von CD8+ T-Zellen analysiert werden. Hierfür wurden PBMCs von Blutspendern mit CD53-PE (HI29) auf der Zelloberfläche gefärbt. Zusätzlich wurde jeweils die Hälfte der Zellen jeden Spenders mit demselben Antikörper intrazellulär gefärbt, sodass hier die CD53-Gesamtmenge ermittelt wurde. Die intrazelluläre CD53-Expression ergab sich somit aus der CD53-Gesamtmenge abzüglich der CD53-Oberflächenexpression. Bei einem verstärkten Transport von intrazellulärem CD53 an die Plasmamembran, wäre zu erwarten, dass die intrazelluläre CD53 deutlich abnimmt. Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin für 4 h zeigt sich jedoch keine signifikante Veränderung der intrazellulären CD53-Menge, während die Oberflächenexpression wie bereits beschrieben hochreguliert wird. Somit ist eine Umlagerung von intrazellulärem CD53 an die Plasmamembran durch Immunzellstimulation unwahrscheinlich.

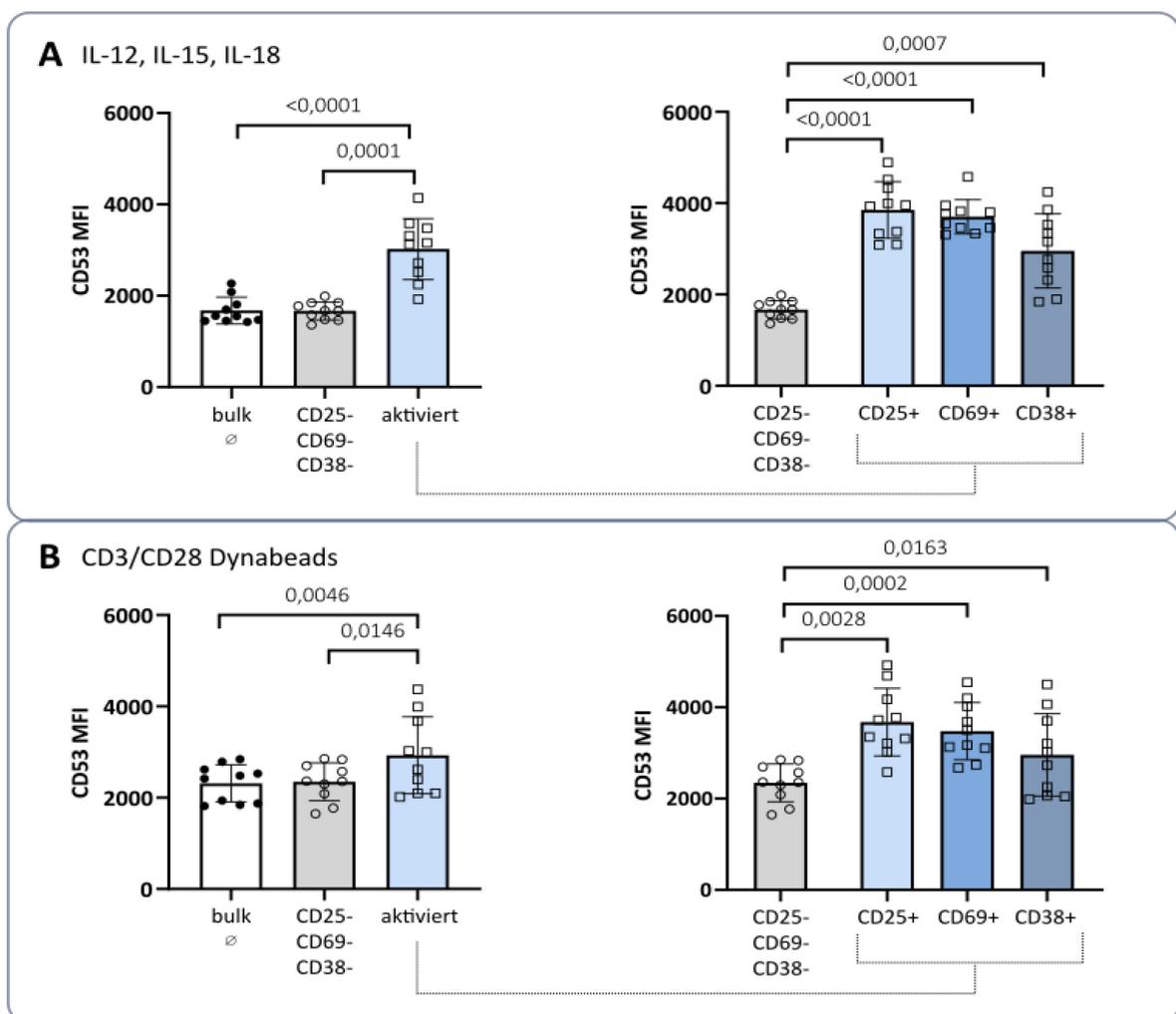


**Abbildung 19: CD53-Expression auf der Zelloberfläche sowie intrazellulär nach unspezifischer Stimulation.** PBMCs von fünf Blutspendern werden für 4 h mit PMA und Ionomycin (P/I) stimuliert. Jeder Spender wird mit CD53-PE (HI29) auf der Zelloberfläche gefärbt. Die Hälfte der Zellen jeden Spenders wird zusätzlich permeabilisiert und intrazellulär mit CD53-PE (HI-29) gefärbt (CD53-Gesamtmenge). Anschließend erfolgt die durchflusszytometrische Analyse. Somit ergibt sich die intrazelluläre CD53-Expression aus der CD53-Gesamtmenge abzüglich der CD53-Oberflächenexpression. Die statistische Analyse erfolgt mittels gepaartem t-Test.

### 3.2.2. CD53 wird nur auf den T-Zellen hochreguliert, die auf einen Stimulus reagieren

CD53 wird nach Immunzellaktivierung unabhängig von der Art des Stimulus auf der Zelloberfläche von CD8+ T-Zellen hochreguliert (3.2.2). Ob alle Zellen gleichermaßen oder lediglich spezifische

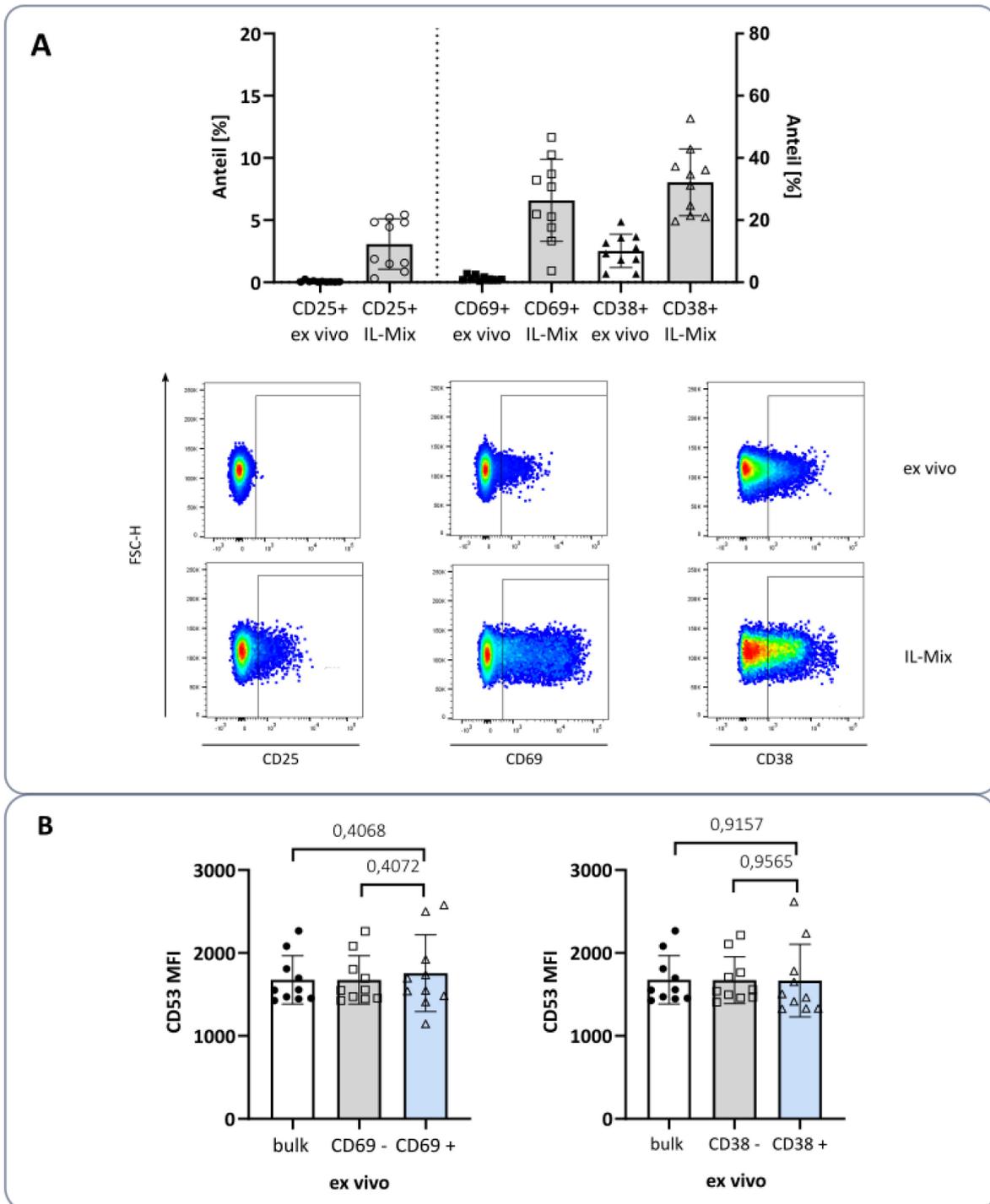
Zellpopulationen mit einer CD53-Hochregulation reagieren, soll im Folgenden analysiert werden. Dazu werden erneut PBMCs von Blutspendern für 24 h mit einem Interleukin-Mix (Abbildung 20A) oder über drei Tage mit Hilfe von CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> (Abbildung 20B) stimuliert und hinsichtlich des Vorkommens von Aktivierungsmarkern in aktivierte und nicht-aktivierte CD8+ T-Zellen eingeteilt. Im Rahmen einer Aktivierung von Immunzellen reagieren diese innerhalb von wenigen Stunden mit der Expression des frühesten Aktivierungsmarkers CD69. Anschließend folgt innerhalb der ersten 24 h schließlich die Expression von CD25 als Untereinheit des IL-2-Rezeptors (Reddy et al. 2004; Jackson et al. 1990). Auch CD38 wird im Verlauf einer T-Zellaktivierung verstärkt exprimiert (Muñoz et al. 2008).



**Abbildung 20: CD53 wird nach Stimulation auf aktivierten CD8+ T-Zellen hochreguliert.** Die dargestellten CD8+ T-Zellen werden als aktiviert angesehen, wenn sie mindestens einen der drei Aktivierungsmarker (CD25, CD69, CD38) auf der Oberfläche exprimieren. Nach der Stimulation werden CD8+ T-Zellen mit und ohne Aktivierungsmarker-Expression mit allen CD8+ T-Zellen im ruhenden Zustand (*bulk*) hinsichtlich ihrer CD53-Expression verglichen. Es werden jeweils PBMCs von 10 gesunden Spendern durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wird ein gepaarter t-Test verwendet. A: Stimulation über 3 Tage mit CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> B: Stimulation über 24 h mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18.

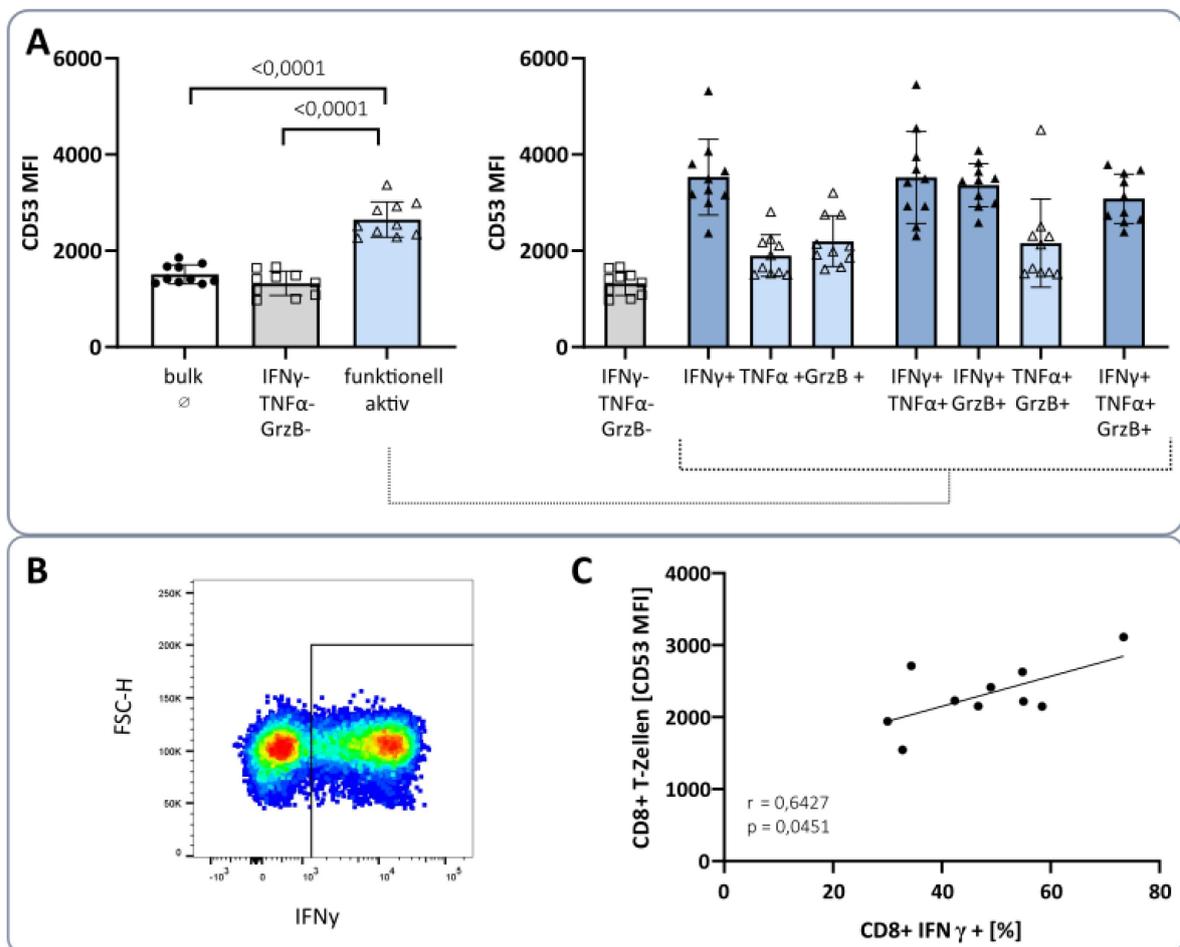
Bei der vergleichenden Analyse von aktivierten und nicht-aktivierten CD8+ T-Zellen wird deutlich, dass CD53 nur auf den CD8+ T-Zellen hochreguliert wird, die auf die Stimulation mit einer Expression von Aktivierungsmarkern reagieren. Zellen ohne einen Aktivierungsmarker bleiben dagegen auf dem CD53-Expressionsniveau der unstimulierten Kontrollzellen. Betrachtet man die Aktivierungsmarker einzeln, zeigen CD25+ CD8+ T-Zellen und CD69+ CD8+ T-Zellen eine höhere CD53-Expression als CD38+ CD8+ T-Zellen (Abbildung 20). Damit ist eine erhöhte Menge des Tetraspanins ausschließlich in der Plasmamembran von den CD8+ T-Zellen zu finden, die auf den Stimulus mit einer Synthese von Aktivierungsmarkern reagieren. Die Verstärkung der CD53-Expression kann dabei sowohl durch unspezifische als auch durch eine T-Zell-spezifische Aktivierung induziert werden. Da durch diese Stimuli unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, wird CD53 ähnlich wie IFN $\gamma$  (Kiani et al. 2001; Samten et al. 2008; Okamura et al. 1998) durch zahlreiche Signalwege beeinflusst. Dies betont erneut die zentrale Funktion des Tetraspanins für die Immunantwort von CD8+ T-Zellen.

Einige der Aktivierungsmarker finden sich auch ohne Stimulation bereits in geringer Menge in der Plasmamembran von CD8+ T-Zellen. So exprimieren CD8+ T-Zellen im ruhenden Zustand kein CD25 und kaum CD69 (etwa 1-2 % der CD8+ T-Zellen), während CD38 hingegen bereits auf durchschnittlich 17 % der CD8+ T-Zellen zu finden ist (Abbildung 21A). Dies hängt damit zusammen, dass CD38 auch unter normalen Umständen von naiven, ruhenden Zellen in geringer Menge exprimiert wird (Dianzani et al. 1994). CD69 kann außerdem bereits durch zellulären Stress induziert werden (Morgan et al. 1999). Im ruhenden Zustand ist die Expression dieser Marker also unspezifisch und hängt nicht mit einer tatsächlichen Immunzellaktivierung durch einen spezifischen Stimulus zusammen. Wird CD53 ausschließlich durch eine solche Immunzellaktivierung hochreguliert, sollten nicht aktivierte CD8+ T-Zellen im ruhenden Zustand trotz Expression von Aktivierungsmarkern keine verstärkte Oberflächenexpression aufweisen. Tatsächlich kann *ex vivo* auf CD38+ CD8+ T-Zellen oder CD69+ CD8+ T-Zellen noch keine vermehrte CD53-Expression im Vergleich zu ihrer jeweiligen Negativ-Population nachgewiesen werden (Abbildung 21B). Damit wird CD53 spezifisch durch Immunzellstimulation verstärkt exprimiert. Diese Anreicherung des Tetraspanins in der Plasmamembran beschränkt sich auf aktivierte CD8+ T-Zellen.



**Abbildung 21: Ex vivo CD53-Expression von CD8+ T-Zellen mit Aktivierungsmarker im nicht-aktivierten Zustand.** Es werden PBMCs 10 gesunder Spender durchflusszytometrisch analysiert. In den Balkendiagrammen sind Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. A: Veränderung der Aktivierungsmarker-Expression auf CD8+ T-Zellen nach 24 h Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 (IL-Mix). Die linke Achse zeigt den Anteil CD25% Zellen, während die rechte Achse den Anteil CD69+ und CD38+ Zellen wiedergibt. Zusätzlich sind repräsentative Punktdiagramme aus der FACS-Analyse dargestellt, um aktivierte CD8+ T-Zellen zu identifizieren. B: CD53-Expression von ruhenden CD8+ T-Zellen abhängig von der Expression eines Aktivierungsmarkers. Ex vivo findet sich kein Unterschied in der CD53-Proteinmenge zwischen CD8+ T-Zellen mit und ohne Aktivierungsmarker. Für die statistische Analyse erfolgt ein gepaarter t-Test.

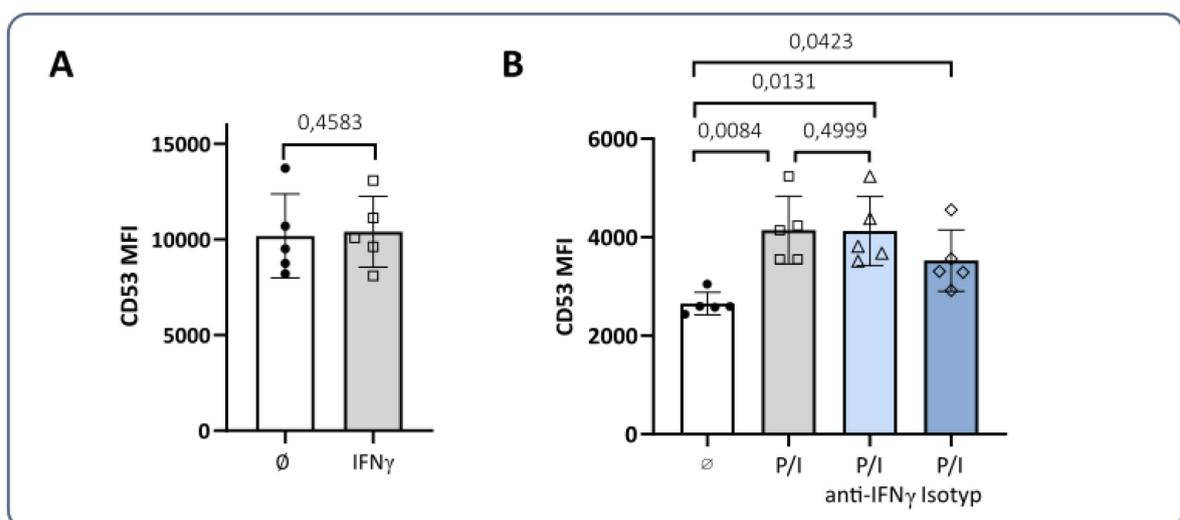
Nach einer Immunzellstimulation reagieren aktivierte CD8+ T-Zellen nicht nur mit der verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern, sondern beginnen auch funktionelle Moleküle wie Zytokine oder Granzyme zu produzieren bzw. zu sekretieren. Daher werden auch funktionell aktive CD8+ T-Zellen im Rahmen einer PBMC-Stimulation mit PMA und Ionomycin für 4 h hinsichtlich ihrer CD53-Expression untersucht. Dabei wird deutlich, dass nur die Zellen, die auf die Stimulation mit der Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  oder Granzym B reagieren, eine Hochregulation von CD53 auf der Zelloberfläche zeigen. Werden diese funktional aktiven CD8+ T-Zellen weiter hinsichtlich ihrer Multifunktionalität aufgeschlüsselt, kann eine interessante Beobachtung gemacht werden: Sobald CD8+ T-Zellen IFN $\gamma$  produzieren, erreichen sie mit Abstand die höchsten CD53-Mengen auf der Zelloberfläche (Abbildung 22A).



**Abbildung 22: CD53 wird nach Stimulation auf funktionell aktiven CD8+ T-Zellen hochreguliert.** PBMCs von Blutspendern werden mit PMA und Ionomycin für 4 h stimuliert. A: Funktionell aktive CD8+ T-Zellen werden über ihre Expression von intrazellulärem IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  oder Granzym B (GrzB) definiert. Sie zeigen im Gegensatz zu funktionell inaktiven CD8+ T-Zellen eine erhöhte CD53-Menge. Bei der durchflusszytometrischen Analyse von multifunktionalen CD8+ T-Zellen zeigt sich, dass IFN $\gamma$ -produzierende CD8+ T-Zellen die höchste CD53-Menge aufweisen (dunkelblau). B: CD8+ T-Zellen eines repräsentativen Spenders im Punktdiagramm nach Stimulation. C: Die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CD8+ T-Zellen korreliert mit der CD53-Expression auf CD8+ T-Zellen.

Dabei gibt es einen korrelativen Zusammenhang zwischen der Menge an IFN $\gamma$ -produzierenden CD8+ T-Zellen und der CD53-Expression auf der Zelloberfläche von CD8+ T-Zellen (Abbildung 22B). CD53 könnte also vor allem von Bedeutung für die IFN $\gamma$ -Produktion sein.

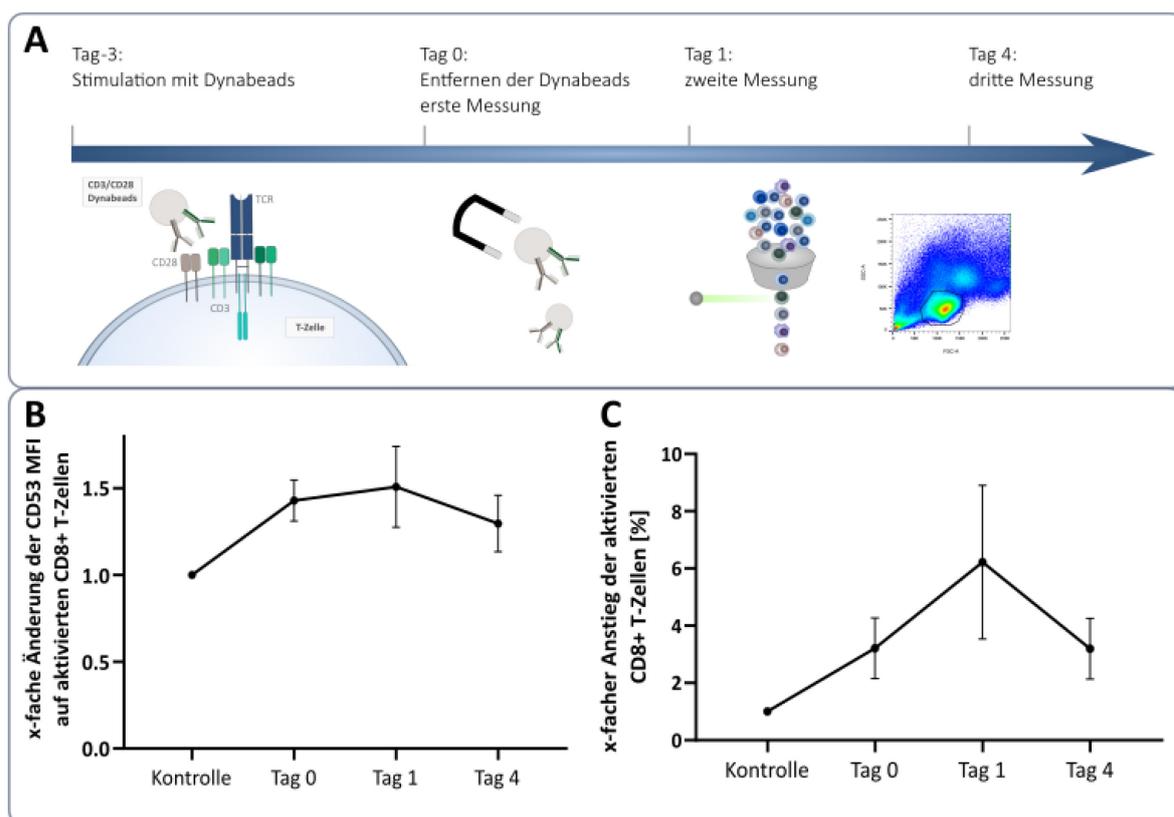
Sekretierte Zytokine wie IFN $\gamma$  binden extrazellulär an ihre spezifischen Rezeptoren, welche als Reaktion wiederum bestimmte Signalkaskaden in der Zielzelle in Gang setzen. Diese führen wiederum zur Induktion von zahlreichen Enzymen und Effektormolekülen. Somit ist es denkbar, dass IFN $\gamma$  selbst die Hochregulation von CD53 nach Immunzellaktivierung induziert. Um dies zu überprüfen, werden PBMCs für 4 h mit 100 U/ml IFN $\gamma$  stimuliert, um anschließend die CD53 Menge auf der Plasmamembran durchflusszytometrisch zu analysieren. In einem weiteren Versuch werden 10  $\mu$ g/ml eines neutralisierenden IFN $\gamma$ -Antikörpers (Klon B27) eingesetzt, welcher freigesetztes IFN $\gamma$  bindet und somit die IFN $\gamma$ -abhängige Expressionsinduktion verhindert (Favre et al. 1989). Zur Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion werden die verwendeten PBMCs anschließend für 4 h mit PMA und Ionomycin behandelt. Als Kontrollen dienen sowohl unstimulierte Zellen und PBMCs, die keine IFN $\gamma$ -Neutralisation erhalten. Mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle sollen unspezifische Effekte des IFN $\gamma$ -Antikörpers ausgeschlossen werden. Es zeigt sich, dass die IFN $\gamma$ -Stimulation keine verstärkte Expression von CD53 bewirkt (Abbildung 23A). Bei Neutralisation des sekretierten IFN $\gamma$  ist ebenso wie bei den stimulierten Kontrollzellen eine erhöhte CD53-Menge auf CD8+ T-Zellen zu beobachten (Abbildung 23B). Damit wird die vermehrte CD53-Expression nach Immunzellaktivierung nicht vom Zytokin IFN $\gamma$  vermittelt.



