

Aus dem Institut für  
Pharmakologie der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

Charakterisierung der Hyaluronsäure-Synthese und funktional  
assoziierter Gene in humanen CD8 T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Emily Schlebes  
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Gerdes

## Zusammenfassung

Das Glykosaminoglykan Hyaluronan (HA) ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und wird typischerweise von Fibroblasten des Bindegewebes produziert. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass unter bestimmten Bedingungen auch Immunzellen HA synthetisieren können. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob humane CD8-T-Zellen aus dem Blut gesunder Spender HA produzieren können und inwieweit sie HA-Rezeptoren sowie HA-abbauende Enzyme exprimieren. Außerdem wurde der Effekt einer pharmakologischen Hemmung der HA-Synthese auf die Funktion der CD8-T-Zellen analysiert. Immunzytochemische Färbungen und quantitative PCR-Daten ergaben, dass die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) durch CD3/CD28 Antikörper die HA-Synthese induziert und dass diese fast ausschließlich durch die HA-Synthase 3 (HAS3) vermittelt wird. Die TZR-Aktivierung führte auch zu einer Hochregulierung der mRNA der HA-Rezeptoren CD44, Hyaluronan-vermittelter Motilitätsrezeptor (RHAMM) und Layilin (LAYN), obwohl zeitlicher Verlauf und Stärke der Expression zwischen den Probanden stark variierten. Die HA-abbauenden Enzyme HYAL1 und HYAL2 wurden ebenfalls auf Transkript-Ebene nachgewiesen und durch Zellaktivierung moduliert. Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  hatten individuell sehr unterschiedliche Wirkungen, wobei insgesamt kein signifikanter Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene gemessen wurde. Um die funktionale Rolle von HA in CD8-T-Zellen zu beurteilen, wurden Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)-basierte Proliferationsassays und Zytokinanalysen in Gegenwart des pharmakologischen HA-Inhibitors 4-Methylumbelliferon (4-MU) durchgeführt. Trotz erheblicher interindividueller Unterschiede in Bezug auf die wirksame Dosis führte 4-MU zu einer Hemmung der CD8-T-Zellproliferation und einer verringerten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Insgesamt zeigen diese Daten, dass menschliche CD8-T-Zellen auf TZR-induzierte Stimulation mit der Synthese von HA und der Expression von HA-assoziierten Genen reagieren. Sie deuten außerdem darauf hin, dass die Hemmung von HA hilfreich sein könnte, um eine pathogene CD8 T-Zell-Aktivierung bei menschlichen Erkrankungen zu blockieren.

## **Abstract**

The glycosaminoglycan hyaluronan (HA) is a major component of the extracellular matrix, typically produced by fibroblasts of the connective tissue. However, recent research suggests that also immune cells synthesize HA under certain conditions. Here, we investigated the capacity of human peripheral blood CD8 T cells from healthy donors to produce HA and to express HA receptors as well as HA degrading enzymes. Further, we evaluated the effect of pharmacological HA inhibition on CD8 T cell function. Using immunocytochemistry together with quantitative PCR analysis, we found that HA synthesis is induced upon CD3/CD28 antibody-induced T cell receptor (TCR) activation and almost exclusively mediated by HA synthase 3 (HAS3). TCR activation also resulted in mRNA upregulation of HA receptors CD44, hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) and layilin (LAYN), although time course and strength of expression varied greatly between subjects. The HA degrading enzymes HYAL1 and HYAL2 were also detected at transcript level and modulated by cell activation. The effects of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  were highly donor dependent but overall did not significantly change expression of the analyzed genes. To assess the functional role of HA in CD8 T cells, we performed Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) based proliferation assays and cytokine analysis in the presence of the HA inhibitor 4-Methylumbelliferone (4-MU). Despite significant inter-individual variation regarding the effective dose, 4-MU resulted in inhibition of CD8 T cell proliferation and reduced release of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . Collectively, these data demonstrate that human CD8 T cells respond to TCR-stimulation with synthesis of HA and expression of HA-related genes. They further suggest that HA inhibition may be helpful to interfere with pathogenic CD8 T cell activation in human disease.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BC	Buffy Coat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zellen
DI	Teilungsindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN	Doppelt negativ
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay/ Enzymimmunoasay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter/ Vorwärtsstreulicht</i>
g	Gramm
g	<i>Gravity/</i> Schwerkraft
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HAbP	HA-Bindungsprotein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HMMR	Hyaluronan Mediated Motility Receptor
Hyal	Hyaluronidase
IL	Interleukin
INF	Interferon
LAYN	Layilin
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter

mRNA	<i>Messenger RNA</i> / Boten-Ribonukleinsäure
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PF	Vorläuferfrequenz
PI	Proliferationsindex
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i> / Rezeptor für HA-mediierte Motilität
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Nährmedium
SSC	<i>Side scatter</i> /Seitwärtsstreulicht
STEMI	<i>ST-Elevation myocardial Infarction</i> / ST-Streckenhebungsinfarkt
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
4-MU	4-Methylumbelliferon

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1 Hyaluronsäure (HA) als Bestandteil der extrazellulären Matrix.....	1
1.1.1 HA-Synthese .....	1
1.1.2 Funktionen von HA .....	1
1.2 HA-Rezeptoren .....	2
1.3 HA-Abbau .....	3
1.4 Akkumulation von HA und T-Zellen im entzündeten Gewebe.....	3
1.5 Fragestellung .....	4
2. Material und Methoden.....	4
2.1 PBMC Isolierung aus Buffy Coats .....	4
2.2 Durchflusszytometrie .....	5
2.3 CD8 T-Zellisolation mit MACS System.....	6
2.3.1 Positive Selektion .....	6
2.3.2 Negative Isolation .....	7
2.4 CFSE-Proliferationsversuch .....	7
2.5 Annexin Apoptoseassay.....	9
2.6 Genexpression im Zeitverlaufsversuch .....	9
2.7 Effekt von Zytokinstimulation auf Genexpression .....	10
2.8 Effekt von 4-MU auf Zytokinproduktion .....	11
2.8.1 ELISA .....	11
2.9 RNA Isolation und cDNA Synthese .....	12
2.9.1 RNA Isolation.....	12
2.9.2 Lithiumchlorid Fällung von RNA.....	13
2.9.3 cDNA Synthese .....	13
2.10 qPCR.....	14
2.11 Immunohistologie.....	15
3. Ergebnisse .....	16
3.1 PBMC-Isolation .....	16

3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung des CD8 T-Zellanteils im peripheren Blut .....	17
3.3 Negative und positive CD8 T-Zellisolation mithilfe der MACS-Technologie. 18	
3.4 Expression HA-assoziiierter Gene im Zeitverlauf .....	20
3.5 Effekt von IL-6 und IL-1 $\beta$ auf die Genexpression funktional assoziierter Gene der HA .....	22
3.6 Immunohistologische Färbung von HA und CD44 .....	24
3.7 Effekt der HA Inhibition durch 4-MU auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ .....	26
3.8 Einfluss von 4-MU auf die Apoptose .....	27
3.9 Inhibition der CD8-T-Zellproliferation durch 4-MU .....	29
4. Diskussion.....	31
4.1 HA-Synthasen und Hyaluronidasen .....	31
4.2 HA-Rezeptoren .....	33
4.3 Bedeutung von Genvarianten für die Genexpression .....	34
4.4 Der Effekt von 4-MU auf Zellproliferation, Apoptose und Zytokinproduktion	35
4.5 Limitationen und Ausblick .....	35
5. Literaturverzeichnis .....	37
6. Appendix .....	40
7. Danksagung.....	43

# 1. Einleitung

## 1.1 Hyaluronsäure (HA) als Bestandteil der extrazellulären Matrix

### 1.1.1 HA-Synthese

HA ist ein nicht sulfatiertes Glykosaminoglykanpolymer. Es besteht aus sich wiederholenden Disacchariden D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin, welche durch eine glucuronidische  $\beta(1\rightarrow3)$ -Bindung verbunden sind und dadurch ein unverzweigtes und unmodifiziertes Polymer bilden (1, 2). Besonders ist die De-novo-Synthese von HA aus einzelnen Monosaccharidbausteinen an der Plasmamembran durch die drei membranständigen HA-Synthasen (HAS1-3) (3). Dabei wird HA in Form von wachsenden HA-Ketten durch porenartige Strukturen in den extrazellulären Raum heraustransportiert (2, 3).

HA wird von verschiedensten Zellen produziert, vorwiegend von Zellen mesenchymalen Ursprungs, zum Beispiel Fibroblasten (2). Auch Monozyten zeigen eine Veränderung der HA-Synthese während ihrer Differenzierung zu Makrophagen. Dabei wird vor allem HAS2, welches zunächst nur in sehr geringen Mengen in Monozyten zu finden ist, innerhalb von 2h nach Induktion der Differenzierung heraufreguliert (4). Auch für dendritische Zellen (DC) ist gezeigt worden, dass sie mRNA für HASen exprimieren und HA auf ihrer Oberfläche aufweisen (5). Inwieweit auch Zellen des adaptiven Immunsystems, also z.B. B- und T-Zellen, HA synthetisieren können, ist bisher nur wenig untersucht.

### 1.1.2 Funktionen von HA

HA besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Wenn HA in den Extrazellulärraum gelangt, leistet es einen Beitrag zur Matrix-Mikroumgebung von Zellen und wechselwirkt mit HA-bindenden Proteinen und Rezeptoren, wobei es zum Teil als direkter Signalübermittler fungiert (1, 6). Daher ist die Funktion maßgeblich von den anwesenden Hyaladherinen, jedoch auch von deren Interaktion mit HA-Rezeptoren bestimmt. Die sich daraus ergebenden Wechselwirkungen beeinflussen die Adhäsion, Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen (SMCs), Fibroblasten und anderen Zelltypen in Gefäßgeweben (1). HA wird dementsprechend bei Gewebeverletzung,

Gewebereparatur und Wundheilung produziert. HA stellt nicht nur ein Gerüst für das Einwachsen von Blutgefäßen und Fibroblasten bereit, sondern beeinflusst auch viele Aspekte der molekularen Mechanismen der Gewebereparatur, z. B. im Rahmen einer immunologischen Antwort bei Entzündungsreaktionen (2). Dies gilt für die Aktivierung und Reifung verschiedener Typen von Immunzellen ebenso wie für die Freisetzung von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen sowie für die Vermehrung und Migration von Leukozyten (7).

## **1.2 HA-Rezeptoren**

HA bindet an unterschiedliche Proteine (Hyaladherine), die entweder verankert in der Zellmembran oder extrazellulär in der Matrix vorkommen. Solche, denen auch eine Signalfunktion und damit ein immunmodulatorisches Potential zugeschrieben wird, werden als HA-Rezeptoren bezeichnet. Zu diesen zählen insbesondere CD44 und RHAMM (Receptor for Hyaluronan-mediated Motility)/ CD168 (8). CD44 ist der wichtigste Rezeptor für HA und wird von vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zelltypen exprimiert. Er reguliert die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel von Blutgefäßen und steuert so die Migration von Immunzellen in das umliegende Gewebe (8). RHAMM ist ein funktioneller HA-Rezeptor in vielen Zellarten. Es wird angenommen, dass er an der Motilität von Tumorzellen beteiligt ist. Außerdem spielen RHAMM-HA-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Schädigung und Wiederherstellung von Gewebe (2, 9). LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) ist der zentrale Rezeptor für HA im Endothel von Lymphgefäßen. Er ist der lymphatische Andockrezeptor für dendritische Zellen, der sich spezifisch mit ihrer Oberflächen-HA-Glykokalyx verbindet, um den Eintritt in die peripheren Lymphgefäße und die Wanderung zu den nachgeschalteten Lymphknoten zur Immunaktivierung zu steuern (10). Layilin ist ein Transmembranprotein mit Homologie zum C-Typ-Lektin (11), welches unter anderem auf einer Untergruppe von aktivierten Tregs in gesunder und kranker menschlicher Haut bevorzugt und stark exprimiert wird (12). Neben der Bindung an membrangebundenen Rezeptoren bindet HA auch an Proteine in der EZM wie z.B. Versican oder Brevican

### **1.3 HA-Abbau**

Spezifische Enzyme, die Hyaluronidasen (HYALs), katalysieren den Abbau von HA. Dabei werden durch Hydrolyse die  $\beta$  1-4 glykosidischen Bindungen gelöst und es entstehen unterschiedlich lange HA-Fragmente. Es gibt verschiedene HYALs, bislang konnten 6 Formen identifiziert werden. HYAL 1 und 2 sind davon die wichtigsten (13, 14). Die HYALs 3, 4 und 5 haben nur schwache Expressionsmuster und HYAL6 ist ein Pseudogen. Daher ist es naheliegend, dass diese vier HYALs nicht wesentlich an der HA-Spaltung beteiligt sind. Zusätzlich zu den sezernierten HYALs ist als bisher einzige membrangebundene Hyaluronidase TMEM2 beschrieben worden, welche durch HA-Degradation im Bereich der Zellverankerung die Zellmigration beeinflusst, (15). Weiterhin kann der HA-Abbau auch durch Reactive Oxygen Species (ROS) stattfinden, wie z.B. in der Gelenkflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis (16).

### **1.4 Akkumulation von HA und T-Zellen im entzündeten Gewebe**

Neben ihrer physiologischen Bedeutung spielt HA auch eine Rolle bei Entzündungsreaktionen. In verschiedenen Erkrankungen akkumuliert HA im betroffenen Gewebe, z.B. im Pankreas bei der Typ-1-Diabetes (17), im Kolon von Patienten mit Kolitis (18), in den Läsionen der Psoriasis (19) oder auch im Herzen nach Myokardinfarkt (20). Diese Anreicherung von HA geht häufig mit der Infiltration von Immunzellen, einschließlich T-Zellen, einher (17, 21). Dabei ist ungeklärt, ob auch die T-Zellen zu der verstärkten HA-Synthese beitragen und inwieweit ihre Funktion durch Interaktion mit HA beeinflusst wird. Insbesondere gibt es wenig Informationen über die Interaktionen von CD8 T-Zellen mit HA. CD8 T-Zellen sind typischerweise in die Abwehr viraler Erreger involviert, indem sie Peptidfragmente der Viren erkennen, die von dendritischen Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Diese Interaktion aktiviert die T-Zellen und durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, porenformender Substanzen wie Perforin sowie zytotoxischer Proteasen wie Granzyme B kommt es zur Eliminierung virusbefallener Zellen (22). Aber auch in nicht-viralen Erkrankungen können CD8-T-Zellen aktiviert werden, so z.B. über Auto-Antigene in den bereits erwähnten Autoimmunerkrankungen. Wenngleich auch hier die Erkennung von Peptiden, in dem Fall körpereigenen, eine zentrale Rolle spielt, tragen auch andere

Mechanismen zur Aktivierung der CD8 T-Zellen bei. Dabei gibt die Expression von HA-Rezeptoren wie CD44 einen Hinweis auf die Bedeutung der Interaktion mit HA. Z.B. wurde für murine CD8 T-Zellen gezeigt, dass HA-bindende, CD44 exprimierende Zellen deutlich stärker proliferieren als solche, die kein HA binden konnten (23).

