

Beurteilung des bioenergetischen Status von T-Zellen und der Reserve-Atmungskapazität mittels extrazellulärer Flussanalytik

Autoren

Jessica Walls und
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Das Agilent Seahorse XF T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kit ist eine robuste Lösung für die umfassende Beurteilung des T-Zell-Metabolismus in Echtzeit. Der Metabolismus hat sich als ein entscheidender Faktor für das Schicksal und die Funktion von T-Zellen erwiesen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die metabolische Neuprogrammierung von T-Zellen als eine Strategie genutzt werden kann, die Antitumor-Wirksamkeit von adoptiven T-Zelltherapien zu steigern. Das XF T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kit ermöglicht die gleichzeitige Messung von glykolytischer und mitochondrialer Aktivität in T-Zellpopulationen in Kombination mit der Messung der Atmungskapazität in den Mitochondrien. Diese Parameter wurden mit einer optimalen Funktion und verbesserten Persistenz von T-Zelltherapien in Verbindung gebracht. In der Vergangenheit war für die Messung der Atmungskapazität in den Mitochondrien mittels FCCP eine Optimierung der Konzentration je nach Zelltyp, Differenzierungsstadium, Spender und Gesundheitszustand bzw. Krankheitsstadium erforderlich. Das XF T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kit macht sich einen optimierten Entkoppler (BAM15) zunutze, um eine höhere Konsistenz und eine präzisere Messung der bioenergetischen Kapazität von T-Zellen zu erreichen, wobei eine geringere Optimierung der Konzentration notwendig ist als bei FCCP. Darüber hinaus wird in dieser Application Note auf die Anwendung des Kits zur Untersuchung der Auswirkungen der Mediumzusammensetzung während der T-Zell-Expansion eingegangen, die dem Arbeitsablauf des XF T-Zell-Persistenz-Assays folgt. Dieser Arbeitsablauf erlaubt die gleichzeitige Beurteilung von Glykolyse sowie mitochondrialer Aktivität und Kapazität und liefert ein umfassendes metabolisches Profil von T-Zellen, die in das Monitoring einbezogen werden können. Dadurch können Design und Entwicklung von T-Zelltherapien verbessert werden.

Einleitung

Die Entwicklung zellvermittelter Immuntherapien hat sowohl die Krebsforschung als auch die Erforschung des Immunsystems revolutioniert. Eine der vielversprechendsten Zelltherapien nutzt gentechnisch generierte neuartige CAR-T-Zellen (CAR = chimäre Antigenrezeptoren) gegen Krebszellen. Es gibt belastbare Evidenz, wonach metabolische Eigenschaften von T-Zellen, d. h. die Art, in der T-Zellen ihren bioenergetischen Bedarf decken, eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Antitumorfunktion spielen und die Wirksamkeit von T-Zell-basierten Immuntherapien steuern.¹

T-Zellen machen während der Aktivierung und Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen in Bezug auf ihren metabolischen Phänotyp eine Reihe von Veränderungen durch, die für den Erhalt der T-Zellfunktion von entscheidender Bedeutung sind.² Naive T-Zellen befinden sich in einem ruhenden Zustand mit geringem Stoffwechselbedarf, der hauptsächlich durch die mitochondriale Atmung aufrechterhalten wird. Antigenstimulation induziert den Ausstieg aus dem ruhenden Zustand, den raschen Anstieg der Nährstoffaufnahme, die Anregung des anabolischen Stoffwechsels und die Neuprogrammierung des Stoffwechsels in den Mitochondrien. Diese Stoffwechseleränderungen tragen entscheidend zur Förderung einer raschen T-Zellproliferation und Differenzierung bei, um die Bildung von Zytokinen oder Molekülen, die für die Auslösung von Zytotoxizität verantwortlich sind, anzuregen. Nach erfolgreicher Ausschaltung des Antigenstimulus kehren die verbleibenden differenzierten Gedächtnis-T-Zellen in einen ruhenderen Phänotyp zurück; dieser Vorgang wird in erster Linie durch die mitochondriale Aktivität und hohe Reserve-Atmungskapazität (spare respiratory capacity, SRC) gefördert. Bei einer chronischen Stimulation oder unter metabolisch eingeschränkten Umgebungsbedingungen kann es zu einer Stoffwechselstörung bei T-Zellen kommen – ein als T-Zellen-Erschöpfung bezeichneter Zustand –, bei dem T-Zellen eine herabgesetzte mitochondriale bioenergetische Kapazität und Effektorfunktion aufweisen (Abbildung 1).

Aufgrund der erheblichen Auswirkungen einer Stoffwechselmodulation auf das Schicksal und die Funktion von T-Zellen kann die Bestimmung der metabolischen Signatur von CAR-T- und anderen adoptiven T-Zelltherapien eine entscheidende Rolle bei der Definition von T-Zell-Persistenz und Antitumorfunktion spielen. Darüber hinaus kann die Modulation oder Neuprogrammierung der metabolischen Signalwege von T-Zellen als Strategie zur Verbesserung der Antitumor-Wirksamkeit von T-Zellen genutzt werden.