**Abbildung 23: Der Anstieg der CD53-Expression nach Aktivierung wird nicht durch IFN $\gamma$  vermittelt.** PBMCs 5 gesunder Spender werden für 4 h mit 100 U/ml IFN $\gamma$  (A) bzw. mit PMA und Ionomycin (B) stimuliert. Für (B) erfolgt vor Stimulation die Zugabe des neutralisierenden IFN $\gamma$ -Antikörpers B27 in einer finalen Konzentration von 10  $\mu$ g/ml. Dieselbe Menge wird auch für die Isotyp-Kontrolle verwendet. Anschließend wird die CD53-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Für die statistische Analyse erfolgt ein gepaarter t-Test.

### 3.2.3. CD53 agiert als ein Aktivierungsmarker auf CD8+ T-Zellen

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass CD53 wie andere Aktivierungsmarker durch eine Immunzellstimulation auf der Zelloberfläche hochreguliert wird. Diese verstärkte Expression ist dabei ausschließlich auf aktivierten oder funktionell aktiven Zellen zu beobachten (s. 3.2.2). Dies deutet an, dass es sich bei CD53 um einen Aktivierungsmarker handeln könnte. In deinem Falle wäre zu erwarten, dass mit abnehmender proinflammatorischer Reaktion auch die CD53-Expression wieder abnimmt. Um diese Annahme zu überprüfen, erfolgt eine T-zell-spezifische Stimulation von PBMCs mit CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> über drei Tage, wobei die verwendeten *Beads* am Ende magnetisch entfernt werden. In den darauffolgenden vier Tagen werden sowohl die Anzahl aktivierter T-Zellen als auch ihre CD53-Expression analysiert (Abbildung 24A). Dazu werden für jeden zu analysierenden Zeitpunkt ein eigener Stimulationsansatz verwendet.

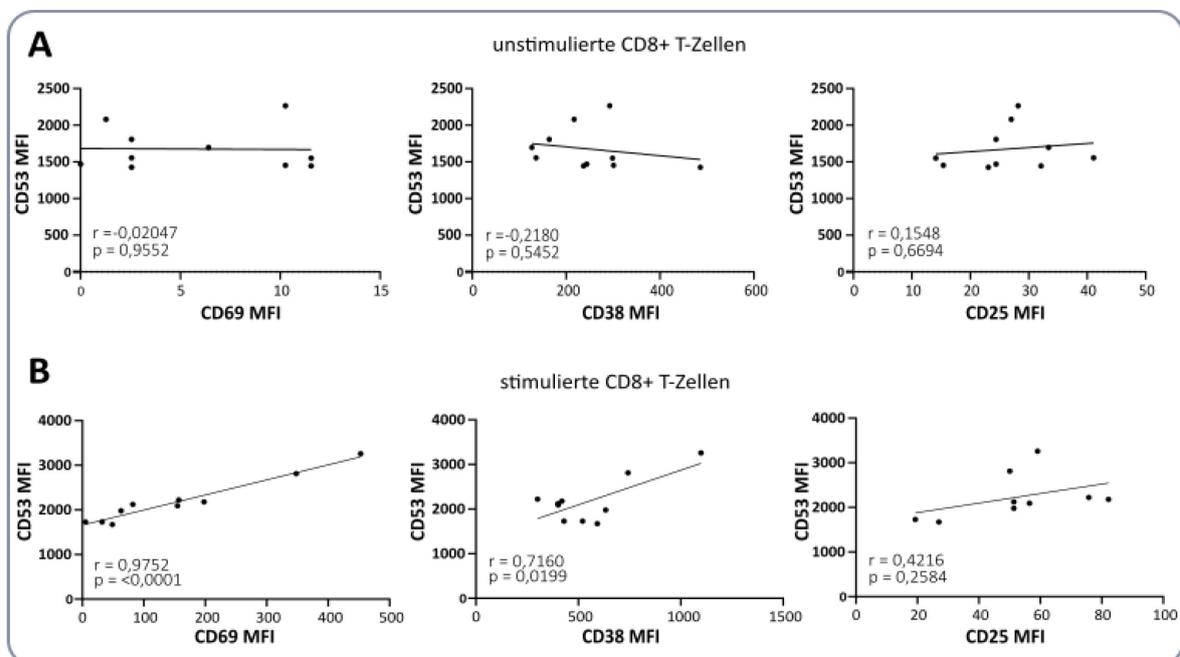


**Abbildung 24: Die CD53-Expression verläuft parallel zu der Anzahl aktivierter T-Zellen.** A: Schematischer Versuchsaufbau. T-Zellen innerhalb eines PBMC-Pools werden mit Hilfe von CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> spezifisch über drei Tage stimuliert. Anschließend (Tag 0) werden die *Beads* magnetisch entfernt. In den nächsten vier Tagen erfolgen durchflusszytometrische Analysen der PBMCs. Für jeden Zeitpunkt erfolgt ein eigener Ansatz. B und C: Verlauf der x-fachen Änderung der CD53-MFI auf aktivierten CD8+ T-Zellen (B) und der Anzahl aktivierter CD8+ T-Zellen (C) gemessen an der Expression von mindestens einem der drei Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder CD38. Die Normalisierung erfolgt mittels unstimulierter Kontrolle. Insgesamt werden PBMCs 5 gesunder Spender analysiert. An Tag 4 erfolgt eine Analyse von 4 Spendern, da die PBMCs eines Spenders noch sichtbare *Beads* enthielten und somit vollständig aktiviert vorliegen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Für die CD53-Expressionsanalyse wurde die Veränderung der CD53-Menge zwischen aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen berechnet und auf die nicht-stimulierte Kontrolle normalisiert. Aktivierte T-Zellen wurden durch die Expression mindestens eines der Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder CD38 definiert (3.2.2). Wie erwartet nimmt die CD53-Expression gemeinsam mit der Anzahl aktivierter T-Zellen zu. Nach Entfernen des Stimulus steigt die Anzahl aktivierter Zellen zunächst noch an, um dann zwischen Tag 1 bis Tag 4 abzunehmen (Abbildung 24C). Zeitgleich sinkt auch die CD53-Menge auf der Zelloberfläche der aktivierten T-Zellen (Abbildung 24B). Damit verhält sich CD53 auf CD8+ T-Zellen genau wie andere Aktivierungsmarker.

### 3.2.4. CD53 befindet sich nach Aktivierung in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker

Weil ein CD53-Expressionsanstieg ausschließlich auf T-Zellen zu beobachten ist, die auf eine Stimulation reagieren und zudem die Expression des Tetraspanins erst dann wieder abnimmt, wenn auch die T-Zellen ihre Aktivierungsmarker runterregulieren, verhält sich CD53 wie ein Aktivierungsmarker. Da Tetraspanine in erster Linie die Zellmembran über Interaktion mit Partnerproteinen organisieren, ist es denkbar, dass CD53 die Organisation der im Rahmen der Immunzellaktivierung zum Teil neu-synthetisierten Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD38 übernimmt.

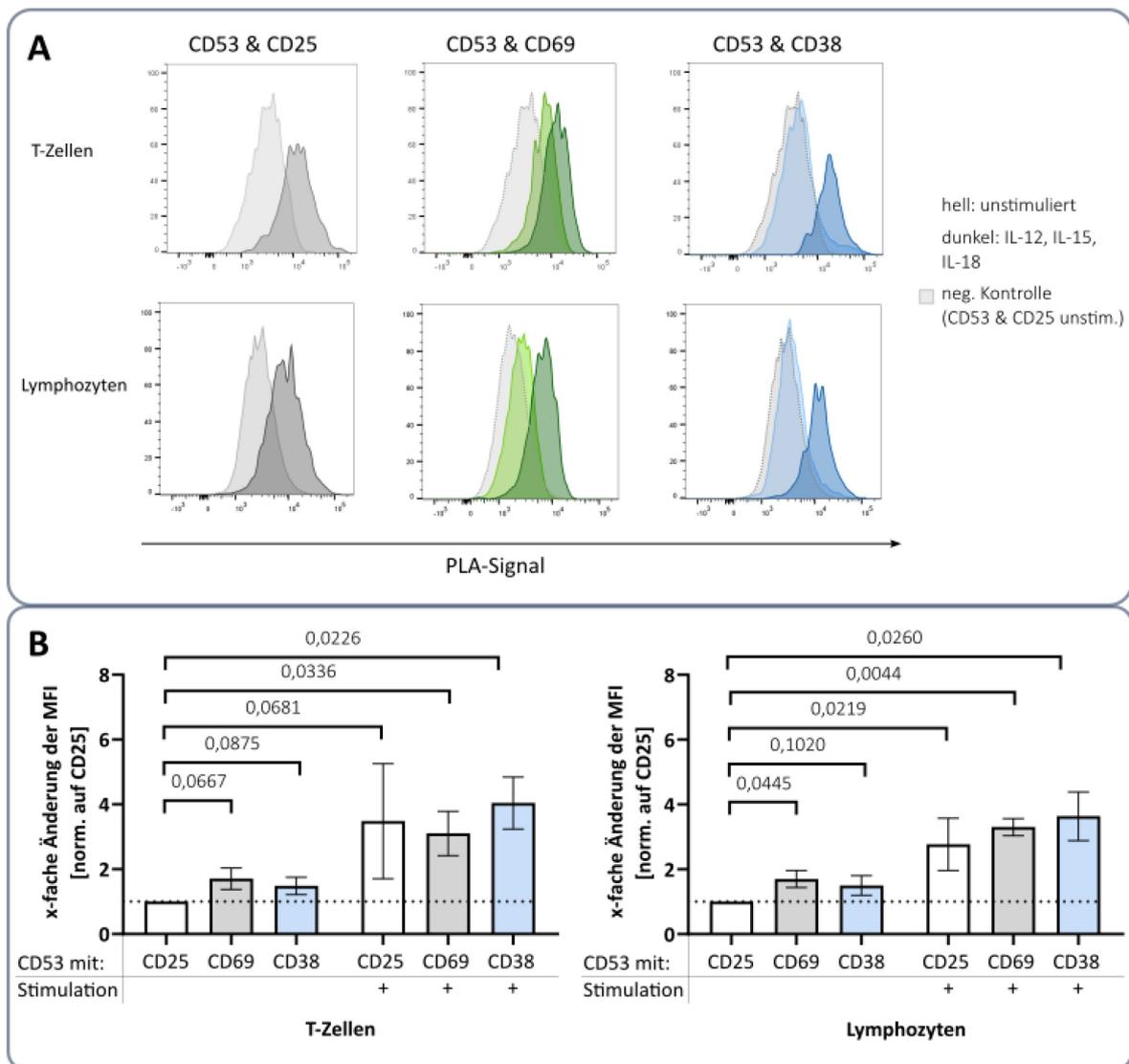


**Abbildung 25: CD53 korreliert mit der Aktivierungsmarker-Expression auf stimulierten CD8+ T-Zellen.** PBMCs von 10 Blutspendern werden für 24 h mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert. Anschließend erfolgt die durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD38 sowie CD53 auf CD8+ T-Zellen. Da CD69 auf unstimulierten CD8+ T-Zellen nur eine niedrige Expression zeigt, wird die MFI hier im Zuge einer besseren Darstellbarkeit angepasst: der niedrigste MFI-Wert wird auf 0 gesetzt und alle weiteren MFI-Werte werden dementsprechend hochgesetzt.

Um in einem ersten Schritt diese Hypothese zu prüfen, werden die CD53-Expression in Abhängigkeit der Expression verschiedener Aktivierungsmarker mit und ohne Interleukin-Mix-Stimulation für 24 h betrachtet. Dabei wird deutlich, dass es ohne Stimulation keinen korrelativen Zusammenhang gibt (Abbildung 25A). Nach Stimulation zeigt sich jedoch ein anderes Bild: Je mehr CD53 auf den CD8+ T-Zellen zu finden ist, desto höher ist auch die Expression des jeweiligen Aktivierungsmarkers (Abbildung 25B). Diese starke Korrelation zwischen Aktivierungsmarker und CD53 ist für CD69 und CD38 zudem signifikant (Abbildung 25B).

Der bestehende Zusammenhang zwischen CD53-Expression und Aktivierungsmarker-Expression nach Stimulation bekräftigt die Hypothese einer möglichen Interaktion. Daher soll im nächsten Schritt mit Hilfe des *Proximity Ligation Assay* (PLA) untersucht werden, ob sich CD53 in räumlicher Nähe der drei Aktivierungsmarker befindet. Liegen zwei Proteine nicht weiter als 40 nm entfernt, kommt es beim Einsatz des PLA-Systems zu einer Rechtsverschiebung des Fluoreszenzsignals, welches durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Um das jeweilige Fluoreszenzsignal einordnen zu können, wurde die Interaktion zwischen CD53 und CD25 auf unstimulierten T-Zellen als Negativkontrolle gewählt, während die beschriebene Interaktion zwischen CD53 und CD2 (Bell et al. 1992) als Positiv-Kontrolle zum Einsatz kommt (s. 2.8.1).

Ohne zusätzliche Stimulation kommt es bei Analyse der Interaktion zwischen CD53 und CD69 (hellgrün) bzw. CD38 (hellblau) auf den untersuchten PBMCs gesunder Blutspender zu einer leichtgradigen Signalverschiebung im Vergleich zur Negativkontrolle (hellgrau) (Abbildung 26A). Nach Stimulation für 24 h mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 verschiebt sich das Fluoreszenzsignal jedoch für alle Interaktionen der Aktivierungsmarker mit CD53 deutlicher (Abbildung 26A, dunkle Farbtöne). Berechnet man die Änderung der PLA-MFI bezogen auf die Negativkontrolle wird ersichtlich, dass unter Stimulation durchschnittlich ein drei- bis vierfach verstärktes Fluoreszenzsignal beobachtet werden kann (Abbildung 26B). Diese ist für die Interaktionsstudie zwischen CD53 und CD69 sowie zwischen CD53 und CD38 signifikant. Nach Stimulation kommt es auch bei der Analyse von CD25 und CD53 auf T-Zellen zu einer Signalverschiebung, jedoch zeigen die PBMCs eines Spenders im Vergleich zu den anderen Proben hier eine schwächere Signalverschiebung. Damit ist der Anstieg des PLA-Signals hier im Vergleich zur Negativkontrolle statistisch nicht signifikant. Dennoch handelt sich um eine Signalverstärkung, die möglicherweise biologisch relevant ist, insbesondere, da sich auf Lymphozyten eine signifikante Verstärkung des Signals zeigt. Die Lymphozyten erhalten dabei keine zusätzliche Oberflächenfärbung nach Abschluss des PLA-Systems, sodass unspezifische Effekte durch andere Fluoreszenzmarker ausgeschlossen werden können.



**Abbildung 26: CD53 befindet sich nach unspezifischer Interleukin-Stimulation in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD38.** A: Histogramme des durchflusszytometrischen PLA-Signals aller untersuchten Interaktionen im unstimulierten (helle Histogramme) und stimulierten (dunkle Histogramme) Zustand im Vergleich zur negativen Kontrolle (hellgrau, CD25 & CD53). Die Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 erfolgt für 24 h. B: Darstellung der Änderung des PLA-Signals auf T-Zellen und Lymphozyten bezogen auf die Negativkontrolle. Zur Identifikation der T-Zellen erfolgt im Anschluss an das PLA-System eine Oberflächenfärbung. Die Änderung des PLA-Signals auf allen Lymphozyten wird ohne zusätzliche Oberflächenfärbung betrachtet. Insgesamt werden PBMCs von drei gesunden Spendern analysiert. Aufgrund einer Wiederholung in zwei unabhängigen Experimenten werden für CD25 und CD53 nach Stimulation insgesamt vier Spender analysiert.

Nach Stimulation wird somit in allen untersuchten Proteininteraktionen mindestens eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität beobachtet. Zwischen CD53 und den beiden Aktivierungsmarkern liegt nach Stimulation aufgrund des signifikanten PLA-Signals eine räumliche Nähe vor. Zwar ist das PLA-Signal für eine potenzielle Interaktion zwischen CD25 und CD53 nach Stimulation statistisch nicht eindeutig, jedoch deutet die vorhandene Signalverschiebung zusammen mit der Korrelation (Abbildung 25B) darauf hin, dass sich beide Proteine nicht weiter als 40 nm

entfernt voneinander befinden. Auch im ruhenden Zustand kann insbesondere für CD53 und CD69 eine räumliche Nähe aufgrund der Signalverschiebung nicht ausgeschlossen werden, zumal diese zumindest für Lymphozyten signifikant ist.

### 3.2.5. CD53 beeinflusst die proinflammatorische Immunantwort

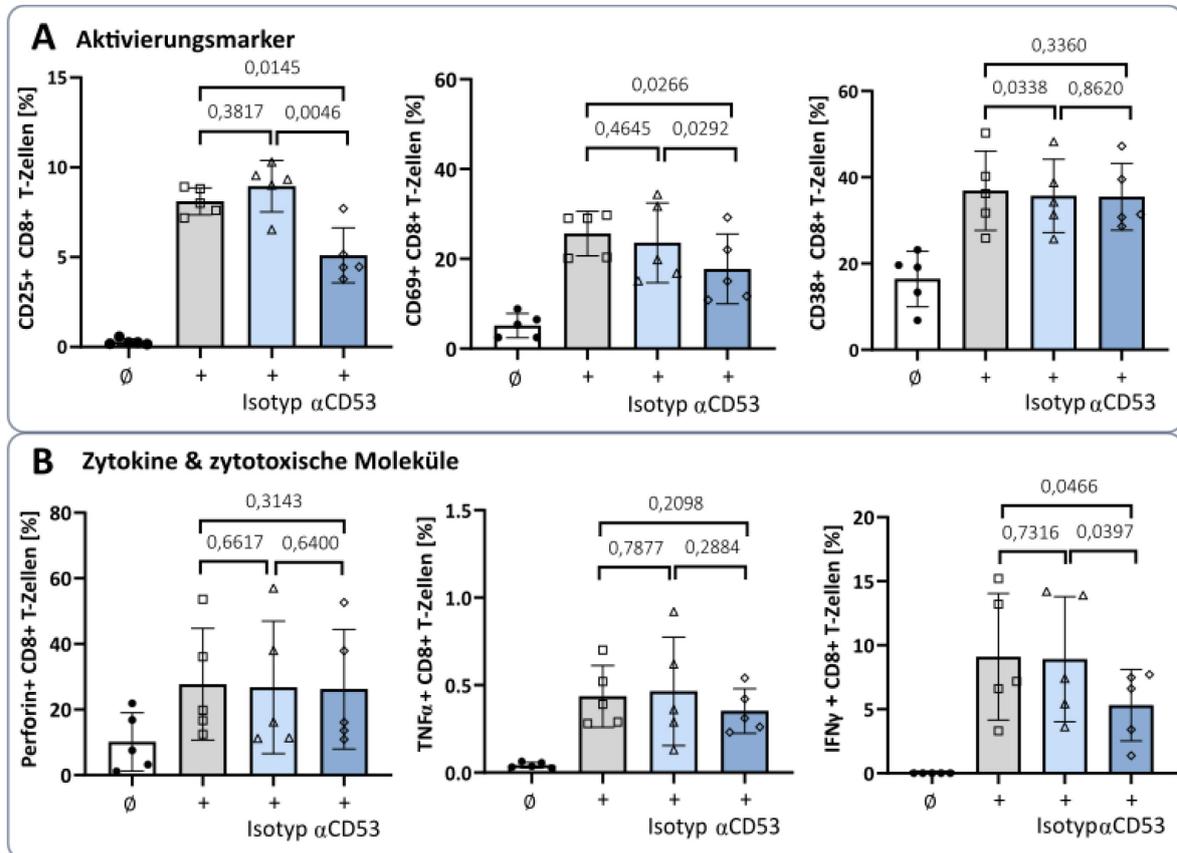
Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass sich CD53 nach Immunzellaktivierung in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker CD69, CD38 und vermutlich auch von CD25 befindet. Somit stellt sich die Frage, ob das Tetraspanin auch deren Funktion beeinflussen kann. Da Tetraspanine keine typische Rezeptorfunktion besitzen und folglich extrazelluläre Liganden in der Regel fehlen, wurden humane Lymphozyten mit einem freien CD53-Antikörper behandelt, der innerhalb der großen extrazellulären Domäne EC1 bindet. Diese ist für die Interaktion mit anderen Membranproteinen hauptverantwortlich. Sodass durch Bindung des Antikörpers die Interaktion zwischen CD53 und Partnerproteinen sterisch behindert werden sollte. Um unspezifische Effekte durch eine Aktivierung von Fc-Rezeptoren auszuschließen, wurde ein REAfinity™-Antikörper der Firma Miltenyi verwendet, der sich durch einen mutierten Fc-Teil auszeichnet.

Für die Analyse des funktionellen Einflusses von CD53 auf seine potenziellen Interaktionspartner, werden PBMCs gesunder Spender in R10-Medium für 1 h zusammen mit dem CD53-Antikörper (Klon REA259, erkennt laut Hersteller das gleiche Epitop wie der HI29 Klon) oder der entsprechenden Isotypkontrolle bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgt eine Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 für 24 h. Um auch die Zytokin-Produktion beurteilen zu können, wird das Medium nach 22 h mit BFA versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, sodass die Freisetzung von Zytokinen blockiert wird.

Wie erwartet induziert die Interleukin-Stimulation eine Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD38 sowie eine Produktion von den Zytokinen IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und dem zytolytischen Protein Perforin (Abbildung 27). Die stimulierten Zellen, die mit der Isotypenkontrolle vorbehandelt wurden, verhalten sich dabei genauso wie Zellen, die ausschließlich stimuliert wurden. Nur im Falle von CD38 zeigt die Isotypenkontrolle nach Stimulation im gepaarten t-Test signifikant weniger CD38 auf der Oberfläche von CD8+ T-Zellen (Abbildung 27A rechts). Der Expressionsunterschied ist mit durchschnittlich 1,2 % jedoch gering.

Durch die Vorinkubation mit dem CD53-Antikörper kann jedoch im Gegensatz zur Isotypenkontrolle sowohl bei CD25 als auch bei CD69 eine deutliche Reduktion auf CD8+ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 27A). Darüber hinaus beeinflusst der gebundene Antikörper auch die IFN $\gamma$ -Produktion negativ (Abbildung 27B). Dahingegen bleiben CD38, TNF $\alpha$  und Perforin auf CD8+ T-

Zellen durch den verwendeten CD53-Antikörper unbeeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass über die Beeinflussung von CD53 Aktivierungsmarker und die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN $\gamma$  reguliert werden.



**Abbildung 27: CD53 beeinflusst die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 sowie das Zytokin IFN $\gamma$ .** PBMCs gesunder Spender werden für 1 h mit einem CD53-Antikörper (REA259) oder der entsprechenden Isotypenkontrolle vorinkubiert. Anschließend erfolgt eine Stimulation mit den Interleukinen IL-12, IL-15 und IL-18 über 24 h, wobei nach 22 h BFA zur Blockade der Sekretion zugegeben wird. Anschließend wird die Expression der Aktivierungsmarker und intrazellulären Moleküle durchflusszytometrisch bestimmt. Der CD53-Antikörper sorgt für eine reduzierte Expression von CD25, CD69 und IFN $\gamma$ , während die anderen untersuchten Moleküle unbeeinflusst bleiben. Für die statistische Analyse erfolgt ein gepaarter t-Test.