## **1.5 Fragestellung**

In dem Projekt sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen humane CD8 T-Zellen HA sowie HA-assoziierte Proteine synthetisieren können. Dabei wurden sowohl unstimulierte als auch über den T-Zell-Rezeptor und durch Zytokine stimulierte Zellen analysiert. Im Speziellen wurde untersucht, zu welchen Anteilen die HA-Synthasen HAS1, -2 und -3 an der HA-Produktion beteiligt sind und inwieweit die Aktivierung der CD8-T-Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-1 $\beta$ ) die HA-Synthese beeinflussen. Des Weiteren wurde die Expression HA-assoziiierter Proteine, insbesondere der HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM sowie der Hyaluronidasen HYAL1 und HYAL2, im Zeitverlauf untersucht. Schließlich wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die pharmakologische Inhibition der HA-Synthese durch 4-Methylumbelliferon (4-MU) die Viabilität, Proliferation und Zytokinproduktion der CD8-T-Zellen beeinflusst.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 PBMC Isolierung aus Buffy Coats**

Leukozytenkonzentrate, sogenannte ‚Buffy Coats‘ (BCs), die im Rahmen der Blutspende als Nebenprodukt bei der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten anfallen, wurden tagesfrisch und nach schriftlichem Einverständnis der Blutspender von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Zusätzlich ist die Verwendung der BCs durch ein positives Ethikvotum (Studiennummer 3853 „Funktion und Einfluss der extrazellulären Matrix in isolierten hämatogenen Zellpopulationen“) vom 27.05.2019 abgedeckt. Die Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte nach einem bereits im Labor der

Pharmakologie etablierten Protokoll. Zunächst wurden je 12 ml Ficoll (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in vier 50 ml Falcons gegeben. Danach wurde der Blutbeutel eröffnet und in eine 75er Zellkulturflasche überführt, diese wurde mit DPBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) auf 120 ml aufgefüllt. Nun wurden jeweils 30 ml des verdünnten Blutes langsam auf das Ficoll pipettiert, so dass eine Phasenbildung entsteht. Dann wurden die Röhrchen bei 400 g für 30 Minuten mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Nach vorsichtiger Aspiration der Plasmaphase wurde die Leukozyten abpipettiert und auf zwei 50 ml Falcons verteilt. Zum Waschen der Zellen wurden die Röhrchen mit DPBS aufgefüllt und dann mit gedrosselter Bremse und Beschleunigung bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 5ml Erylysispuffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden die Zellen in einem Falcon gepoolt und erneut mit DPBS gewaschen, diesmal bei 150 g für 10 min. Dieser langsame Zentrifugationsschritt dient der Entfernung von Blutplättchen, die bei dieser Geschwindigkeit zum größten Teil im Überstand bleiben. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 50 ml DPBS resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension zum Zählen der Zellen mithilfe der Neubauer-Kammer entnommen. Während des Zählvorgangs wurden die restlichen Zellen bei 400 g für 7 Minuten mit voller Bremse und Beschleunigung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 9ml FCS resuspendiert. Danach wurden jeweils 0,5 ml in 18 Kryoröhrchen verteilt und anschließend jeweils 0,5 ml Einfriermedium (FCS + 14% DMSO) dazugegeben, so dass die finale DMSO-Konzentration 7% betrug. Die PBMC wurden nun in einem speziellen, mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter ‚Mr Frosty‘ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zunächst bei -80 °C für 24h gelagert, um ein gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellen (1 Grad/Minute) zu gewährleisten. Anschließend wurden sie zur dauerhaften Aufbewahrung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

## **2.2 Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrischen (*Fluorescence activated cell scanning* (FACS)) Analysen erfolgten an einem BD LSRFortessa™ (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Die Datenauswertung wurde mit der Software FlowJo™ durchgeführt. (BD

Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die Methodik der Vorbereitung der Proben wird bei den entsprechenden Versuchen beschrieben.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Antikörper	Klon	Hersteller
Annexin V - FITC	N/A	BioLegend, San Diego, CA, USA
Live/Dead Aqua	N/A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-human CD3-PerCp/Cy5	UCHT1	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-human CD8-BV605	SK1	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-human CD4-AF488	SK3	BioLegend, San Diego, CA, USA

## 2.3 CD8 T-Zellisolation mit MACS System

### 2.3.1 Positive Selektion

Die CD8 T-Zellen wurden mit dem Zellisolierungskits *CD8 MicroBeads human* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgereinigt. Dazu wurden zunächst die cryopräservierten PBMC im vorgewärmten Complete Medium aufgetaut, zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde nun in 80 µl PEB Puffer (DPBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und mit 20 µl CD8 MicroBeads je  $10^7$  Zellen versetzt, gefolgt von 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank (2-8 °C). Nach der Inkubationszeit wurden 1-2 ml PEB Puffer je  $10^7$  Zellen hinzugegeben und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert, um ungebundene MicroBeads zu entfernen. Währenddessen wurde die LS Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) für die MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) Isolierung vorbereitet, hierfür wurde sie in einem Magneten platziert und mit 3 ml PEB Puffer äquilibriert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 500 µl pro  $10^8$  Zellen resuspendiert und die Suspension auf die Säule gegeben. Die Säule wurde insgesamt dreimal mit je 3 ml PEB Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie aus dem Magnetfeld genommen und die CD8 T-Zellen mit 5 ml PEB Puffer aus der Säule in ein 15 ml Falcon gedrückt. Die Zellsuspension wurde dann bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert.

### **2.3.2 Negative Isolation**

Die CD8 T-Zellen wurden mit dem Zellisolerungskits *CD8 T Cell Isolation Kit human* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgereinigt. In diesem Verfahren werden die CD8 T-Zellen isoliert, indem alle nicht CD8 positiven Zellpopulationen mit Antikörpern markiert und mithilfe magnetischer Beads entfernt werden. Man spricht von einer ‚negativen‘ Isolation, da die isolierten Zellen ‚unberührt‘ bleiben, d.h. nicht an Antikörper gebunden sind. Gemäß Anleitung wurden die aufgetauten PBMC zunächst in je 40 µl PEB Puffer je  $10^7$  Zellen resuspendiert, dann mit je 10 µl Biotin-Antibody Cocktail pro  $10^7$  Zellen versetzt und für 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden 30 µl Puffer je  $10^7$  Zellen hinzugegeben, gefolgt von 20 µl CD8 T-Zell MicroBead Cocktail je  $10^7$  Zellen. Die Suspension wurde anschließend für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Währenddessen wurde die magnetische Separation vorbereitet, indem die LS Säule im magnetischen Feld platziert und mit 3 ml PEB Puffer äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die vorbereitete Säule gegeben. Die im Durchfluss enthaltenen CD8 T-Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen mit 10 ml PEB aufgefangen. Um möglichst alle CD8 T-Zellen zu gewinnen, wurde die Säule mit 3 ml Puffer gespült. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 400 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml PEB Puffer resuspendiert. Dann wurden 10 µl einer 1:1 Mischung aus Zellsuspension und Trypanblau zum Bestimmen der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Kammer verwendet. Während des Zählvorgangs wurden die restlichen Zellen bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.4 CFSE-Proliferationsversuch**

Für diesen Versuch wurden zunächst von ca. 20-30 Mio PBMC (1 Aliquot) CD8 T-Zellen isoliert (negative Isolation, s. 2.3.2). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 5 µM Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Um den ungebundenen Farbstoff zu absorbieren, wurde die Zellsuspension anschließend mit 2 ml Complete Medium (RPMI 1640 GlutaMAX, 10% FCS, 1% PS) erneut für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Währenddessen wurde die mit CD3

Antikörper (1 µg/ml) über Nacht vorbeschichtete Zellkulturplatte mit DPBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zelldichte mit vorgewärmten AIM V Medium auf 2 Millionen Zellen pro ml eingestellt. Davon wurden 100 µl ( $2 \times 10^5$  Zellen) für die unstimulierte Kontrolle entnommen und in ein ungecoatetes Well gegeben. Die restliche Suspension wurde mit Anti-humanem CD28-Ultra-Leaf Antikörper in einem Verhältnis von 1:500 versetzt (2 µg/ml). Dann wurden jeweils 100 µl der Suspension auf die Wells verteilt und pro Well 100 µl der 4-MU-Ansätze hinzugegeben, so dass folgende finale 4-MU Konzentrationen erreicht wurden: 300 µM, 150 µM, 75 µM, 37,5 µM und 18,75 µM (Abb. 1). Das Kontroll-Well wurde mit 100 µl AIM V Medium aufgefüllt. Die finale Konzentration des CD28-Antikörpers betrug somit 1 µg/ml. Nach 120 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in beschriftete FACS Röhrchen überführt. Dann wurden 2 ml PEB Puffer hinzugefügt und die Suspension bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde die Färbelösung zur Detektion toter Zellen vorbereitet: 1,5 µl „Aqua Live/Dead“ wurden zu 1,5 ml DPBS (1:1000) gegeben und bei 4-8 °C im Kühlschrank zwischengelagert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 100 µl „Live/Dead“ Färbelösung resuspendiert und für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Währenddessen wurde der Antikörper-Cocktail vorbereitet, dafür wurden pro Probe je 1,5 µl CD3-PERCP-Cy5.5 Antikörper und 2 µl CD8-BVB650 Antikörper verwendet. Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml PEB Puffer hinzugegeben und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert, um den ungebundenen Farbstoff abzuwaschen. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert, 3,5 µl des Antikörper Cocktails hinzugegeben, die Suspension kurz gevortext und für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PEB Puffer hinzugegeben und die Suspension bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde abdekantiert, 150 µl PEB Puffer hinzugefügt und die Proben per Durchflusszytometrie vermessen. Die Daten wurden mit der FlowJo Software (Becton Dickinson, NJ, USA) analysiert.

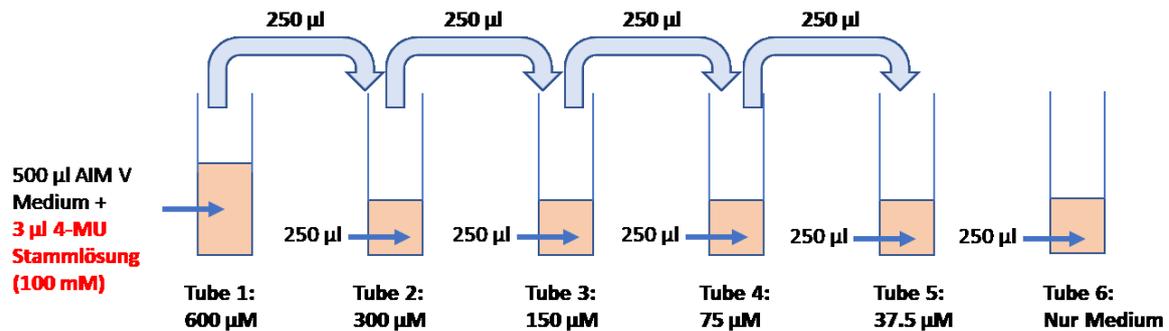


Abb 1. 4-MU Verdünnungsreihe

## 2.5 Annexin Apoptoseassay

Ausgangspunkt sind isolierte, mit CD3-Ultra-Leaf/CD28-Ultra-Leaf aktivierte und mit unterschiedlichen 4-MU Konzentration versetzte CD8 T-Zellen in einer 96 Well Platte am 4. Tag nach Aktivierung. Die Inhibition mittels 4-MU erfolgte analog wie im CFSE-Proliferationsversuch (s. Abschnitt 2.4). Zunächst wurden die Zellen geerntet und in FACS Röhrchen überführt, 2 ml PEB Puffer wurden dann zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden sie bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Vorbereitung der „Aqua Live/Dead“ Lösung (1:1000 in PBS, 100 µl pro Probe) wurde diese zu den Zellen gegeben und die Suspension für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Währenddessen wurde der Antikörper-Mix hergestellt, dafür wurden 1,5 µl CD3-PERCP-Cy5.5 Antikörper und 2.0 µl CD8-BVB650 Antikörper je Probe verwendet. Nach der Inkubation wurden erneut 2 ml PEB zur Suspension gegeben und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl PEB resuspendiert. 3,5 µl des Antikörper-Mix wurden hinzugegeben und die Suspension für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Dann wurden erneut 2 ml PEB Puffer zu der Suspension gegeben und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 100 µl Annexin Puffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) sowie 2 µl Annexin-FITC (BioLegend, San Diego, CA, USA) hinzugegeben. Anschließend folgte eine Inkubation für 15 Minuten im Kühlschrank. Danach wurden 50 µl Annexin Puffer zu der Suspension gegeben und die Proben im Fortessa vermessen.

## 2.6 Genexpression im Zeitverlaufsversuch

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde eine 48-well Zellkulturplatte mit 1 µg/ml CD3 Antikörper in DPBS gecoatet. Am Versuchstag wurden zunächst aus ca. 100-120

Mio aufgetauten PBMC CD8 T-Zellen isoliert (positive Isolation, s. 2.3.1). Die isolierten und zentrifugierten Zellen wurden in 2 ml AIM V Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Nun wurde die Zellkulturplatte vorbereitet, indem sie mit 250 µl DPBS je Well gewaschen wurde. 1,75 ml der Zellsuspension wurden nun mit 1,75 µl Anti-humanen CD28-Ultra-Leaf Antikörper versetzt, welches einer finalen Konzentration von 1 µg/ml entsprach. Die verbleibenden 250 µl dienten als negative Kontrolle und erhielten keinen Antikörper. Anschließend wurden jeweils 250 µl Zellsuspension pro Well (2,5-3,5 Mio Zellen) auf die Zellkulturplatte überführt. Die Zellkulturplatte wurde für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert, mit folgenden Abnahmezeitpunkten: 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden. Das Eppendorf-Röhrchen mit den jeweiligen Zellen wurde dann bei 800 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml Trizol lysiert, als Vorbereitung für die RNA-Isolation. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

**Tabelle 2: Antikörper für die Zellkultur**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-human CD3-Ultra-Leaf	OKT3	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-human CD28-Ultra-Leaf	CD28.2	BioLegend, San Diego, CA, USA

## **2.7 Effekt von Zytokinstimulation auf Genexpression**

Zunächst wurden 12 Wells einer 48-well Platte mit CD3-Ultra-Leaf Antikörper (1 µg/ml) gecoatet und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. . Am Versuchstag wurden zunächst aus ca. 90 Mio aufgetauten PBMC je untersuchten Buffy Coat CD8 T-Zellen isoliert (positive Isolation, s. 2.3.1). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml T-Zell Medium resuspendiert und 3 µl CD28-Ultra-Leaf Antikörper zur Aktivierung hinzugeben (2-fach konzentriert (2µg/ml), nach Zytokinzugabe betrug die finale Konzentration 1 µg/ml). Pro Well wurden 250 µl der Zellsuspension auf die Platte geben und diese in den Inkubator gestellt. Die Zytokinlösung wurde für die beiden Zytokine IL-1β (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) und IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) vorbereitet. Dafür wurden jeweils 1,5 ml einer 1:500 Verdünnung in T-Zellmedium angesetzt, so dass die finale Zytokinkonzentration 20 ng/ml betrug. Zu den unstimulierten Zellen wurden pro well

250 µl T-Zell Medium geben. Nach 6 und 48h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 800 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Trizol lysiert. Bis zur RNA-Isolierung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

## **2.8 Effekt von 4-MU auf Zytokinproduktion**

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde eine 96-Well Platte mit 1 µg/ml CD3-Ultra-Leaf Antikörper in DPBS gecoatet und bei 4°C aufbewahrt. Zu Versuchsbeginn wurden 3 Aliquots PBMC pro BC (ca. 90 Millionen Zellen) aufgetaut und die CD8 T-Zellen mittels positiver Selektion isoliert. (s. 2.3.1) Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt und die Zellkonzentration auf 2 Millionen pro 100 µl mit AIM V Medium eingestellt. Dann wurde CD28 Antikörper in einem 1:500 Verhältnis hinzugegeben (2 µg/ml). Nach Waschen der Zellkulturplatte mit DPBS, wurden jeweils 100 µl auf die Wells verteilt, wobei pro BC 4 Wells (technische Replikate) angesetzt wurden. Nun folgte die Stimulation mit 4-MU mit Ausnahme der negativen Kontrolle. Die verwendeten Konzentrationen waren: 300 µM, 75 µM und 18,75 µM. Die finale Konzentration des CD28-Antikörpers betrug 1 µg/ml. Die Zellkulturplatte wurde für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 800 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Zytokinanalyse mittels ELISA und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 1 ml Trizol resuspendiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

### **2.8.1 ELISA**

Die ELISA wurden nach Gebrauchsanweisung durchgeführt. Es wurden DuoSet ELISA Kits für die Zytokine IFN-γ, TNF-α und Granzyme B (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet. Zunächst wurden am Vortag die Platten vorbereitet, dafür wurde der Fängerantikörper in seiner Arbeitsdosierung in PBS ohne Transportproteine gelöst. Mit dieser Suspension wurde eine 96 Well Platte mit je 100 µl pro Well gecoatet. Die Platte wurde mit einer Dichtungsfolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst

die Suspension abgesaugt. Jedes Well wurde insgesamt 3 mal mit jeweils 400 µl Waschpuffer gewaschen. Dies entspricht dem Waschschemata wie es im gesamten Versuchsverlauf angewendet wurde. Danach wurden die Platten mit je 300 µl Verdünnungspuffer geblockt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten gewaschen. Dann wurden 100 µl des Standards oder der Probe in jedes Well gegeben, die Herstellung des Standards bzw. die Dosis der Probe unterschieden sich je nach untersuchtem Zytokin. Erneut wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut gewaschen. 100 µl Fänger-Antikörper wurden nun pro Well hinzugegeben, wieder wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden jeweils 100 µl von der Arbeitsverdünnung des Streptavidin-HRP in jedes Well gegeben. Dann folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschen. Nun wurden 100 µl der Trägerlösung je Well hinzugegeben und wieder für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 50 µl der Stopp-Lösung in jedes Well gegeben, um die Reaktion zu beenden. Direkt danach wurde mit Hilfe des Synergy M Microplate Readers (BioTek Instruments, Winooski, Vt, USA) die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 540 nm. Die absoluten Zytokin-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Standardkurve und unter Berücksichtigung der Probenverdünnungen berechnet.