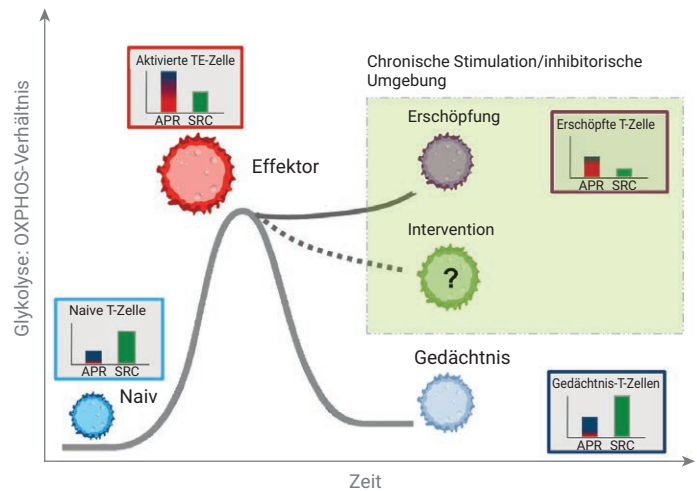


Abbildung 1. Grundprinzip des Energiestoffwechsels von T-Zellen mit Messung des metabolischen Phänotyps der T-Zellen zur Darstellung der Beziehung zwischen Glykolyse/OXPHOS-Verhältnis und Zellschicksal, -fitness und -funktion. Bei chronischer Stimulation oder angesichts eingeschränkter Umgebungsbedingungen wie der Mikroumgebung des Tumors kann es zu einem erschöpften T-Zell-Phänotyp mit gestörter Mitochondrienfunktion kommen.

Die vollständige Charakterisierung von sowohl glykolytischen als auch mitochondrialen bioenergetischen Signalwegen in T-Zellen, die sich in unterschiedlichen Stadien des T-Zellen-Lebenszyklus befinden, und die Erfassung von Informationen über Stoffwechselanpassungen an unterschiedliche zelluläre Umgebungsbedingungen oder Stresssignale gelten als entscheidend für die Optimierung von T-Zelltherapien und zur Verbesserung der Antitumor-Wirkstärke von Immuntherapieprodukten. Die Agilent Seahorse XF Technologie wurde zur gleichzeitigen Untersuchung der glykolytischen und mitochondrialen Funktion in Lebendzellen entwickelt und ist eine der führenden Plattformen zur Untersuchung des Immunzellmetabolismus. Sie hat entscheidend zum heutigen Verständnis des Immunstoffwechsels und der Anerkennung der grundlegenden Rolle von Stoffwechseleränderungen, die während T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung stattfinden, beigetragen.^{3,4}

In dieser Application Note wird das neue Agilent Seahorse XF T-Zellmetabolismus-Profilierungskit vorgestellt, welches die gleichzeitige Erfassung robuster Daten zur glykolytischen und mitochondrialen Aktivität in T-Zellpopulationen in Kombination mit der mitochondrialen Atmungskapazität ermöglicht. Mit diesen Messwerten ist eine vollständige Charakterisierung des Stoffwechselprofils von T-Zellen in einem einzigen Assay möglich, und sie können herangezogen werden, um Korrelationen mit gesteigerter oder verminderter Antitumor-Funktion von T-Zelltherapieprodukten zu erkennen. Insbesondere während der Prozessschritte bei der Therapieentwicklung, die eine Verbesserung der T-Zell-Persistenz oder Vermeidung metabolischer Erschöpfung nach Aktivierung in der Mikroumgebung des Tumors zum Ziel haben, können diese Messwerte von großem Wert sein.

Leistungsüberprüfung von in T-Zellen verwendeten mitochondrialen Entkopplern

Durch die Untersuchung der mitochondrialen Funktion in T-Zellen mithilfe des Agilent Seahorse XF Cell Mito Stresstests in Kombination mit Agilent Seahorse XF Analyzern wurden grundlegende Erkenntnisse zum Energiestoffwechsel von T-Zellen und dessen Bedeutung bei der Steuerung des Schicksals und der Funktion der T-Zellen gewonnen.^{3,4}

Das Agilent Seahorse XF Cell Mito Stresstest-Kit kombiniert eine Reihe von Reagenzien, die eine vollständige Charakterisierung der mitochondrialen Funktion erlauben. Die sequenziellen Injektionen eines ATP-Synthase-Inhibitors (Oligomycin), eines mitochondrialen Entkopplers (Carbonyl cyanid-*p*-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon, FCCP) und eines mitochondrialen Inhibitors (Mischung aus Rotenon und Antimycin A [rot/AA]) ermöglicht insbesondere die Berechnung der Sauerstoff-Verbrauchsrate in intakten Zellen, die an die mitochondriale ATP-Produktion gekoppelt ist (ATP-abhängige Atmung), die maximale entkoppelte Atmung sowie die SRC, d. h. den Unterschied zwischen basaler Atmung und maximaler Atmungskapazität. Diese Parameter werden häufig zur Charakterisierung der mitochondrialen Funktion verschiedener T-Zellpopulationen und zur Beschreibung von Prozessen herangezogen, die die Antitumor-Wirkstärke der T-Zellen verbessern.⁵⁻⁷ Trotz der weiten Verbreitung des Assays auf dem Gebiet des Immunstoffwechsels ist seine Verwendung bei T-Zellen mit einigen Problemen behaftet, was in erster Linie auf die Verwendung des Protonophoren-Entkopplers FCCP zurückzuführen ist.