### 3.3. Das T-Zell-spezifische CD53-Interaktom

Mit Hilfe der BioID können Proteine identifiziert werden, die sich in räumlicher Nähe des Fusionsproteins aus CD53 und der Biotinligase BirA\* befinden. Da die Biotinligase an den C-Terminus von CD53 gekoppelt ist, werden über die hier durchgeführte BioID intrazelluläre Interaktionen identifiziert. Membranproteine müssen also zumindest einen intrazellulären Anteil aufweisen, um von der BirA\* biotinyliert zu werden. Dies unterscheidet die BioID wesentlich vom PLA, bei welchem ausschließlich Plasmamembranproteine mit extrazellulärem Anteil identifiziert

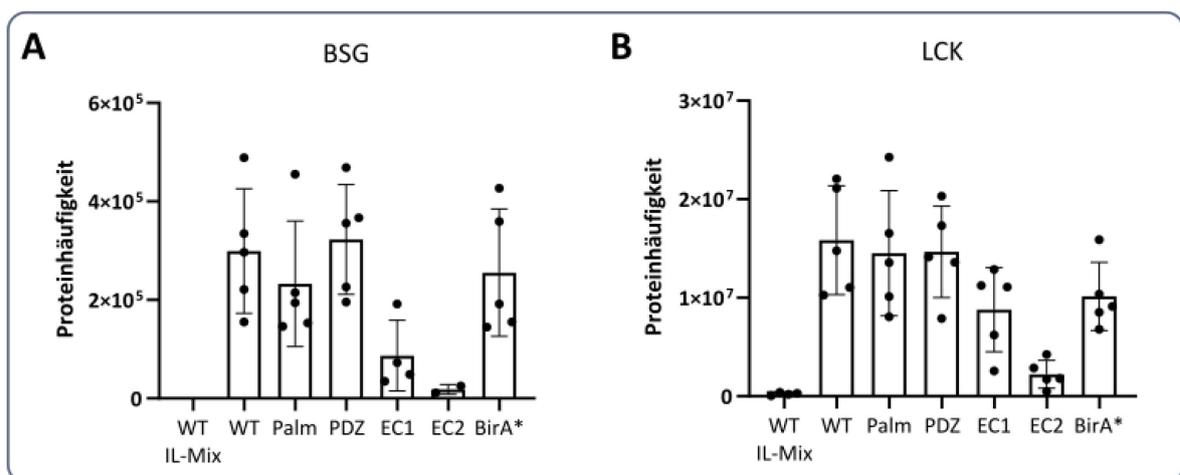
wurden (3.2.4). Das intrazelluläre Interaktom von CD53 ist jedoch genauso essenziell, um zu verstehen, in welche Signalkaskaden es eingreifen kann.

### 3.3.1. Potenzielle Interaktionspartner des Tetraspanins CD53 in Jurkat-T-Zellen

Für die Analyse des CD53-Interaktoms werden Jurkat-Linien erzeugt, die das CD53-BirA\* Konstrukt stabil exprimieren. Eine Stimulation dieser mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 soll Aufschluss über eine Veränderung des CD53-Interaktoms während einer unspezifischen Immunzellaktivierung von T-Zellen geben. Um zusätzlich bedeutende Proteinstrukturen im CD53-Protein zu identifizieren, die im ruhenden Zustand an der Bindung von Partnerproteinen beteiligt sind, werden vier CD53-Mutanten erzeugt. Diese erlauben die Analyse des Einflusses der Palmitoylierung (CD53(Palm\*)-BirA\*), der C-terminalen PDZ-Erkennungsdomäne (CD53( $\Delta$ PDZ)-BirA\*), der Stützfunktion der EC1 (CD53(EC1\*)-BirA\*) und der bilobulären Struktur der EC2 (CD53(EC2\*)-BirA\*) auf die CD53 vermittelten Interaktionen. Eine BirA\*-Kontrolle wird mitgeführt, um unspezifische Interaktionen zu identifizieren und auszuschließen.

Insgesamt werden 263 Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Darunter findet sich aufgrund einer Selbstbiotinylierung in allen sieben Bedingungen auch CD53 selbst. Diese Selbstbiotinylierung kann folglich als interne positive Kontrolle des BioID-Systems betrachtet werden und zeigt, dass über die funktionale BirA\* in allen Konstrukten biotinylierte Proteine angereichert werden können. Beim Vergleich zwischen der BirA\*-Kontrolle und dem unstimulierten CD53-BirA\*-Konstrukt zeigen sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede in der zweifaktoriellen Varianzanalyse. Jedoch werden einige Proteine in den Proben des BirA\*-Konstruktes dennoch weniger häufig gefunden (s. Anhang). So liegt die Anreicherungs-Ratio vom bekannten Interaktionspartner CLCN7 (Luck et al. 2020) zwischen CD53-BirA\* zu BirA\* bei einem Faktor von 5,51. Werden die anderen Bedingungen (Stimulation und Mutanten) hingegen mit dem unstimulierten CD53-BirA\*-Konstrukt verglichen, finden sich zahlreiche Proteine, die signifikant verändert sind. Um das CD53-Interaktom auch ohne die BirA\*-Kontrolle aufzuschlüsseln, werden daher all jene Proteine als Kandidaten betrachtet, die in den Mutanten von CD53-BirA\* bzw. nach Stimulation des CD53-BirA\* im Vergleich zu CD53-BirA\* deutlich verändert sind. Unspezifische Proteine werden so weitestgehend ausgeschlossen, da sich diese in allen Proben gleichermaßen wiederfinden sollten. CD53-spezifische Interaktion sollten hingegen durch eine Änderung der Proteinstruktur oder Stimulation beeinflusst werden. Eine Veränderung wird angenommen, wenn der Unterschied in der Häufigkeit eines Proteins zwischen zwei Bedingungen statistisch signifikant ist oder das Protein in einer Bedingung komplett bzw. in mehreren technischen Replikaten einer

Bedingung (mind. in drei von fünf) fehlt. Beispielsweise konnte Basigin (BSG) nicht nach Stimulation detektiert werden und war zudem nur zweimal mit der mutierten EC2-Domäne nachzuweisen, während es mit den übrigen Mutanten bei allen Wiederholungen gefunden wird (Abbildung 28A). Damit wird BSG als Kandidat betrachtet. Das Protein LCK hingegen zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt eine signifikant reduzierte Proteinhäufigkeit nach Stimulation und durch Einbringen eines mutierten EC2-Motivs (Abbildung 28B).

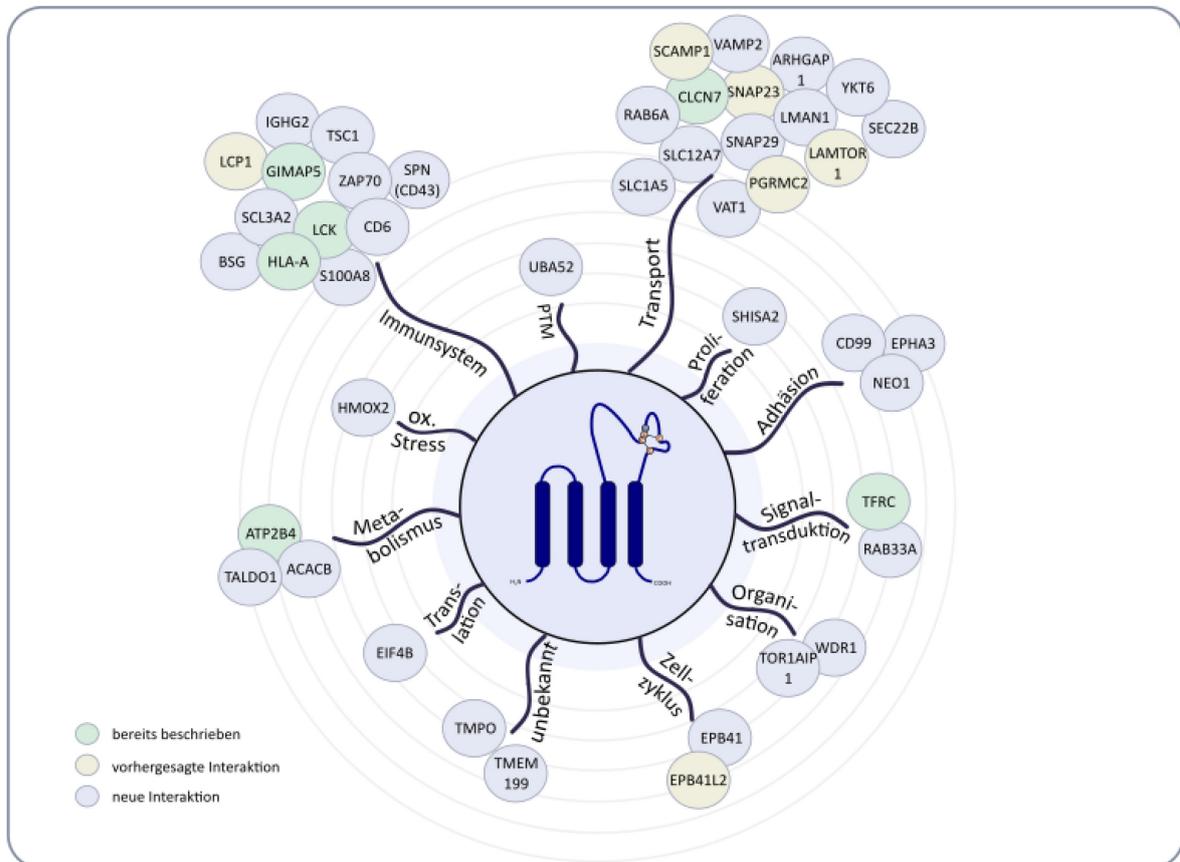


**Abbildung 28: Beispiele für die Identifizierung von potenziellen Interaktionspartnern in der BioID.** Um Proteine in der BioID zu identifizieren, die mit CD53 interagieren, werden die Proteinhäufigkeiten in allen untersuchten Bedingungen mit dem CD53-BirA\*-Konstrukt (WT) verglichen. Fehlt ein Protein vollständig wie Basigin (BSG) nach Stimulation des WT-Konstruktes (WT IL-Mix) oder ist es wie BSG in der EC2-Mutante in seiner Frequenz deutlich reduziert (fehlt mind. 3x), wird eine räumliche Nähe angenommen (A). Dies gilt ebenfalls, wenn in der zweifaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum WT festgestellt wird wie z.B. bei LCK im stimulierten WT-Konstrukt und der EC2-Mutante (B).

Insgesamt können so 45 potenzielle und spezifische Interaktionspartner von CD53 identifiziert werden (Abbildung 29). Darunter finden sich sechs Proteine, die bereits in anderen CD53-Interaktionsstudien beschrieben wurden (Dunlock et al. 2022; Luck et al. 2020; Szöllösi et al. 1996b) (Abbildung 29 grün). Weitere sechs Proteine wurden über die Integrierte Interaktionsdatenbank (IID, <http://ophid.utoronto.ca/iid>) oder STRING (<https://string-db.org>) vorhergesagt (Abbildung 29 gelb). Dies verdeutlicht, dass die BioID erfolgreich durchgeführt wurde und vielversprechende, neue Kandidaten identifiziert.

Es fällt auf, dass die Funktionen der identifizierten Proteine überwiegend dem Transport sowie Aufgaben des Immunsystems zugeordnet werden können. Da es sich bei den Jurkat-Zellen um Immunzellen handelt, ist eine solche Anreicherung nicht überraschend. Unter den Transportproteinen finden sich einige Proteine, die mit Vesikeltransport zusammenhängen. Da Tetraspanine oft als Marker für extrazelluläre Vesikel verwendet werden, passen auch solche CD53-

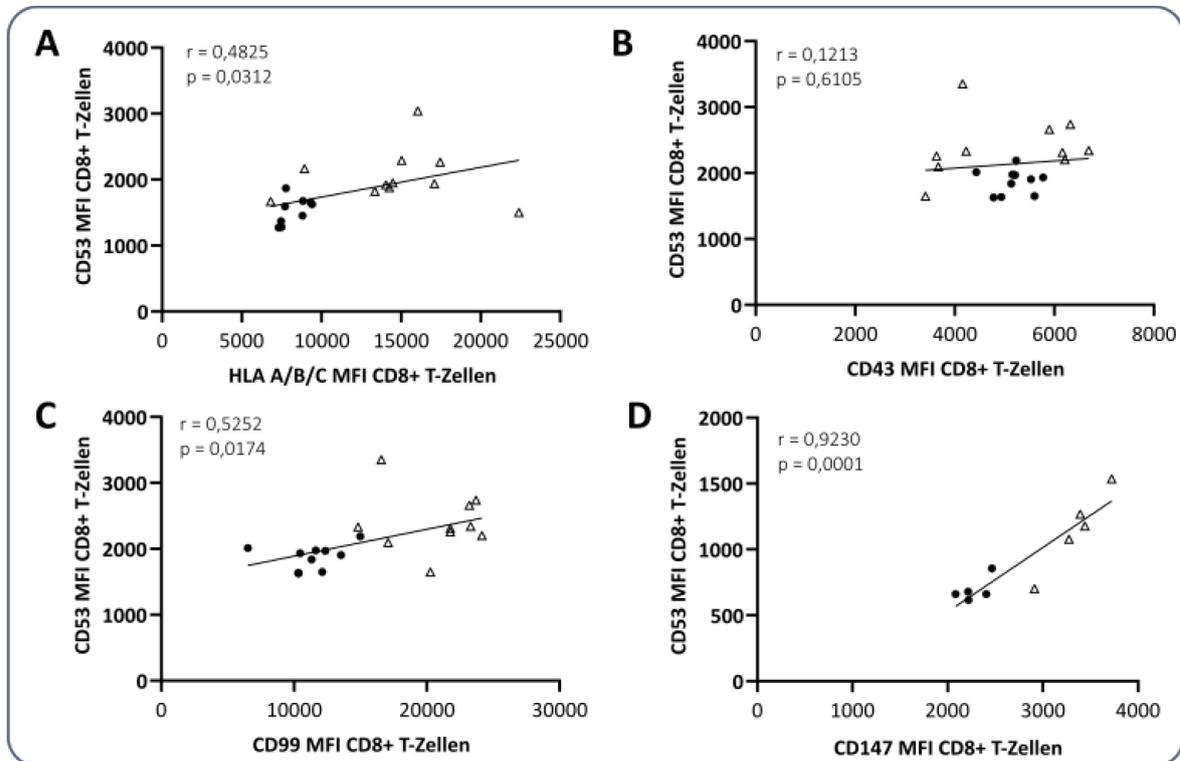
Interaktionspartner zu den bisherigen Erkenntnissen über diese Proteinfamilie. Außerdem finden sich vermehrt Proteine unter den potenziellen Interaktionspartnern, die Adhäsionsprozesse vermitteln und den Metabolismus steuern (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Potenzielles Interaktionsnetzwerk des Proteins CD53.** Die über Massenspektrometrie identifizierte 45 Proteine sind zur Veranschaulichung nach ihrer Funktion angeordnet. Je länger die Linie, desto mehr Proteine können dieser Funktion zugeordnet werden. Angegeben sind die jeweiligen Gennamen. Sechs Proteine wurden bereits als potenzieller Interaktionspartner von CD53 beschrieben (grün), weitere sechs Proteine sind über die Plattformen IID und STRING vorhergesagt (gelb). Neue Interaktionen sind in blau dargestellt. PTM = Posttranslationale Modifikation.

Da die Membranproteine CD99, Basigin (CD147) und CD43 gut mit Hilfe Fluorophorgekoppelter Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können, sollen diese hinsichtlich eines Zusammenhangs mit der CD53-Expression auf CD8+ T-Zellen von gesunden Probanden und therapie-naiven HIV-Patienten analysiert werden. Dabei kann ein korrelativer Zusammenhang für HLA-A/B/C mit CD53 beobachtet werden (Abbildung 30A). Da es sich bei den HLA-Molekülen um bekannte Partnerproteine von CD53 handelt (Szöllösi et al. 1996b), entspricht diese Beobachtung den Erwartungen. Für CD43 kann hingegen kein Zusammenhang mit der CD53-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 30B). Jedoch zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen CD53-Menge und der Expression von CD99 und CD147 (Abbildung 30C und D), was eine

mögliche Interaktion zwischen CD53 und den beiden Membranproteinen CD99 und CD147 auch auf CD8+ T-Zellen bekräftigt. Interessanterweise besitzen CD8+ T-Zellen von HIV-Patienten nicht nur eine höhere CD53-Expression, sondern auch größere Mengen an CD99, CD147 und HLA A/B/C.



**Abbildung 30: Korrelativer Zusammenhang zwischen CD53 und den Membranproteinen CD99 und CD147 auf CD8+ T-Zellen.** Dargestellt ist die *ex vivo* Expression auf CD8+ T-Zellen. Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  mit beidseitigem Hypothesentest. A-C: PBMCs 10 gesunder Spender (gefüllter Kreis) und 10 therapie-naiver HIV-Patienten (ungefülltes Dreieck) werden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer CD53 Expression im Zusammenhang mit der Expression von HLA-A/B/C (A), CD43 (B) und CD99 (C) analysiert. D: PBMCs 5 gesunder Spender (Kreis) und 5 therapie-naiver HIV-Patienten (Dreieck) werden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer CD53 Expression im Zusammenhang mit der Expression von CD147.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD53 die IFN $\gamma$ -Produktion von CD8+ T-Zellen reguliert (3.2.5). Über welche Proteine bzw. Transmembranproteine dies geschieht, ist bisher nicht geklärt. Da jedoch ein CD53-Antikörper, der an die EC2-Domäne von CD53 bindet, zu einer reduzierten IFN $\gamma$ -Produktion geführt hat, spricht dies dafür, dass für den beobachteten Effekt ein Membranprotein verantwortlich ist. Daher sind insbesondere die über die BioID identifizierten Membranproteine von Interesse, die gleichzeitig in Zusammenhang mit dem IFN $\gamma$ -Signalweg stehen. Um diese unter den 45 Kandidaten zu identifizieren, wurde eine funktionelle Anreicherungsanalyse mit Hilfe der Analysesoftware FunRich (Fonseka et al. 2021; Pathan et al. 2015; Pathan et al. 2017) durchgeführt. Hierbei wurden insgesamt neun Proteine (EIF4B, HLA-A, LCK, LMAN1, SLC3A2, TFRC, TSC1, VAMP2, ZAP70) identifiziert, die mit dem IFN $\gamma$ -Signalweg in Verbindung stehen. Weitere drei

Kandidaten (BSG, SLC1A5, SPN) konnten über Publikationen mit dem Zytokin in Verbindung gebracht werden (Tabelle 11). Von diesen stellen HLA-A, Ergic53, SLC1A5, CD43, CD98hc, CD71, CD147 und Vamp2 Membranproteine dar. Die räumliche Nähe zwischen CD53 und einigen dieser Proteine ist darüber hinaus abhängig von der korrekten Struktur der EC2 (3.3.3).

**Tabelle 11: In der BioID identifizierte potenzielle Bindepartner von CD53, die mit der Sekretion des Zytokins IFN $\gamma$  in Verbindung stehen.** Die jeweilige Funktion wurde mit Hilfe des Human Protein Atlas (proteatlas.org, (Sjöstedt et al. 2020; Uhlén et al. 2015)) angegeben.

Genname	Proteinname	Funktion	In der Literatur beschriebener Zusammenhang mit IFN $\gamma$
BSG	Basigin, CD147	Induziert Matrix-Metalloproteasen	CD147+ T-Zellen produzieren mehr IFN $\gamma$ (Solstad et al. 2011).
EIF4B	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4B	Translationsinitiation	Verminderte IFN $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen einer <i>Knockout</i> (KO)-Maus (Chen et al. 2021). Unterstützt die Translation von IFN-stimulierten Genen (ISG) (Joshi et al. 2010).
HLA-A	HLA Klasse I Histokompatibilitätsantigen A	Antigen-Präsentation	Verstärkte Expression durch IFN $\gamma$ (Fellous et al. 1979; Burrone und Milstein 1982).
LCK	Lymphozyten-spezifische Tyrosinkinase	Initiation der TCR-Signalkaskade nach Immunzellaktivierung	Durch die TCR-Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B, NFAT oder AP-1, die die Synthese von u.a. Zytokinen wie IFN $\gamma$ einleiten (Hwang et al. 2020; Sica et al. 1997).
LMAN1	Protein ERGIC-53	Membranprotein zwischen ER und Golgi-Apparat, das als Transportprotein für Glykoproteine fungiert	
SLC1A5	Neutraler Aminosäure-transporter B(0)	Transporter für neutrale Aminosäuren	verminderte IFN $\gamma$ -Produktion durch CD4+ T-Zellen in KO-Mäusen (Nakaya et al. 2014). Verminderte IFN $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen nach Blockieren des Transportes (Jensen et al. 2017).
SLC3A2	CD98hc (CD98 <sup>heavy chain</sup> )	Beteiligt an Integrin-Signalkaskaden, Zellfusion und T-Zellaktivierung	Verminderte IFN $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen nach Blockieren des Transportes (Jensen et al. 2017).
SPN	CD43, Sialophorin	Beteiligt an der Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen	Regulation der IFN $\gamma$ -Produktion von CD8+ T-Zellen (Zhou et al. 2013).
TFRC	CD71, Transferrinrezeptor	Eisenaufnahme	
TSC1	Hamartin	Tumorsuppressor, der mTORC1 negativ reguliert	Weniger IFN $\gamma$ Produktion in TSC1-defizienten CD8+ T-Zellen nach bakterieller Infektion (Shrestha et al. 2014). Erhöhte IFN $\gamma$ Produktion von CD4+ T-Zellen (Park et al. 2013).

<b>VAMP2</b>	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2	Beteiligt an der Fusion von Vesikeln mit der Membran	IFN $\gamma$ induziert in eosinophilen Leukozyten eine Translokation von VAMP2 zur Plasmamembran(Lacy et al. 2001).
<b>ZAP70</b>	Tyrosin-Porteinkinase Zap70	Teil der TCR-Signalkaskade	Eine Verminderung von Zap70 in CD4+ Gedächtniszellen führt zu einer reduzierten IFN $\gamma$ -Produktion (Chandok et al. 2007).

### 3.3.2. Einfluss einer Interleukin-Stimulation auf das CD53-Proteinnetzwerk

Aus den Experimenten dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass CD53 zentral für die Regulation der proinflammatorischen Immunantwort von CD8+ T-Zellen ist. Dies legt nahe, dass sich durch eine Immunzellstimulation auch das Interaktionsspektrum von CD53 ändert. Aufgrund des Fehlens einer gut modifizierbaren, humanen CD8+ T-Zelllinie werden hier Jurkat-Zellen als CD4+ T-Zellen analysiert, da auch primäre CD4+ T-Zellen eine leicht erhöhte CD53-Expression nach Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 gezeigt haben (3.2.1).

Überraschenderweise finden sich nach Stimulation jedoch ausschließlich verringerte Interaktionen verglichen zur unstimulierten Bedingung (Tabelle 12). Die Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 hat mit 42 verringerten Proteinen zudem einen großen Einfluss auf das Interaktom von CD53.

**Tabelle 12: Proteine, die nach Stimulation (IL-12, IL-15, IL-18) eine verminderte direkte oder indirekte Interaktion mit CD53 zeigen.** Angegeben sind die Gennamen der identifizierten Kandidaten.

Bedingung	Verminderte Interaktion von CD53 mit
Stimulation	ACACB, ARHGAP1, ATP2B4, BSG, CD6, CD99, CLCN7, EIF4B, EPB41, EPB41L2, EPHA3, GIMAP5, HLA-A, HMOX2, LAMTOR1, LCK, LMAN1, NEO1, PGRMC2, RAB33A, RAB6A, S100A8, SCAMP1, SEC22b, SHISA2, SLC12A7, SLC1A5, SLC3A2, SNAP23, SNAP29, SPN, TFRC, TMEM199, TMPO, TOR1AIP1, TSC1, UBA52, VAMP2, VAT1, WDR1, YKT6, ZAP70

### 3.3.3. Einfluss der Proteindomänen auf das CD53-Proteinnetzwerk

Mit Hilfe von CD53-Mutanten soll analysiert werden, wie sich bestimmte Proteindomänen auf die Bindung von CD53 an seine Zielproteine auswirkt. Wie erwartet bewirken die Mutationen relevanter und Tetraspanin-spezifischer Proteindomänen (1.2.1) eine Verringerung zahlreicher Proteinhäufigkeiten (Tabelle 13).

Durch das mutierte CCG-Motiv und der Punktmutation der beiden proximalen Cysteine wird die typische Struktur der EC2 aufgelöst (CD53(EC2\*)-BirA\*), sodass Bindungen von Transmembranproteinen, die spezifisch mit dieser CD53-Region interagieren, verhindert werden. Massenspektrometrisch werden durch diese eingeführten Mutationen sowohl

Transmembranproteine als auch zytoplasmatische Proteine identifiziert, die im Vergleich zum CD53-BirA\*-Konstrukt reduziert vorkommen (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Reduzierte Interaktionen zwischen CD53 und seinen potenziellen Partnerproteinen durch Einführung verschiedener Mutationen.** Angegeben sind die Gennamen der jeweiligen Kandidaten. Alle anderen, hier nicht aufgeführten Proteine sind in ihrer Häufigkeit nicht signifikant verändert. Proteine, die mit dem IFN $\gamma$ -Signalweg in Verbindung stehen, sind fett markiert.