## **2.9 RNA Isolation und cDNA Synthese**

### **2.9.1 RNA Isolation**

Die RNA Isolation erfolgte nach der Trizol-Methode mit peqGOLD TriFast™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemäß Anleitung. Die Zellpellets wurden mit 1ml Trizol lysiert und zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform je eingesetztem Milliliter Trizol hinzugegeben und die Proben für 15 s kräftig geschüttelt. Nach 3-10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 5 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Die RNA enthaltende wässrige Phase wurde nun in ein frisches Röhrchen überführt, die anderen Phasen (Protein und DNA) wurden verworfen. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter Trizol. Nach Mischung der

Probe und 10minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 12000 g und 4 °C. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation (12000 g, 10 Minuten, 4 °C) gewaschen. Das Pellet wurde bei 55 °C einige Minuten trocknen gelassen und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst und für 5 min bei 55 °C erhitzt. Konzentration und Reinheit (Quotient aus 260 nm/280nm) der RNA wurden mithilfe des Nanodrop-UV/VIS Spektralphotometer (Nanodrop, Peqlab, Erlangen) bestimmt.

### **2.9.2 Lithiumchlorid Fällung von RNA**

Die Methode der Lithiumchlorid-Fällung wurde bei Proben mit nicht ausreichender RNA-Reinheit angewendet (260/230 Ratio < 1). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Lithiumchlorid sehr effizient RNA, aber nicht DNA, Protein oder freie Nukleotide präzipitiert. Zunächst wurde das Reaktionsvolumen mit Nuklease-freiem Wasser auf 50µl angepasst, danach wurden 25µl 7.5M LiCl hinzugefügt, so dass die finale LiCl Konzentration bei 2.5M lag. Dann wurde 1µl 20mg/ml Glykogen in RNA-Qualität hinzugegeben, so dass die finale Glykogen Konzentration 0,26 µg/ml betrug. Im nächsten Schritt wurden 150µl 100% Ethanol zur Suspension hinzugegeben und anschließend bei -20 °C für 30 Minuten inkubiert. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt bei Höchstgeschwindigkeit (15000 g) und 4 °C für 15 Minuten, um das RNA-Pellet zu gewinnen. Der Überstand wurde abgesaugt, 500 µl eiskalter 80% Ethanol hinzugefügt, die Suspension kurz gevortext und anschließend erneut bei Höchstgeschwindigkeit und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet bei 55°C für ca. 20 Minuten getrocknet. Danach wurde das Pellet mit 20 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und der RNA-Gehalt mithilfe des Nanodrop Spektralphotometers gemessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### **2.9.3 cDNA Synthese**

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Zunächst wurde die RNA für die weitere Verarbeitung auf

Eis aufgetaut. Die weiteren Substanzen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Elimination der genomischen DNA wurden zunächst 2 µl des gDNA Wipeout Puffers zu 12 µl der RNA gegeben. Die Mischung wurde für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Nun wurde der ‚Reverse Transkriptase Mastermix‘ hergestellt. Dazu wurden je Reaktion 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 4 µl Quantiscript RT Puffer sowie 1 µl RT Primer Mix hinzugefügt. Davon wurden je 6 µl in ein Eppi gegeben. Anschließend wurde die zuvor hergestellte Template RNA hinzugegeben. Die Suspension wurde dann für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend die Reverse Transkriptase durch 3-minütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert. Die cDNA konnte nun direkt für die Durchführung einer Realtime PCR verwendet werden oder für spätere Versuche bei -80 °C gelagert werden.

## **2.10 qPCR**

Alle PCR-Reaktionen wurden in Triplikaten mit einer zusätzlichen Wasserkontrolle in 96-Well-Platten (MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf Eis angesetzt. Pro Reaktion wurden 10 µl ‚Schneller Master Mix‘ (Thermo Fisher Scientific), 1 µl der 18S-VIC Sonde (endogene Kontrolle), 1 µl der Sonde des zu untersuchenden Gens (markiert mit FAM) und je 6 µl Wasser verwendet. Für Details zu den verwendeten Taqman-Sonden siehe Tabelle 3. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl pro Well. Zunächst wurden die 18 µl der Mischung hinzugefügt und dann jeweils 2 µl cDNA bzw. für die Kontrolle 2 µl Wasser. Danach wurde die Platte mit einer qPCR konformen Dichtungsfolie verschlossen und für 2 Minuten bei 1500 g zentrifugiert, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblase auf dem Boden der Platte war. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und folgendem PCR Programm durchgeführt:

Haltephase

Schritt 1: 50 °C für 2 Minuten

Schritt 2: 95 °C für 2 Minuten

Amplifikationsphase: 40 Zyklen

Schritt 3: 95 °C für 3 Sekunden

Schritt 4: 60 °C für 30 Sekunden

Die gewonnenen Daten wurden mit Excel ausgewertet und als relative Expression ( $2^{-dCt}$ ) dargestellt.

**Tabelle 3: Sonden für die PCR Analysen**

Sonde	Farbstoff	Sonden-ID	Hersteller
HAS3	FAM	Hs00193436_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HAS2	FAM	Hs00193435_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HAS1	FAM	Hs04398914_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HYAL1	FAM	Hs00201046_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HYAL2	FAM	Hs00186841_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD44	FAM	Hs01075862_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HMMR	FAM	Hs00234864_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
18S	VIC	Hs99999901_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.11 Immunohistologie

Zur Vorbereitung der Färbung von HA und CD44 in CD8 T-Zellen wurden zunächst in Kammern eingeteilte Objektträger (BD Falcon™, NJ, USA) mit Kollagen (PureCol, Advanced BioMatrix, CA, USA) beschichtet. Dazu wurde die Stammlösung 1:30 in sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt, um eine Kollagen-Konzentration von 100 µg/ml zu erhalten. 250 µl dieser Lösung wurden dann in jede Kammer des Objektträgers pipettiert und dieser für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die nach dieser Zeit verbleibende Flüssigkeit wurde abgesaugt. Für die T-Zellaktivierung wurden nun einige Kammern mit 250 µl einer CD3-Antikörper enthaltenden PBS-Lösung versehen. Die Antikörper-Konzentration betrug 1 µg/ml. Zur Kontrolle wurden einige Kammern nur mit PBS gefüllt. Nach Inkubation der Objektträger über Nacht bei 4°C wurde die verbleibende Flüssigkeit abgesaugt und die Kammern 1x mit PBS gewaschen. Nun wurden pro Kammer 250 µl einer CD8 T-Zellsuspension (Konzentration: 1 Mio Zellen/ml in AIM-V™ Medium) hinzugegeben und für 24h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen für 20 min in einer PBS-Lösung mit 3,7%

Formaldehyd, 5 % Essigsäure und 70% Ethanol bei Raumtemperatur fixiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurde biotinyliertes HA-Bindungsprotein (HAbP) und CD44-Antikörper hinzugefügt und die Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Detektion des HA für 1h mit Cy3-gelabeltem Streptavidin und zur Detektion von CD44 mit einem sekundären AF647-gelabeltem Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden erneut 3x mit PBS gewaschen und die dem Objektträger aufliegenden Kammern entfernt. Im letzten Schritt wurden die Zellkerne durch Zugabe eines Tropfens ROTI®Mount FluorCare gefärbt und die Deckgläschen aufgesetzt. Die mikroskopische Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des Zeiss AxioObserver. Für Details zu den verwendeten Antikörpern und Reagenzien siehe Tabelle 4.

**Tabelle 4: Antikörper und Reagenzien für Immunhistologie**

<b>Produkt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
HAbP	1:375 in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CD44	1:500 in PBS/1% BSA	Abcam, Cambridge, UK
Alexa fluor 647 goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:400 in PBS	Life Technologies, OR, USA
Streptavidin-Cy3	1:400 in PBS	Invitrogen, CA, USA
ROTI®Mount FluorCare	Anwendung unverdünnt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 PBMC-Isolation**

Für die Untersuchung der humanen CD8 T-Zellen wurden zunächst die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Leukozytenkonzentraten („Buffy Coats“, BC) gesunder Blutspender isoliert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde die erforderliche Anzahl Aliquots aufgetaut und die CD8 T-Zellen mithilfe der MACS-Technologie aus den PBMC separiert (siehe Material und Methoden). Dieser Ansatz wurde gewählt, da die CD8 T-Zellen eine relativ kleine Population im Blut darstellen - ca. 20-50 % der Lymphozyten, welche ihrerseits nur ca. 30% der Gesamtleukozyten ausmachen (Quelle: viamedici.thieme.de). Auf

diese Weise wurde gewährleistet, dass für alle Versuche sowie Versuchswiederholungen genügend Zellen isoliert werden konnten. Außerdem war es wichtig, Abweichungen in den Eigenschaften der Zellen, die bei wiederholten Blutabnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht auszuschließen wären, zu vermeiden. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der PBMC-Isolation zusammen.

**Tabelle 5: Isolation von PBMC aus Buffy coats gesunder Blutspender**

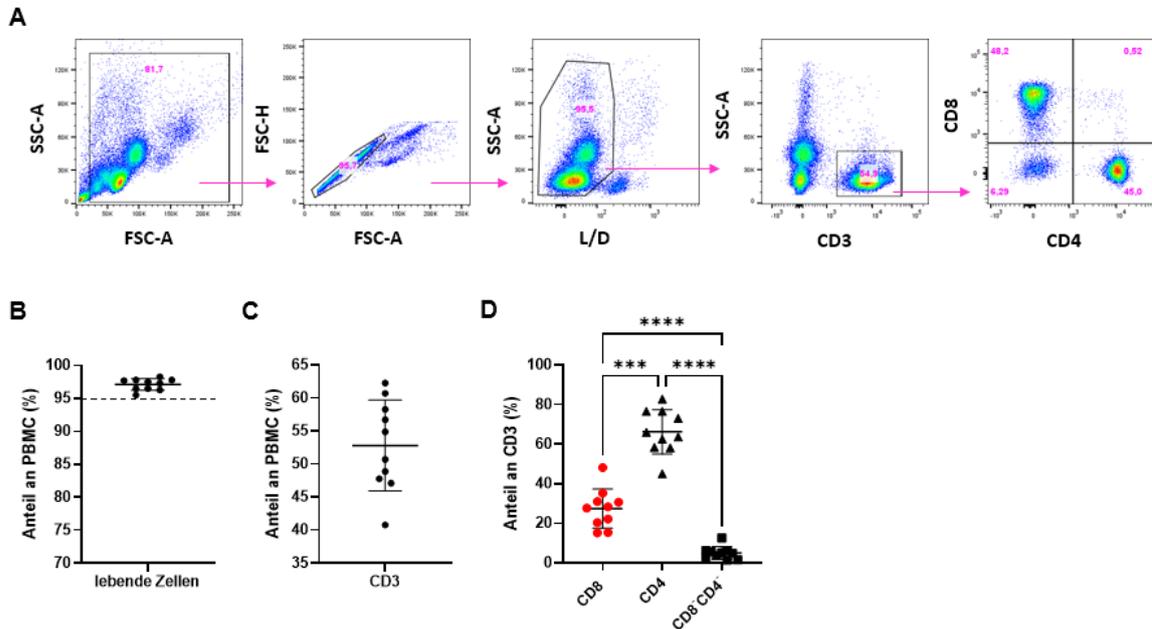
<b>BC-Nr.</b>	<b>BC- ID</b>	<b>Datum</b>	<b>PBMC Ausbeute (Mio)</b>	<b>Aliquots eingefroren</b>
BC9	0005372	02.09.2020	<b>ca. 625</b>	18 x 34,7 Mio
BC10	0005429	04.09.2020	<b>ca. 500</b>	18 x 27,78 Mio
BC11	0005486	07.09.2020	<b>ca. 450</b>	18 x 25 Mio
BC12	0005501	08.09.2020	<b>ca. 615</b>	18 x 34,17 Mio
BC13	0005608	29.09.2020	<b>ca. 670</b>	18 x 37,2 Mio
BC14	0005650	30.09.2020	<b>ca. 575</b>	18 x 31,9 Mio
BC15	0005751	02.10.2020	<b>ca. 660</b>	18 x 36,3 Mio
BC16	0005752	02.10.2020	<b>ca. 435</b>	18 x 24,17 Mio
BC17	0006009	12.10.2020	<b>ca. 525</b>	18 x 29,17 Mio
BC18	0006010	12.10.2020	<b>ca. 555</b>	18 x 30,8 Mio
BC19	0007412	07.12.2020	<b>ca. 560</b>	18 x 31,1 Mio
BC20	1000938	18.02.2021	<b>ca. 650</b>	18 x 36,1 Mio
BC21	1000941	18.02.2021	<b>ca. 640</b>	18 x 35,55 Mio

### **3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung des CD8 T-Zellanteils im peripheren Blut**

Da der Anteil der CD8 T-Zellen beim Menschen erheblich variieren kann, z.B. abhängig vom Alter (24) oder dem Aktivierungsgrad des Immunsystems (25), wurde zu Beginn für jeden Donor der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dazu wurden die PBMC mit Antikörpern gegen die Haupt-T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 inkubiert (siehe auch Material und Methoden).

In Abbildung 2A ist das Gating-Schema zur Bestimmung des CD8 T-Zellanteils im peripheren Blut dargestellt. Abbildung 2B zeigt, dass bei allen Probanden der Anteil lebender Zellen in den aufgetauten PBMC bei über 95% lag. Der durchschnittliche Anteil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen an den PBMC betrug ca. 50%, wobei erhebliche donorabhängige Unterschiede festzustellen waren (40,8- 62,3%) (Abbildung 2C). Die Häufigkeit der CD8-T-Zellen an den Gesamt-T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) lag bei durchschnittlich ca. 27% und war damit signifikant geringer als der Anteil der

CD4-T-Zellen (66,3%). Die CD4/CD8 doppelt negativen Zellen machten durchschnittlich nur ca. 5% der CD3 T-Zellen aus. Diese Ergebnisse zeigten die hohe Qualität der PBMC-Präparationen und gaben Aufschluss über die zu erwartende Zellausbeute bei der CD8 T-Zellisolation.