Es gibt mehrere Gründe, warum die Verwendung von FCCP mit T-Zellen (und potenziell anderen Immunzellen) keine ideale Verbindung ist. Zunächst hängt die optimale Konzentration von FCCP von vielen Faktoren ab, unter anderem vom Immunzelltyp, dem Differenzierungsstadium, dem Spender und dem Krankheitsstadium. Wenn dessen Konzentration nicht für jeden einzelnen Versuch titriert oder optimiert wird, kann dies eine Unterschätzung der maximalen Atmungskapazität zur Folge haben. Zweitens ist die Sauerstoff-Verbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) in naiven T-Zellen und einigen differenzierten T-Zellen nach FCCP-Exposition nicht stabil. Dies führt zu einer hohen Variation der Messwerte und einer potenziell unzureichenden Erfassung der maximalen Atmungskapazität.

Darüber hinaus schränkt die Verwendung von FCCP im XF Cell Mito Stresstest die Möglichkeiten des Assays ein, quantitative Messungen der glykolytischen Aktivität, also die glykolytische ATP (glykoATP)-Syntheserate, zu liefern. Die Berechnung der glykoATP-Syntheserate anhand der mit Seahorse XF ECAR (extrazelluläre Azidifizierungsrate) ermittelten Messwerte macht eine Korrektur des CO₂-Beitrags nötig, der anhand der basalen OCR-Messungen und der OCR nach Zugabe von rot/AA geschätzt wird.⁸ Wenn jedoch FCCP vor der Zugabe von rot/AA in dem Assay verwendet wird, kann eine Unterschätzung des CO₂-Beitrags die Folge sein, was sich auf die Quantifizierung der glykolytischen Aktivität auswirkt. Dies gilt ganz besonders für hoch oxidative Zellen, d. h. Zellen, die ihre Energie in erster Linie aus der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien beziehen, bei der der CO₂-Beitrag an ECAR nicht unbedeutend ist.

Die gleichzeitige Beurteilung der mitochondrialen ATP (mitoATP)-Syntheserate und der glykoATP-Syntheseraten erlaubt die Charakterisierung des grundlegenden zellulären Energiebedarfs (d. h. die zelluläre ATP-Gesamtsyntheserate) und des basalen metabolischen Gleichgewichts (d. h. das Verhältnis zwischen glykoATP- und mitoATP-Syntheserate). Hierbei handelt es sich um kritische Parameter für die Bestimmung von Schicksal und Funktion der T-Zellen. Der XF Cell Mito Stresstest liefert diese Parameter aber nicht, weshalb die Charakterisierung der Bioenergetik von T-Zellen unvollständig ist.

Entwicklung des neuen Agilent Seahorse XF T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kits

Bei der Entwicklung des Agilent Seahorse XF T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kits stand die gleichzeitige Erfassung präziser, einheitlicher und quantitativer bioenergetischer Messwerte für die glykolytische und die mitochondriale Aktivität von T-Zellpopulationen im Vordergrund. Das Kit ermöglicht präzise Messungen der maximalen Atmungskapazität von T-Zellen durch Verwendung des Entkopplers BAM15 ((2-Fluorophenyl){6-[(2-fluorophenyl)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pyrazin-5-yl)}amine). BAM15 ist ein neuartiger Entkoppler, der angabengemäß eine ähnliche Wirkstärke wie FCCP bei geringerer Zytotoxizität und niedrigerer Affinität zur Plasmamembran aufweist, was mit einem größeren Wirkungsbereich verbunden ist.⁹

Wie in Abbildung 2A bis 2C (rote Linien) dargestellt, ist beim Testen von naiven T-Zellen mit dem XF Zell-Mito-Stresstest-Kit die Änderungsrate für das O₂-Niveau während der dreiminütigen Messung mit dem Instrument nach der FCCP-Injektion nicht konstant oder linear. Daraus resultieren schwankende OCR-Berechnungen und eine Unterschätzung der Maximalatmung (Abbildung 2D bis 2F, rote Linien). Darüber hinaus könnte es zu einer deutlichen Überschätzung der OCR nach rot/AA-Injektion kommen, wie der Vergleich der kinetischen Kurven, die man nach Injektion von FCCP oder Trägerflüssigkeit erhält, andeutet (Abbildung 2D, rote oder blaue Kurve). Wenn dagegen der Entkoppler BAM15 anstelle von FCCP verwendet wird, ist nach Injektion von BAM15 ein stabiler Anstieg der OCR zu beobachten (Abbildung 2A bis 2C, grüne Linien). Daraus resultiert eine akkuratere und präzisere Bestimmung der Maximalatmung (Abbildung 2D bis 2F, grüne Linien).