CD53(EC2*)-BirA*	CD53(EC1*)-BirA*	CD53( $\Delta$ PDZ)-BirA*	CD53(Palm*)-BirA*
ATP2B4			
<b>BSG (CD147)</b>			
	CLCN7		
EPB41L2			
	IGHG2	IGHG2	IGHG2
LAMTOR1			
<b>LCK</b>			
			LCP1
NEO1			
RAB6A			
	S100A8		S100A8
SCAMP1			
			SEC22B
SHISA2			
<b>SLC3A2 (CD98hc)</b>			
<b>SPN (CD43)</b>			
TALDO1		TALDO1	
<b>TSC1</b>			
<b>VAMP2</b>			
	WDR1		

Die übrigen Mutanten haben im Gegensatz zur Stimulation und der EC2-Mutante CD53(EC2\*)-BirA\* einen weniger deutlichen Einfluss. Auch die Punktmutation von vier Aminosäuren der EC1 beeinflusst insgesamt vier Proteine (Tabelle 13). Die EC1 soll eine unterstützende Funktion der EC2 übernehmen (Yang et al. 2020), sodass auch hier ausschließlich Transmembranproteine in ihrer direkten oder indirekten Interaktion mit CD53 gestört werden sollten. Hier finden sich jedoch auch die zytoplasmatischen Proteine S100A8 und WDR1. Die Deletion der C-terminalen PDZ-Erkennungsdomäne führt lediglich zu einer Reduktion von zwei Proteinhäufigkeiten (Tabelle 13), wobei es sich bei den hier gefundenen Proteinen nicht um PDZ-Proteine handelt. Auch unter allen 45 identifizierten Kandidaten findet sich kein PDZ-Protein. Da sich die Biotinligase ebenfalls C-terminal befindet, kann das Fehlen von PDZ-Proteinen in CD53-BirA\*-Konstrukt auch durch einen sterisch behindernden Einfluss von BirA\* auf die Bindung an diese Erkennungsdomäne zurückgehen, sodass das hier verwendete Konstrukt nicht zur Analyse des Einflusses der PDZ-Erkennungsdomäne geeignet ist. Die Mutation der membrannahen Palmitoylierungsstellen beeinflusst hingegen

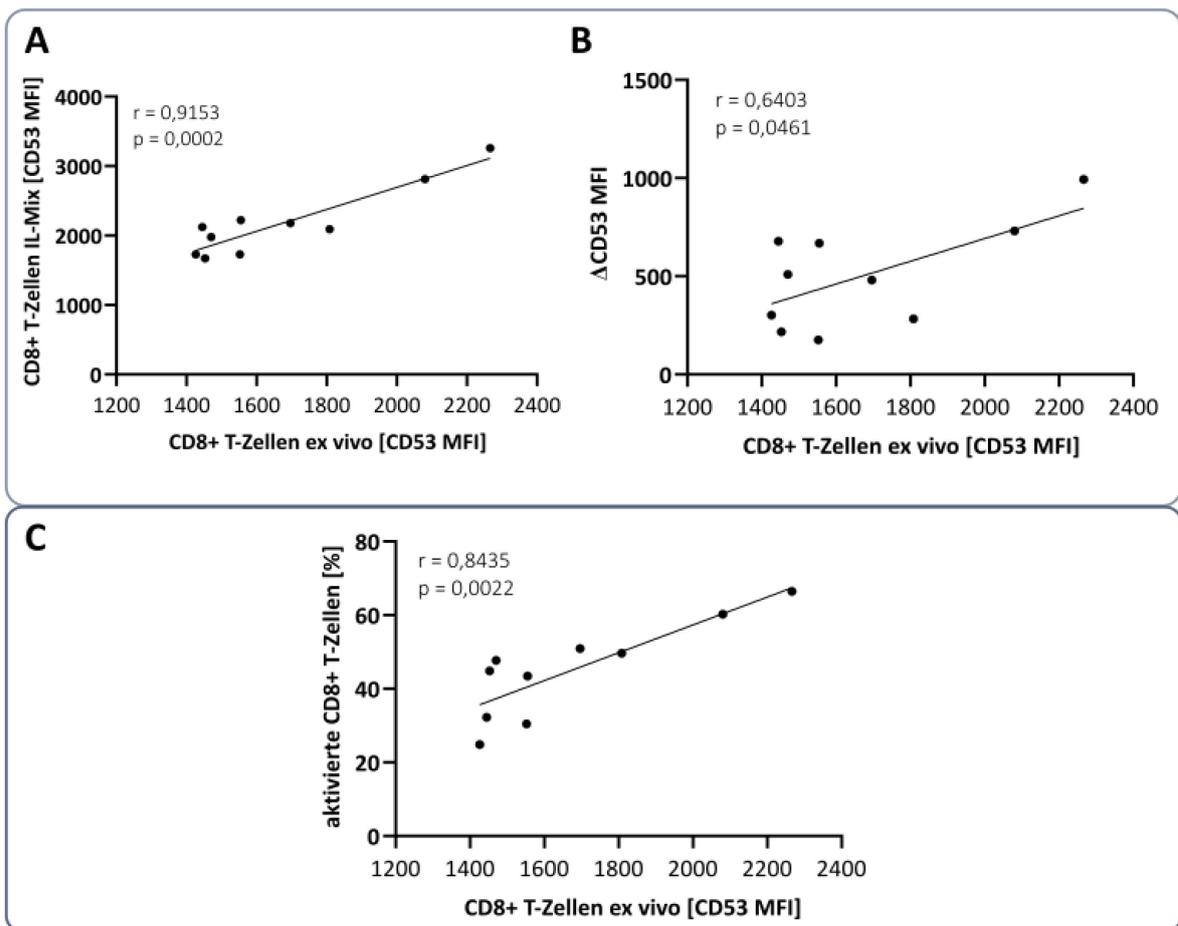
insgesamt vier Proteine (Tabelle 13), wobei es sich lediglich bei Lcp1 und S100A8 um zytoplasmatische Proteine handelt.

Die Erkenntnisse aus der Mutation relevanter CD53-Proteindomänen unterstreichen somit insgesamt, dass die EC2 unter den hier untersuchten Strukturen in der Vermittlung von Proteininteraktionen die größte Rolle spielt. Jedoch hat auch die Palmitoylierung der intrazellulären, membrannahen Cysteine von CD53 einen nicht zu unterschätzenden Einfluss in der Vermittlung von Interaktionen.

### 3.4. CD53 als Prädiktor der Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen

Die vorangegangenen Experimente zeigen, dass sich CD53 besonders ausgeprägt auf Effektor-Gedächtniszellen wiederfindet, die im Rahmen eines erneuten Antigenkontaktes schnell mit einer Zytokinproduktion reagieren. Im Rahmen einer solchen Immunzellaktivierung wird das Tetraspanin auf aktivierten CD8+ T-Zellen verstärkt exprimiert und reguliert dabei die Expression von CD25 und CD69 sowie die Produktion von IFN $\gamma$ . Die BioID hat wiederum die Rolle von CD53 im IFN $\gamma$ -Signalweg bestätigt und liefert darüber hinaus einige interessante Membranproteine, die für die CD53-abhängige Regulation der IFN $\gamma$ -Produktion verantwortlich sein könnten. CD53 ist folglich eng mit der Aktivierung von CD8+ T-Zellen verknüpft. Fraglich bleibt jedoch was die CD53-Expression im ruhenden Zustand einer CD8+ T-Zelle für eine Aussagekraft besitzt.

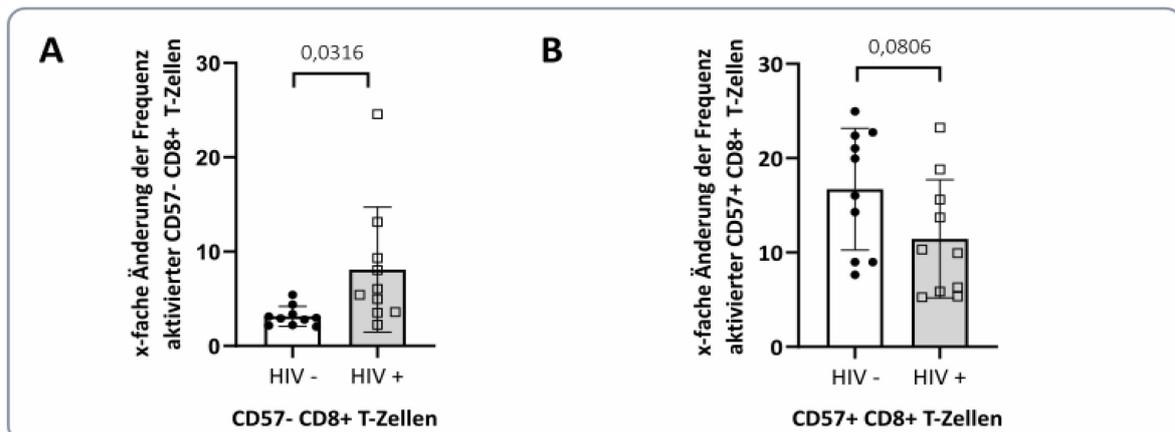
Daher wird zunächst analysiert, ob eine hohe CD53-Expression von ruhenden CD8+ T-Zellen im Rahmen einer Immunzellaktivierung ebenfalls einen starken CD53-Expressionsanstieg bewirkt. In der Tat ergibt sich ein signifikanter korrelativer Zusammenhang zwischen der CD53-Expression vor und nach Stimulation (Abbildung 31A). Betrachtet man, wie stark sich die CD53-Expression nach Interleukin-Stimulation verändert, zeigen CD8+ T-Zellen mit hoher *ex vivo* CD53-Menge nach Aktivierung ebenfalls den stärksten Expressionsunterschied ( $\Delta$  CD53 MFI,  $(\text{CD53 MFI}_{\text{stimuliert}} - \text{CD53 MFI}_{\text{ex vivo}})$ ) (Abbildung 31B). CD8+ T-Zellen, die also bereits im nicht aktivierten Zustand viel CD53 auf ihrer Oberfläche besitzen, reagieren bei einer Immunzellaktivierung mit einer stärkeren CD53-Hochregulation als CD8+ T-Zellen mit schwacher *ex vivo* CD53-Expression. Darüber hinaus zeigt sich eine Korrelation zwischen der CD53-Menge von ruhenden CD8+ T-Zellen und der Aktivierungsmarker-Expression nach Immunzellstimulation (Abbildung 31C). Je mehr CD53 durchschnittlich auf einer CD8+ T-Zellpopulation bereits im ruhenden Zustand exprimiert wird, desto stärker kann diese später aktiviert werden.



**Abbildung 31: Korrelation der *ex vivo* CD53-Expression mit dem Anstieg der CD53-Expression und der Frequenz aktivierter CD8+ T-Zellen nach Aktivierung.** PBMCs 10 gesunder Spender werden für 24 h mit einem Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert. Anschließend wird auf CD8+ T-Zellen die CD53-Expression analysiert. A: Die *ex vivo* CD53 Menge korreliert mit der CD53-Menge nach Aktivierung. B: Je höher die *ex vivo* CD53-Expression, desto stärker steigt die CD53-Expression gemessen an  $\Delta$  CD53 MFI an.  $\Delta$  CD53 MFI ergibt sich aus  $CD53\text{-MFI}_{\text{stimuliert}} - CD53\text{-MFI}_{\text{ex vivo}}$ . Dazu werden die Daten aus A erneut analysiert. C: Je mehr CD53 sich auf der Oberfläche von ruhenden CD8+ T-Zellen findet, desto mehr aktivierte CD8+ T-Zellen finden sich nach Stimulation. Aktivierte CD8+ T-Zellen werden durch das Vorkommen mindestens eines der drei Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder CD38 definiert.

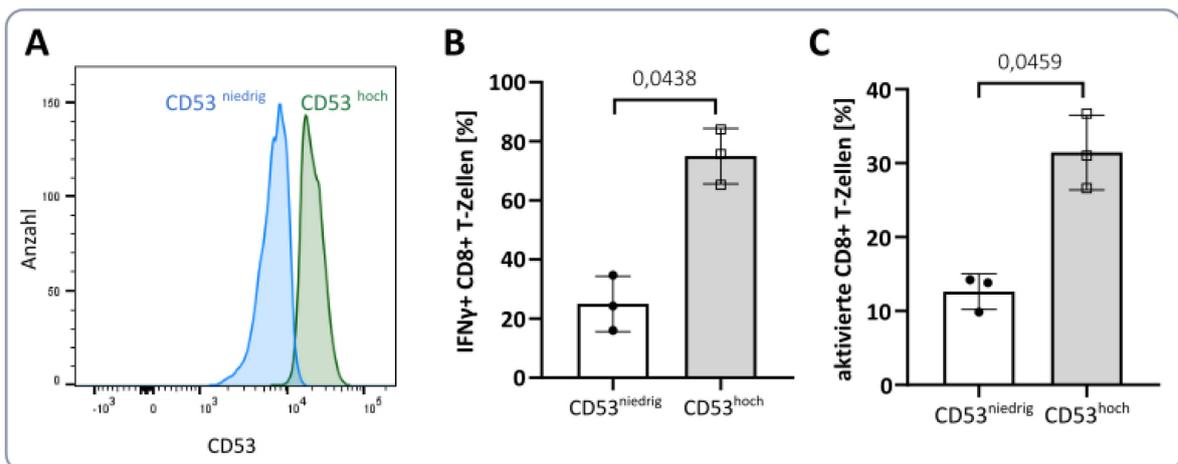
Ähnliches kann in einem weiteren Experiment mit HIV-positiven Patienten beobachtet werden. Die HIV-Infektion führt – wie bereits beschrieben – zu einer reduzierten CD53-Expression auf CD57+ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern. CD57+ T-Zellen von HIV-Patienten besitzen dagegen signifikant mehr CD53 auf der T-Zelloberfläche (s. 3.1.3). Wurden die Lymphozyten beider Patientengruppen mit einem Mix aus Interleukinen für 24 h stimuliert, zeigt sich, dass die CD53-Menge mit der Aktivierbarkeit der einzelnen CD57+ Populationen zusammenhängt. So weisen die CD57+ CD8+ T-Zellen gesunder Spender (mehr CD53-Expression als HIV-Patienten) nach Stimulation auch mehr aktivierte CD8+ T-Zellen innerhalb dieser Population auf (Abbildung 32B). Aktivierte CD8+ T-Zellen werden hier nur anhand der Expression von CD25 und CD69 definiert, da CD38 im Rahmen einer HIV-Infektion stark hochreguliert wird (Kestens et al. 1992; Rodríguez-Alba et al. 2019) und sich

in diesem Kontext nicht als Aktivierungsmarker eignet. Die CD57- CD8+ T-Zellen gesunder Spender weisen wiederum signifikant weniger CD53 auf ihrer Oberfläche auf als diese von HIV-positiven Patienten. Während der Immunzellaktivierung reagieren die CD57- CD8+ T-Zellen gesunder Spender dann auch mit einer signifikant geringeren Hochregulation der Aktivierungsmarker verglichen mit den Zellen der HIV-Patienten (Abbildung 32A).



**Abbildung 32: Zunahme aktivierter CD8+ T-Zellen abhängig von CD57-Expression auf gesunden Spendern und HIV-Patienten.** Pro Gruppe werden 10 Probanden analysiert. Die Stimulation erfolgt mit IL-12, IL-15 und IL-18 für 24 h. Aktivierte T-Zellen werden anhand ihrer Expression von CD25 und/oder CD69 identifiziert. Für die statistische Analyse wird ein nicht gepaarter t-Test durchgeführt.

Um zu verifizieren, dass CD53 tatsächlich als Prädiktor für die Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen dienen kann, sollen isolierte CD8+ T-Zellen aufgrund ihrer *ex vivo* CD53-Oberflächenexpression in zwei Populationen (CD53<sup>niedrig</sup> und CD53<sup>hoch</sup>) sortiert (Abbildung 33A) und anschließend für 16 h unspezifisch stimuliert werden. Für die Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion erfolgt die Stimulation mit PMA und Ionomycin, während für die Expressionsanalyse der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 ein Mix aus den Interleukinen IL-12, IL-15 und IL-18 gewählt wird. Es zeigt sich, dass im Vergleich zu den CD8+ T-Zellen mit geringer *ex vivo* CD53-Expression die CD53<sup>hoch</sup>-Population nach Stimulation mit PMA und Ionomycin mehr als doppelt so viel IFN $\gamma$  produziert (Abbildung 33B). Auch die Aktivierungsmarker CD25 und/oder CD69 werden von CD8+ T-Zellen mit hoher *ex vivo* CD53-Menge durch die Interleukin-Stimulation stärker hochreguliert (Abbildung 33C). Dies bestätigt also die Annahme, dass die CD53-Konzentration auf der Zelloberfläche von CD8+ T-Zellen im nicht-aktivierten Zustand bestimmt, wie gut dieselbe Zelle später auf einen Stimulus reagieren kann.



**Abbildung 33:** Die *ex vivo* CD53-Expression bestimmt über die Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen. A: CD8+ T-Zellen werden anhand ihrer CD53-Menge in zwei Populationen sortiert (blau: wenig CD53, grün: viel CD53). Die sortierten CD8+ T-Zellen von drei gesunden Spendern werden unspezifisch für 16 h stimuliert (B & C). Die statistische Analyse erfolgt mittels gepaartem t-Test. B: Stimulation mit PMA und Ionomycin. CD8+ T-Zellen mit starker *ex vivo* CD53-Expression produzieren nach Aktivierung mehr IFN $\gamma$ . C: Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18. CD8+ T-Zellen mit starker *ex vivo* CD53-Expression sind nach Stimulation stärker aktiviert. Aktivierte CD8+ T-Zellen werden anhand der Expression von CD25 und/oder CD69 definiert.

## 4. Diskussion

### 4.1. CD53 auf ruhenden, immunoseneszenten CD8+ T-Zellen

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass das Tetraspanin CD53 mit der Aktivierung und der Expansion von CD8+ T-Zellen verknüpft ist. Nach einer Aktivierung differenzieren einige T-Zellen in Gedächtniszellen, die eine rasche Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt gewährleisten. Dabei reichert sich CD53 mit zunehmender Differenzierung von naiven CD8+ T-Zellen hin zu  $T_{EMRA}$  an (Abbildung 11) und findet sich zudem verstärkt auf der speziellen Subpopulation von CD57+ CD8+ T-Zellen, welche ebenfalls stark differenzierte  $T_{EM}$  bzw.  $T_{EMRA}$  darstellen (Abbildung 13, Abbildung 14).  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  haben durch einen wiederkehrenden Antigenkontakt bereits einige klonale Expansionen durchgemacht und zeigen eine verminderte Proliferationskapazität (Geginat et al. 2003). Gleichzeitig stellt CD57 einen T-Zell-spezifischen Marker der Immunoseneszenz (u.a. replikative Seneszenz) dar. CD53 könnte somit nicht nur mit der Immunzellaktivierung in Verbindung stehen, sondern zudem einen Immunoseneszenzmarker darstellen.

Die replikative Seneszenz wird durch eine begrenzte Proliferationskapazität verursacht: Mit jeder Zellteilung kommt es zur Verkürzung der Telomere bis schließlich eine kritische Länge erreicht ist und ein stabiler und terminaler Zellzyklusarrest eingeleitet wird (HAYFLICK 1965; Cristofalo et al. 2004). Für Immunzellen ist die replikative Seneszenz im Vergleich zu anderen Körperzellen weniger detailliert beschrieben und definiert, wird jedoch für T-Zellen meist mit typischen phänotypischen Veränderungen wie dem Verlust des kostimulatorischen Proteins CD28 oder der Expressionsinduktion von CD57 beschrieben, da in diesen Zellen gleichzeitig eine verkürzte Telomerlänge und eine eingeschränkte Proliferation beobachtet werden konnte (Brenchley et al. 2003; Bandrés et al. 2000; Vallejo 2005; Weng et al. 2009; Effros et al. 1996). So haben Gedächtnis-T-Zellen wie  $T_{EM}$  und  $T_{EMRA}$  durch wiederkehrende Antigenstimulationen bereits einige Zellteilungen durchschritten und zeigen ebenfalls eine reduzierte oder fehlende CD28-Expression (Mahnke et al. 2013). Auch die Expression anderer typischer NK-Zell-Marker (u.a. KLRG1, Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren) wurden schon für seneszente T-Zellen beschrieben (Xu und Larbi 2017; Abedin et al. 2005). Damit verlieren seneszente T-Zellen zwar die Fähigkeit der Proliferation, jedoch erlangen sie gleichzeitig eine starke Effektorfunktion ähnlich der von NK-Zellen. Allerdings wird die genaue Definition von replikativ seneszenten T-Zellen weiter kontrovers diskutiert (Strioga et al. 2011; Goronzy und Weyand 2019), sodass die Definition von CD57+ CD8+ T-Zellen als immunoseneszent unter Vorbehalt betrachtet werden sollte.

Dennoch finden sich weitere Hinweise, dass Tetraspanine im Zusammenhang mit replikativer Seneszenz stehen. So wird auch das Tetraspanin CD151 verstärkt auf CD28- oder CD57+ CD4+ T-

Zellen von HIV-Patienten exprimiert (Perez et al. 2020). Auch CD53 findet sich auf vermehrt CD57+ CD8+ T-Zellen von HIV-Patienten im Gegensatz zu CD57- CD8+ T-Zellen (Abbildung 17). Während der Ausbildung des replikativ seneszenten Zustandes von humanen Endothel-Nabelschnurzelllinien (HUVEC) kommt es außerdem zu einer Hochregulation des Tetraspanins CD9 (Kim et al. 2008). Ebenso führt eine Onkogen-induzierte Seneszenz in Fibroblasten zur Hochregulation der Tetraspanine CD63 und CD9, nicht jedoch des Tetraspanins CD81 (Buratta et al. 2017). Zwar stellt die Onkogen-induzierte Seneszenz eine Stress-induzierte Seneszenz dar, dennoch führen beide Formen zu einem terminalen, tumorsuppressiven Zellschicksal (Nelson et al. 2014). Dass sich sowohl CD53 als auch CD151 verstärkt auf replikativ seneszenten T-Zellen wiederfinden und ein irreversibler Zellzyklusarrest im Allgemeinen eine vermehrte Expression von einigen Tetraspaninen bewirkt, könnte somit eine funktionale bzw. regulatorische Rolle dieser Proteine in der Seneszenz andeuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CD9 in der Lage ist, Seneszenz in HUVECs zu induzieren. Fehlte das Tetraspanin, waren die Zellen weniger seneszent. Eine Überexpression von CD9 in jungen Zellen führte dagegen zu einem früher auftretenden seneszenten Phänotyp (Cho et al. 2020). Dies zeigt, dass Tetraspanine einen regulatorischen Einfluss auf das Zellschicksal Seneszenz nehmen können. Ein solcher Einfluss wäre also auch für CD53 denkbar.

Darüber hinaus zeigen CD57+ CD8+ T-Zellen interessanterweise eine stärkere Genexpression von zuvor beschriebenen und in dieser Arbeit identifizierte CD53-Interaktionspartnern im Vergleich zu CD57- CD8+ T-Zellen (Tabelle 14). Diese Kandidaten wurden von (Le Priol et al. 2006) durch eine vergleichende Analyse von CD57+/- CD8+T-Zellen von Gesunden und HIV-Patienten identifiziert. So besitzen CD57+ CD8+ T-Zellen eine höhere Genexpression von MHC-Proteinen (HLA-A, -B, -C, -DP), von Adhäsionsmolekülen (CD11a, CD18, CD99) aber auch von LCP1 und CD2. Nur die CD53-Interaktionspartner S100A8 und CD127 kommen in CD57+ CD8+ T-Zellen weniger vor (Le Priol et al. 2006). Eine stärkere Genexpression von CD53-Interaktionspartnern auf CD57+ CD8+ T-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für ein gehäuftes Vorkommen des Tetraspanins auf dieser Zellpopulation sein. Da es seine Partnerproteine in und an der Zellmembran anordnet, bedarf es hier auch mehr CD53-Proteinen, die diese Organisation vornehmen können.

CD53 markiert also eine CD8+ T-Zellpopulation, die stark antigenerfahren ist und sich aufgrund zahlreicher Zellteilungen der Immunoseneszenz annähert. Da mit zunehmendem Alter auch die Antigenkontakte und folglich der Anteil immunoseneszenter Zellen zunimmt, wäre eine altersabhängige Betrachtung der CD53-Expression auf CD8+ T-Zellen von Interesse. Außerdem bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet wie sich die CD53-Menge mit jeder weiteren klonalen Expansion verändert. Denkbar wäre, dass die CD53-Expression wie in 3.2.3 gezeigt zwar nach abklingender

Aktivierung wieder abnimmt, jedoch nicht das ursprüngliche Niveau erreicht. Damit würde mit jeder weiteren Aktivierung eine anschließend höhere Grundexpression erzielt.

**Tabelle 14: Übersicht über potenzielle CD53-Interaktionspartner, die zwischen CD57+ und CD57- CD8+ T-Zellen differenziell exprimiert werden.** Die differentielle Expression wurde von (Le Priol et al. 2006) identifiziert. \* Für eine Interaktion mit LFA-1 gibt es bisher nur funktionale Zusammenhänge und keine Interaktionsstudien.

Interaktionspartner	Expression auf CD57+ CD8+ T-Zellen im Vergleich zu CD57- CD8+ T-Zellen	Nachweis	Literatur
MHC-Proteine	verstärkt	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), BioID	(Szöllósi et al. 1996b), diese Arbeit
LFA-1 (CD11a/CD18)	verstärkt	Funktionale Assoziation*	(Todros-Dawda et al. 2014; Cao et al. 1997)
CD2	verstärkt	Immunpräzipitation, PLA	(Bell et al. 1992), diese Arbeit
CD99	verstärkt	BioID	diese Arbeit
CD127	vermindert	Proximity Ligation Assay (PLA)	(Greenberg et al. 2020b)
LCP1	verstärkt	BioID	diese Arbeit
S100A8	vermindert	BioID	diese Arbeit

#### 4.2. Die Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen wird durch die CD53-Expression bestimmt

Kommt es zu einer Immunzellaktivierung durch Zytokine oder ein spezifisches Antigen, reagieren CD8+ T-Zellen mit einer Hochregulation des Tetraspanins CD53 auf ihrer Oberfläche (3.2.1). Diese verstärkte Expression nach Stimulation oder Stress wurde in der Literatur bereits für andere Immunzellen ebenso wie für primäre T-Zellen beschrieben (Amiot 1990; Kim et al. 2004; Dunlock et al. 2022; Greenberg et al. 2022). Dass CD53 durch so vielfältige Stimuli beeinflusst wird (Abbildung 18), betont wie zentral das Protein für die Immunzellaktivierung ist. In *Crosslinking*-Experimenten mit CD53- und CD3-Antikörpern konnte für CD53 ebenfalls ein kostimulatorischer Effekt nachgewiesen werden (Dunlock et al. 2022). Dies unterstreicht also bereits die funktionale Rolle des Tetraspanins in der Aktivierung von T-Zellen.

In dieser Arbeit konnte nochmals herausgearbeitet werden, dass lediglich die Zellen mit einem Anstieg der CD53-Expression reagieren, die auch auf den Stimulus ansprechen. Lässt der aktivierte Zustand nach, nimmt auch die CD53-Expression wieder ab (3.2.2, 3.2.3). Eine solch detaillierte Aufschlüsselung der CD53-Hochregulation in primären Zellen ist neu und vervollständigt das Bild, dass CD53 gemeinsam mit seinem Interaktionspartner CD45 nach Aktivierung zur immunologischen Synapse rekrutiert wird (Dunlock et al. 2022). Das Tetraspanin wird also vermutlich im Rahmen einer Immunzellaktivierung für die Organisation seiner Interaktionspartner verstärkt benötigt und erlaubt eine ausreichende Stabilisierung von bspw. CD45 am entsprechenden Zielort. Denkbar wäre auch,

dass CD53 mit seinen Interaktionspartnern nur den Aufenthaltsort von einer intrazellulären Membran hin zur Oberflächenmembran wechselt. Die Daten aus der intrazellulären CD53-Färbung (Abbildung 19) sprechen jedoch dagegen, dass dies der Regel entspricht. Zudem wurde bereits gezeigt, dass CD53 auf RNA-Ebene in humanen peripheren Blutlymphozyten und humanen natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) nach Stimulation hochreguliert wird (Amiot 1990; Menne 2022) und somit eine *de novo*-Synthese am wahrscheinlichsten ist.