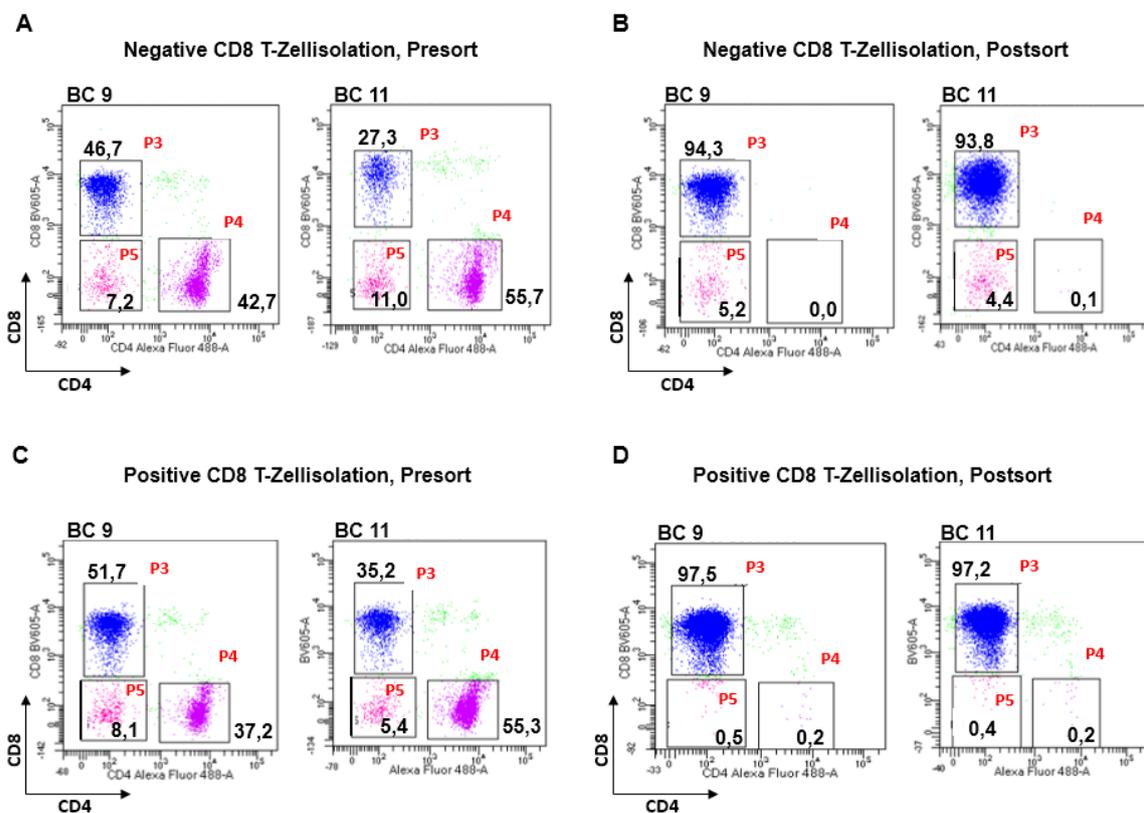


**Abb. 2. Durchflusszytometrische Bestimmung des CD8 T-Zellanteils im peripheren Blut.** PBMC von gesunden Probanden (n = 10) wurden mit einem Zellviabilitätsmarker („Live/Dead“, LD) sowie fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die T-Zellantigene CD3, CD4 und CD8 markiert. Die Anteile der jeweiligen T-Zellpopulationen wurden dann mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. (A) Gating-Schema (B) Anteil lebender Zellen in den aufgetauten PBMC (C) Prozentualer Anteil der CD3 T-Zellen an den PMBC (D) Prozentualer Anteil der CD8, CD4 und CD8/CD4 doppelt negativen (CD8-CD4-) T-Zellen an den CD3 T-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Statistischer Test: One-Way-Anova. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.3 Negative und positive CD8 T-Zellisolation mithilfe der MACS-Technologie

Um die CD8 T-Zellen untersuchen zu können, war eine Zellisolation aus den gewonnenen PBMC nötig. Dafür standen zwei verschiedene Ansätze zur Verfügung, die sogenannte ‚negative‘ und ‚positive‘ Isolation. Zunächst wurde die negative Isolation getestet, eine Methode, bei der alle Zellpopulationen außer den CD8 T-Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert und über eine magnetische Säule aussortiert werden können (siehe auch Material und Methoden). Der Vorteil

dieser Methode ist, dass die isolierten CD8-T-Zellen unmarkiert bleiben und daher die Gefahr einer ungewollten Aktivierung minimiert wird. Abbildung 3A stellt beispielhaft für zwei Probanden (BC9 & BC11) den Anteil der Haupt-T-Zellpopulationen vor der CD8 T-Zellisolation dar (Presort). Die Anteile nach der CD8 T-Zellisolation sind in Abbildung 3B dargestellt (Postsort). Während die Elimination der CD4 T-Zellen (P4) sehr effizient war, reduzierte sich die CD4/CD8 doppelt negative (DN) Zellpopulation (P5) nur von 7,2 % auf 5,2 % (BC9) bzw. von 11,0% auf 4,4 % (BC11). Da diese Zellen nur unzureichend entfernt werden konnten, wurde auch die positive Isolation getestet. Dabei wurden die CD8-Zellen mithilfe eines CD8-Antikörpers selektiert (siehe Material und Methoden). Wie in Abbildungen 3C und 3D dargestellt, betrug der Anteil der CD4/CD8 DN Zellpopulation nach der Isolation nur noch 0,5% (BC9) bzw. 0,2% (BC11). Diese Form der Isolation wurde daher für die qPCR-Experimente gewählt, die eine möglichst hohe Reinheit der CD8 T-Zellen erforderten.



**Abb. 3. Vergleich unterschiedlicher Methoden der CD8- T-Zellisolation.** Die Isolation der CD8-T-Zellen aus PBMC wurde mithilfe der MACS-Technologie durchgeführt. Dabei wurden zwei Methoden, die ‚negative‘ und ‚positive‘ Zellisolation getestet (siehe auch Material und Methoden). Die Effizienz der CD8 T-Zell-Aufreinigung wurde mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des Anteils der CD8 T-Zellen vor und nach der Isolation (Pre- bzw. Postsort) ermittelt. (A,B) Beispielhafte

Darstellung der negativen CD8 T-Zellisolation für zwei Probanden (BC9, BC11). (C, D) Beispielhafte Darstellung der positiven Isolation für zwei Probanden (BC9, BC11). P3 = CD8+T-Zellen, P4 = CD4+ T-Zellen P5 = CD4/CD8 doppelt negative T-Zellen. Die Zahlen geben der Anteil der jeweiligen Zellpopulation in Prozent an.

### **3.4 Expression HA-assoziierter Gene im Zeitverlauf**

In diesem Versuch sollte mithilfe der qPCR untersucht werden, ob humane CD8 T-Zellen HA synthetisieren können, welche HA-Rezeptoren sie exprimieren und ob sie Enzyme für den HA-Abbau produzieren. Dabei war sowohl die basale Genexpression als auch der zeitliche Verlauf nach T-Zellaktivierung von Interesse. Zunächst wurden mittels positiver Isolation CD8 T-Zellen aus PBMC isoliert. Mit Ausnahme der Kontrolle (unstimulierte Zellen, Zeitpunkt 0h) wurden diese dann mit anti-CD3/CD28 Antikörper (jeweils 1 µg/ml) aktiviert und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 12, 24, 48 und 72 h wurden die Zellen abgenommen und wie die unstimulierten Zellen mit Trizol lysiert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression der HA-Synthasen HAS1-3, der Hyaluronidasen HYAL-1 und -2 sowie der HA-Rezeptoren CD44, RHAMM und Layilin mittels qPCR bestimmt (siehe Material und Methoden).

In Abbildung 4A ist das Expressionsmuster von HAS3 dargestellt. Obwohl die HA-Synthase insgesamt sehr schwach exprimiert wurde (Ct-Werte > 30), konnte bereits in den unstimulierten Zellen (Zeitpunkt 0h) eine basale Expression detektiert werden, die nach 6 h Zellaktivierung weiter zunahm und nach 12 h wieder auf basale Werte zurückging. Nach 24 h wurde ein zweiter Peak der Expression erreicht, bevor nach 72 h wieder Werte gemessen wurden, die nur leicht über der basalen Expression lagen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen wurden allerdings nur Trends beobachtet, d.h. keine statistisch signifikanten Änderungen. Interessanterweise wurde HAS 1 gar nicht exprimiert, und HAS 2 war nicht verlässlich detektierbar, lediglich eine Probe zeigte ein sehr schwaches Signal (Daten nicht angegeben).

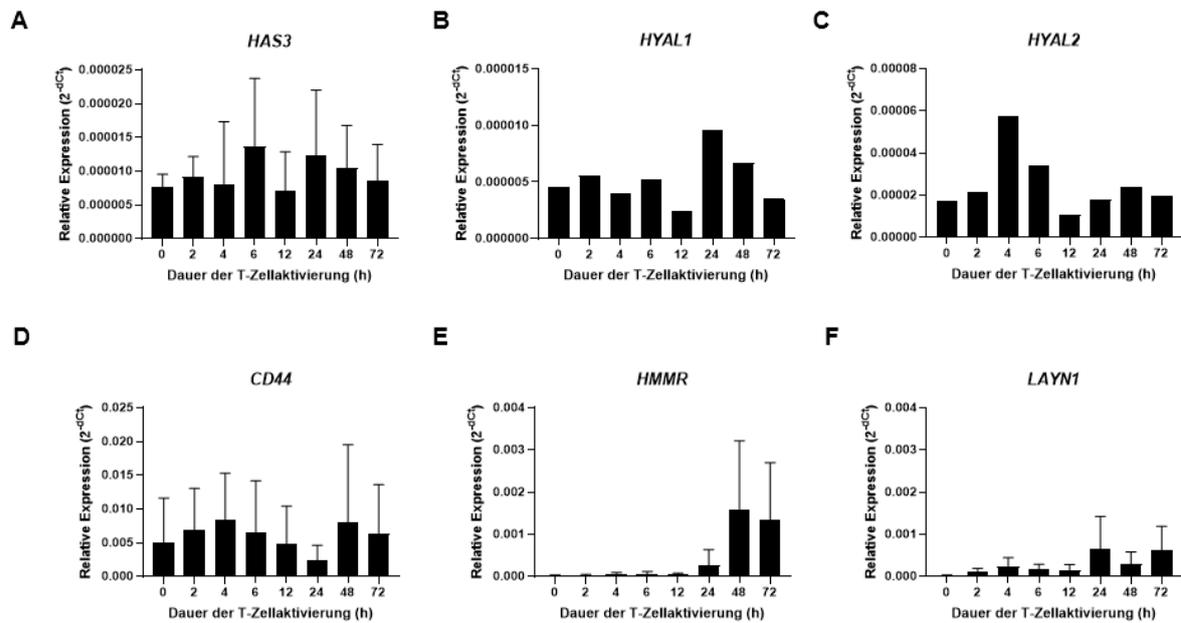
HYAL1 und HYAL2 wurden unterschiedlich stark exprimiert (beachte Skalen in Abb. 4B und 4C) und erreichten die Maxima ihrer Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zellaktivierung. Während die insgesamt deutlich stärker exprimierte HYAL2 mit einem Peak nach 4 h in ihrem Expressionsmuster HAS3

ähnelte, wurde HYAL1 erst nach 24 h heraufreguliert. Zu diesem Zeitpunkt war die HYAL2-Expression wieder deutlich zurückgegangen.

Die HA-Rezeptoren wiesen ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster auf. CD44 (Abb. 4D) wurde deutlich stärker exprimiert als die beiden anderen Rezeptoren HMMR (Abb. 4E) und LAYN1 (Abb. 4F). Bereits basal wurde CD44 exprimiert, dies trifft auf die anderen beiden Rezeptoren nicht zu. Ähnlich wie HAS3 zeigte CD44 eine oszillierende Expression mit Peaks nach 4 und 48 h Aktivierung. Nach 24 h fiel die Expression von CD44 auf Werte unterhalb des Basalwerts, um danach wieder anzusteigen. Sowohl HMMR als auch LAYN1 wurden erst nach 24 h stärker exprimiert, HMMR allerdings insgesamt stärker als LAYN1.

Obwohl insgesamt keine signifikanten Änderungen in der Expression der analysierten Gene festgestellt werden konnten, wurden erhebliche donorabhängige Unterschiede deutlich, die im Appendix, Abbildungen 1A-D dargestellt sind. Z.B. stieg die Expression von HMMR bei 4 von 6 Probanden nach 24 bis 48 h Zellaktivierung stark an und erreichte ihr Maximum nach 48 oder 72h. Dahingegen wurde bei zwei Probanden zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte HMMR-Expression in den CD8 T-Zellen gemessen. Ähnlich stellte es sich auch bei LAYN1 dar: während die meisten Probanden mit einer Heraufregulierung des Rezeptors nach Zellaktivierung reagierten, wurden die Maxima der Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24-72 h) gemessen. Hinsichtlich der Koexpression der untersuchten Gene war auffällig, dass tendenziell die CD8-Zellen der Probanden, die vermehrt HAS3 exprimierten, auch eine höhere CD44-Expression aufwiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HAS3 die dominante HA-Synthase in humanen CD8 T-Zellen ist und durch Zellaktivierung über den TZR heraufreguliert wird. CD8 T-Zellen exprimieren die HA-Rezeptoren CD44, RHAMM und Layilin, wobei die Expressionsmuster deutliche Unterschiede aufweisen. Die Expression von HYAL1 und HYAL2 zeigt, dass CD8 T-Zellen das Potential haben, HA der extrazellulären Matrix abzubauen.



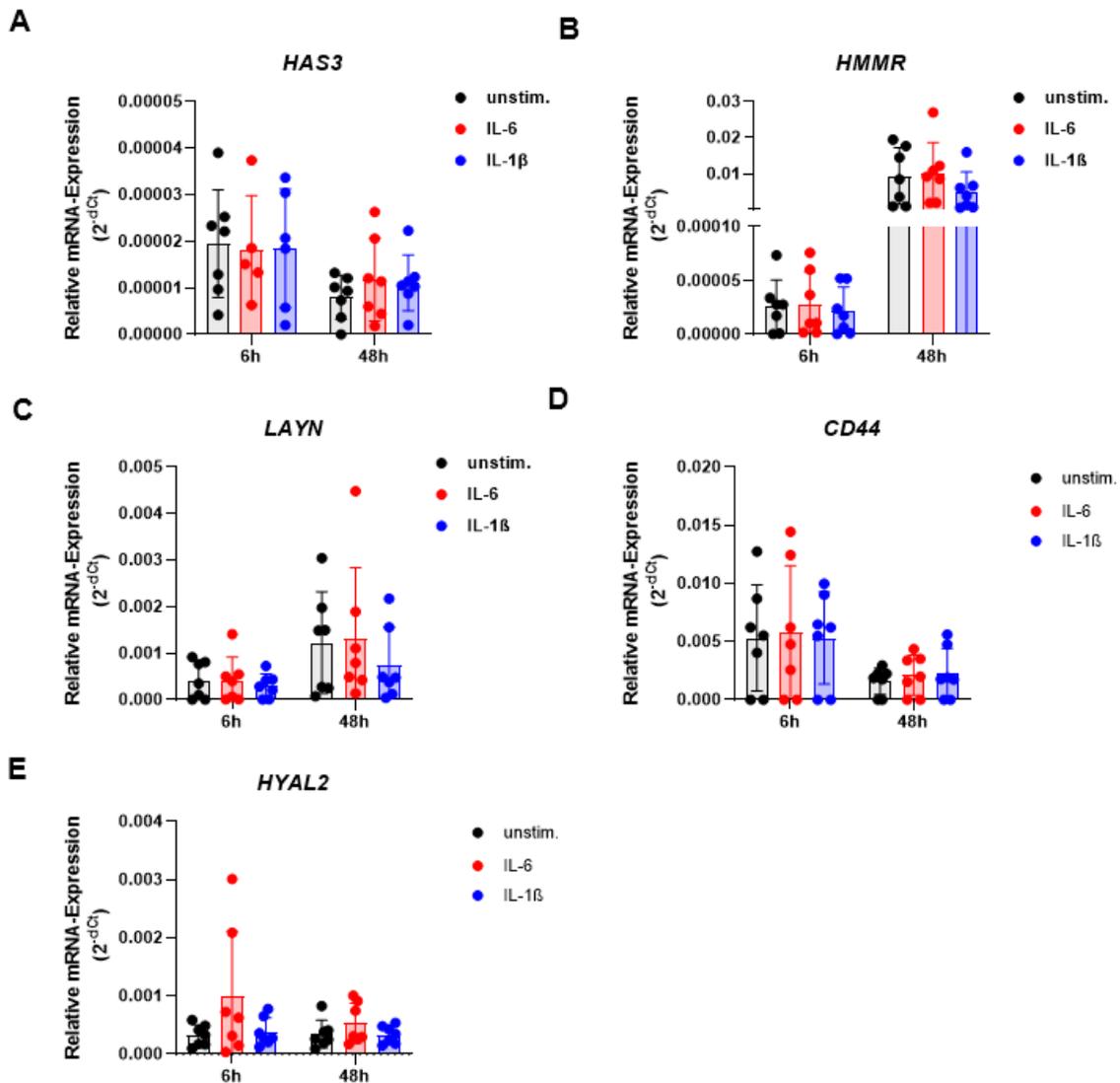
**Abb. 4. Expression HA-assoziiertes Gene im Zeitverlauf.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden mit CD3/CD28-AK (jeweils 1 µg/ml) aktiviert und bis zu 72h bei 37 °C inkubiert (Abnahmezeitpunkte: 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 und 72h). Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression von (A) HAS3, (B) HYAL1, (C) HYAL2, (D) CD44, (E) HMMR und (F) LAYN1 mittels qPCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD der relativen Expression (2<sup>-dCt</sup>). N = 6 für A,D,E,F und n = 2 für B, C. Statistischer Test: One-Way Anova.