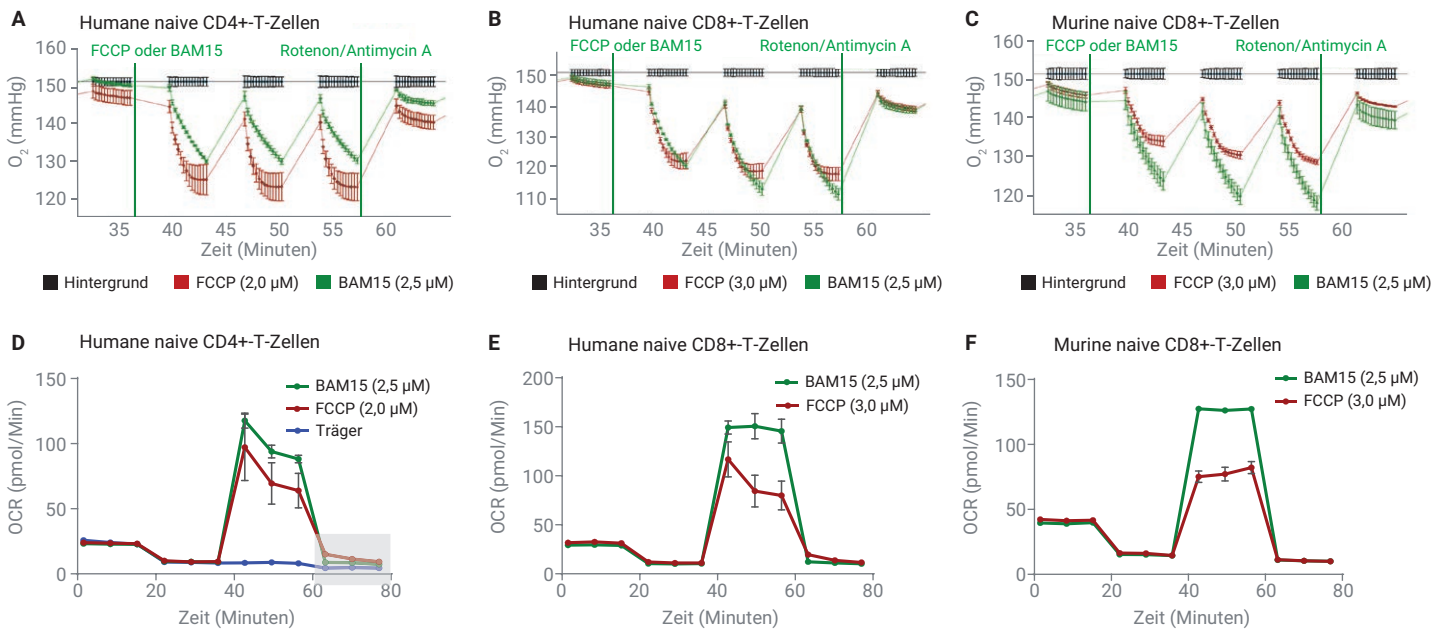
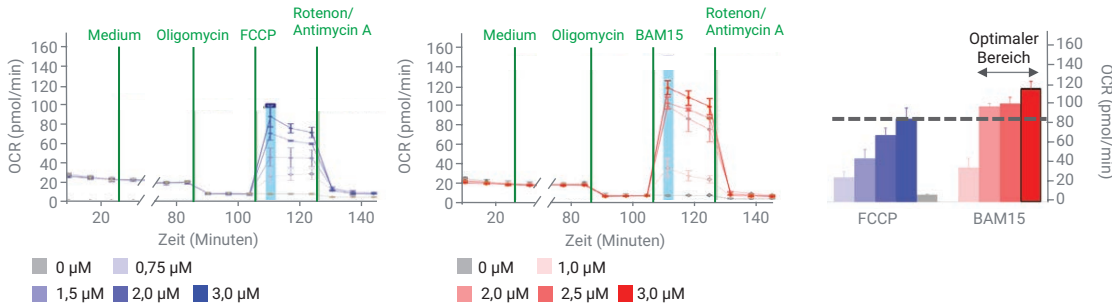


Abbildung 2. Vergleich der Sauerstoff-Verbrauchswerte bei Verwendung der Entkoppler FCCP und BAM15. Sämtliche Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/Well in Agilent Seahorse XF RPMI-Medium, pH 7,4, angereichert mit 10 mM Glucose, 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat, ausgesät. Veränderungen der extrazellulären Sauerstoffkonzentration bei naiven humanen CD4⁺-T-Zellen (A), naiven humanen CD8⁺-T-Zellen (B) und CD8⁺-T-Zellen aus der Milz von Mäusen (C) nach Zugabe der Entkoppler FCCP in der optimalen Konzentration (rote Linien) oder BAM15 (grüne Linien). Mittels XF Zell Mito Stresstest (rote Linien) oder T-Zellmetabolismus-Profilierstellungs-kits (grüne Linien) erhaltene Sauerstoff-Verbrauchswerte (OCR) bei naiven humanen CD4⁺-T-Zellen (D), naiven humanen CD8⁺-T-Zellen (E) und CD8⁺-T-Zellen aus der Milz von Mäusen (F). Blaue Linie in Diagramm 2D: Anstelle von Entkoppler wurde Assay-Medium injiziert.

Auf diese vorläufigen Tests folgten weitere Versuche mit naiven CD4⁺- und naiven CD8⁺-Zellen und PBMC (jeweils humanen Ursprungs) sowie CD8⁺-T-Zellen aus der Milz von Mäusen von mindestens drei verschiedenen Spendern je Zelltyp. In allen Fällen wurden direkte Titrationen mit FCCP oder BAM15 vorgenommen. Bei Verwendung von BAM15 als Entkoppler wurde durchweg eine höhere Maximalatmung und niedrigere Standardabweichungen beobachtet, verglichen

mit den Werten, die bei optimalen FCCP-Konzentrationen ermittelt wurden (Abbildung 3A bis 3C). Titrationsversuche zeigten auch, dass der Bereich der optimalen BAM15-Konzentration breiter als der optimale FCCP-Bereich ist. Das lässt vermuten, dass der Bedarf einer Optimierung der Entkopplerkonzentration für jede einzelne Probe bei Verwendung von BAM15 minimal ist (Abbildung 3A und 3B, mittlere Balkendiagramme).