#### 4.2.1. CD53 reguliert die proinflammatorische Immunantwort

Nachdem sich eine Korrelation zwischen der CD53-Oberflächenexpression und der Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD38 und CD69 nach Stimulation gezeigt hat, konnte ebenfalls mittels des PLA-Systems nachgewiesen werden, dass sich das Tetraspanin im Rahmen einer Aktivierung nicht weiter als 40 nm von den untersuchten Proteinen entfernt befindet (3.2.4). Wie die meisten Interaktionsstudien kann das PLA-System jedoch nur eine Aussage über die Nähe jedoch nicht über eine tatsächliche Interaktion tätigen. Je näher jedoch zwei Proteine beieinander liegen, desto wahrscheinlicher wird auch eine Interaktion. Damit deutet die nachgewiesene räumliche Nähe eine Interaktion zwischen CD53 und CD25, CD38 bzw. CD69 an. Durch eine CD53-Ko-Immunoprecipitation in unstimulierten Raji B-Zellen konnte eine Interaktion zwischen CD53 und CD38 verifiziert werden (Dunlock et al. 2022), allerdings wurde nicht näher auf dessen potenzielle Funktion eingegangen. Eine räumliche Nähe zu CD38 wurde darüber hinaus auch bereits für die Tetraspanine CD9 und CD81 berichtet (Vences-Catalán et al. 2012; Zilber et al. 2005). Des Weiteren wird die Interaktion von CD53 mit CD69 in der Integrierten Interaktionsdatenbank (IID, <http://ophid.utoronto.ca/iid>) vorhergesagt. All dies bekräftigt die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien.

Mit Hilfe eines gegen CD53 gerichteten Antikörpers, der in der EC2 als Hauptvermittler von Interaktionen bindet, konnte die Expression der beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD69 negativ beeinflusst werden. Der Aktivierungsmarker CD38 zeigte hingegen kein verändertes Expressionsverhalten. Dies deutet darauf hin, dass sich CD53 nicht nur in räumlicher Nähe zu CD25 und CD69 befindet, sondern CD53 hier die beiden Proteine über eine EC2-vermittelte Interaktion in ihrer Stabilität reguliert. Dagegen beeinflusst CD53 die Stabilität von CD38 nicht, was eine direkte Interaktion dennoch nicht ausschließt. Auch andere Tetraspanine zeigen eine Beeinflussung mit dem Aktivierungsmarker CD69. Ein Knockdown von CD9 und CD151 in Jurkat-J77-Zellen führte zu einer Reduktion der IL-2-Produktion sowie einer verringerten Expression von CD69 im basalen Zustand (Rocha-Perugini et al. 2014).

Darüber hinaus wurde die IFN $\gamma$ -Produktion durch den CD53-Antikörper wesentlich verringert (3.2.5). Während der Anfertigung dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein *Knockout* von CD53 in der T-Zelllinie CEM zu einer signifikanten Reduktion der IFN $\gamma$ -Menge nach Stimulation führte (Dunlock et al. 2022). Zum einen zeigt dies, dass der verwendete Antikörper ähnliche Effekte wie ein CD53-*Knockout* verursacht, indem er die Bindestelle in der EC2 von CD53 für andere Interaktionspartner blockiert. Zum anderen kann der regulierende Einfluss von CD53 über ein Membranprotein auf die IFN $\gamma$ -Produktion so nochmals in primären T-Zellen bestätigt werden. Über die BioID (3.3) wurden schließlich einige Proteine identifiziert, die diese CD53-abhängige IFN $\gamma$ -Regulation erklären können (Tabelle 11). Besonders interessant sind hier CD43, CD98hc, CD147, Lck, TSC1 und VAMP2, da sie durch die Auflösung der bilobulären EC2-Struktur vermindert vorkommen. Dabei bilden CD147, CD98hc, CD43 und die Lck ein Netzwerk aufgrund nachgewiesener Interaktionen oder Co-Expressionen in der STRING-Analyse (<https://string-db.org>). CD53 wurde über die BioID nun als potenzieller Vermittler dieses IFN $\gamma$ -regulierenden Komplexes identifiziert. In diesem interagieren die Membranproteine vermutlich direkt mit der CD53-EC2, während die intrazelluläre Lck möglicherweise über ein Membranprotein (CD43) indirekt mit CD53 assoziiert ist (siehe auch 4.3).

Im Rahmen der CD53-*Knockout*-Studie von Dunlock et al. 2022 konnte im Gegensatz zur IFN $\gamma$ -Produktion kein Einfluss auf die Expression von CD25 und CD69 beobachtet werden. Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass die in dieser Arbeit mit dem Antikörper beobachteten Effekte Artefakte darstellen, da durch die Verwendung von immortalisierten Zelllinien oft nicht die tatsächliche und vollständige *in vivo* Situation wiedergespiegelt werden. Durch die Entartung als Tumorzelllinie kann es zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen kommen, die sich in dieser Form nicht in primären Zellen zeigen. Die Verwendung primärer Zellen ermöglicht also eine getreue Darstellung des komplexen physiologischen Systems. Somit ist es denkbar, dass in der T-Zelllinie CEM die Bindung zwischen CD53 und CD25 bzw. CD69 keine Rolle spielt, während diese in primären Zellen von zentraler Bedeutung für die Immunzellaktivierung ist.

Zusammen genommen bedeutet dies, dass CD53 mit den beiden Aktivierungsmarkern CD25 und CD69 interagiert und diese positiv reguliert. Dabei ist bereits die basale CD53-Expression entscheidend für das spätere Ausmaß der CD53-Hochregulation und die Aktivierbarkeit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Je mehr CD53 sich bereits *ex vivo* auf der Oberfläche von CD8<sup>+</sup> T-Zellen befindet, desto stärker werden diese aktiviert und desto stärker fällt auch die IFN $\gamma$ -Produktion aus (3.4). Eine reduzierte CD53-Expression im Rahmen einer Erkrankung (wie z.B. bei HIV auf CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen) hat durch die herabgesetzte Expression von CD25 und CD69 sowie dem verminderten Potenzial IFN $\gamma$  zu sekretieren somit denkbar weitreichende Folgen. Eine reduzierte CD25-Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

zieht eine geringere IL-2 Sensitivität nach sich, sodass es zu einer reduzierten Proliferationskapazität kommt (Bachmann et al. 2007). CD69 zeigt in Mausmodellen dagegen eher immunregulatorische Funktionen, die eine überschießende Immunreaktion verhindern sollen. (González-Amaro et al. 2013). Eine geringere CD69-Expression würde folglich eine chronische Entzündungsreaktion bspw. bei Virusinfektionen begünstigen. Allerdings kommt es im Rahmen von Autoimmunerkrankungen beim Menschen wie der rheumatoiden Arthritis zu einer verstärkten CD69-Expression, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass CD69 im humanen System eine pro- statt antiinflammatorische Funktion übernimmt (González-Amaro et al. 2013; Afeltra et al. 1993). Da CD53 jedoch vor allem proinflammatorische Funktionen auf CD8+ T-Zellen übernimmt, ist eine entzündungsfördernde Rolle von CD69 durchaus wahrscheinlich. Interessanterweise finden sich zahlreiche Literaturhinweise, die ebenfalls eine erhöhte CD53-Expression bei Autoimmunerkrankungen nachweisen (Su et al. 2021; Li et al. 2012; Bradley et al. 2015; Lombardo et al. 2019; Zheng et al. 2020). So stellt CD53 u.a. auch eines von zwölf zentralen Proteinen dar, die bei der rheumatoiden Arthritis hochreguliert vorgefunden werden (Xiao et al. 2022).

### 4.3. CD53 besitzt ein komplexes Proteinnetzwerk in Jurkat T-Zellen

Mit Hilfe der BioID konnten neben bereits beschriebenen CD53-Interaktionspartnern sowohl vorhergesagte Interaktionskandidaten als auch neue bisher unbekannte potenzielle Bindepartner identifiziert werden (3.3.1). Zu den bereits bekannten Partnerproteinen zählen CLCN7 (H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Austausch-Transporter), Gimap5 (GTPase des Immunitäts-assoziierten Proteins 5) (Luck et al. 2020), TFRC (Transferrin-Rezeptor CD71), ATP2B4 (Plasmamembran-Calcium-transportierende ATPase 4), die Kinase Lck (Dunlock et al. 2022) und das MHC-Protein HLA-A (Szöllösi et al. 1996b), welche somit in dieser Arbeit als direkte oder indirekte Interaktionspartner verifiziert werden konnten. Jedoch muss erwähnt werden, dass die über die BioID identifizierten Kandidaten aufgrund von extremen Lieferverzögerungen (über 6 Monate) gegen Ende dieser Arbeit nicht mehr durch das PLA-System als unabhängige Methode bestätigt werden konnten. Folglich ist nicht auszuschließen, dass sich in dem hier identifizierten Netzwerk Kandidaten befinden, die jedoch tatsächlich keine Interaktion oder räumliche Nähe zu CD53 zeigen. Dies gilt besonders, da solche Proteine als Kandidaten betrachtet wurden, die in den untersuchten Bedingungen (Stimulation und Mutationen) im Vergleich zum CD53-BirA\*-Konstrukt verändert vorlagen. Dabei kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Stimulation ebenfalls unspezifische Interaktionspartner in ihrer Proteinhäufigkeit verändert und somit fälschlicherweise als Kandidat betrachtet werden. Insgesamt ist das hier ermittelte Proteinnetzwerk und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen unter Vorbehalt zu betrachten,

jedoch liefert es dennoch einen ersten Eindruck in welche zahlreiche zelluläre Prozesse das Tetraspanin CD53 involviert sein kann.

Interessanterweise stimmen einige der in der CD53-BioID identifizierten Proteine mit den Kandidaten aus einer BioID mit dem Tetraspanin CD63 überein (Cheerathodi et al. 2021) oder finden sich auch in räumlicher Nähe des Tetraspanins CD81 (Pata et al. 2011) (Tabelle 15). Da Tetraspanine durch ihre konservierte Struktur auch überlappende Interaktionspartner besitzen und gemeinsam in Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen (TEMs) Membranabschnitte organisieren, war dies durchaus zu erwarten.

**Tabelle 15: In der CD53-BioID identifizierte Kandidaten interagieren auch mit CD63 und CD81.** Es wurden die Gennamen der jeweiligen Kandidaten angegeben. Proteine, die sich auch in räumlicher Nähe von CD63 befinden, wurden ebenfalls mit einer BioID identifiziert (Cheerathodi et al. 2021).

Tetraspanin	Interaktionspartner	Literatur
CD63	ARHGAP1, ATP2B4, BSG (CD147), CLCN7, EIF4B, EPB41, EPB41L2, HMOX2, LAMTOR1, LMAN1 (Ergic53), NEO1, PGRMC2, RAB6A, SHISA2, SLC1A5, SLC3A2 (CD98hc), SNAP23, SNAP29, SPN (CD43), TMEM199, TMPO, TOR1AIP1, TSC1, VAT1, YKT6	(Cheerathodi et al. 2021)
CD81	CD99	(Pata et al. 2011)

Dass in der Massenspektrometrie (MS) keine anderen Tetraspanine oder weitere bekannte mit CD53-interagierende Membranproteine wie CD45 oder CD2 detektiert wurden, kann damit zusammenhängen, dass Membranproteine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften generell schwer löslich sind. Darüber hinaus ist die Detektion von vergleichsweise schwach exprimierten Proteinen auch mit MS schwierig, da ihre Peptide in der Analyse durch die von Proteinen hohen Vorkommens überlagert werden. Außerdem ist die Zusammenstellung der identifizierten Membranproteine stark von der Zusammensetzung der verwendeten Puffer – besonders des verwendeten Detergens – abhängig (Peach et al. 2015; Banerjee et al. 1995). Somit können mittels MS zwangsläufig nicht alle Proteine identifiziert werden, die in einer Probe vorkommen. Ein in der BioID fehlendes Protein ist also nicht gleichbedeutend mit einer nicht vorhandenen räumlichen Nähe zu CD53. Folglich widerlegt das Fehlen von CD45, CD2, CD69, CD25, anderen Tetraspaninen und weiteren bereits beschriebenen CD53-Bindepartnern in der MS-Analyse nicht deren potenzielle räumliche Nähe. Mit Hilfe vorhergesagter Interaktionen bspw. durch eine künstliche Intelligenz könnten auch solche in der MS schwer detektierenden Proteine in den Fokus genommen werden, indem diese anschließend über das PLA-System oder eine andere unabhängige Methode verifiziert werden.

Durch eine Stimulation verändert sich das Proteom einer Zelle, da einige Proteine neu-synthetisiert werden. Dass durch die Aktivierung von Jurkat-Zellen nur verringerte

Proteinhäufigkeiten und keine neuen Proteine wie Aktivierungsmarker in der BioID identifiziert wurden (3.3.2), kann damit zusammenhängen, dass hier eine CD4+ T-Zelllinie analysiert wurde, die aufgrund ihrer Eigenschaft als immortalisierte Linie nicht vollständig die *in vivo* Situation abbildet. Zudem zeigen primäre CD4+ T-Zellen keine so deutliche Verstärkung der CD53-Expression nach Interleukin-Stimulation wie CD8+ T-Zellen (3.2.1). Somit wäre es denkbar, dass CD53 in CD8+ T-Zellen eine essenziellere Rolle bei der Regulation der Immunzellaktivierung spielt und hier durch die Stimulation neue Interaktionen eingegangen werden. CD4+ T-Zellen regulieren das Tetraspanin dagegen möglicherweise weniger stark hoch, weil hier auch weniger zahlreiche neue Proteininteraktionen benötigt werden. Stattdessen scheinen Interaktionen hier sogar eher aufgelöst zu werden. Somit wäre es entscheidend das Interaktom auch nach Stimulation von primären CD8+ T-Zellen zu betrachten, da bislang eine verwendbare CD8+ T-Zelllinie fehlt. Dies wurde hier nicht durchgeführt, da für eine transiente Transduktion primärer CD8+ T-Zellen und anschließender BioID enorm viele Zellen benötigt würden. Diese Anzahl ist bei Isolation von CD8+ T-Zellen aus einem einzelnen Spender jedoch nicht realistisch.

Darüber hinaus werden durch Interleukin-Stimulation einige Proteine vermindert vorgefunden, die typischerweise nach T-Zellrezeptor-Stimulation zur immunologischen Synapse rekrutiert werden (z.B. CD43, CD99 und die Kinasen Lck und Zap70). Da hier jedoch eine Interleukin-Stimulation stattfindet, wird keine immunologische Synapse ausgebildet. Somit ist es denkbar, dass CD53 diese nicht benötigten Proteine schwächer bindet, um die Interaktion mit anderen Faktoren, die für die Interleukin-abhängige Aktivierung benötigt werden, zu verstärken. Da für eine erfolgreiche MS-Analyse eine sehr hohe Zellzahl (20 Mio.) benötigt wird, wurde hier keine T-Zell-spezifische Aktivierung über CD3/CD28 *Dynabeads*<sup>TM</sup> durchgeführt. Dennoch wäre es für weitere Studien von besonderem Interesse, wie sich die Bindung zwischen CD53 und seinen Partnerproteinen verändert, wenn eine immunologische Synapse ausgebildet wird.

Bei der CD53-Mutanten-Analyse (3.3.3) konnte zudem festgestellt werden, dass die EC2 mit ihrer spezifischen bilobulären Struktur den größten Einfluss auf die Interaktion mit den hier identifizierten Proteinen besitzt. Im Vergleich zum CD53-BirA\*-Konstrukt kommt es durch Auflösung der EC2-Struktur zu einer Reduktion zahlreicher Proteinhäufigkeiten. Dass sich hier nicht alle Membranproteine wiederfinden, die in der BioID als potenzielle Bindepartner von CD53 identifiziert wurden, kann bedeuten, dass einige von ihnen die korrekte Ausbildung der EC2-Struktur nicht für die Interaktion benötigen. Interessanterweise finden sich unter den Kandidaten, die auf die bilobuläre Struktur der EC2 für eine Interaktion mit CD53 angewiesen sind, auch einige Proteine, die mit IFN $\gamma$  in Verbindung stehen (CD147, Lck, CD98hc, CD43, TSC1, VAMP2). Da CD53 die Produktion dieses Zytokins über ein Membranprotein, das mit der EC2 interagiert, positiv reguliert, sind diese

Kandidaten besonders interessant (4.2.1). Neben Membranproteinen finden sich darunter auch einige intrazelluläre Proteine (EPB41L2 (Band 4.1 ähnliches Protein 2), Lck, Rab6a und Taldo1). Da diese aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation nicht mit der extrazellulären EC2 interagieren können, ist es wahrscheinlich, dass hier eine direkte oder indirekte Interaktion in einem Komplex mit einem weiteren Membranprotein stattfindet. Für die Kinase Lck könnte dieses Membranprotein die Tyrosinphosphatase CD45 darstellen, die mit Lck interagiert (Koretzky et al. 1993) und sie durch Dephosphorylierung in ihrer Aktivierung unterstützt (Courtney et al. 2017). Zuletzt konnte eine Interaktion zwischen CD45 und CD53 ermittelt werden, die die Stabilität und Phosphatase-Aktivität von CD45 beeinflusst (Dunlock et al. 2022). Allerdings konnte CD45 nicht mit Hilfe der BioID identifiziert werden. Dennoch ist es möglich, dass CD53 im Komplex mit anderen Membranproteinen indirekt Einfluss auf die Kinase Lck nimmt, die am Anfang der Signalkaskade nach Antigenbindung an den T-Zellrezeptor (TCR) steht.

Durch die Inhibition der Palmitoylierung der membrannahen Cysteine von CD53 wurde interessanterweise die Proteinhäufigkeit der zytoplasmatischen Proteine Lcp1 und S100A8 wesentlich reduziert (3.3.2). Lcp1 (auch Zytoplasmatisches Lymphozyten-Protein 1) stellt eines der häufigsten Proteine in T-Zellen dar (Goldstein et al. 1985) und vermittelt die Quervernetzung von Aktinbündeln, um so die Stabilität von spezifischen Zellstrukturen wie Pseudopodien zu stärken. Damit ist es nicht nur an der Beweglichkeit von T-Zellen, sondern auch an der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt (Morley 2013; Wabnitz et al. 2017). Wie die Lcp1-Aktivität gesteuert wird, ist bisher nicht abschließend geklärt. Über die Interaktion mit den palmitoylierten Cysteinen im CD53-Protein könnte Lcp1 membrannah angereichert und möglicherweise über CD53 weiter reguliert werden. Somit stellt sich auch hier die Frage, wie sich die Interaktion zwischen CD53 und Lcp1 bei Ausbildung der immunologischen Synapse verändert. Darüber hinaus zeigte sich, dass Lcp1 nach Antigen-Stimulation zur immunologischen Synapse rekrutiert und phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von Serin 5 war dabei entscheidend für den Transport der beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD69 zur Plasmamembran (Wabnitz et al. 2007). Da CD53 auch eine in dieser Arbeit beschriebene und wahrscheinliche Interaktion mit diesen beiden Proteinen zeigt, ist es denkbar, dass das Tetraspanin über die Interaktion mit Lcp1 zusätzlich deren Transport unterstützt und orchestriert. Das ebenfalls durch die Palmitoylierungs-Mutante beeinflusste Protein S100A8 bildet zusammen mit S100A9 einen Komplex, der auch als Calprotectin bezeichnet wird. Neben S100A8 wurde auch S100A9 in der CD53-BioID identifiziert, war jedoch in den untersuchten Bedingungen nicht verändert. Dies könnte deuten darauf hindeuten, dass die Formation von Calprotectin an CD53 über die S100A8-Untereinheit vermittelt wird. Calprotectin selbst unterstützt intrazellulär in einer calciumabhängigen Art und Weise die Organisation des Zytoskeletts über eine

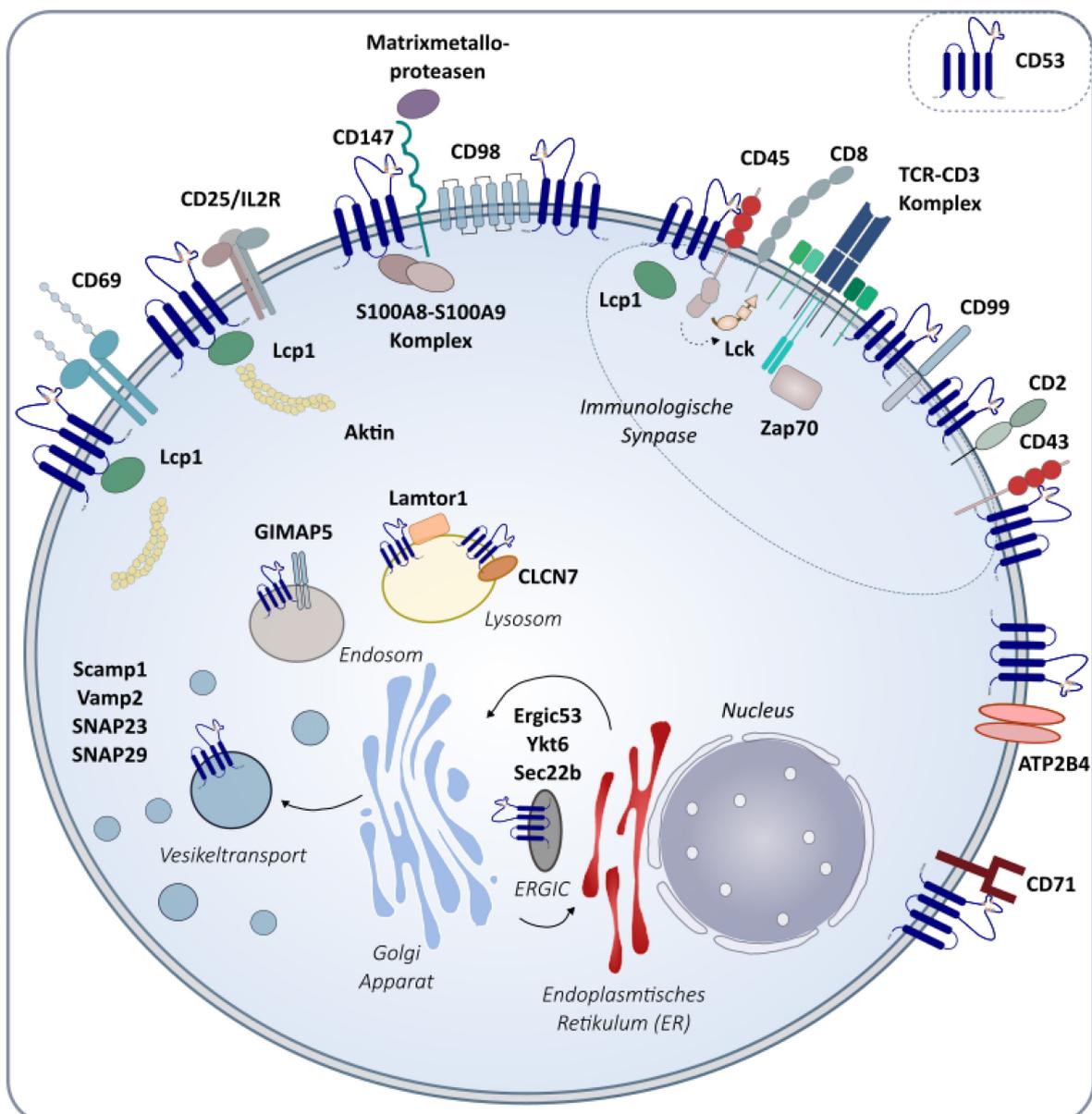
Interaktion mit bspw. Tubulin. Wird Calprotectin hingegen sekretiert, wirkt es extrazellulär als Alarmin und unterstützt über die Bindung an verschiedenste Rezeptoren vor allem die angeborene Immunantwort (Wang et al. 2018).

#### 4.3.1. Zusammenfassender Überblick über das Proteinnetzwerk des Tetraspanins CD53

Im Rahmen der BioID wurden Proteine aus verschiedensten zellulären Prozessen identifiziert, die sich potenziell in räumlicher Nähe des Tetraspanins CD53 befinden und eine direkte oder indirekte Interaktion in einem Komplex somit denkbar ist (Abbildung 34).

Dabei zeigt sich, dass CD53 nicht nur in der Plasmamembranregion angereichert ist, sondern auch stark mit in Vesikeln angereicherten Proteinen (u.a. aus Endosomen und Lysosomen) in Verbindung steht. So finden sich zahlreiche Proteine der SNARE-Familie (lösliche N-Ethylmaleimidempfindliche Faktor-Anheftungsprotein-Rezeptor-Proteine; dazu gehören Sec22b, SNAP23, SNAP29, Vamp2, Ykt6), die die Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran vermitteln (Wang et al. 2017). Darüber hinaus findet sich das Tetraspanin CD53 ebenfalls im ER-Golgi-Zwischenkompartiment (ERGIC), welches durch das Protein Ergic53 markiert wird (Schweizer et al. 1988). In diesem speziellen Organell findet der retrograde und anterograde Transport von Proteinen statt, wobei neu synthetisierte Proteine zusätzlich hinsichtlich ihrer korrekten Faltung überprüft werden (Appenzeller-Herzog und Hauri 2006; Gomez-Navarro und Miller 2016). Damit könnte CD53 eine besondere Rolle im Proteintransport einnehmen und über die potenzielle Interaktion mit ERGIC-Proteinen bereits am Anfang des sekretorischen Signalweges stehen. Folglich ist es auch nicht überraschend, dass sich das Tetraspanin ebenfalls auf Endosomen und Lysosomen als spezialisierte Vesikel wiederfindet. Hier konnte die Interaktion mit dem Enzym Gimap5 und CLCN7 bestätigt werden. Gimap5 reguliert die Aktivität der Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) negativ und ermöglicht so die Proliferation und DNA-Schädigungsantwort von T-Zellen (Patterson et al. 2018). Auch das Protein Lamtor1, das sich in räumlicher Nähe zu CD53 befindet, ist als membranverankernder Teil des Ragulator-Komplexes mit der Regulation von Zellwachstum verknüpft. Der Ragulator-Komplex rekrutiert dazu mTORC1, welches die Translation von Proteinen aktiviert. Dies zeigt eine mögliche Verknüpfung von CD53 mit der Proliferation von T-Zellen. Diese findet sich nicht nur intrazellulär wieder, sondern auch in der vermutlich stabilisierenden Interaktion von CD53 mit dem Plasmamembranprotein CD25 als Untereinheit des IL-2-Rezeptors (3.2.4, 3.2.5). Erst durch CD25 gelangt dieser in seine hochaffine Form, sodass anschließend eine adäquate klonale Expansion der T-Zelle eingeleitet wird und eine Apoptose in der Zelle durch Hochregulation anti-apoptotischer Proteine verhindert wird (Gaffen 2001). Dieses Bild könnte durch die potenzielle

Interaktion mit dem Aminosäuretransporter CD98 vervollständigt werden, welcher über seine schwere Kette (SLC3A2, CD98hc) die klonale Expansion von T-Zellen durch Verstärkung von Integrin-Signalen unterstützt (Cantor und Ginsberg 2012). Auch andere Tetraspanin-Familienmitglieder wurden in der Vergangenheit schon zahlreich mit der Proliferation von Immunzellen in Verbindung gebracht (Shi et al. 2000; Tarrant et al. 2002; Maecker und Levy 1997; Hou et al. 2015). Bei bestehender CD37-Defizienz kam es beispielsweise zu einer Hyperproliferation nach Stimulation der Immunzellen (van Sriel et al. 2004). Mit Hilfe der CD53-BioID wurden neue mögliche Anhaltspunkte geliefert, über welche Proteine auch CD53 diesen zellulären Prozess möglicherweise reguliert (3.3).