### 3.5 Effekt von IL-6 und IL-1β auf die Genexpression funktional assoziierter Gene der HA

Entzündungsreaktionen treten häufig zusammen mit einer verstärkten HA-Akkumulation im betroffenen Gewebe auf (2). Dabei konnte für einige proinflammatorische Zytokine, z.B. Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1β (IL-1β), ein direkter Effekt auf die HA-Synthese nachgewiesen werden (26, 27). Daher sollte in diesem Versuch die Frage beantwortet werden, inwieweit IL-6 und IL-1β die Expression von HAS3 und der weiteren, bereits in 3.4. vorgestellten Gene, beeinflusst.

Aus PBMC-Aliquots isolierte CD8 T-Zellen (n=7) wurden mit anti CD3/CD28 Antikörper (jeweils 1 µg/ml) aktiviert und mit IL-6 (20 ng/ml) oder IL-1β (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten aktivierte Zellen ohne Zugabe von Zytokin. Der Einfluss der Zytokin-Stimulation auf die Genexpression wurde nach 6 und 48 h Inkubationszeit mithilfe der qPCR gemessen.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, führten insgesamt weder IL-6 noch IL-1 $\beta$  zu signifikanten Änderungen der untersuchten Gene. Allerdings waren auch hier-ähnlich wie in den vorhergehenden Versuchen- erhebliche interindividuelle Unterschiede festzustellen (siehe Appendix, Abb. 2). Unabhängig von der Zytokinstimulation war der Hauptfaktor für Änderungen in der Genexpression die Dauer der Inkubationszeit, d.h. die Dauer der Antikörper-induzierten Zellaktivierung. Z.B. war HAS3 nach 48 h herunterreguliert im Vergleich zu 6 h, wobei die Zytokine diese Herunterregulierung tendenziell etwas abschwächten. Die Expression der HA-Rezeptoren änderte sich mit zunehmender Inkubationszeit ebenfalls deutlich. Während RHAMM und Layilin nach 48 h stärker exprimiert waren (Abb. 5B und 5C), wurde CD44 herunterreguliert (Abb. 5D). Die Expression von HYAL2 war nach 6 und 48 h nahezu unverändert. Hier bewirkte IL-6 bei zwei der Probanden eine deutliche Steigerung der Expression nach 6 h (Abb. 5E und Appendix, Abb. 2). Zusammenfassend bestätigen diese Daten den in 3.4. festgestellten Effekt der TZR-induzierten Zellaktivierung und zeigen darüber hinaus, dass auch IL-6 und IL-1 $\beta$  die Expression der analysierten Gene modulieren kann, wenn auch individuell in sehr unterschiedlicher Weise.



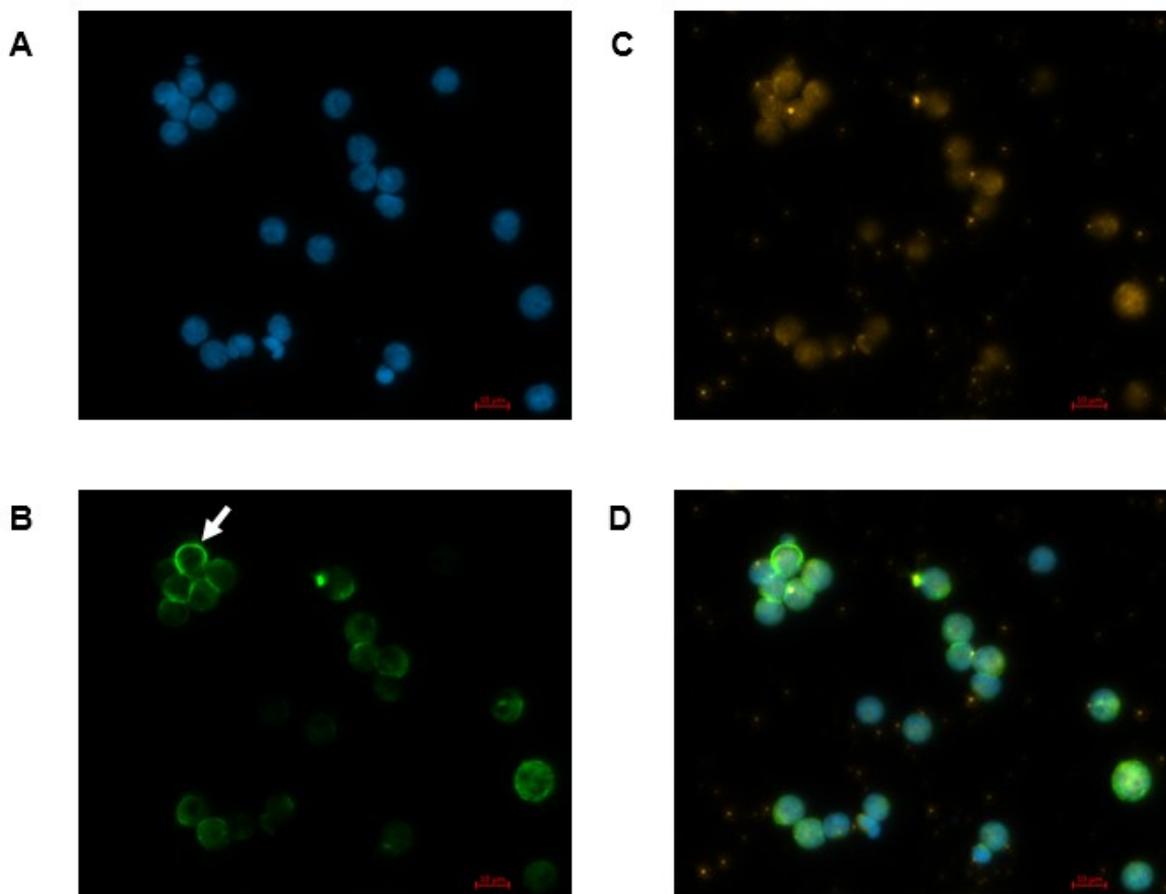
**Abb. 5. Effekt von IL-6 und IL-1 $\beta$  auf die Genexpression funktional assoziierter Gene der HA.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden für 6 oder 48 h mit anti CD3/CD28 Antikörper aktiviert und mit IL-6 (20 ng/ml) oder IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten aktivierte Zellen ohne Zytokinzugabe („unstim.“). Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Genexpression mithilfe der qPCR gemessen. (A) HAS-3 (B) HMMR (C) LAYN (D) CD44 (E) HYAL2. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. N = 7; statistischer Test: One-Way-Anova.

### 3.6 Immunohistologische Färbung von HA und CD44

Nachdem wir gezeigt hatten, dass humane CD8 T-Zellen aufgrund der Expression von HAS-3 das Potential haben, HA zu synthetisieren, war Ziel dieses Versuchs, HA in den T-Zellen anzufärben und zu untersuchen, ob möglicherweise eine Kolo-kalisation mit CD44 vorliegt. Dafür wurden isolierte CD8 T-Zellen auf mit Kollagen-beschichtete Objektträger aufgebracht und mit 1 $\mu$ g/ml CD3-Antikörper für

24h aktiviert. Danach erfolgte die Färbung von HA und CD44 sowie die mikroskopische Auswertung (siehe Material und Methoden).

Abbildung 6A zeigt die mit DAPI gefärbten Zellkerne. In Abbildung 6B ist zu erkennen, dass die meisten, aber nicht alle Zellen, CD44 exprimieren. Die Intensität der Färbung ist unterschiedlich stark und auch die Verteilung des CD44-Proteins erscheint uneinheitlich. Während manche Zellen eine klare Expression auf der Zelloberfläche aufweisen (weißer Pfeil in Abb. 6B), ist CD44 in anderen Zellen deutlich diffuser verteilt. Die Färbung von HA ist eher schwach ausgeprägt, wenn auch in den meisten Zellen klar zu erkennen (Abb. 6C). Die Überlagerung der Einzelfärbungen (Abb. 6D) verdeutlicht, dass die meisten HA-positiven Zellen auch CD44 exprimieren, wobei eine Kolo-kalisation nur teilweise erkennbar ist.



**Abb. 6. Immunohistologische Färbung von HA und CD44.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden auf kollagenbeschichtete Objektträger ausgesät und für 24 Stunden mit anti-CD3 (1 µg/ml) aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit HA-bindendem Protein+ Strep-Cy3 für HA und mit anti-CD44-AF647 für CD44 gefärbt und mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert (A) Färbung des Zellkerns mittels DAPI (B) Färbung von CD44. Der weiße Pfeil deutet auf eine Zelle

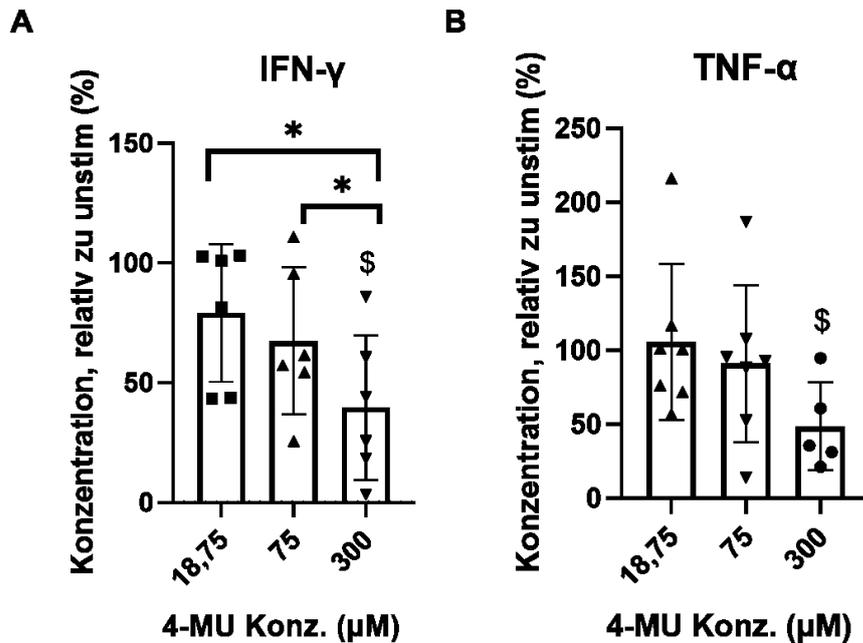
mit ausgeprägter Expression von CD44 auf der Zelloberfläche hin. (C) HA-Färbung. (D) Überlagerung der Färbungen. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ M.

### **3.7 Effekt der HA Inhibition durch 4-MU auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$**

In diesem Versuch sollte der Effekt der 4-MU vermittelten HA-Inhibition auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie der Protease Granzyme B durch CD8 T-Zellen untersucht werden, dies erfolgte per ELISA. Zunächst wurden mittels positiver Isolation CD8 T-Zellen aus PBMC isoliert. Die Zellen wurden mit anti CD3/CD28 Antikörper (jeweils 1  $\mu$ g/ml) für 48 h aktiviert, und mit unterschiedlichen Dosen 4-MU behandelt. Aktivierte, aber nicht mit 4-MU versetzte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 48 h wurden per ELISA die Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Granzyme B in den Zellüberständen gemessen (siehe Material und Methoden).

Abbildung 7 zeigt die relativen Veränderungen der Zytokin-Freisetzung im Vergleich zu der nicht mit 4-MU behandelten Kontrolle. 4-MU führte dosisabhängig sowohl zu einer Reduktion von IFN- $\gamma$  als auch von TNF- $\alpha$  (Abb. 3A und 3B), wobei nur die höchste 4-MU Konzentration (300  $\mu$ M) die Zytokin-Freisetzung signifikant verringerte (für beide Zytokine auf unter 50 %). Betrachtet man die Veränderungen der absoluten Zytokinkonzentrationen (Appendix, Abb. 3), konnte kein signifikanter Effekt von 4-MU festgestellt werden. Dies lag an den großen donorabhängigen Unterschieden in der basalen Zytokinproduktion (ohne 4-MU Behandlung) der CD8 T-Zellen.

Auch für das Granzyme B wurde ein ELISA durchgeführt. Allerdings war die gemessene Absorption deutlich im Sättigungsbereich, so dass keine verlässlichen Konzentrationen berechnet werden konnten (Daten nicht angegeben). Für eine Wiederholung des ELISAs mit verdünnten Proben stand leider nicht mehr ausreichend Zellüberstand zur Verfügung.