A Kinetische Kurven humaner naive CD4⁺-T-Zellen und Maximalatmung bei unterschiedlichen Konzentrationen



B Kinetische Kurven humaner naive CD8⁺-T-Zellen und Maximalatmung bei unterschiedlichen Konzentrationen

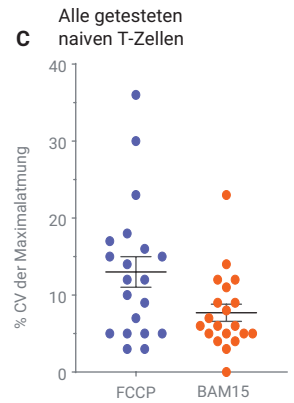
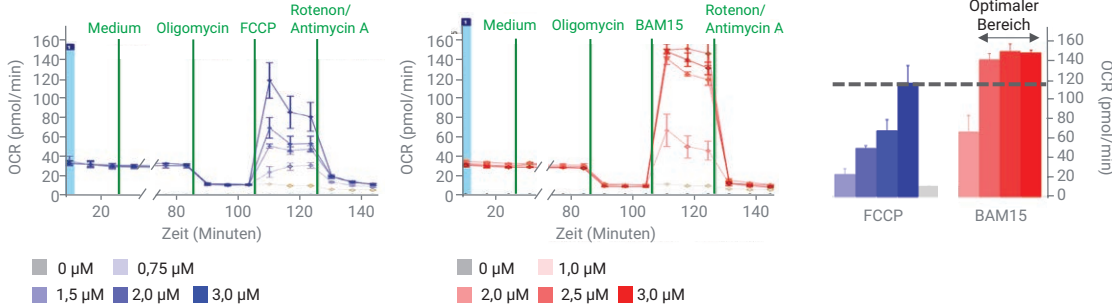


Abbildung 3. Vergleich der Maximalatmungswerte bei Titrationsversuchen mit FCCP und BAM15 unter Verwendung von humanen naiven CD4⁺- (A) und CD8⁺-T-Zellen (B). Die Balkendiagramme in der Mitte stellen die Maximalatmung dar, die mit unterschiedlichen Entkopplerkonzentrationen erreicht wurde. (C) % CV der Maximalatmung, die in einem Panel mit naiven T-Zellen erreicht wurde, wenn die Tests unter Zugabe der optimalen Konzentration von FCCP oder 2,5 μM BAM15 erfolgten.

Die bei Verwendung des XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskits (mit BAM15 als Entkoppler) berechneten glykoATP-Syntheseraten wurden zudem mit jenen verglichen, die bei parallel durchgeführten Versuchen mit dem Agilent Seahorse XF Echtzeit-ATP-Ratenanalyse-Kit ermittelt wurden. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede bei den basalen glykoATP-Syntheseraten, die mit diesen beiden Kits oder Assays ermittelt wurden (Abbildung 4).

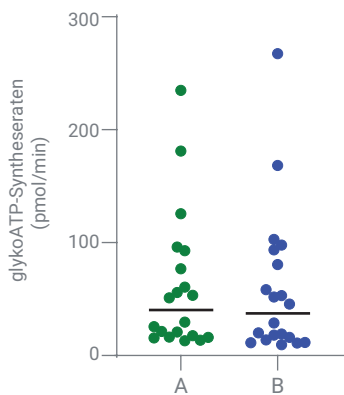


Abbildung 4. Vergleich der basalen glykoATP-Syntheseraten von naiven T-Zellen; die Berechnung erfolgte mit dem Agilent Seahorse XF Echtzeit-ATP-Ratenanalyse-Kit (B) bzw. dem XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskit (A), wobei die Injektion von BAM15 zwischen der Injektion von Oligomycin und rot/AA erfolgte.

Ein umfassendes T-Zell-Panel wurde ausgewählt, um das XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskit eingehender zu beurteilen. Dazu wurden Zellen humanen und murinen Ursprungs unterschiedlicher Spender und in unterschiedlichen Zellstadien verwendet. Im Rahmen der Titrationsversuche wurden die maximalen OCR-Werte, die bei einer optimalen FCCP-Konzentration ermittelt wurden, mit denjenigen Werten verglichen, die bei Verwendung einer einzigen Konzentration von BAM15 (2,5 μM) für das T-Zell-Panel resultierten (Abbildung 5). In allen Fällen betrug die maximale OCR, die bei 2,5 μM BAM15 ermittelt wurde, mindestens 90 % der maximalen OCR, die bei der optimalen FCCP-Konzentration für den gleichen Zelltyp ermittelt wurde. Die mit 2,5 μM BAM15 erhaltene maximale OCR war durchschnittlich 20 % höher als der Wert, der bei der optimalen FCCP-Konzentration resultierte. Dies zeigt, dass das Reagens aus dem Kit, BAM15, in einer festgelegten Konzentration von 2,5 μM für alle T-Zelltypen verwendet werden kann bzw. nur eine minimale Optimierung erforderlich ist.