**Abbildung 34:** Schematische Darstellung einiger potenzieller Interaktionspartner von CD53 in einer T-Zelle. Das Tetraspanin findet sich sowohl auf intrazellulären Membranen als auch auf der Plasmamembran. Hier findet sich eine Anreicherung mit Proteinen, die zur immunologischen Synapse rekrutiert werden.

Zusätzlich zur CD53-vermittelten Regulation von CD25 organisiert das Tetraspanin über die potenzielle Interaktion mit Lcp1 vermutlich zusätzlich den Transport von CD25 und CD69 an die Plasmamembran. Neben Lcp1 als Zytoskelett-organisierendes Protein und essentieller Faktor der Ausbildung der immunologischen Synapse, finden sich in der CD53-BioID zahlreiche Proteine, die mit diesem spezialisierten Membranbereich assoziiert sind (3.3). Zwar ist bereits bekannt, dass CD53 nach Antigenstimulation zur immunologischen Synapse rekrutiert wird (Dunlock et al. 2022), jedoch demonstriert die große Anzahl der hiermit verbundenen Proteine eine mögliche zentrale Rolle des Tetraspanins bei der Organisation dieser Membranstruktur an

Unter den Plasmamembranproteinen finden sich zudem einige Ionentransporter, die als Interaktionspartner von CD53 in Frage kommen. So wurde hier eine zuvor beschriebene Interaktion mit ATP2B4 als Regulator der zellulären Calcium-Hämostase bestätigt (3.3.1). Die Verwendung von Antikörpern gegen einige Tetraspanine (wie CD9 und CD82) hat bereits einen Zusammenhang mit der Regulation der Calcium-Mobilisierung nahe gelegt (Lebel-Binay et al. 1995; Worthington et al. 1990). So führte auch das *Crosslinking* von CD53 zu einem Calciumflux in humanen Monozyten und B-Zellen (Olweus et al. 1993a). Calcium beeinflusst dabei zahlreiche Signalprozesse wie z.B. die Immunzellaktivierung, die Proliferation oder die Zytokinsekretion in T-Zellen. Sind die Calcium-Mengen in T-Zellen dysreguliert, können Autoimmunerkrankungen oder Immundefizienzen entstehen (Trebak und Kinet 2019). Eine mögliche Interaktion von CD53 mit dem Calcium-Transporter ATP2B4 kann somit das Verständnis der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration vervollständigen.

Da Tetraspanine oft mit Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie interagieren (Yáñez-Mó et al. 2009), ist die gefundene Bindung von CD147 als Mitglied dieser Familie auch ohne Verifikation recht wahrscheinlich, zumal sich ein starker korrelativer Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen findet (3.3.1). CD147 stellt einen Induktor der extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) dar, die wiederum Proteine der extrazellulären Matrix abbauen, aber ebenso an der Prozessierung und Abspaltung von Rezeptoren beteiligt sind (van Lint und Libert 2007; Verma und Hansch 2007). In T-Zellen wird über MMPs die Migration sowie das Eindringen in entzündetes Gewebe beeinflusst (Wu et al. 2007). Für einige Tetraspanine konnte bereits eine Interaktion oder regulatorische Funktion für mehrere MMPs nachgewiesen werden (Hong et al. 2005; Lafleur et al. 2009; Yáñez-Mó et al. 2008; Herr et al. 2013). Auch CD53 zeigt eine Interaktion mit der Membran-assoziierten MMP14 sowie weiteren MMPs (u.a. MMP1, MMP2, MMP9) (Schröder et al. 2013). Mit CD147 könnte sich somit ein regulatorisches Netzwerk ergeben, das CD53 als Gerüstprotein organisiert.

Damit identifiziert die BioID insgesamt einige neue interessante Interaktionspartner, die nach erfolgreicher Verifikation der hier beschriebenen räumlichen Nähe zahlreiche neue Ansatzpunkte für das tiefere Verständnis der Funktion des Tetraspanins CD53 aufzeigen oder bestehende Erkenntnisse mit neuen Details versehen kann.

#### 4.4. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich CD53 vermehrt auf stark antigenerfahrenen CD8+ Effektor-T-Zellen findet. Diese zeichnen sich durch eine rasche IFN $\gamma$ -Produktion bei erneutem Antigenkontakt aus. Während einer solchen Immunzellaktivierung reguliert CD53 als Gerüstprotein direkt das Ausmaß einer CD8+ T-Zellantwort auf mehreren Ebenen. Ein geringes CD53-Vorkommen geht dabei mit einer verminderten Immunantwort einher. Dies gilt sowohl für die Expression von an der Immunantwort beteiligten Plasmamembranproteinen als auch für die Zytokinproduktion. Die BioID hat zudem gezeigt, dass CD53 über mehrere Bindeproteine in der Lage ist, dieselben zellulären Prozesse – beispielsweise die IFN $\gamma$ -Produktion oder die Proliferation – zu beeinflussen.

In zukünftigen Studien sollte betrachtet werden, wie und welche Proteine bei der Ausbildung der immunologischen Synapse von CD53 orchestriert werden. Die potenzielle Interaktion mit dem Zytoskelett-organisierenden Protein Lcp1 legt hier eine sehr wesentliche Rolle nahe, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht während einer T-Zell-spezifischen Stimulation betrachtet. Die Beobachtung, dass CD53 mit zunehmender Annäherung an den immunoseneszenten Zustand verstärkt exprimiert wird, wirft wiederum die Frage auf, wie sich dessen Expression in Abhängigkeit vom Alter des Patienten verhält. Hierbei wäre es interessant, die Entwicklung der CD53-Expression einer naiven T-Zelle während wiederkehrender Antigenstimulationen genau zu verfolgen. Damit könnte ermittelt werden, ob CD53 aufgrund einer unvollständigen Herabregulation nach Ende der Antigenstimulation auf der Zelloberfläche akkumuliert oder ob die hohe CD53-Expression auf Effektor-Gedächtniszellen mit dem veränderten Expressionsprofil einer T<sub>EM</sub> bzw. T<sub>EMRA</sub> zusammenhängt.

Durch die Behandlung mit einem gegen CD53-gerichteten Antikörper konnte zudem das Ausmaß der IFN $\gamma$ -Produktion sowie der Aktivierungsmarker-Expression reduziert werden. Um eine ungewollte, überschießende Immunantwort (z.B. bei Autoimmunerkrankungen oder Viruserkrankungen mit hoher Zytokinproduktion wie COVID-19) von CD8+ T-Zellen zu drosseln, wäre eine Unterbrechung der CD53-spezifischen Interaktionen vorteilhaft. Dadurch, dass CD53 in seiner Expression vor allem auf Immunzellen beschränkt ist, wäre eine Störung der vermittelten Interaktionen und die damit verbundenen Effekte wesentlich gerichteter als bei einem Tetraspanin, das ubiquitär vorkommt.

## 5. Literaturverzeichnis

A Ratner, W R Clark (1993): Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. In: *The Journal of Immunology* (150 (10)), S. 4303–4314.

Abedin, Sameem; Michel, Joshua J.; Lemster, Bonnie; Vallejo, Abbe N. (2005): Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. In: *Experimental gerontology* 40 (7), S. 537–548. DOI: 10.1016/j.exger.2005.04.012.

Acuto O, Michel F. (2003): CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. In: *Nat Rev Immunol* 3 (12), S. 939–951. DOI: 10.1038/nri1248.

Afeltra, A.; Galeazzi, M.; Ferri, G. M.; Amoroso, A.; Pità, O. de; Porzio, F.; Bonomo, L. (1993): Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 52 (6), S. 457–460. DOI: 10.1136/ard.52.6.457.

Ahmed, R.; Gray, D. (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5258), S. 54–60. DOI: 10.1126/science.272.5258.54.

Amiot, M. (1990): Identification and analysis of cDNA clones encoding CD53. A pan-leukocyte antigen related to membrane transport proteins. In: *The Journal of Immunology* 145 (12), S. 4322–4325. DOI: 10.4049/jimmunol.145.12.4322.

Andreasen, S. O.; Christensen, J. E.; Marker, O.; Thomsen, A. R. (2000): Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (7), S. 3689–3697. DOI: 10.4049/jimmunol.164.7.3689.

Andrian, U. H. von; Mackay, C. R. (2000): T-cell function and migration. Two sides of the same coin. In: *The New England journal of medicine* 343 (14), S. 1020–1034. DOI: 10.1056/NEJM200010053431407.

Anikeeva, Nadia; Somersalo, Kristina; Sims, Tasha N.; Thomas, V. Kaye; Dustin, Michael L.; Sykulev, Yuri (2005): Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (18), S. 6437–6442. DOI: 10.1073/pnas.0502467102.

Appenzeller-Herzog, Christian; Hauri, Hans-Peter (2006): The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. In: *J Cell Sci* 119 (Pt 11), S. 2173–2183. DOI: 10.1242/jcs.03019.

Bachmann, Martin F.; Wolint, Petra; Walton, Senta; Schwarz, Katrin; Oxenius, Annette (2007): Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (6), S. 1502–1512. DOI: 10.1002/eji.200637023.

Badovinac, Vladimir P.; Harty, John T. (2006): Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. In: *Immunological reviews* 211, S. 67–80. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00384.x.

Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252. DOI: 10.1038/32588.

Bandrés, E.; Merino, J.; Vázquez, B.; Inogés, S.; Moreno, C.; Subirá, M. L.; Sánchez-Ibarrola, A. (2000): The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded

- CD8(+high)CD28(-)CD57(+) subpopulation. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 96 (3), S. 230–235. DOI: 10.1006/clim.2000.4894.
- Banerjee, P.; Joo, J. B.; Buse, J. T.; Dawson, G. (1995): Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. In: *Chemistry and physics of lipids* 77 (1), S. 65–78. DOI: 10.1016/0009-3084(95)02455-R.
- Bassani, Silvia; Cingolani, Lorenzo A. (2012): Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (5), S. 703–708. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.01.020.
- Bell, G. M.; Seaman, W. E.; Niemi, E. C.; Imboden, J. B. (1992): The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line. In: *J Exp Med* 175 (2), S. 527–536. DOI: 10.1084/jem.175.2.527.
- Berditchevski, F. (2001): Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 23), S. 4143–4151. DOI: 10.1242/jcs.114.23.4143.
- Berditchevski, Fedor; Odintsova, Elena; Sawada, Shigeaki; Gilbert, Elizabeth (2002): Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (40), S. 36991–37000. DOI: 10.1074/jbc.M205265200.
- Berke, Gideon (1995): The CTL's kiss of death. In: *Cell* 81 (1), S. 9–12. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90365-8.
- Bijlmakers, M. (2003): The on–off story of protein palmitoylation. In: *Trends in Cell Biology* 13 (1), S. 32–42. DOI: 10.1016/S0962-8924(02)00008-9.
- Boonen, Ger J. J. C.; van Dijk, Astrid M. C.; Verdonck, Leo F.; van Lier, René A. W.; Rijksen, Gert; Medema, René H. (1999): CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. In: *European Journal of Immunology* 29 (3), S. 789–798. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199903)29:03<789::AID-IMMU789>3.0.CO;2-5.
- Bos, Steffan D.; Lakenberg, Nico; van der Breggen, Ruud; Houwing-Duistermaat, Jeanine J.; Kloppenburg, Margreet; Craen, Anton J. M. de et al. (2010): A genome-wide linkage scan reveals CD53 as an important regulator of innate TNF-alpha levels. In: *European journal of human genetics : EJHG* 18 (8), S. 953–959. DOI: 10.1038/ejhg.2010.52.
- Bradley, Sean J.; Suarez-Fueyo, Abel; Moss, David R.; Kyttaris, Vasileios C.; Tsokos, George C. (2015): T Cell Transcriptomes Describe Patient Subtypes in Systemic Lupus Erythematosus. In: *PLoS one* 10 (11), e0141171. DOI: 10.1371/journal.pone.0141171.
- Brenchley, Jason M.; Karandikar, Nitin J.; Betts, Michael R.; Ambrozak, David R.; Hill, Brenna J.; Crotty, Laura E. et al. (2003): Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. In: *Blood* 101 (7), S. 2711–2720. DOI: 10.1182/blood-2002-07-2103.
- Brenner, M. B.; Trowbridge, I. S.; Strominger, J. L. (1985): Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idotype  $\beta$  subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. In: *Cell* 40 (1), S. 183–190. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90321-6.

- Buratta, Sandra; Urbanelli, Lorena; Sagini, Krizia; Giovagnoli, Stefano; Caponi, Silvia; Fioretto, Daniele et al. (2017): Extracellular vesicles released by fibroblasts undergoing H-Ras induced senescence show changes in lipid profile. In: *PloS one* 12 (11), e0188840. DOI: 10.1371/journal.pone.0188840.
- Burel, Julie G.; Qian, Yu; Lindestam Arlehamn, Cecilia; Weiskopf, Daniela; Zapardiel-Gonzalo, Jose; Taplitz, Randy et al. (2017): An Integrated Workflow To Assess Technical and Biological Variability of Cell Population Frequencies in Human Peripheral Blood by Flow Cytometry. In: *The Journal of Immunology* 198 (4), S. 1748–1758. DOI: 10.4049/jimmunol.1601750.
- Burrone, O. R.; Milstein, C. (1982): Control of HLA-A,B,C synthesis and expression in interferon-treated cells. In: *The EMBO journal* 1 (3), S. 345–349.
- Butcher, E. C.; Picker, L. J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5258), S. 60–66. DOI: 10.1126/science.272.5258.60.
- Cannon, K. S.; Cresswell, P. (2001): Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. In: *The EMBO journal* 20 (10), S. 2443–2453. DOI: 10.1093/emboj/20.10.2443.
- Cantor, Joseph M.; Ginsberg, Mark H. (2012): CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. In: *J Cell Sci* 125 (Pt 6), S. 1373–1382. DOI: 10.1242/jcs.096040.
- Cao, L.; Yoshino, T.; Kawasaki, N.; Sakuma, I.; Takahashi, K.; Akagi, T. (1997): Anti-CD53 monoclonal antibody induced LFA-1/ICAM-1-dependent and -independent lymphocyte homotypic cell aggregation. In: *Immunobiology* 197 (1), S. 70–81. DOI: 10.1016/S0171-2985(97)80058-7.
- Chandok, Meena R.; Okoye, Francesca I.; Ndejemi, Modesta P.; Farber, Donna L. (2007): A biochemical signature for rapid recall of memory CD4 T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (6), S. 3689–3698. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3689.
- Chaplin, David D. (2010): Overview of the Immune Response. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S3-23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Charrin, Stéphanie; Manié, Serge; Oualid, Michael; Billard, Martine; Boucheix, Claude; Rubinstein, Eric (2002): Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. In: *FEBS Letters* 516 (1-3), S. 139–144. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02522-X.
- Cheerathodi, Mujeeb; Nkosi, Dingani; Cone, Allaura S.; York, Sara B.; Meckes, David G. (2021): Epstein-Barr Virus LMP1 Modulates the CD63 Interactome. In: *Viruses* 13 (4). DOI: 10.3390/v13040675.
- Chen, Biao; Chen, Yuhai; Rai, Kul Raj; Wang, Xuefei; Liu, Shasha; Li, Yingying et al. (2021): Deficiency of eIF4B Increases Mouse Mortality and Impairs Antiviral Immunity. In: *Frontiers in immunology* 12. DOI: 10.3389/fimmu.2021.723885.
- Cherukuri, Anu; Carter, Robert H.; Brooks, Stephen; Bornmann, William; Finn, Ronald; Dowd, Cynthia S.; Pierce, Susan K. (2004): B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (30), S. 31973–31982. DOI: 10.1074/jbc.M404410200.
- Cho, Jung Hee; Kim, Eok-Cheon; Son, Youlim; Lee, Da-Woon; Park, Yong Seop; Choi, Joon Hyuk et al. (2020): CD9 induces cellular senescence and aggravates atherosclerotic plaque formation. In: *Cell death and differentiation* 27 (9), S. 2681–2696. DOI: 10.1038/s41418-020-0537-9.

- Choi-Rhee, Eunjoo; Schulman, Howard; Cronan, John E. (2004): Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 13 (11), S. 3043–3050. DOI: 10.1110/ps.04911804.
- Courtney, Adam H.; Amacher, Jeanine F.; Kadlecsek, Theresa A.; Mollenauer, Marianne N.; Au-Yeung, Byron B.; Kuriyan, John; Weiss, Arthur (2017): A Phosphosite within the SH2 Domain of Lck Regulates Its Activation by CD45. In: *Molecular cell* 67 (3), 498-511.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.024.
- Cristofalo, Vincent J.; Lorenzini, Antonello; Allen, R. G.; Torres, Claudio; Tresini, Maria (2004): Replicative senescence: a critical review. In: *Mechanisms of ageing and development* 125 (10-11), S. 827–848. DOI: 10.1016/j.mad.2004.07.010.
- Cui, Weiguo; Kaech, Susan M. (2010): Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. In: *Immunological reviews* 236, S. 151–166. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2010.00926.x.
- Curtsinger, Julie M.; Mescher, Matthew F. (2010): Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. In: *Current opinion in immunology* 22 (3), S. 333–340. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.013.
- Delon, Jérôme; Germain, Ronald N. (2000): Information transfer at the immunological synapse. In: *Current Biology* 10 (24), R923-R933. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00870-8.
- Demaria, Maria C.; Yeung, Louisa; Peeters, Rens; Wee, Janet L.; Mihaljcic, Masa; Jones, Eleanor L. et al. (2020): Tetraspanin CD53 Promotes Lymphocyte Recirculation by Stabilizing L-Selectin Surface Expression. In: *iScience* 23 (5), S. 101104. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101104.
- DeSalle, Rob; Mares, Roso; Garcia-España, Antonio (2010): Evolution of cysteine patterns in the large extracellular loop of tetraspanins from animals, fungi, plants and single-celled eukaryotes. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 56 (1), S. 486–491. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.02.015.
- Dianzani, U.; Funaro, A.; DiFranco, D.; Garbarino, G.; Bragardo, M.; Redoglia, V. et al. (1994): Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153 (3), S. 952–959.
- Dock, Jeffrey N.; Effros, Rita B. (2011): Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. In: *Aging and Disease* 2 (5), S. 382–397.
- DuBridge, R. B.; Tang, P.; Hsia, H. C.; Leong, P. M.; Miller, J. H.; Calos, M. P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. In: *Molecular and cellular biology* 7 (1), S. 379–387. DOI: 10.1128/MCB.7.1.379.
- Dunlock, Vera-Marie E.; Arp, Abbey B.; Singh, Simar Pal; Charrin, Stéphanie; Nguyen, Viet; Jansen, Erik et al. (2022): Tetraspanin CD53 controls T cell immunity through regulation of CD45RO stability, mobility, and function. In: *Cell reports* 39 (13), S. 111006. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111006.
- Dustin, Michael L.; Colman, David R. (2002): Neural and immunological synaptic relations. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594), S. 785–789. DOI: 10.1126/science.1076386.
- Ebert, Lisa M.; Schaerli, Patrick; Moser, Bernhard (2005): Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. In: *Molecular immunology* 42 (7), S. 799–809. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.06.040.

- Effros, R. B.; Allsopp, R.; Chiu, C. P.; Hausner, M. A.; Hirji, K.; Wang, L. et al. (1996): Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. In: *AIDS* 10 (8), F17-22. DOI: 10.1097/00002030-199607000-00001.
- Favre, C.; Wijdenes, J.; Cabrillat, H.; Djossou, O.; Banchereau, J.; Vries, J. E. de (1989): Epitope mapping of recombinant human gamma interferon using monoclonal antibodies. In: *Molecular immunology* 26 (1), S. 17–25. DOI: 10.1016/0161-5890(89)90015-1.
- Fellous, M.; Kamoun, M.; Gresser, I.; Bono, R. (1979): Enhanced expression of HLA antigens and beta 2-microglobulin on interferon-treated human lymphoid cells. In: *Eur. J. Immunol.* 9 (6), S. 446–449. DOI: 10.1002/eji.1830090606.
- Flannery, Andrew R.; Czibener, Cecilia; Andrews, Norma W. (2010): Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca<sup>2+</sup> sensor synaptotagmin VII to lysosomes. In: *The Journal of cell biology* 191 (3), S. 599–613. DOI: 10.1083/jcb.201003021.
- Florin, Luise; Lang, Thorsten (2018): Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1140. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01140.
- Focosi, Daniele; Bestagno, Marco; Burrone, Oscar; Petrini, Mario (2010): CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. In: *Journal of Leukocyte Biology* 87 (1), S. 107–116. DOI: 10.1189/jlb.0809566.
- Fonseka, Pamali; Pathan, Mohashin; Chitti, Sai V.; Kang, Taeyoung; Mathivanan, Suresh (2021): FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. In: *Journal of molecular biology* 433 (11), S. 166747. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.166747.
- Früh, Klaus; Yang, Young (1999): Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . In: *Current opinion in immunology* 11 (1), S. 76–81. DOI: 10.1016/s0952-7915(99)80014-4.
- Gaffen, S. L. (2001): Signaling domains of the interleukin 2 receptor. In: *Cytokine* 14 (2), S. 63–77. DOI: 10.1006/cyto.2001.0862.
- Geginat, Jens; Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica (2003): Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. In: *Blood* 101 (11), S. 4260–4266. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3577.
- Goldstein, David; Djeu, Julie; Latter, Gerald; Burbeck, Stephen; Leavitt, John (1985): Abundant Synthesis of the Transformation-induced Protein of Neoplastic Human Fibroblasts, Plastin, in Normal Lymphocytes. In: *Cancer Res* 45 (11\_Part\_2), S. 5643–5647.
- Gomez-Navarro, Natalia; Miller, Elizabeth (2016): Protein sorting at the ER-Golgi interface. In: *The Journal of cell biology* 215 (6), S. 769–778. DOI: 10.1083/jcb.201610031.
- González-Amaro, Roberto; Cortés, José R.; Sánchez-Madrid, Francisco; Martín, Pilar (2013): Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? In: *Trends in molecular medicine* 19 (10), S. 625–632. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.07.006.
- Goronzy, Jörg J.; Weyand, Cornelia M. (2019): Mechanisms underlying T cell ageing. In: *Nat Rev Immunol* 19 (9), S. 573–583. DOI: 10.1038/s41577-019-0180-1.
- Grakoui, A.; Bromley, S. K.; Sumen, C.; Davis, M. M.; Shaw, A. S.; Allen, P. M.; Dustin, M. L. (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5425), S. 221–227. DOI: 10.1126/science.285.5425.221.

- Greenberg, Zev J.; Monlish, Darlene; Chiquetto Paracatu, Luana; Dong, Qian; Rettig, Michael P.; Roundy, Nate Dee et al. (2022): The tetraspanin CD53 protects stressed hematopoietic stem cells via promotion of DREAM complex- mediated quiescence. In: *Blood*. DOI: 10.1182/blood.2022016929.
- Greenberg, Zev J.; Monlish, Darlene A.; Bartnett, Rachel L.; Yang, Yihu; Shen, Guomin; Li, Weikai et al. (2020a): The Tetraspanin CD53 Regulates Early B Cell Development by Promoting IL-7R Signaling. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 204 (1), S. 58–67. DOI: 10.4049/jimmunol.1900539.
- Greenberg, Zev J.; Monlish, Darlene A.; Bartnett, Rachel L.; Yang, Yihu; Shen, Guomin; Li, Weikai et al. (2020b): The Tetraspanin CD53 Regulates Early B Cell Development by Promoting IL-7R Signaling. In: *The Journal of Immunology* 204 (1), S. 58–67. DOI: 10.4049/jimmunol.1900539.
- HAYFLICK, L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. In: *Experimental cell research* 37, S. 614–636. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Hemler, Martin E. (2005): Tetraspanin functions and associated microdomains. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (10), S. 801–811. DOI: 10.1038/nrm1736.
- Herr, Michael J.; Kotha, Jayaprakash; Hagedorn, Nikolaus; Smith, Blake; Jennings, Lisa K. (2013): Tetraspanin CD9 promotes the invasive phenotype of human fibrosarcoma cells via upregulation of matrix metalloproteinase-9. In: *PloS one* 8 (6), e67766. DOI: 10.1371/journal.pone.0067766.
- Hong, In-Kee; Kim, Young-Myeong; Jeoung, Doo-Il; Kim, Keun-Cheol; Lee, Hansoo (2005): Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. In: *Experimental & molecular medicine* 37 (3), S. 230–239. DOI: 10.1038/emm.2005.31.
- Hou, Feng-Qiang; Lei, Xi-Feng; Yao, Jian-Long; Wang, Yi-Jin; Zhang, Wei (2015): Tetraspanin 1 is involved in survival, proliferation and carcinogenesis of pancreatic cancer. In: *Oncology reports* 34 (6), S. 3068–3076. DOI: 10.3892/or.2015.4272.
- Hwang, Jeong-Ryul; Byeon, Yeongseon; Kim, Donghwan; Park, Sung-Gyoo (2020): Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. In: *Experimental & molecular medicine* 52 (5), S. 750–761. DOI: 10.1038/s12276-020-0435-8.
- Jackson, A. L.; Matsumoto, H.; Janszen, M.; Maino, V.; Blidy, A.; Shye, S. (1990): Restricted expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. In: *Clinical Immunology and Immunopathology* 54 (1), S. 126–133. DOI: 10.1016/0090-1229(90)90012-F.
- Jensen, Helle; Potempa, Marc; Gotthardt, Dagmar; Lanier, Lewis L. (2017): IL-2-induced expression of the amino acid transporters SLC1A5 and CD98 is a prerequisite for NKG2D-mediated activation of human NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (6), S. 1967–1972. DOI: 10.4049/jimmunol.1700497.
- Jin, Hyun-Seok; Cho, Jang-Eun; Park, Sangjung (2019): Association between CD53 genetic polymorphisms and tuberculosis cases. In: *Genes & genomics* 41 (4), S. 389–395. DOI: 10.1007/s13258-018-0764-3.
- Joshi, Sonali; Kaur, Surinder; Kroczyńska, Barbara; Plataniias, Leonidas C. (2010): Mechanisms of mRNA translation of interferon stimulated genes. In: *Cytokine* 52 (1-2), S. 123–127. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.03.019.