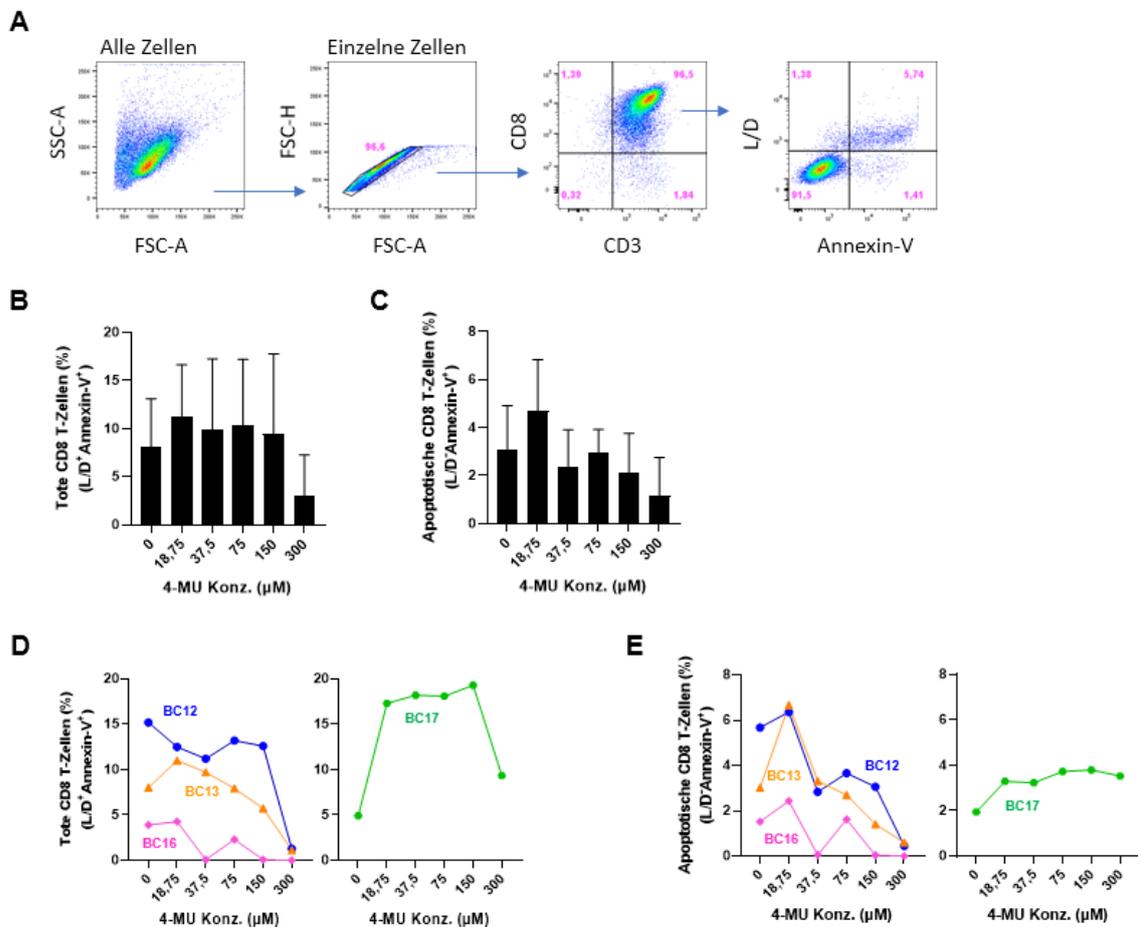
**Abb. 7. Effekt der 4-MU-vermittelten HA-Inhibition auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in CD8-T-Zellen.** CD8 T-Zellen wurden mit anti CD3/CD28 Antikörper für 48 h aktiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen 4-MU behandelt (Kontrolle: unbehandelte Zellen). Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (A) und TNF- $\alpha$  (B) in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD der relativen Abweichungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. N = 7; statistischer Test: One-Way-Anova. \* =  $p < 0,05$ ; \$ =  $p < 0,05$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.8 Einfluss von 4-MU auf die Apoptose

Da Studien gezeigt haben, dass 4-MU in Krebszellen Apoptose induzieren kann (28, 29), sollte in diesem Versuch der Einfluss von 4-MU auf die CD8-T-Zellviabilität untersucht werden. Dafür wurden CD8 T-Zellen mit anti CD3-Antikörper (1  $\mu$ g/ml) aktiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-MU (300  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 37,5  $\mu$ M, 18,75  $\mu$ M, 0  $\mu$ M) für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. An Tag 4 wurde mithilfe der Durchflusszytometrie der Anteil toter (L/D<sup>+</sup>Annexin-V<sup>+</sup>) sowie apoptotischer (L/D<sup>-</sup>Annexin-V<sup>+</sup>) Zellen bestimmt (siehe Material und Methoden).

Abbildung 8A zeigt beispielhaft das Gating-Schema. Wie in den Abbildungen 8B und C zu erkennen, konnte insgesamt kein signifikanter Einfluss von 4-MU auf den Anteil toter oder apoptotischer CD8 T-Zellen festgestellt werden. Allerdings gab es zum Teil deutliche Trends: bei der niedrigsten 4-MU Konzentration (18,75  $\mu$ M) stieg sowohl der Anteil der toten als auch der apoptotischen Zellen zunächst an. Bei den

toten Zellen im Durchschnitt von 8,0 % auf 11,3 %, bei den apoptotischen von 3,0 % auf 4,7%. Dieser Trend setzte sich aber mit steigenden 4-MU Konzentrationen nicht fort, im Gegenteil: Bei höheren 4-MU Konzentration sank vor allem der Anteil apoptotischer Zellen, wobei die höchste Konzentration (300µM) sowohl zu einer Reduktion der toten Zellen (im Mittel 2,94%) als auch der apoptotischen Zellen (im Mittel 1,15%) führte. Die Abbildungen 9D und E stellen separat für jeden Probanden den Einfluss von 4-MU dar. Während bei drei von vier Probanden höhere 4-MU-Konzentrationen eine deutliche Reduktion toter und apoptotischer Zellen bewirkten, hatte 4-MU bei einem Probanden den gegenteiligen Effekt. Dieser ‚Ausreißer‘ führte zu hohen Standardabweichungen, die statistisch signifikante Ergebnisse verhinderten. Insgesamt weisen die Daten aber eher auf anti-apoptotische Eigenschaften von 4-MU in CD8 T-Zellen hin.



**Abb. 8. Effekt von 4-MU auf Zelltod und Apoptose.** CD8 T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 aktiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-MU für 4 Tage inkubiert. An Tag 4 wurde mithilfe der Durchflusszytometrie der Anteil toter (L/D<sup>+</sup>Annexin-V<sup>+</sup>) sowie apoptotischer (L/D<sup>+</sup>Annexin-V<sup>+</sup>) Zellen bestimmt. (A) Gating-Strategie (B) Anteil toter CD8 T-Zellen und (C) Anteil

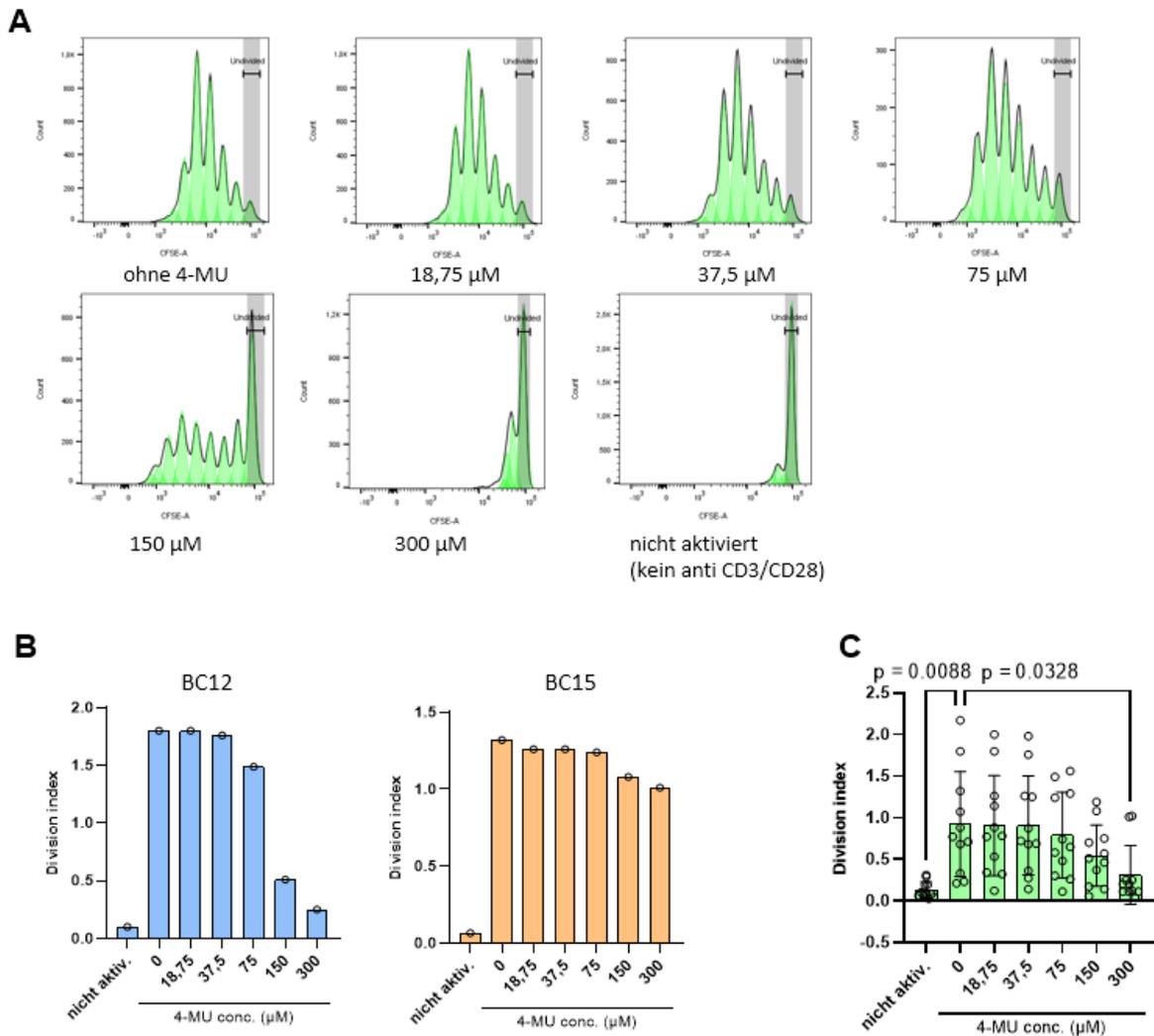
apoptotischer CD8 T-Zellen. N =4 für (B) und (C). Dargestellt ist der Mittelwert + SD. Statistischer Test: One-Way-Anova. (D) Individuelle Darstellung des Effekts von 4-MU auf den Anteil toter sowie (E) apoptotischer CD8 T-Zellen.

### **3.9 Inhibition der CD8-T-Zellproliferation durch 4-MU**

In diesem Versuch sollte der Effekt der 4-MU vermittelten HA-Inhibition auf die T-Zell Proliferation untersucht werden. Zunächst wurden mittels negativer Isolation CD8 T-Zellen aus PBMC isoliert. Diese wurden mit CFSE gelabelt und mit Ausnahme der Kontrolle mit anti-CD3/CD28 Antikörper (jeweils 1 µg/ml) aktiviert. Mit CFSE können Zellen in vitro und in vivo markiert werden, so dass mehrere Zellgenerationen durch Farbstoffverdünnung in der Durchflusszytometrie identifiziert werden können (30). Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-MU versetzt und für 120 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mithilfe der Durchflusszytometrie im Fortessa vermessen (siehe Material und Methoden) und mithilfe des Proliferationsmoduls des FlowJo-Programms analysiert. Dazu wurde der FlowJo Teilungsindex (DI) herangezogen. Der DI ist die durchschnittliche Anzahl der Teilungen für alle Zellen in der ursprünglichen Kultur. Er setzt sich aus der Formel:  $DI = PI \times PF$ , zusammen. Die Vorläuferfrequenz (PF) oder der prozentuale Anteil der sich teilenden Zellen, gibt an, welcher Anteil der ursprünglichen Zellpopulation sich während der Kultur mindestens einmal geteilt hat. Der Proliferationsindex (PI), ist die durchschnittliche Anzahl der Teilungen, die alle reagierenden Zellen seit Beginn der Kultur durchlaufen haben und spiegelt damit die Proliferationsfähigkeit der Zellen wider (30).

Abbildung 9A zeigt beispielhaft die FlowJo-Analyse für die Zellproliferation eines einzelnen Probanden. Jeder Peak repräsentiert eine Zellgeneration, wobei die Höhe mit der Anzahl der Zellen korreliert. Wie erwartet, wurde bei nicht aktivierten Zellen (kein CD3/CD28-Antikörper) nur ein Hauptpeak gemessen, d.h. die Zellen blieben weitestgehend ungeteilt. Aktivierte, jedoch nicht mit 4-MU behandelte Zellen, wiesen dagegen mehrere Peaks auf, d.h. es fanden mehrere Zellteilungen statt. Mit steigenden 4-MU-Konzentration nahm die Höhe und/oder Anzahl der Peaks ab, ein Zeichen für die verminderte Zellproliferation.

Auch in diesem Versuch wurden große donorabhängige Unterschiede festgestellt. Während die Zellen mancher Probanden sehr deutlich und dosisabhängig von 4-MU inhibiert wurden, reagierten die Zellen anderer Probanden kaum auf die HA-Blockade (Abb. 9B). Insgesamt wurde allerdings eine Reduktion der Zellproliferation gemessen, die bei der höchsten 4-MU Konzentration (300  $\mu\text{M}$ ) auch Signifikanz erreichte (Abb. 9C).



**Abb. 9. Inhibition der CD8 T-Zell-Proliferation durch 4-MU.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden mit CFSE gelabelt und mit Ausnahme der Kontrolle mit anti-CD3/CD28 Antikörper (jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aktiviert. Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von 4-MU (300  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 18,75  $\mu\text{M}$ , 0  $\mu\text{M}$ ) wurden die Zellen für 120 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann mithilfe der Durchflusszytometrie vermessen und mit der FlowJo Software analysiert. (A) Beispielhafte Darstellung der FlowJo-Auswertung der CD8 T-Zellproliferation eines einzelnen Probanden. Jeder Peak entspricht einer Zellgeneration, wobei die Höhe mit der Anzahl der Zellen korreliert. Zu erkennen ist, dass nicht aktivierte Zellen nur einen Hauptpeak aufweisen, d.h. sich nicht oder nur minimal geteilt haben. Dahingegen zeigen die aktivierten Zellen ohne 4-MU-Behandlung

mehrere Peaks, die auf Zellteilungen hinweisen. Mit steigenden 4-MU-Dosierungen nimmt die Höhe und/oder die Anzahl der Peaks ab, was die abgeschwächte Zellproliferation widerspiegelt. (B) Gegenüberstellung eines gut auf 4-MU ansprechenden Probanden (BC12) und eines schlecht auf 4-MU ansprechenden Probanden (BC15) (C) Zusammenfassende Darstellung der CD8-T-Zellproliferation aller Probanden bei unterschiedlichen Dosen 4-MU. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. N = 11; statistischer Test: One-Way-Anova.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane CD8 T-Zellen durch Expression von HAS3 HA synthetisieren können. Außerdem exprimieren sie zu unterschiedlichen Anteilen und abhängig von ihrer Aktivierung über den T-Zellrezeptor die HA-Rezeptoren CD44, RHAMM und Layilin. Weiter wird die Expression von HAS3, HA-Rezeptoren und Hyaluronidasen bei den meisten Probanden durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  moduliert. CD8 T-Zellen können HA abbauen, da sie eigene Hyaluronidasen bilden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass 4-MU zu einer Hemmung der CD8-T-Zellproliferation führt sowie zu einer verringerten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ .

### 4.1 HA-Synthasen und Hyaluronidasen

Vorherige Arbeiten aus unserem Institut zeigten bereits, dass auch in der Maus sowie bei CD3 T-Zellen von STEMI Patienten HAS3 die am stärksten exprimierte HA-Synthase ist (3). Dies bestätigte sich auch in unseren Untersuchungen für humane CD8 T-Zellen. Dabei gab es trotz individuell sehr variabler HAS3 mRNA Expression keine Anzeichen für eine kompensatorische Expression anderer HAS Isoformen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter bestimmten Bedingungen bzw. individuell abhängig HAS2 in CD8 T-Zellen exprimiert wird. Auffällig war, dass einer der Probanden, der eine hohe HAS3 Expression zeigte, auch HAS2 exprimierte. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein, die ebenfalls in einzelnen Fällen auf HAS2-Expression in humanen T-Zellen hindeuteten (3). Warum die Expression von HAS2 nur sporadisch auftritt, ist unklar. Eine Erklärung könnten erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine sein, denen die T-Zellen einiger Probanden möglicherweise *in vivo* ausgesetzt waren. Z.B. ist gezeigt worden, dass IL-1 $\beta$  und

TNF- $\alpha$  HAS2 mRNA über Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges induzieren (31). Auch IL-6 ist mit der Regulation von HAS2 assoziiert worden, wenn auch in kardialen Fibroblasten (27).