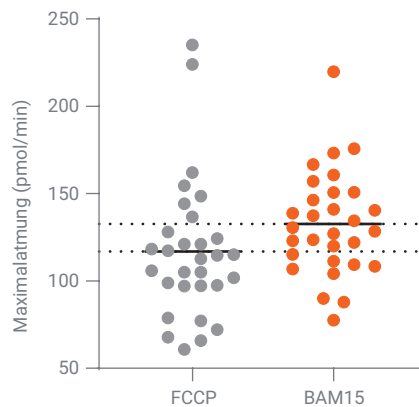


Abbildung 5. Vergleich der Maximalatmung, die bei optimaler FCCP-Konzentration bzw. 2,5 μM BAM15 in einem umfassenden T-Zell-Panel ermittelt wurde. Das Panel umfasste PBMC, naive CD4^+ -, naive CD8^+ -, aktivierte CD4^+ -, aktivierte CD8^+ -, Effektor- CD8^+ -, Gedächtnis- CD8^+ -Zellen (humanen Ursprungs) und naive und aktivierte CD8^+ -T-Zellen murinen Ursprungs (n = 3 je Zelltyp).

Anwendung des XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskits zur Optimierung der Persistenz bei T-Zell-Therapieprodukten

Ein entscheidendes Merkmal, das bei der Beurteilung von CAR-T- und anderen adoptiven T-Zelltherapien berücksichtigt werden muss, ist die metabolische Signatur von Zellen; sie spielt eine entscheidende Rolle beim Bestimmen der T-Zell-Persistenz und Antitumor-Funktion. Tatsächlich ist es so, dass CAR-T-Zellen, die einen Effektor-Phänotyp mit hoher metabolischer Aktivität während der Expansion *in vitro* annehmen, Berichten zufolge durch eine unzureichende Persistenz und Antitumor-Aktivität *in vivo* auffielen. CAR-T-Zellen mit einer niedrigen bis mittleren metabolischen Aktivität während der Expansion *in vitro* und hohen Reserve-Atmungskapazitäten verleihen dagegen eine gute Antitumor-Immunität, die durch verbesserte Proliferationsfähigkeiten, eine höhere Tumorzellabtötungsrate und Zytokinproduktion gekennzeichnet ist.¹⁰ Verschiedenen Publikationen zufolge könnten die Expansionsbedingungen während der Herstellung zur Generierung von T-Zellprodukten mit einem unerwünschten metabolischen Phänotyp führen, der *in vivo* mit einer eingeschränkten Wirkstärke verbunden ist. In diesen Publikationen wird auch darauf hingewiesen, dass eine metabolische Konditionierung der T-Zellen während der Expansionsphase eine metabolische Neuprogrammierung induzieren kann, die *in vivo* mit einer höheren Persistenz und verbesserten Antitumor-Funktion einhergeht.^{5,11,12}

Das XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskit wurde konzipiert, um die Entwicklung von T-Zelltherapien zu unterstützen. Es liefert ein umfassendes Bild des Stoffwechselprofils von T-Zellen in einem einzigen Assay, nämlich den basalen Gesamtenergiebedarf, das basale metabolische Gleichgewicht und die Reserve-Atmungskapazität. Alle diese Parameter wurden in der Vergangenheit herangezogen, um die Stoffwechselzustände von T-Zellen mit erhöhter oder reduzierter Persistenz zu beschreiben.¹⁰ Aus diesem Grund ist es ideal zur Beurteilung und Optimierung der Bedingungen für die T-Zellexpansion geeignet, die notwendig sind, um den gewünschten metabolischen Phänotyp und eine gesteigerte Persistenz der T-Zellen zu erreichen.

Hier wurde das XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskit verwendet, um zu beurteilen, inwieweit die Zusammensetzung des Zellkulturmediums (RPMI mit 10 mM Glucose + 10 % FBS oder ImmunoCult XF-Medium [STEMCELL Technologies]) sowie die Zugabe verschiedener Interleukine (IL-2 oder IL-15) einen Einfluss auf das Stoffwechselprofil von T-Zellprodukten haben können. Frühere Studien haben gezeigt, dass in IL-15 expandierte Zellen einen weniger differenzierten Phänotyp präsentieren als Zellen, die in IL-2 kultiviert wurden.¹³ In dieser Studie wurden Pan-T-Zellen von verschiedenen

gesunden menschlichen Spendern mit magnetischen, mit CD3/CD28-Antikörpern konjugierten Beads aktiviert. Nach drei Tagen wurden die magnetischen Beads entfernt und die Zellen mit den genannten Mediumbedingungen expandiert (Abbildung 6). Die Zellen verblieben in der Kultur bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml, wobei alle drei Tage das Medium aufgefrischt und das Volumen aufgefüllt wurde. An Tag 7, 14 und 22 wurden Proben genommen und mit dem XF T-Zell-Persistenz-Assay in Kombination mit dem XF T-Zellmetabolismus-Profilerstellungskit unter Beachtung der für den Assay empfohlenen Bedingungen analysiert.¹⁴

Zunächst wurde die SRC im Verlauf der Zellexpansion verglichen. Wie in Abbildung 6A dargestellt, wurde an Tag 7 ein Unterschied in der SRC von in IL-15 und in IL-2 expandierten Zellen beobachtet, der unabhängig vom Zellkulturmedium war, das im Rahmen der Expansion verwendet wurde. Die erhöhte SRC von in IL-15 expandierten Zellen wird an Tag 22 noch deutlicher, dies gilt insbesondere für Zellen, die in dem optimierten ImmunoCult XF-Medium (Abbildung 6C) kultiviert wurden. Eine erhöhte SRC ist typisch für den Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp und wurde in der Vergangenheit mit einer höheren Persistenz assoziiert.