- Jumper, John; Evans, Richard; Pritzel, Alexander; Green, Tim; Figurnov, Michael; Ronneberger, Olaf et al. (2021): Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. In: *Nature* 596 (7873), S. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kaech, Susan M.; Wherry, E. John; Ahmed, Rafi (2002): Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. In: *Nat Rev Immunol* 2 (4), S. 251–262. DOI: 10.1038/nri778.
- Kared, Hassen; Martelli, Serena; Ng, Tze Pin; Pender, Sylvia L. F.; Larbi, Anis (2016): CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 65 (4), S. 441–452. DOI: 10.1007/s00262-016-1803-z.
- Karupiah, G.; Xie, Q. W.; Buller, R. M.; Nathan, C.; Duarte, C.; MacMicking, J. D. (1993): Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. In: *Science (New York, N.Y.)* 261 (5127), S. 1445–1448. DOI: 10.1126/science.7690156.
- Katharina Maria Richter (2022): Analyse des CD53-Interaktions mit Hilfe der BioID-Methode. Masterarbeit. Henrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Institut für Virologie.
- Kestens, L.; Vanham, G.; Gigase, P.; Young, G.; Hannet, I.; Vanlangendonck, F. et al. (1992): Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. In: *AIDS* 6 (8), S. 793–797. DOI: 10.1097/00002030-199208000-00004.
- Kiani, A.; García-Cózar, F. J.; Habermann, I.; Laforsch, S.; Aebischer, T.; Ehninger, G.; Rao, A. (2001): Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. In: *Blood* 98 (5), S. 1480–1488. DOI: 10.1182/blood.V98.5.1480.
- Kim, Tae Woo; Kim, Hyun Jung; Lee, Chuhee; Kim, Hwa Young; Baek, Suk-Hwan; Kim, Jung Hye et al. (2008): Identification of replicative senescence-associated genes in human umbilical vein endothelial cells by an annealing control primer system. In: *Experimental gerontology* 43 (4), S. 286–295. DOI: 10.1016/j.exger.2007.12.010.
- Kim, Tae-Rim; Yoon, Jeong-Heon; Kim, Yong-Chan; Yook, Young-Hun; Kim, In Gyu; Kim, Young-Sang et al. (2004): LPS-induced CD53 expression: a protection mechanism against oxidative and radiation stress. In: *Molecules and cells* 17 (1), S. 125–131.
- Kitadokoro, K.; Bordo, D.; Galli, G.; Petracca, R.; Falugi, F.; Abrignani, S. et al. (2001): CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. In: *The EMBO journal* 20 (1-2), S. 12–18. DOI: 10.1093/emboj/20.1.12.
- Koretzky, G. A.; Kohmetscher, M.; Ross, S. (1993): CD45-associated kinase activity requires lck but not T cell receptor expression in the Jurkat T cell line. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (12), S. 8958–8964.
- Krangel, Michael S. (2009): Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. In: *Current opinion in immunology* 21 (2), S. 133–139. DOI: 10.1016/j.coi.2009.03.009.
- Kumaraguru, U.; Davis, I. A.; Deshpande, S.; Tevethia, S. S.; Rouse, B. T. (2001): Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (2), S. 1066–1074. DOI: 10.4049/jimmunol.166.2.1066.
- Lacy, P.; Logan, M. R.; Bablitz, B.; Moqbel, R. (2001): Fusion protein vesicle-associated membrane protein 2 is implicated in IFN-gamma-induced piecemeal degranulation in human eosinophils from

- atopic individuals. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 107 (4), S. 671–678. DOI: 10.1067/mai.2001.113562.
- Lafleur, Marc A.; Xu, Daosong; Hemler, Martin E. (2009): Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. In: *Molecular biology of the cell* 20 (7), S. 2030–2040. DOI: 10.1091/mbc.e08-11-1149.
- Lagaudrière-Gesbert, C.; Le Naour, F.; Lebel-Binay, S.; Billard, M.; Lemichez, E.; Boquet, P. et al. (1997): Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. In: *Cellular immunology* 182 (2), S. 105–112. DOI: 10.1006/cimm.1997.1223.
- Le Priol, Yannick; Puthier, Denis; Lécureuil, Cédric; Combadière, Christophe; Debré, Patrice; Nguyen, Catherine; Combadière, Béhazine (2006): High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (8), S. 5145–5154. DOI: 10.4049/jimmunol.177.8.5145.
- Lebel-Binay, S.; Lagaudrière, C.; Fradelizi, D.; Conjeaud, H. (1995): CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line. In: *Journal of Leukocyte Biology* 57 (6), S. 956–963. DOI: 10.1002/jlb.57.6.956.
- Lee, Haeyong; Bae, Sungmin; Jang, Jaewoong; Choi, Byoung Whui; Park, Choon-Sik; Park, Jong Sook et al. (2013): CD53, a suppressor of inflammatory cytokine production, is associated with population asthma risk via the functional promoter polymorphism -1560 CT. In: *Biochimica et biophysica acta* 1830 (4), S. 3011–3018. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.12.030.
- Lemster, Bonnie H.; Michel, Joshua J.; Montag, David T.; Paat, John J.; Studenski, Stephanie A.; Newman, Anne B.; Vallejo, Abbe N. (2008): Induction of CD56 and TCR-independent activation of T cells with aging. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (3), S. 1979–1990. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1979.
- Li, Ko-Jen; Wu, Cheng-Han; Hsieh, Song-Chou; Lu, Ming-Chi; Tsai, Chang-Youh; Yu, Chia-Li (2012): Deranged bioenergetics and defective redox capacity in T lymphocytes and neutrophils are related to cellular dysfunction and increased oxidative stress in patients with active systemic lupus erythematosus. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 548516. DOI: 10.1155/2012/548516.
- Lieberman, M. W.; Barrios, R.; Carter, B. Z.; Habib, G. M.; Lebovitz, R. M.; Rajagopalan, S. et al. (1995): gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? In: *The American Journal of Pathology* 147 (5), S. 1175–1185.
- Liu, Kebin; Catalfamo, Marta; Li, Yu; Henkart, Pierre A.; Weng, Nan-ping (2002): IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9), S. 6192–6197. DOI: 10.1073/pnas.092675799.
- Lombardo, Salvo Danilo; Mazzon, Emanuela; Basile, Maria Sofia; Campo, Giorgia; Corsico, Federica; Presti, Mario et al. (2019): Modulation of Tetraspanin 32 (TSPAN32) Expression in T Cell-Mediated Immune Responses and in Multiple Sclerosis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (18). DOI: 10.3390/ijms20184323.

- London, C. A.; Lodge, M. P.; Abbas, A. K. (2000): Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (1), S. 265–272. DOI: 10.4049/jimmunol.164.1.265.
- Luck, Katja; Kim, Dae-Kyum; Lambourne, Luke; Spirohn, Kerstin; Begg, Bridget E.; Bian, Wenting et al. (2020): A reference map of the human binary protein interactome. In: *Nature* 580 (7803), S. 402–408. DOI: 10.1038/s41586-020-2188-x.
- Lyakh, L.; Ghosh, P.; Rice, N. R. (1997): Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. In: *Molecular and cellular biology* 17 (5), S. 2475–2484.
- Maecker, H. T.; Levy, S. (1997): Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. In: *The Journal of experimental medicine* 185 (8), S. 1505–1510. DOI: 10.1084/jem.185.8.1505.
- Maecker, Holden T.; Todd, Scott C.; Levy, Shoshana (1997): The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. In: *FASEB j.* 11 (6), S. 428–442. DOI: 10.1096/fasebj.11.6.9194523.
- Mahnke, Yolanda D.; Brodie, Tess M.; Sallusto, Federica; Roederer, Mario; Lugli, Enrico (2013): The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. In: *European Journal of Immunology* 43 (11), S. 2797–2809. DOI: 10.1002/eji.201343751.
- Market, Eleonora; Papavasiliou, F. Nina (2003): V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. In: *PLoS biology* 1 (1), E16. DOI: 10.1371/journal.pbio.0000016.
- Martin, F.; Roth, D. M.; Jans, D. A.; Pouton, C. W.; Partridge, L. J.; Monk, P. N.; Moseley, G. W. (2005): Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? In: *Journal of virology* 79 (17), S. 10839–10851. DOI: 10.1128/JVI.79.17.10839-10851.2005.
- Masciopinto, Francesca; Campagnoli, Susanna; Abrignani, Sergio; Uematsu, Yasushi; Pileri, Piero (2001): The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. In: *Virus Research* 80 (1-2), S. 1–10. DOI: 10.1016/S0168-1702(01)00245-3.
- McLaughlin-Taylor, E.; Pande, H.; Forman, S. J.; Tanamachi, B.; Li, C. R.; Zaia, J. A. et al. (1994): Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. In: *Journal of medical virology* 43 (1), S. 103–110. DOI: 10.1002/jmv.1890430119.
- Menne, Christopher (2022): Analysis of invariant natural killer T cells in health and disease: lessons from acute hepatitis C virus infection. Düsseldorf: Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Miyazaki, T.; Müller, U.; Campbell, K. S. (1997): Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. In: *The EMBO journal* 16 (14), S. 4217–4225. DOI: 10.1093/emboj/16.14.4217.
- Mollinedo, F.; Fontán, G.; Barasoain, I.; Lazo, P. A. (1997): Recurrent infectious diseases in human CD53 deficiency. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 4 (2), S. 229–231. DOI: 10.1128/cdli.4.2.229-231.1997.
- Monks, C. R.; Freiberg, B. A.; Kupfer, H.; Sciaky, N.; Kupfer, A. (1998): Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. In: *Nature* 395 (6697), S. 82–86. DOI: 10.1038/25764.

- Monks, C. R.; Kupfer, H.; Tamir, I.; Barlow, A.; Kupfer, A. (1997): Selective modulation of protein kinase C- $\theta$  during T-cell activation. In: *Nature* 385 (6611), S. 83–86. DOI: 10.1038/385083a0.
- Mora, J. Rodrigo; Andrian, Ulrich H. von (2006): T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. In: *Trends in immunology* 27 (5), S. 235–243. DOI: 10.1016/j.it.2006.03.007.
- Morgan, A. J.; Jacob, R. (1994): Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. In: *The Biochemical journal* 300 (Pt 3) (Pt 3), S. 665–672. DOI: 10.1042/bj3000665.
- Morgan, C. D.; Greene, J. F.; Measel, J. W. (1999): Induction of surface antigen CD69 expression in T-lymphocytes following exposure to actinomycin D. In: *International journal of immunopharmacology* 21 (10), S. 689–703. DOI: 10.1016/s0192-0561(99)00045-4.
- Morley, Sharon Celeste (2013): The actin-bundling protein L-plastin supports T-cell motility and activation. In: *Immunological reviews* 256 (1), S. 48–62. DOI: 10.1111/imr.12102.
- Muñoz, Pilar; Mittelbrunn, María; La Fuente, Hortensia de; Pérez-Martínez, Manuel; García-Pérez, Angélica; Ariza-Veguillas, Adriana et al. (2008): Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. In: *Blood* 111 (7), S. 3653–3664. DOI: 10.1182/blood-2007-07-101600.
- Nakaya, Mako; Xiao, Yichuan; Zhou, Xiaofei; Chang, Jae-Hoon; Chang, Mikyoung; Cheng, Xuhong et al. (2014): Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. In: *Immunity* 40 (5), S. 692–705. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.04.007.
- Nandi, Bisweswar; Behar, Samuel M. (2011): Regulation of neutrophils by interferon- $\gamma$  limits lung inflammation during tuberculosis infection. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (11), S. 2251–2262. DOI: 10.1084/jem.20110919.
- Nelson, David M.; McBryan, Tony; Jeyapalan, Jessie C.; Sedivy, John M.; Adams, Peter D. (2014): A comparison of oncogene-induced senescence and replicative senescence: implications for tumor suppression and aging. In: *Age (Dordrecht, Netherlands)* 36 (3), S. 9637. DOI: 10.1007/s11357-014-9637-0.
- Newton, A. C. (2001): Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. In: *Chemical Reviews* 101 (8), S. 2353–2364. DOI: 10.1021/cr0002801.
- Nichols, Timothy C.; Guthridge, Joel M.; Karp, David R.; Molina, Hector; Fletcher, Dana R.; Holers, V. Michael (1998):  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. In: *Eur. J. Immunol.* 28 (12), S. 4123–4129. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<4123::AID-IMMU4123>3.0.CO;2-G.
- Okamura, H.; Kashiwamura, S.; Tsutsui, H.; Yoshimoto, T.; Nakanishi, K. (1998): Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18. In: *Current opinion in immunology* 10 (3), S. 259–264. DOI: 10.1016/S0952-7915(98)80163-5.
- Olweus, J.; Lund-Johansen, F.; Horejsi, V. (1993a): CD53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and B cells. In: *The Journal of Immunology* 151 (2), S. 707–716. DOI: 10.4049/jimmunol.151.2.707.

- Olweus, J.; Lund-Johansen, F.; Horejsi, V. (1993b): CD53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and B cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (2), S. 707–716.
- Park, Yoon; Jin, Hyung-Seung; Lopez, Justine; Elly, Chris; Kim, Gisen; Murai, Masako et al. (2013): TSC1 regulates the balance between effector and regulatory T cells. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (12), S. 5165–5178. DOI: 10.1172/JCI69751.
- Parkin, J.; Cohen, B. (2001): An overview of the immune system. In: *Lancet (London, England)* 357 (9270), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
- Pata, Supansa; Otáhal, Pavel; Brdička, Tomáš; Laopajon, Witida; Mahasongkram, Kodchakorn; Kasinrerak, Watchara (2011): Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses. In: *BMC research notes* 4, S. 293. DOI: 10.1186/1756-0500-4-293.
- Pathan, Mohashin; Keerthikumar, Shivakumar; Ang, Ching-Seng; Gangoda, Lahiru; Quek, Camelia Y. J.; Williamson, Nicholas A. et al. (2015): FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. In: *Proteomics* 15 (15), S. 2597–2601. DOI: 10.1002/pmic.201400515.
- Pathan, Mohashin; Keerthikumar, Shivakumar; Chisanga, David; Alessandro, Riccardo; Ang, Ching-Seng; Askenase, Philip et al. (2017): A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. In: *Journal of extracellular vesicles* 6 (1), S. 1321455. DOI: 10.1080/20013078.2017.1321455.
- Patterson, Andrew R.; Endale, Mehari; Lampe, Kristin; Aksoylar, Halil I.; Flagg, Aron; Woodgett, Jim R. et al. (2018): Gimap5-dependent inactivation of GSK3 $\beta$  is required for CD4+ T cell homeostasis and prevention of immune pathology. In: *Nature communications* 9 (1), S. 430. DOI: 10.1038/s41467-018-02897-7.
- Peach, Mandy; Marsh, Noelle; Miskiewicz, Ewa I.; MacPhee, Daniel J. (2015): Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1312, S. 49–60. DOI: 10.1007/978-1-4939-2694-7\_8.
- Perez, Mildred D.; Seu, Lillian; Lowman, Kelsey E.; Moylan, David C.; Tidwell, Christopher; Samuel, Shekwonya et al. (2020): The tetraspanin CD151 marks a unique population of activated human T cells. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 15748. DOI: 10.1038/s41598-020-72719-8.
- Pittet, M. J.; Speiser, D. E.; Valmori, D.; Cerottini, J. C.; Romero, P. (2000): Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (3), S. 1148–1152. DOI: 10.4049/jimmunol.164.3.1148.
- Reddy, Manjula; Eirikis, Edward; Davis, Cuc; Davis, Hugh M.; Prabhakar, Uma (2004): Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. In: *Journal of immunological methods* 293 (1-2), S. 127–142. DOI: 10.1016/j.jim.2004.07.006.
- Rocha-Perugini, Vera; González-Granado, José Maria; Tejera, Emilio; López-Martín, Soraya; Yañez-Mó, María; Sánchez-Madrid, Francisco (2014): Tetraspanins CD9 and CD151 at the immune

- synapse support T-cell integrin signaling. In: *European Journal of Immunology* 44 (7), S. 1967–1975. DOI: 10.1002/eji.201344235.
- Rodríguez-Alba, Juan C.; Abrego-Peredo, Amayrani; Gallardo-Hernández, Carlos; Pérez-Lara, Jocelyn; Santiago-Cruz, Wendolaine; Jiang, Wei; Espinosa, Enrique (2019): HIV Disease Progression: Overexpression of the Ectoenzyme CD38 as a Contributory Factor? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 41 (1), e1800128. DOI: 10.1002/bies.201800128.
- Romero-Olmedo, Addi J.; Schulz, Axel R.; Huber, Magdalena; Brehm, Corinna U.; Chang, Hyun-Dong; Chiarolla, Cristina M. et al. (2021): Deep phenotypical characterization of human CD3+ CD56+ T cells by mass cytometry. In: *European Journal of Immunology* 51 (3), S. 672–681. DOI: 10.1002/eji.202048941.
- Roux, Kyle J.; Kim, Dae in; Raida, Manfred; Burke, Brian (2012): A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. In: *The Journal of cell biology* 196 (6), S. 801–810. DOI: 10.1083/jcb.201112098.
- Salgame, P.; Abrams, J. S.; Clayberger, C.; Goldstein, H.; Convit, J.; Modlin, R. L.; Bloom, B. R. (1991): Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. In: *Science (New York, N.Y.)* 254 (5029), S. 279–282. DOI: 10.1126/science.254.5029.279.
- Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999a): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712. DOI: 10.1038/44385.
- Sallusto, Federica; Geginat, Jens; Lanzavecchia, Antonio (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. In: *Annual review of immunology* 22, S. 745–763. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Sallusto, Federica; Lenig, Danielle; Förster, Reinhold; Lipp, Martin; Lanzavecchia, Antonio (1999b): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 402 (S6763), S. 34–38. DOI: 10.1038/35005534.
- Samelson, L. (1985): Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. In: *Cell* 43 (1), S. 223–231. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90027-3.
- Samten, Buka; Townsend, James C.; Weis, Steven E.; Bhoumik, Anindita; Klucar, Peter; Shams, Homayoun; Barnes, Peter F. (2008): CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. In: *The Journal of Immunology* 181 (3), S. 2056–2064. DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.2056.
- Schneider, U.; Schwenk, H. U.; Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. In: *International journal of cancer* 19 (5), S. 621–626. DOI: 10.1002/ijc.2910190505.
- Schröder, H. M.; Hoffmann, S. C.; Hecker, M.; Korff, T.; Ludwig, T. (2013): The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 45 (6), S. 1133–1144. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.020.
- Schweitzer, A. N.; Sharpe, A. H. (1998): Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (6), S. 2762–2771.

- Schweizer, A.; Fransen, J. A.; Bächli, T.; Ginsel, L.; Hauri, H. P. (1988): Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. In: *The Journal of cell biology* 107 (5), S. 1643–1653. DOI: 10.1083/jcb.107.5.1643.
- Seder, Robert A.; Ahmed, Rafi (2003): Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. In: *Nature immunology* 4 (9), S. 835–842. DOI: 10.1038/ni969.
- Seigneuret, M.; Delaguillaumie, A.; Lagaudrière-Gesbert, C.; Conjeaud, H. (2001): Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (43), S. 40055–40064. DOI: 10.1074/jbc.M105557200.
- Shi, W.; Fan, H.; Shum, L.; Derynck, R. (2000): The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF- $\alpha$  and regulates TGF- $\alpha$ -induced EGF receptor activation and cell proliferation. In: *The Journal of cell biology* 148 (3), S. 591–602. DOI: 10.1083/jcb.148.3.591.
- Shrestha, Sharad; Yang, Kai; Wei, Jun; Karmaus, Peer W. F.; Neale, Geoffrey; Chi, Hongbo (2014): Tsc1 promotes the differentiation of memory CD8+ T cells via orchestrating the transcriptional and metabolic programs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41), S. 14858–14863. DOI: 10.1073/pnas.1404264111.
- Sica, A.; Dorman, L.; Viggiano, V.; Cippitelli, M.; Ghosh, P.; Rice, N.; Young, H. A. (1997): Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the interferon- $\gamma$  promoter. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (48), S. 30412–30420. DOI: 10.1074/jbc.272.48.30412.
- Sjöstedt, Evelina; Zhong, Wen; Fagerberg, Linn; Karlsson, Max; Mitsios, Nicholas; Adori, Csaba et al. (2020): An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. In: *Science (New York, N.Y.)* 367 (6482). DOI: 10.1126/science.aay5947.
- Smith-Garvin, Jennifer E.; Koretzky, Gary A.; Jordan, Martha S. (2009): T cell activation. In: *Annual review of immunology* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- Solstad, Therese; Bains, Simer Jit; Landskron, Johannes; Aandahl, Einar Martin; Thiede, Bernd; Taskén, Kjetil; Torgersen, Knut Martin (2011): CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. In: *Blood* 118 (19), S. 5141–5151. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339242.
- Springer, T. A. (1990): Adhesion receptors of the immune system. In: *Nature* 346 (6283), S. 425–434. DOI: 10.1038/346425a0.
- Stinchcombe, Jane C.; Majorovits, Endre; Bossi, Giovanna; Fuller, Stephen; Griffiths, Gillian M. (2006): Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. In: *Nature* 443 (7110), S. 462–465. DOI: 10.1038/nature05071.
- Stipp, Christopher S.; Kolesnikova, Tatiana V.; Hemler, Martin E. (2003): Functional domains in tetraspanin proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* 28 (2), S. 106–112. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)00014-2.
- Strioga, Marius; Pasukoniene, Vita; Characiejus, Dainius (2011): CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. In: *Immunology* 134 (1), S. 17–32. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x.

- Su, Wenxing; Zhao, Ying; Wei, Yuqian; Zhang, Xiaoyan; Ji, Jiang; Yang, Shun (2021): Exploring the Pathogenesis of Psoriasis Complicated With Atherosclerosis via Microarray Data Analysis. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 667690. DOI: 10.3389/fimmu.2021.667690.
- Szöllösi, J.; Horejsí, V.; Bene, L.; Angelisová, P.; Damjanovich, S. (1996a): Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (7), S. 2939–2946.
- Szöllösi, J.; Horejsí, V.; Bene, L.; Angelisová, P.; Damjanovich, S. (1996b): Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (7), S. 2939–2946. Online verfügbar unter <https://www.jimmunol.org/content/157/7/2939.short>.
- Tai, X. G.; Toyooka, K.; Yashiro, Y.; Abe, R.; Park, C. S.; Hamaoka, T. et al. (1997): CD9-mediated costimulation of TCR-triggered naive T cells leads to activation followed by apoptosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (8), S. 3799–3807.
- Tarrant, Jacqueline M.; Groom, Joanna; Metcalf, Donald; Li, Ruili; Borobokas, Bette; Wright, Mark D. et al. (2002): The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. In: *Molecular and cellular biology* 22 (14), S. 5006–5018. DOI: 10.1128/MCB.22.14.5006-5018.2002.
- Todros-Dawda, Izabela; Kveberg, Lise; Vaage, John T.; Inngjerdigen, Marit (2014): The tetraspanin CD53 modulates responses from activating NK cell receptors, promoting LFA-1 activation and dampening NK cell effector functions. In: *PLoS one* 9 (5), e97844. DOI: 10.1371/journal.pone.0097844.
- Trebak, Mohamed; Kinet, Jean-Pierre (2019): Calcium signalling in T cells. In: *Nat Rev Immunol* 19 (3), S. 154–169. DOI: 10.1038/s41577-018-0110-7.
- Uhlén, Mathias; Fagerberg, Linn; Hallström, Björn M.; Lindskog, Cecilia; Oksvold, Per; Mardinoglu, Adil et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
- Umeda, Rie; Satouh, Yuhkoh; Takemoto, Mizuki; Nakada-Nakura, Yoshiko; Liu, Kehong; Yokoyama, Takeshi et al. (2020): Structural insights into tetraspanin CD9 function. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1606. DOI: 10.1038/s41467-020-15459-7.
- Vallejo, Abbe N. (2005): CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. In: *Immunological reviews* 205, S. 158–169. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00256.x.
- van Lint, Philippe; Libert, Claude (2007): Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. In: *Journal of Leukocyte Biology* 82 (6), S. 1375–1381. DOI: 10.1189/jlb.0607338.
- van Spriel, Annemiek B.; Puls, Kirsten L.; Sofi, Mariam; Pouniotis, Dodie; Hochrein, Hubertus; Orinska, Zane et al. (2004): A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (5), S. 2953–2961. DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.2953.
- Varadi, Mihaly; Anyango, Stephen; Deshpande, Mandar; Nair, Sreenath; Natassia, Cindy; Yordanova, Galabina et al. (2022): AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D439–D444. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.