Eine weitere Ursache für HAS2-Expression in CD8 T-Zellen könnte auch ein Mechanismus sein, der in einer neueren Studie als HAS Isoform-,*Switching*' bezeichnet wird: In einem Mausmodell des Typ-1-Diabetes wurde beobachtet, dass autoreaktive T-Zellen *in vitro* zunächst hauptsächlich HAS3 exprimierten, aber nach Transfer in die Maus und Infiltration in die Bauchspeicheldrüse HAS1 und HAS2 heraufregulierten, während HAS3 schwächer exprimiert wurde (32). Da T-Zellen zwischen Gewebe und Peripherie zirkulieren können (33), ist es denkbar, dass auch in den Blutproben unserer Probanden T-Zellen vorhanden waren, die aus entzündetem Gewebe stammten und einen ‚*Switch*‘ der HAS-Expression vollzogen hatten. Um dies beim Menschen näher zu untersuchen, wäre ein Vergleich der HAS-Expression von T-Zellen aus der Zirkulation mit solchen aus Gewebe hilfreich. Eine Erkrankung, für die sich derartige Analysen aufgrund der Zugänglichkeit des Gewebes anbieten würden, ist die Psoriasis. Hier wurde bereits die Akkumulation pathogener CD8 T-Zellen in der Epidermis entzündlicher Läsionen gezeigt (34).

Generell waren große donorabhängige Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene festzustellen, sowohl basal als auch nach *in vitro*-Aktivierung der CD8 T-Zellen durch Antikörper oder die Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$ . Als Ursachen kommen sowohl äußere Einflüsse als auch genetische Faktoren infrage (siehe auch 4.3). Obwohl Blut von ‚gesunden‘ Spendern verwendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Probanden zum Zeitpunkt der Blutspende asymptomatisch erkrankt waren und damit eine besondere Aktivierung ihres Immunsystems aufwiesen. Virale Infektionen oder auch chronisch entzündliche Erkrankungen führen zu erhöhter Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  oder auch IFN- $\gamma$  (35), deren regulatorische Funktion ja schon beispielhaft erwähnt wurde. Aber nicht nur HAS2, sondern auch HAS3 und die Hyaluronidasen werden durch Zytokine moduliert. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren z.B. HAS3 mRNA in Fibroblasten (36, 37) und HYAL mRNA in Chondrozyten und Epithelzellen (38, 39). Wenngleich TNF- $\alpha$  in dieser Arbeit nicht verwendet wurde, konnte der Effekt von IL-1 $\beta$  in einigen Probanden bestätigt werden. Außerdem wurden in Einzelfällen HAS3 und auch HYAL2 durch IL-6 induziert.

## 4.2 HA-Rezeptoren

Die HA-Rezeptoren CD44, RHAMM und Layilin wurden in den CD8-Zellen aller Probanden verlässlich detektiert, zeigten jedoch im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Expressionsmuster. Während CD44 mRNA schon früh nach Zellaktivierung (4-6h) heraufreguliert wurde und damit dem Verlauf der HAS3-Expression ähnelte, wurden Layilin und RHAMM zunächst kaum exprimiert und erst nach 48 h deutlich induziert. Die Korrelation zwischen HAS3 und CD44-Expression stimmt mit unserer früheren Beobachtung überein, dass murine *Has3* defiziente T-Zellen nicht nur weniger HA, sondern auch signifikant weniger CD44-Protein auf der Zelloberfläche aufwiesen als *Has3* kompetente Wildtyp-Zellen (3). Eine Reihe muriner Studien belegt die Bedeutung von CD44 und HA für die T-Zell-Funktion: Zum einen ist CD44 entscheidend für die Extravasation von T-Zellen durch das Endothel der Blutkapillaren in das umliegende Gewebe (40), zum anderen ist es auch ein Aktivierungsmarker für T-Zellen und reguliert die Entwicklung von Subtypen der CD4 Helferzellen (41, 42). Damit überein stimmen Studien aus unserer und anderen Arbeitsgruppen, die zeigen, dass auch HA für die Aktivierung und Polarisation von CD4 T-Zellen wichtig ist (3, 43, 44).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass dieser Zusammenhang zwischen HA und CD44 auch in humanen CD8 T-Zellen besteht. Dabei ist eine noch offene Frage, ob auch die Blockade des CD44 Signalweges, z.B. durch neutralisierende CD44-Antikörper, einen ähnlichen Effekt hätte wie die 4-MU vermittelte HA- Inhibition. Zumindest eine Studie lässt dies vermuten: In einem Mausmodell der lymphozytären Choriomeningitis zeigten CD44 defiziente, antigen-spezifische CD8 T-Zellen eine deutlich verminderte Expansion (45).

Im Gegensatz zu CD44 stieg die Expression von RHAMM erst nach 48 h Zellaktivierung an. Wie an der veränderten Zellform erkennbar, fiel dieser Zeitpunkt mit dem Einsetzen der T-Zellproliferation zusammen. Ein Zusammenhang zwischen RHAMM und Zellproliferation wurde bereits in verschiedenen Krebszelllinien (41, 42), in der Angiogenese (46) sowie in hämatopoetischen Stammzellen (47) nachgewiesen. Zudem deuten laufende Arbeiten aus unserem Labor mit RHAMM defizienten und RHAMM überexprimierenden Mäusen ebenfalls auf eine Funktion dieses HA-Rezeptors für die Zellproliferation hin (unveröffentlichte Daten). Die

Isolation und vergleichende Analyse der CD8 T-Zellen aus diesen Tieren wäre ein Ansatz, um die Rolle von RHAMM in CD8 T-Zellen näher zu untersuchen.

Die Expression von Layilin war schwächer ausgeprägt als die von RHAMM und CD44, stieg aber auch mit andauernder Aktivierung der Zellen. Ein Grund für die insgesamt geringe Expression könnte sein, dass Layilin möglicherweise nur in einem Subtyp der CD8 T-Zellen vorkommt. Einen Hinweis darauf liefert eine Studie, in der Layilin bevorzugt und in hohem Maße in CD4 regulatorischen T-Zellen (Tregs) der Haut detektiert wurde (12). CD4 Tregs spielen eine wichtige Rolle bei der Auflösung von Immunreaktionen, indem sie andere Immunzellen, z.B. proinflammatorische Th1-Zellen, hemmen (48). Interessanterweise war die Expression von Layilin mit einer verminderten *in vivo* Funktion der Tregs assoziiert (12). Auch innerhalb der CD8 T-Zellen sind regulatorische Subpopulationen identifiziert worden, wobei humane regulatorische CD8 T-Zellen häufig als CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> charakterisiert werden (48). Inwieweit die Interaktion von Layilin mit HA für die Funktion der CD8 T-Zellen von Bedeutung ist, ist nicht bekannt. Erste Einblicke dazu könnten *in vitro*-Experimente geben, in denen Layilin positive und negative CD8 T-Zellen nach HA-Stimulation analysiert werden.

#### **4.3 Bedeutung von Genvarianten für die Genexpression**

Auch wenn genetische Variation in dieser Arbeit nicht erfasst wurde, so soll doch auf eine mögliche Beteiligung genetischer Polymorphismen an der heterogenen Expression der untersuchten Gene hingewiesen werden. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) sind in verschiedensten Genen von Zytokin-Signalwegen oder auch dem TZR- Signalweg nachgewiesen und beeinflussen die Expression ihrer Zielgene. Beispiele hierfür sind Variationen im IL-6 Rezeptor (49) oder auch in Komponenten des IL-2 Signalweges (50). IL-2 ist ein Zytokin, das nach T-Zellaktivierung (z.B. nach anti CD3/CD28 Stimulation wie in dieser Arbeit) von den T-Zellen produziert wird und für deren Überleben und Proliferation essenziell ist (50). Die Expressionsstärke der Gene, die durch IL-2 (oder auch IL-6) induziert werden, hängt damit auch von der genetischen Variation in Komponenten der entsprechenden Signalwege ab. Weiterführende Studien mit Probanden, die für solche Polymorphismen genotypisiert werden, könnten

Aufschluss über den Anteil genetischer Variation an der Expression der von uns untersuchten Gene geben.

#### **4.4 Der Effekt von 4-MU auf Zellproliferation, Apoptose und Zytokinproduktion**

4-MU wird bereits pharmakologisch, z.B. bei Gallenproblemen, als Spasmolytikum eingesetzt. Außerdem hemmt 4-MU sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die HA-Produktion in verschiedenen Zell- und Gewebetypen (7, 51). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass 4-MU die Proliferation von murinen CD3 T-Zellen dosisabhängig inhibiert, wobei der Anteil apoptotischer Zellen auch bei höheren Dosen unverändert blieb (52). Letzteres war in unserer Studie uneindeutig: Zwar ergab sich im Mittelwert keine signifikante Änderung der Apoptose, allerdings waren erhebliche donorabhängige Unterschiede zu beobachten. Tendenziell nahm der Prozentsatz apoptotischer CD8 T-Zellen mit steigender 4-MU-Konzentration ab. Dies war insofern überraschend, als dass 4-MU in verschiedenen Krebszellen Apoptose-induzierende Eigenschaften zugeschrieben werden (28, 29). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass 4-MU in T-Zellen, die *in vitro* über den TZR aktiviert wurden, zu einer Abschwächung des sog. ‚aktivierungsinduzierten Zelltod‘ (*Activation-induced cell death* AICD) führt. Dieses Phänomen bezeichnet einen wichtigen immunologischen Vorgang, der dafür sorgt, dass aktivierte T-Zellen nach dem Gipfel einer Immunantwort wieder eliminiert werden (53). Da HA für die vollständige T-Zellaktivierung wichtig ist (5, 44, 52), ist es plausibel, dass die Blockade der HA-Synthese durch 4-MU das Aktivierungspotential der CD8 T-Zellen und damit das Ausmaß des AICD verringert. Für eine insgesamt reduzierte Zellaktivierung nach 4-MU-Behandlung spricht auch die verminderte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN - $\gamma$ .

#### **4.5 Limitationen und Ausblick**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern neue Einblicke in das Potential humaner CD8 T-Zellen, mit extrazellulärer Matrix zu interagieren und tragen damit dazu bei, die Funktionsweise dieses Zelltyps besser zu verstehen. Eine der Limitationen der Arbeit besteht in der ausschließlichen Verwendung von Blutproben von gesunden Spendern. Dies war dem Umstand geschuldet, dass nur mithilfe der

bei einer Blutspende anfallenden Leukozytenkonzentrate eine ausreichende Menge an CD8 T-Zellen isoliert werden konnte, um die funktionalen Assays durchzuführen und zu wiederholen. Weiterhin ist zu erwähnen, dass keine Möglichkeit bestand, weitere Daten von den Probanden wie z.B. Alter, Geschlecht oder Blutbild zu erfassen, so dass potenzielle Korrelationen zwischen den Ergebnissen und diesen Parametern nicht festgestellt werden konnten. Eine weitere Limitation war die Notwendigkeit, sich auf die Analyse einer begrenzten Anzahl an Genen zu beschränken, da eine globale Erfassung der Genexpression, z.B. mithilfe der RNA-Sequenzierung, den vorgegebenen zeitlichen Rahmen der Arbeit gesprengt hätte. Schließlich ist zu bemerken, dass die Ergebnisse gezeigt haben, dass aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität die Anzahl der untersuchten Probanden oftmals zu gering war, um statistisch signifikante Unterschiede zu detektieren. Daher ist diese Arbeit als Pilotstudie zu betrachten, die neue Hinweise auf die Funktionsweise humaner CD8 T-Zellen aufgrund von Wechselwirkung mit extrazellulärer Matrix gibt. Ein Ansatzpunkt für weitere Studien wäre die verminderte Zellproliferation und Zytokinproduktion aufgrund der 4-MU induzierten Blockade der HA-Synthese. Viele entzündliche oder autoimmun-vermittelte Erkrankungen sind durch überschießende CD8- T-Zellantworten gekennzeichnet (54), so dass eine Abschwächung dieser Reaktion durch eine Inhibition der HA-Produktion möglicherweise zum Heilungsprozess beitragen würde. Genauso denkbar ist, dass eine Blockade der HA-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion die pathologische Funktion der CD8 T-Zellen einschränkt. Um dies genauer zu untersuchen, wären Studien mit neutralisierenden Antikörpern gegen CD44, RHAMM oder Layilin hilfreich. Ebenfalls interessant ist die Frage, ob die Inhibition der Hyaluronidasen zu einer verminderten Proliferation oder Migration der CD8 T-Zellen führen würde, ähnlich wie es für andere Zelltypen bereits beschrieben wurde (55). Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen damit als Grundlage für weiterführende Studien, die möglicherweise auch zu neuen therapeutischen Ansätzen zur Modulation pathogener CD8-T-Zellantworten führen können.