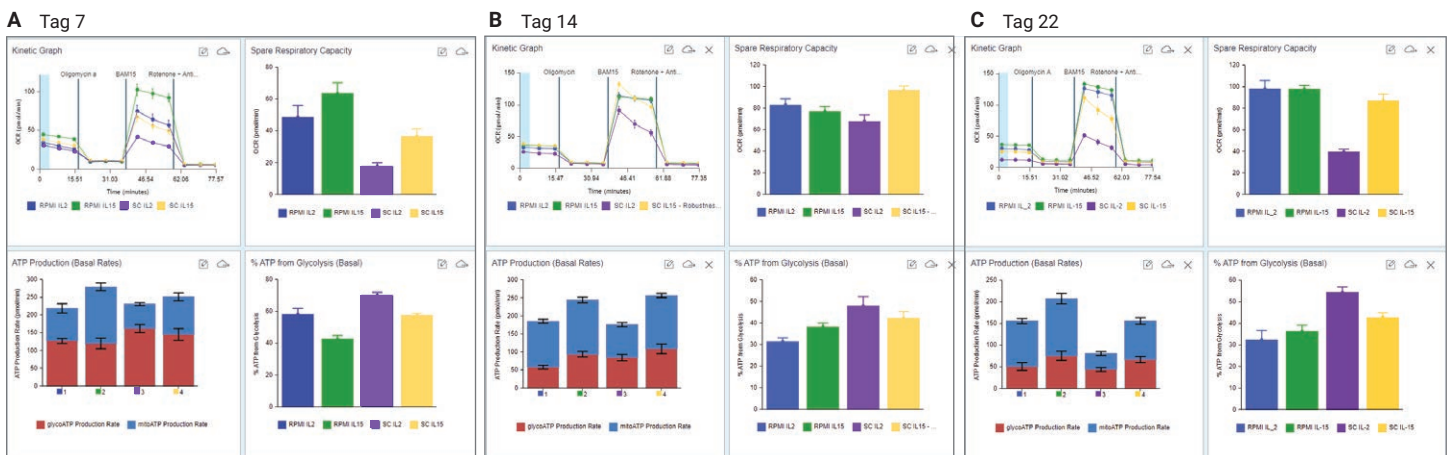


Abbildung 6. Einfluss der Zellexpansionsbedingungen auf die metabolischen Werte der T-Zellen. Pan-T-Zellen aus menschlichem peripherem Blut wurden mit Dynabeads Human Activator CD3/CD28 in ImmunoCult XF T-Zell-Expansionsmedium aktiviert und bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator mit 5 % CO₂ kultiviert. Zwei Tage nach der Aktivierung wurden die Dynabeads entfernt und die Zellen in 4 Gruppen eingeteilt. Sie wurden mit 1×10^6 Zellen/ml unter den folgenden 4 Mediumbedingungen resuspendiert: Blau: RPMI angereichert mit 2 mM Glutamin, 10 % FBS und IL-2 (300 E/ml); grün: RPMI angereichert mit 2 mM Glutamin, 10 % FBS und IL-15 (10 ng/ml); lila: ImmunoCult XF-Medium angereichert mit IL-2 (300 E/ml); gelb: ImmunoCult XF-Medium angereichert mit IL-15 (10 ng/ml). Die Proben wurden an Tag 7, Tag 14 und Tag 22 nach der Aktivierung entnommen und analysiert. Für jeden Tag wurden folgende Daten ermittelt: kinetische Kurven der OCR (oben links), SRC (oben rechts), ATP-Syntheseraten (unten links) und Prozentanteil der ATP aus Glykolyse (unten rechts).

Im nächsten Schritt wurden die weiteren Ergebnisse untersucht, die mit diesem Assay gewonnen wurden, um die Expansionsbedingungen eingehender zu charakterisieren und zu verbessern. Dabei handelt es sich um die basalen ATP-Syntheseraten von Glykolyse und Mitochondrien (Abbildung 6, die beiden unteren Diagramme in jedem der Schaubilder). Zellen, die in ImmunoCult XF-Medium mit IL-15 expandiert wurden, sind durch einen stärker oxidativen metabolischen Zustand gekennzeichnet (niedrigerer Anteil an ATP aus Glykolyse) im Vergleich zu Medium, das mit IL-2 angereichert wurde (Abbildung 6, rechtes unteres Diagramm in jedem der Schaubilder, gelbe Balken gegenüber lila Balken). Darüber hinaus weisen Zellen, die in RPMI-Medium expandiert und differenziert wurden, einen höheren Stoffwechselbedarf

auf (höhere basale ATP-Gesamtsyntheserate) als Zellen, die in ImmunoCult XF-Medium expandiert und differenziert wurden. Dies ist unabhängig vom verwendeten Interleukin der Fall (Abbildung 6, linkes unteres Diagramm in jedem der Schaubilder). Ein gesteigerter Stoffwechselbedarf ist mit dem Effektor-T-Zellen-Phänotyp assoziiert. Wenn die Expression der Oberflächenmarker CCR7-A und CD45RO-A mithilfe des Agilent NovoCyte Advanteon Durchflusszytometers analysiert wurde, konnte man beobachten, dass in ImmunoCult XF-Medium expandierte Zellen einen höheren Anteil zentraler Gedächtniszellen mit CCR7-A⁺/CD45RO-A⁺ aufrechterhalten, verglichen mit den in RPMI expandierte Zellen, die reich an Effektor-Gedächtnis-Zellen waren (Abbildung 7).

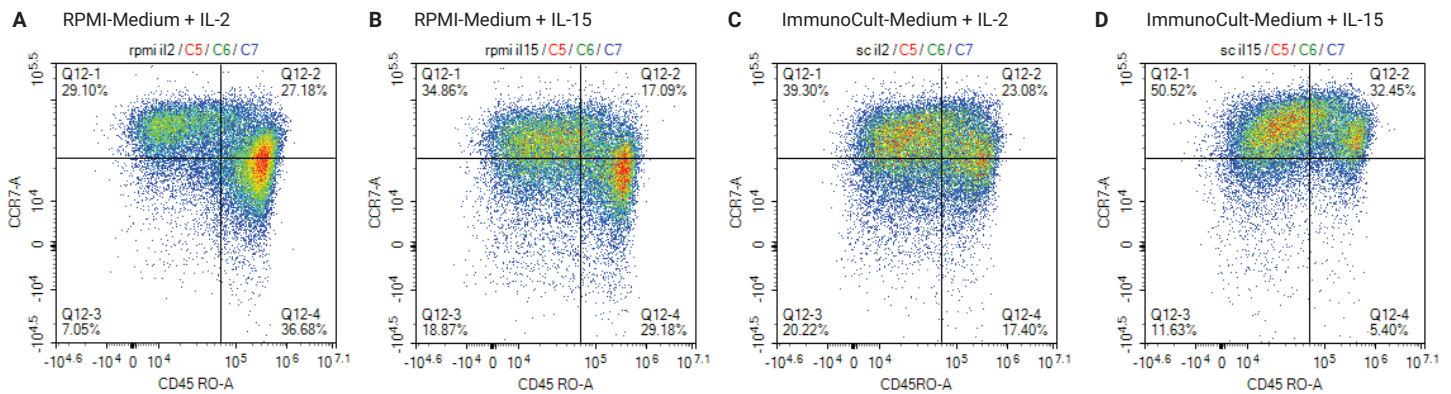


Abbildung 7. Durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenmarker CCR7-A und CD45RO-A an Proben von Tag 22, die wie in den Diagrammen gezeigt unter unterschiedlichen Mediumbedingungen expandiert wurden. RPMI-Medium wurde auch mit 2 mM Glutamin und 10 % FBS angereichert.

Fazit

In diesem Dokument wird ein optimierter Assay für die vollständige Charakterisierung des Stoffwechselprofils von T-Zellen vorgestellt. In dem Assay wird der XF Analyzer mit dem XF T-Zell-Metabolismus-Charakterisierungskit kombiniert. Auf diese Weise wird ein optimierter Entkoppler zur Verfügung gestellt, der robuste Messungen der Maximalatmung und der Reserve-Atmungskapazität in T-Zellen bei minimaler Optimierung der Entkopplerkonzentration ermöglicht. Darüber hinaus erhalten die Anwender mit diesem Assay neben quantitativen Informationen zur Glykolyseaktivität in ein und derselben Zellprobe auch einzigartige Messwerte zum basalen bioenergetischen Bedarf der Zelle.

Um wirksamere und besser vorhersagbare T-Zelltherapien entwickeln zu können, wird eine Kombination aus Instrumenten und orthogonalen Assays zur Generierung umfangreicher Datensätze benötigt, die eine Charakterisierung von CAR-T-Zelltherapieprodukten ermöglichen. Es liegt auf der Hand, dass die metabolische Charakterisierung von T-Zellen einer der kritischen Faktoren ist, die analysiert werden müssen, wenn Persistenz und Antitumor-Wirkstärke von T-Zellprodukten verbessert werden sollen. Der XF T-Zell-Persistenz-Assay liefert multiparametrische Ergebnisse, die eine vollständige Charakterisierung des Stoffwechselprofils von T-Zellen in ein und derselben Probe ermöglichen. Er kann als Routine-Assay zur Optimierung von Design und Herstellung von T-Zelltherapieprodukten aufgenommen werden.

Literatur

1. Chang C. H.; Pearce, E. L. *Nature Immunology* **2016**, 17, 364–368. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fni.3415>.
2. Sukumar *et al.* *Current Opinion in Immunology* **2017**, 46, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>.
3. Wei *et al.* *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 717014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717014>.
4. Voss *et al.* *Nature Reviews Immunology* **2021**, 21, 637–652. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00529-8>.
5. Geiger *et al.* *Cell* **2016**, 167, 829–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>.
6. Kawalekar *et al.* *Immunity* **2016**, 44, 380–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>.
7. Scharping *et al.* *Immunity* **2016**, 45, 374–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>.
8. Natalia, R. Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *Agilent Technologies Whitepaper*, Publikationsnummer **5991-9309EN**.
9. Kenwood *et al.* *Molecular Metabolism* **2014**, 3, 114–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005>.
10. Rostamian *et al.* *Cancer Letters* **2021**, 500, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.004>.
11. Hermans *et al.* *PNAS* **2020**, 117(11), 6047–6055. <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1920413117>.
12. Geltink *et al.* *Nature Metabolism* **2020**, 2, 703–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0256-z>.
13. Alizadeh *et al.* *Cancer Immunol. Res.* **2019**, 7(5), 759–772. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0466>.
14. Agilent Seahorse XF T Cell Metabolic Profiling Kit User Guide. *Agilent Technologies*, Publikationsnummer **5994-3493EN**.

www.agilent.com/xfpro

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

RA44573.6858796296

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA am 8. Februar 2022
5994-4494DEE