- Varma, Rajat; Campi, Gabriele; Yokosuka, Tadashi; Saito, Takashi; Dustin, Michael L. (2006): T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. In: *Immunity* 25 (1), S. 117–127. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2006.04.010.
- Vences-Catalán, Felipe; Rajapaksa, Ranjani; Levy, Shoshana; Santos-Argumedo, Leopoldo (2012): The CD19/CD81 complex physically interacts with CD38 but is not required to induce proliferation in mouse B lymphocytes. In: *Immunology* 137 (1), S. 48–55. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03602.x.
- Verma, Kriti; Ogonek, Justyna; Varanasi, Pavankumar Reddy; Luther, Susanne; Bünting, Ivonne; Thomay, Katrin et al. (2017): Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called "old". In: *PLoS one* 12 (5), e0177405. DOI: 10.1371/journal.pone.0177405.
- Verma, Rajeshwar P.; Hansch, Corwin (2007): Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 15 (6), S. 2223–2268. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.01.011.
- Wabnitz, Guido; Balta, Emre; Samstag, Yvonne (2017): L-plastin regulates the stability of the immune synapse of naive and effector T-cells. In: *Advances in biological regulation* 63, S. 107–114. DOI: 10.1016/j.jbior.2016.09.009.
- Wabnitz, Guido H.; Köcher, Thomas; Lohneis, Philipp; Stober, Christoph; Konstandin, Mathias H.; Funk, Beate et al. (2007): Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (3), S. 649–662. DOI: 10.1002/eji.200636320.
- Wang, Siwen; Song, Rui; Wang, Ziyi; Jing, Zhaocheng; Wang, Shaoxiong; Ma, Jian (2018): S100A8/A9 in Inflammation. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1298. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01298.
- Wang, Tuanlao; Li, Liangcheng; Hong, Wanjin (2017): SNARE proteins in membrane trafficking. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 18 (12), S. 767–775. DOI: 10.1111/tra.12524.
- Wegener, A. M.; Hou, X.; Dietrich, J.; Geisler, C. (1995): Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (9), S. 4675–4680. DOI: 10.1074/jbc.270.9.4675.
- Weng, Nan-ping; Akbar, Arne N.; Goronzy, Jorg (2009): CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. In: *Trends in immunology* 30 (7), S. 306–312. DOI: 10.1016/j.it.2009.03.013.
- Witherden, D. A.; Boismenu, R.; Havran, W. L. (2000): CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (4), S. 1902–1909. DOI: 10.4049/jimmunol.165.4.1902.
- Wood, Karen L.; Twigg, Homer L.; Doseff, Andrea I. (2009): Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14 (10), S. 3771–3781. DOI: 10.2741/3487.
- Worthington, R. E.; Carroll, R. C.; Boucheix, C. (1990): Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. In: *British journal of haematology* 74 (2), S. 216–222. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb02568.x.

- Wu, Beibei; Crampton, Steve P.; Hughes, Christopher C. W. (2007): Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. In: *Immunity* 26 (2), S. 227–239. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.12.007.
- Wucherpfennig, Kai W.; Gagnon, Etienne; Call, Melissa J.; Huseby, Eric S.; Call, Matthew E. (2010): Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (4), a005140. DOI: 10.1101/cshperspect.a005140.
- Xiao, Lu; Yang, Zhou; Lin, Shudian (2022): Identification of hub genes and transcription factors in patients with rheumatoid arthritis complicated with atherosclerosis. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 4677. DOI: 10.1038/s41598-022-08274-1.
- Xu, Weili; Larbi, Anis (2017): Markers of T Cell Senescence in Humans. In: *International journal of molecular sciences* 18 (8). DOI: 10.3390/ijms18081742.
- Yañez-Mó, María; Barreiro, Olga; Gonzalo, Pilar; Batista, Alicia; Megías, Diego; Genís, Laura et al. (2008): MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. In: *Blood* 112 (8), S. 3217–3226. DOI: 10.1182/blood-2008-02-139394.
- Yañez-Mó, María; Barreiro, Olga; Gordon-Alonso, Mónica; Sala-Valdés, Mónica; Sánchez-Madrid, Francisco (2009): Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. In: *Trends in Cell Biology* 19 (9), S. 434–446. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.06.004.
- Yang, Xiuwei; Claas, Christoph; Kraeft, Stine-Kathrein; Chen, Lan Bo; Wang, Zemin; Kreidberg, Jordan A.; Hemler, Martin E. (2002): Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. In: *Molecular biology of the cell* 13 (3), S. 767–781. DOI: 10.1091/mbc.01-05-0275.
- Yang, Yihu; Liu, Xiaoran Roger; Greenberg, Zev J.; Zhou, Fengbo; He, Peng; Fan, Lingling et al. (2020): Open conformation of tetraspanins shapes interaction partner networks on cell membranes. In: *The EMBO journal* 39 (18), e105246. DOI: 10.15252/embj.2020105246.
- Yewdell, Jonathan W.; Norbury, Christopher C.; Bennink, Jack R. (1999): Mechanisms of Exogenous Antigen Presentation by MHC Class I Molecules in Vitro and in Vivo: Implications for Generating CD8+ T Cell Responses to Infectious Agents, Tumors, Transplants, and Vaccines. In: *Advances in Immunology*, S. 1–77.
- Yoshimoto, T.; Takeda, K.; Tanaka, T.; Ohkusu, K.; Kashiwamura, S.; Okamura, H. et al. (1998): IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (7), S. 3400–3407.
- Yunta, Mónica; Lazo, Pedro A. (2003): Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. In: *Oncogene* 22 (8), S. 1219–1224. DOI: 10.1038/sj.onc.1206183.
- Zhang, Sheng; Zhang, Hongjun; Zhao, Jiandong (2009): The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 384 (4), S. 405–408. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.04.134.
- Zhang, X. A.; Bontrager, A. L.; Hemler, M. E. (2001): Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 25005–25013. DOI: 10.1074/jbc.M102156200.

Zhang, Xiaohong; Sun, Siqian; Hwang, Inkyu; Tough, David F.; Sprent, Jonathan (1998): Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8+ T Cells In Vivo by IL-15. In: *Immunity* 8 (5), S. 591–599. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80564-6.

Zheng, Long; Dou, Xiaojie; Song, Huijia; Wang, Pengwei; Qu, Wei; Zheng, Xianghong (2020): Bioinformatics analysis of key genes and pathways in Hashimoto thyroiditis tissues. In: *Bioscience reports* 40 (7). DOI: 10.1042/BSR20200759.

Zhou, Hui-fang; Yan, Huimin; Cannon, Judy L.; Springer, Luke E.; Green, Jonathan M.; Pham, Christine T. N. (2013): CD43-mediated IFN- $\gamma$  production by CD8+ T cells promotes abdominal aortic aneurysm in mice. In: *The Journal of Immunology* 190 (10), S. 5078–5085. DOI: 10.4049/jimmunol.1203228.

Zilber, Marie-Thérèse; Setterblad, Niclas; Vasselon, Thierry; Doliger, Christelle; Charron, Dominique; Mooney, Nuala; Gelin, Catherine (2005): MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes. In: *Blood* 106 (9), S. 3074–3081. DOI: 10.1182/blood-2004-10-4094.

Zimmerman, Brandon; Kelly, Brendan; McMillan, Brian J.; Seegar, Tom C. M.; Dror, Ron O.; Kruse, Andrew C.; Blacklow, Stephen C. (2016): Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. In: *Cell* 167 (4), 1041-1051.e11. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.056.

Zinkernagel, R. M.; Bachmann, M. F.; Kündig, T. M.; Oehen, S.; Pirchet, H.; Hengartner, H. (1996): On immunological memory. In: *Annual review of immunology* 14, S. 333–367. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.333.

Zuidscherwoude, Malou; Dunlock, Vera-Marie E.; van den Bogaart, Geert; van Deventer, Sjoerd J.; van der Schaaf, Alie; van Oostrum, Jenny et al. (2017): Tetraspanin microdomains control localized protein kinase C signaling in B cells. In: *Science signaling* 10 (478). DOI: 10.1126/scisignal.aag2755.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Priming von naiven T-Zellen (blau) durch Dendritische Zellen (gelb). .....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse auf T-Zell-Seite.....	4
Abbildung 3: Strukturelle Merkmale der Tetraspanin-Familie.....	8
Abbildung 4: Identifikation von CD8+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. ....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Proximity Ligation Assays (PLA) zum Nachweis von Interaktionspartnern des Proteins CD53. ....	20
Abbildung 6: PLA-Signal der Negativkontrolle auf Lymphozyten-Populationen nach Oberflächenfärbung. ....	21
Abbildung 7: Prozess der Generierung stabiler Jurkat-Zelllinien mit dem Fusionskonstrukt CD53-BirA*. ....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufes der BioID.. ....	24
Abbildung 9: Oberflächenexpression des Tetraspanins CD53 auf humanen Immunzellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern. ....	26
Abbildung 10: Die CD53-Expression auf T-Zellen ist unabhängig von der auf anderen Immunzellpopulationen.....	27
Abbildung 11: CD53-Expression auf der Oberfläche von naiven und Gedächtnis-T-Zellen.. ....	28
Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der CD56+ und CD57+ Populationen auf T-Zellen.....	29
Abbildung 13: CD56+ und CD57+ T-Zellen stellen vor allem Effektor-Gedächtnis-T-Zellen dar und weisen eine erhöhte CD53-Expression auf. ....	30
Abbildung 14: Koexpression von CD56 und CD57 auf CD8+ T-Zellen. ....	31
Abbildung 15: CD53-Expression auf T-Zellen CMV-positiver Patienten im Vergleich zu CMV-negativen Patienten.....	32
Abbildung 16: CD53-Expression auf T-Zellen von HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (HIV-). ....	33
Abbildung 17: CD53-Expression auf CD57- und CD57+ T-Zellen von HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (HIV-). ....	34
Abbildung 18: Die CD53-Oberflächenexpression wird auf CD8+ T-Zellen nach Immunzellaktivierung hochreguliert. ....	35
Abbildung 19: CD53-Expression auf der Zelloberfläche sowie intrazellulär nach unspezifischer Stimulation. ....	36
Abbildung 20: CD53 wird nach Stimulation auf aktivierten CD8+ T-Zellen hochreguliert. ....	37

---

Abbildung 21: Ex vivo CD53-Expression von CD8+ T-Zellen mit Aktivierungsmarker im nicht-aktivierten Zustand.....	39
Abbildung 22: CD53 wird nach Stimulation auf funktionell aktiven CD8+ T-Zellen hochreguliert. ...	40
Abbildung 23: Der Anstieg der CD53-Expression nach Aktivierung wird nicht durch IFN $\gamma$ vermittelt. ....	41
Abbildung 24: Die CD53-Expression verläuft parallel zu der Anzahl aktivierter T-Zellen. ....	42
Abbildung 25: CD53 korreliert mit der Aktivierungsmarker-Expression auf stimulierten CD8+ T-Zellen. ....	43
Abbildung 26: CD53 befindet sich nach unspezifischer Interleukin-Stimulation in räumlicher Nähe der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD38.....	45
Abbildung 27: CD53 beeinflusst die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 sowie das Zytokin IFN $\gamma$ . .	47
Abbildung 28: Beispiele für die Identifizierung von potenziellen Interaktionspartnern in der BioID. ....	49
Abbildung 29: Potenzielles Interaktionsnetzwerk des Proteins CD53. ....	50
Abbildung 30: Korrelativer Zusammenhang zwischen CD53 und den Membranproteinen CD99 und CD147 auf CD8+ T-Zellen.....	51
Abbildung 31: Korrelation der ex vivo CD53-Expression mit dem Anstieg der CD53-Expression und der Frequenz aktivierter CD8+ T-Zellen nach Aktivierung. ....	56
Abbildung 32: Zunahme aktivierter CD8+ T-Zellen abhängig von CD57-Expression auf gesunden Spendern und HIV-Patienten.....	57
Abbildung 33: Die ex vivo CD53-Expression bestimmt über die Aktivierbarkeit von CD8+ T-Zellen. ....	58
Abbildung 34: Schematische Darstellung einiger potenzieller Interaktionspartner von CD53 in einer T-Zelle. ....	69
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Proteinhäufigkeiten der 45 Kandidaten aus der BioID..	92

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	8
Tabelle 2: Verwendete Medien, Puffer, Zellkulturzusätze und Chemikalien .....	8
Tabelle 3: Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Puffer .....	9
Tabelle 4: Verwendete Plasmide .....	9
Tabelle 5: Zusammensetzung der therapienaiven HIV-Kohorte. ....	11
Tabelle 6: Aussaat von primären PBMCs je nach angestrebtem Test. ....	13
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Oberflächenfärbung mittels Durchflusszytometrie. ....	16
Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Proteinfärbung mittels Durchflusszytometrie. ....	18
Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für PLA.....	19
Tabelle 10: Generierte Jurkat-Zelllinien im Rahmen der CD53-BioID.. ....	23
Tabelle 11: In der BioID identifizierte potenzielle Bindepartner von CD53, die mit dem Zytokin IFN $\gamma$ in Verbindung stehen. ....	52
Tabelle 12: Proteine, die nach Stimulation (IL-12, IL-15, IL-18) eine verminderte direkte oder indirekte Interaktion mit CD53 zeigen. ....	53
Tabelle 13: Reduzierte direkte oder indirekte Interaktion zwischen CD53 und seinen potenziellen Partnerproteinen durch Einführung verschiedener Mutationen.....	54
Tabelle 14: Übersicht über potenzielle CD53-Interaktionspartner, die zwischen CD57+ und CD57- CD8+ T-Zellen differentiell exprimiert werden. ....	61
Tabelle 15: In der CD53-BioID identifizierte Kandidaten interagieren auch mit CD63 und CD81. ....	65

# Anhang

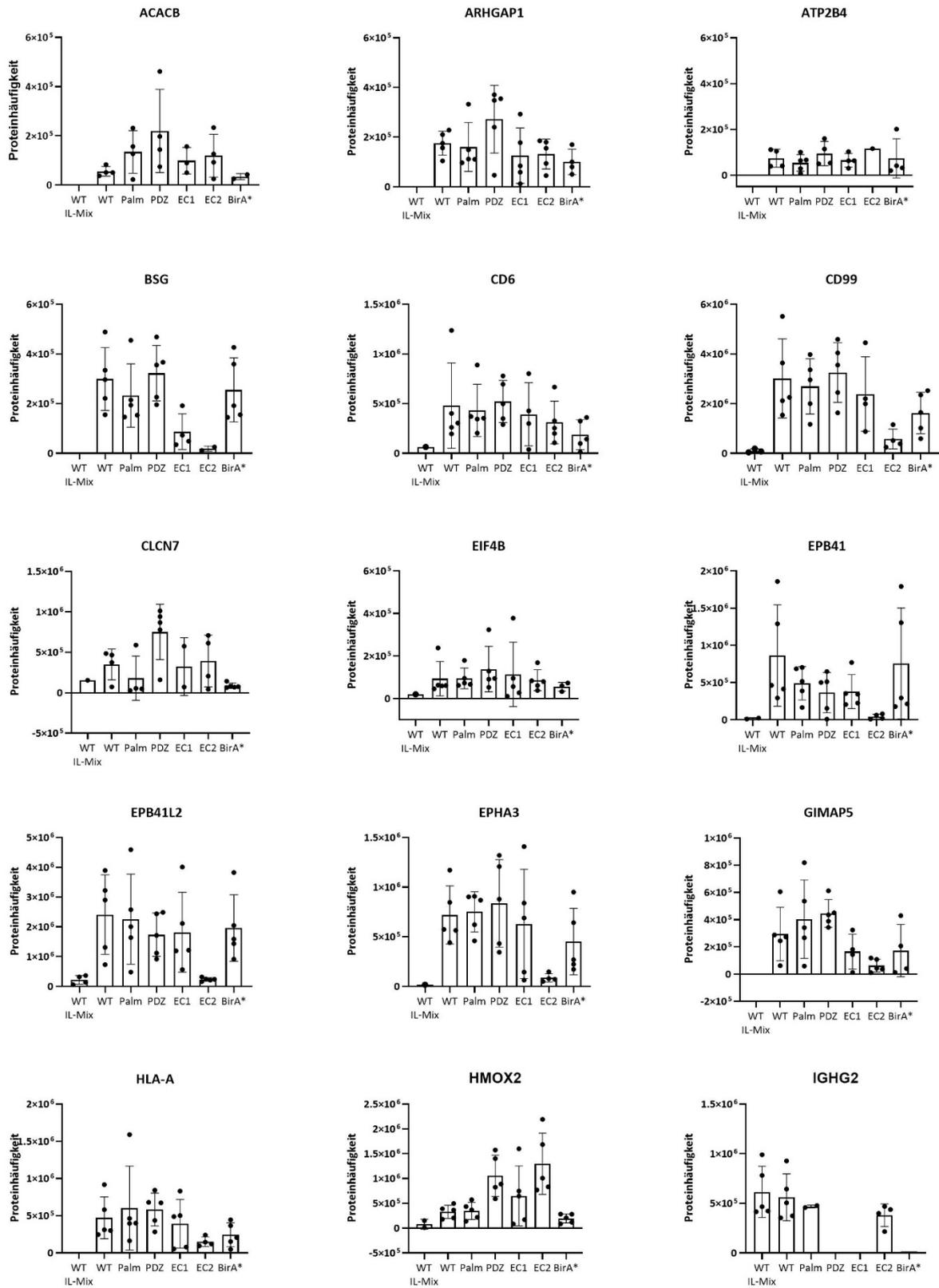
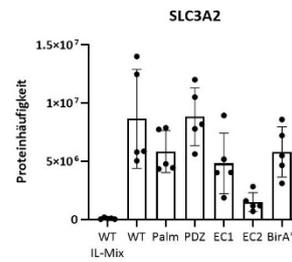
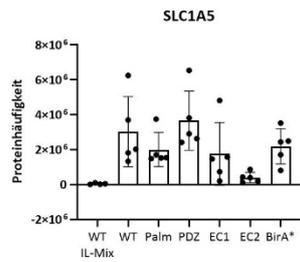
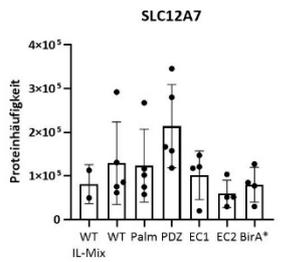
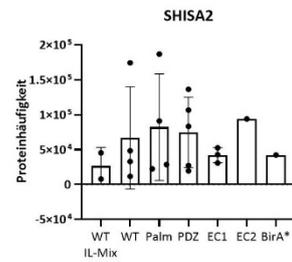
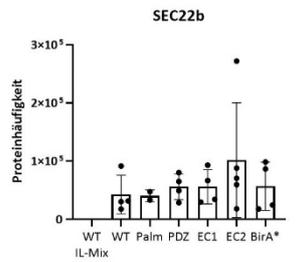
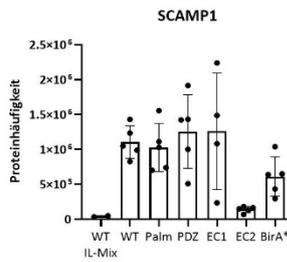
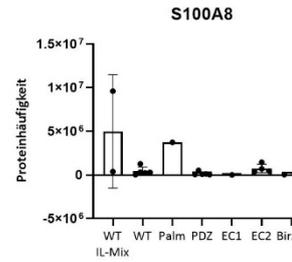
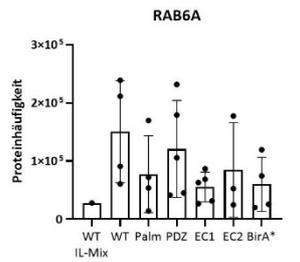
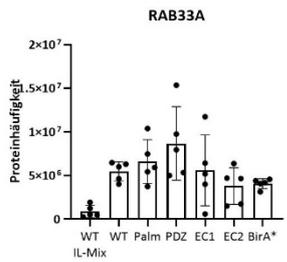
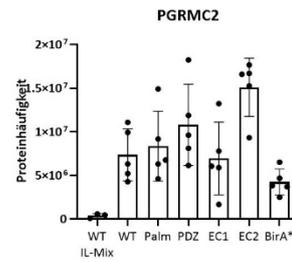
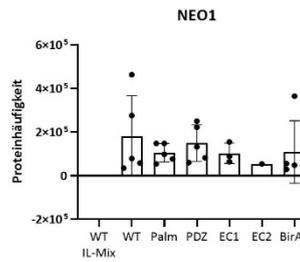
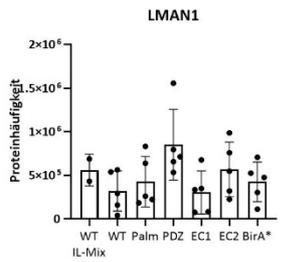
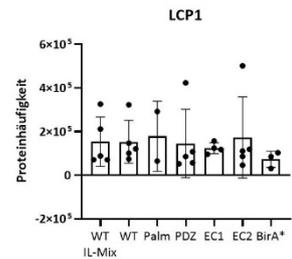
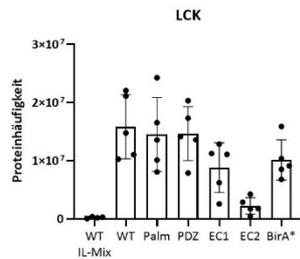
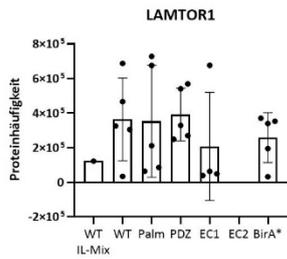
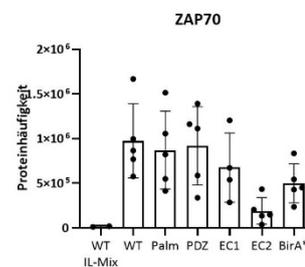
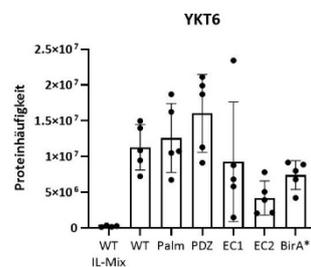
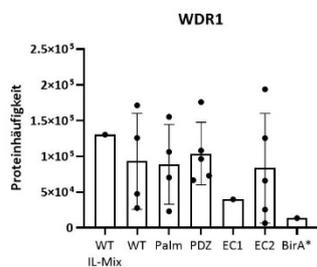
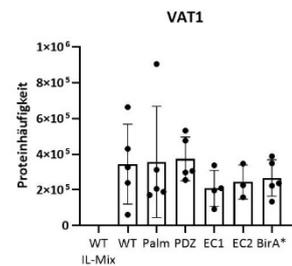
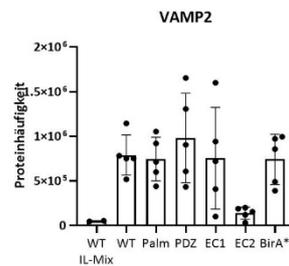
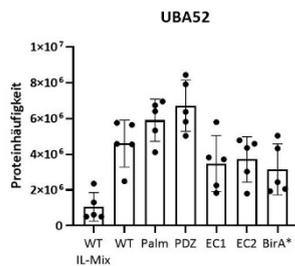
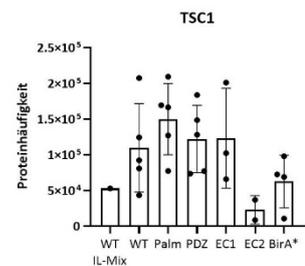
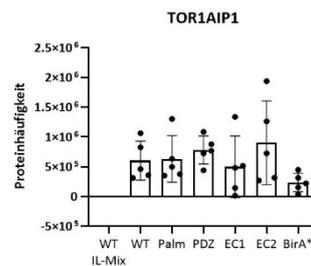
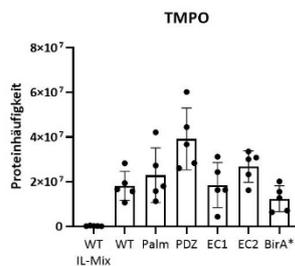
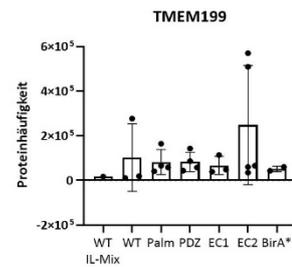
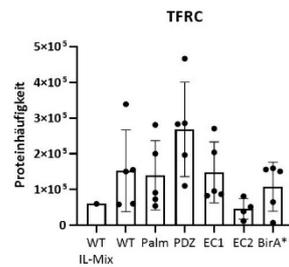
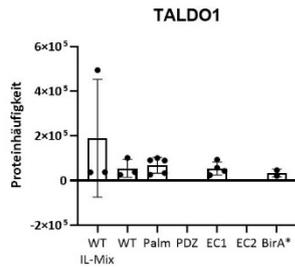
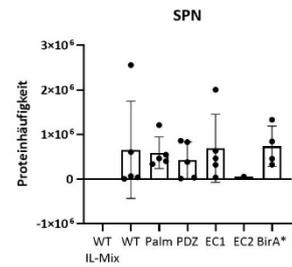
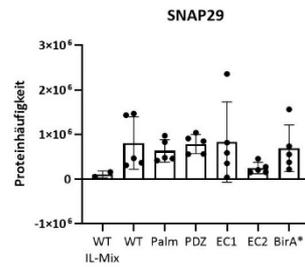
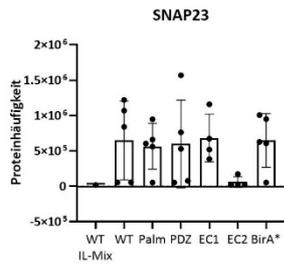


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Proteinhäufigkeiten der 45 Kandidaten aus der BioID. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der 5 Wiederholungen. Fehlt ein Punkt, konnte das Protein nicht nachgewiesen werden. WT = CD53-BirA\*, Palm = CD53(Palm\*)-BirA, PDZ = CD53( $\Delta$ PDZ)-BirA\*, EC1 = CD53(EC1\*)-BirA, EC2 = CD53(EC2\*)-BirA.



Fortsetzung Abbildung 35



Fortsetzung Abbildung 35

## Curriculum vitae

In der Online-Version nicht enthalten.

## Danksagung

In der Online-Version nicht enthalten.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

---

Lara Katharina Olejnik

Ort, Datum