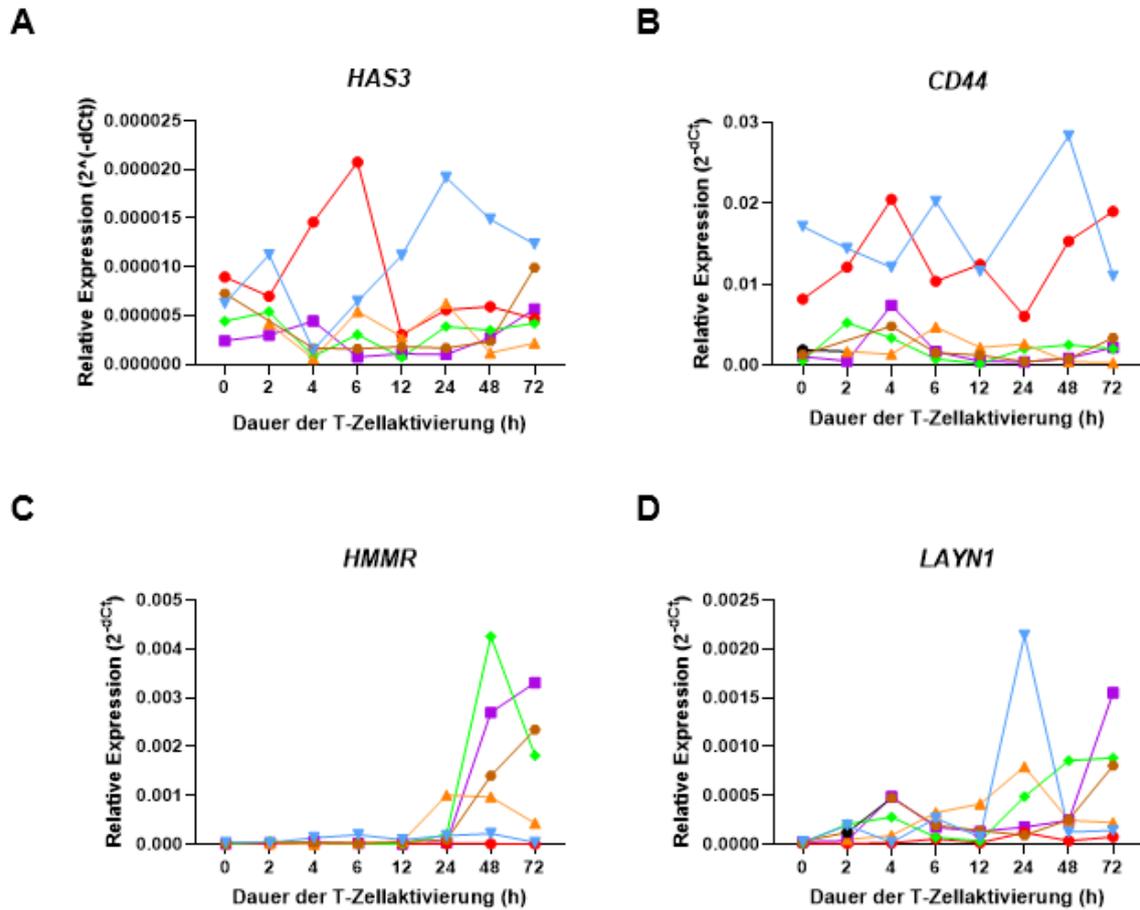
## 5. Literaturverzeichnis

1. Grandoch M, Bollyky PL, Fischer JW. Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation. *Circ Res.* 2018;122(10):1341-3.
2. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(1):221-64.
3. Piroth M, Gorski DJ, Hundhausen C, Petz A, Gorressen S, Semmler D, et al. Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response. *Matrix Biol.* 2022;112:116-31.
4. Chang MY, Chan CK, Braun KR, Green PS, O'Brien KD, Chait A, et al. Monocyte-to-macrophage differentiation: synthesis and secretion of a complex extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2012;287(17):14122-35.
5. Mummert ME, Mummert D, Edelbaum D, Hui F, Matsue H, Takashima A. Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation. *J Immunol.* 2002;169(8):4322-31.
6. Hartmann F, Gorski DJ, Newman AAC, Homann S, Petz A, Owsiany KM, et al. SMC-Derived Hyaluronan Modulates Vascular SMC Phenotype in Murine Atherosclerosis. *Circ Res.* 2021;129(11):992-1005.
7. Nagy N, Kuipers HF, Frymoyer AR, Ishak HD, Bollyky JB, Wight TN, et al. 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol.* 2015;6:123.
8. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009;8(3):208-20.
9. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, et al. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol.* 1992;117(6):1343-50.
10. Jackson DG. Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol.* 2019;78-79:219-35.
11. Bono P, Rubin K, Higgins JM, Hynes RO. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell.* 2001;12(4):891-900.
12. Mehta P, Gouirand V, Boda DP, Zhang J, Gearty SV, Zirak B, et al. Layilin Anchors Regulatory T Cells in Skin. *J Immunol.* 2021;207(7):1763-75.
13. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22466-70.
14. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006;106(3):818-39.
15. Irie F, Tobisawa Y, Murao A, Yamamoto H, Ohyama C, Yamaguchi Y. The cell surface hyaluronidase TMEM2 regulates cell adhesion and migration via degradation of hyaluronan at focal adhesion sites. *J Biol Chem.* 2021;296:100481.
16. Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnhold J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules.* 2006;7(3):659-68.
17. Bogdani M, Johnson PY, Potter-Perigo S, Nagy N, Day AJ, Bollyky PL, et al. Hyaluronan and hyaluronan-binding proteins accumulate in both human type 1 diabetic islets and lymphoid tissues and associate with inflammatory cells in insulinitis. *Diabetes.* 2014;63(8):2727-43.
18. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation. *Matrix Biol.* 2019;78-79:314-23.
19. Tammi R, Paukkonen K, Wang C, Horsmanheimo M, Tammi M. Hyaluronan and CD44 in psoriatic skin. Intense staining for hyaluronan on dermal capillary loops and reduced expression of CD44 and hyaluronan in keratinocyte-leukocyte interfaces. *Arch Dermatol Res.* 1994;286(1):21-9.
20. Petz A, Grandoch M, Gorski DJ, Abrams M, Piroth M, Schneckmann R, et al. Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res.* 2019;124(10):1433-47.

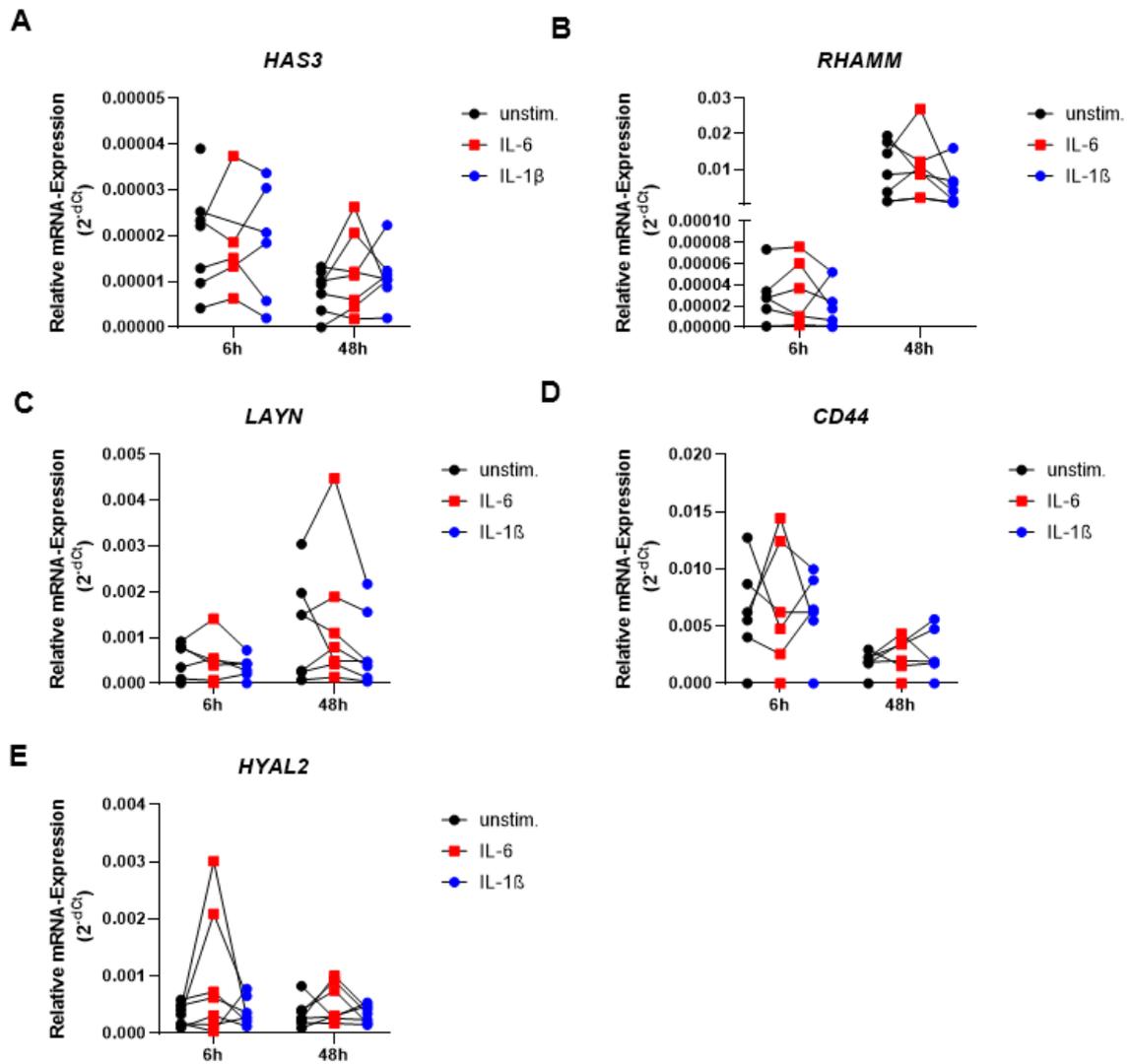
21. Nagy N, Kuipers HF, Marshall PL, Wang E, Kaber G, Bollyky PL. Hyaluronan in immune dysregulation and autoimmune diseases. *Matrix Biol.* 2019;78-79:292-313.
22. Hashimoto M, Im SJ, Araki K, Ahmed R. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(1).
23. Maeshima N, Poon GF, Dosanjh M, Felberg J, Lee SS, Cross JL, et al. Hyaluronan binding identifies the most proliferative activated and memory T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(4):1108-19.
24. Li M, Yao D, Zeng X, Kasakovski D, Zhang Y, Chen S, et al. Age related human T cell subset evolution and senescence. *Immun Ageing.* 2019;16:24.
25. Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol.* 2003;171(10):5165-71.
26. Meran S, Martin J, Luo DD, Steadman R, Phillips A. Interleukin-1beta induces hyaluronan and CD44-dependent cell protrusions that facilitate fibroblast-monocyte binding. *Am J Pathol.* 2013;182(6):2223-40.
27. Muller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, et al. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(6):440.
28. Pibuel MA, Diaz M, Molinari Y, Poodts D, Silvestroff L, Lompartia SL, et al. 4-Methylumbelliferone as a potent and selective antitumor drug on a glioblastoma model. *Glycobiology.* 2021;31(1):29-43.
29. Karalis TT, Heldin P, Vynios DH, Neill T, Buraschi S, Iozzo RV, et al. Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: Regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors. *Matrix Biol.* 2019;78-79:118-38.
30. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A.* 2011;79(2):95-101.
31. Vignetti D, Genasetti A, Karousou E, Viola M, Moretto P, Clerici M, et al. Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24639-45.
32. Gebe JA, Gooden MD, Workman G, Nagy N, Bollyky PL, Wight TN, et al. Modulation of hyaluronan synthases and involvement of T cell-derived hyaluronan in autoimmune responses to transplanted islets. *Matrix Biol Plus.* 2021;9:100052.
33. Piconese S, Campello S, Natalini A. Recirculation and Residency of T Cells and Tregs: Lessons Learnt in Anacapri. *Front Immunol.* 2020;11:682.
34. Di Meglio P, Villanova F, Navarini AA, Mylonas A, Tosi I, Nestle FO, et al. Targeting CD8(+) T cells prevents psoriasis development. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):274-6 e6.
35. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):118-27.
36. Ijuin C, Ohno S, Tanimoto K, Honda K, Tanne K. Regulation of hyaluronan synthase gene expression in human periodontal ligament cells by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interferon-gamma. *Arch Oral Biol.* 2001;46(8):767-72.
37. Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, Yager DR. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg.* 2000;35(6):874-9.
38. Monzon ME, Manzanares D, Schmid N, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM. Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(3):289-95.
39. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251(3):824-9.
40. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science.* 1997;278(5338):672-5.

41. Baaten BJ, Li CR, Bradley LM. Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol.* 2010;3(6):508-12.
42. Schumann J, Stanko K, Schliesser U, Appelt C, Sawitzki B. Differences in CD44 Surface Expression Levels and Function Discriminates IL-17 and IFN-gamma Producing Helper T Cells. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132479.
43. Bollyky PL, Evanko SP, Wu RP, Potter-Perigo S, Long SA, Kinsella B, et al. Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(3):211-20.
44. Kuipers HF, Rieck M, Gurevich I, Nagy N, Butte MJ, Negrin RS, et al. Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):1339-44.
45. Graham VA, Marzo AL, Tough DF. A role for CD44 in T cell development and function during direct competition between CD44+ and CD44- cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(4):925-34.
46. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36770-8.
47. Snauwaert S, Vanhee S, Goetgeluk G, Verstichel G, Van Caeneghem Y, Velghe I, et al. RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2012;97(10):1539-47.
48. Rocamora-Reverte L, Melzer FL, Wurzner R, Weinberger B. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging. *Front Immunol.* 2020;11:616949.
49. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JM, Rainbow DB, Smyth DJ, et al. Functional IL6R 358Aa allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003444.
50. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:411-33.
51. Nagy N, Gurevich I, Kuipers HF, Ruppert SM, Marshall PL, Xie BJ, et al. 4-Methylumbelliferyl glucuronide contributes to hyaluronan synthesis inhibition. *J Biol Chem.* 2019;294(19):7864-77.
52. Mahaffey CL, Mummert ME. Hyaluronan synthesis is required for IL-2-mediated T cell proliferation. *J Immunol.* 2007;179(12):8191-9.
53. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev.* 2003;193:70-81.
54. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):235.
55. Kohi S, Sato N, Koga A, Hirata K, Harunari E, Igarashi Y. Hyaluromycin, a Novel Hyaluronidase Inhibitor, Attenuates Pancreatic Cancer Cell Migration and Proliferation. *J Oncol.* 2016;2016:9063087.

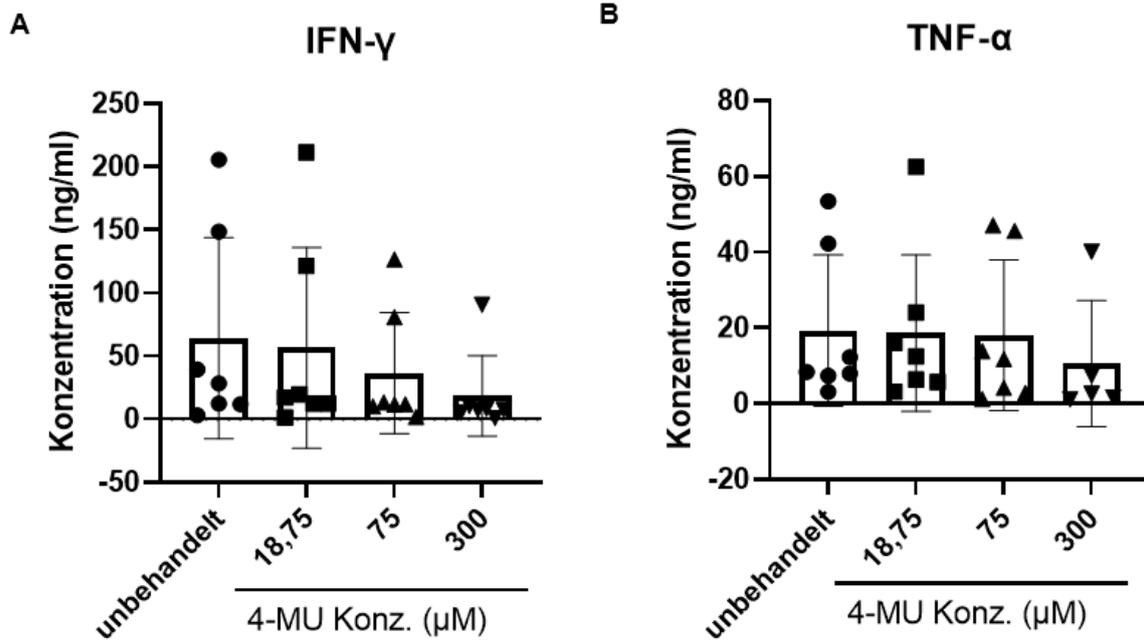
## 6. Appendix



**Appendix Abb. 1. Donorabhängige Expression HA-assoziiierter Gene im Zeitverlauf.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden mit CD3/CD28-AK (jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aktiviert und bis zu 72h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Abnahmezeitpunkte: 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 und 72h). Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression von (A) HAS3, (B) CD44, (C) HMMR und (D) LAYN1 mittels qPCR bestimmt. Gleiche Farben repräsentieren denselben Probanden, n = 6.



**Appendix Abb. 2. Effekt von IL-6 und IL-1 $\beta$  auf die Genexpression funktional assoziierter Gene der HA.** Aus PBMC isolierte CD8 T-Zellen wurden für 6 oder 48 h mit anti CD3/CD28 Antikörper aktiviert und mit IL-6 (20 ng/ml) oder IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten aktivierte Zellen ohne Zytokinzugabe („unstim.“). Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Genexpression mithilfe der qPCR gemessen. (A) HAS-3 (B) HMMR (C) LAYN (D) CD44 (E) HYAL2. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. N = 7; statistischer Test: One-Way-Anova.



**Appendix Abb. 3. Effekt der 4-MU-vermittelten HA-Inhibition auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in CD8-T-Zellen.** CD8 T-Zellen wurden mit anti CD3/CD28 Antikörper für 48 h aktiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen 4-MU behandelt (Kontrolle: unbehandelte Zellen). Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (A) und TNF- $\alpha$  (B) in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. N = 7; statistischer Test: One-Way-Anova.

## 7. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Jens W. Fischer für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können. Mein zweiter riesengroßer Dank gilt Dr. Christian Hundhausen, der meine unmittelbare Betreuung übernommen hat. Seine fachliche Anleitung im Labor, aber vor allem auch sein Weitblick in der Projektplanung haben diese Arbeit erst ermöglicht. Vielen Dank für die Hilfe, das stets offene Ohr und die teilweise benötigte Geduld. Bei Herrn Professor Dr. Norbert Gerdes möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme der Co-Betreuung bedanken. Bei Petra Pieres bedanke ich mich für die organisatorischen Hilfen.

Abschließend möchte ich auch meinem persönlichen Umfeld einen Dank aussprechen. Meiner Mutter Rita Schlebes möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich glaubt und mir mit viel Liebe in jeder Lebenslage beisteht. Abschließend geht der größte Dank an Tim Hülzevoort, der mich durch die zum Teil schwierigen Zeiten des Studiums und jetzt auch der Promotion begleitet hat. Danke für die viele Geduld und deine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenssituationen.