

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

Die Bedeutung des ATP-Gehalts von T-Lymphozyten als Parameter zur Beurteilung einer zellulären Immunreaktion. Untersuchungen am Mausmodell.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kristina Herden
aus Vechta

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.08.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Haag

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ingo Müller

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: -

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Einleitung..... | 6 |
| 1.1. Das Immunsystem | 6 |
| 1.1.1 Die angeborene Immunität..... | 6 |
| 1.1.2 Die erworbene Immunität..... | 7 |
| 1.1.3 T-Zellen..... | 7 |
| 1.1.4 Der T-Zell-Rezeptor..... | 8 |
| 1.2 Energetische Voraussetzungen für die ATP-Produktion in T-Zellen..... | 8 |
| 1.3 Die Rolle der T-Zelle während einer Transplantatabstoßung..... | 10 |
| 1.4 Immunsuppression..... | 11 |
| 1.5 Der ImmuKnow-Assay..... | 11 |
| 1.6 Stimulanzien..... | 13 |
| 1.6.1 PHA-L..... | 13 |
| 1.6.2 Anti-CD3 / anti-CD28..... | 13 |
| 1.6.3 PMA / Ionomycin..... | 13 |
| 1.6.4 Concanavalin A..... | 14 |
| 1.6.5 SEB..... | 14 |
| 1.6.6 OVA- und LLO-Peptid..... | 14 |
| 1.7 Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> in der Maus..... | 15 |
| 2 Zielsetzung..... | 17 |
| 3 Material und Methoden..... | 18 |
| 3.1 Materialien..... | 18 |
| 3.1.1 Laborgeräte..... | 18 |
| 3.1.2 Verbrauchsmittel..... | 18 |
| 3.1.3 Verwendete Medien und Puffer..... | 18 |
| 3.1.4 Lösungen..... | 20 |
| 3.1.5 Stimulanzien..... | 20 |
| 3.1.6 Antikörper..... | 21 |
| 3.1.7 Mauslinien..... | 21 |
| 3.1.8 Bakterienstamm..... | 21 |
| 3.2 Methoden..... | 21 |
| 3.2.1 Milzaufreinigung..... | 22 |
| 3.2.2 Zellstimulation..... | 22 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3 Färbung der Zellen..... | 23 |
| 3.2.3.1 CFSE Färbung..... | 23 |
| 3.2.3.2 DAPI-Färbung..... | 24 |
| 3.2.4 Durchflusszytometrie..... | 24 |
| 3.2.5 Der ImmuKnow-Assay..... | 24 |
| 3.2.6 Listerien-Infektion..... | 26 |
| 4 Ergebnisse..... | 27 |
| 4.1 Etablierung des ImmuKnow-Assays im Mausmodell..... | 27 |
| 4.1.1 Erste Ergebnisse nach Durchführung des Assays mit Mausmilzzellen..... | 28 |
| 4.1.2 Vermeidung von unspezifischer Zellbindung an der Mikrotiterplatte durch Zugabe von EDTA | 29 |
| 4.1.3 Durchführung des ImmuKnow-Assays auf unbeschichteter Mikrotiterplatte..... | 30 |
| 4.1.4. Einfluss von SDS 7% auf die Menge an messbarem ATP in T-Zellen..... | 32 |
| 4.2 Einfluss unterschiedlicher Arten der T-Zell Stimulation auf die intrazelluläre ATP-Konzentration..... | 33 |
| 4.2.1. ATP-Werte nach Stimulation von CD4+ Zellen mit α CD3/ α CD28, PMA/Ionomycin, Concanavalin A und Staphylokokken Enterotoxin B..... | 33 |
| 4.2.2. Der Einfluss von Kostimulanzen auf die T-Zell-Stimulation..... | 35 |
| 4.2.3. Einfluss von CTLA-4 auf die ATP-Produktion in der T-Zelle..... | 39 |
| 4.3. Zeitliche Abfolge der Effektorfunktionen von T-Zellen..... | 41 |
| 4.4 Energetische Voraussetzungen für die ATP Produktion in T-Zellen..... | 43 |
| 4.4.1 Hemmung der Glykolyse durch Desoxyglukose..... | 43 |
| 4.4.2 Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid..... | 45 |
| 4.5 ATP-Spiegel bei in vivo-Infektionen..... | 49 |
| 4.5.1 Einleitung..... | 49 |
| 4.5.1.1 ATP-Werte in CD8+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L und OVA-Peptid | 49 |
| 4.5.2 ATP- und TNF-Werte nach Stimulation von 9 Tage infizierten Mausmilzzellen..... | 50 |
| 4.5.3 Kinetik der ATP- und Zytokinproduktion im Verlauf einer Listeria monocytogenes Infektion..... | 54 |
| 5 Diskussion..... | 60 |
| 5.1 Etablierung des Immuknow-Assays im Maussystem..... | 60 |
| 5.2 Die ATP-Menge in T-Zellen ist von der Art des Stimulanz abhängig..... | 61 |
| 5.3 Kostimulanzen haben einen Einfluss auf den ATP- und den Zytokingehalt der Zelle..... | 63 |
| 5.4 T-Zellen benötigen mehr als nur Glukose für die ATP-Produktion..... | 64 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5 Kinetik der ATP-Produktion nach Stimulation in T-Zellen..... | 65 |
| 5.6 Eine Infektion mit Lm geht mit niedrigen intrazellulären ATP-Spiegeln einher..... | 65 |
| 6 Zusammenfassung..... | 67 |
| 7 Abkürzungsverzeichnis..... | 68 |
| 8 Literaturverzeichnis..... | 70 |
| 8.1 Zeitschriften..... | 70 |
| 8.2 Beitragswerke..... | 76 |
| 8.3 Internetquellen..... | 77 |
| 9 Danksagung..... | 78 |
| 10 Lebenslauf..... | 79 |
| 11 Eidesstattliche Versicherung | 80 |

1 Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Menschen vor Mikroorganismen, Fremd – und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen (Pezzuto, 2006).

Zu den Aufgaben des Immunsystems gehören das Erkennen sowie die Abwehr von im Körper bestehenden Infektionen, die Immunregulation, um eine überschießende Immunantwort im Körper zu verhindern, und auch die Verhinderung eines erneuten Auftretens einer schon bekämpften Krankheit durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses.

Dafür ist es von großer Bedeutung, dass das Immunsystem zwischen „Fremd“ und „Eigen“ unterscheiden kann. Dabei können unter „Fremd“ zum Beispiel Infektionskeime, die von außen in den Organismus eingedrungen sind, und auch körpereigene Zellen, die sich im Verlauf ihres Bestehens maligne verändert haben, verstanden werden.

Das Immunsystem kann in zwei wichtige Bereiche unterteilt werden: Die angeborene und die erworbene Immunität.

In den folgenden Abschnitten wird die Immunreaktion vor allem in Hinsicht auf die Bekämpfung eines Erregers vorgestellt.

1.1.1 Die angeborene Immunität

Zu den Bestandteilen der angeborenen Immunität gehören das Komplementsystem, unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine (II) und die zellulären Komponenten wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die an der ersten Abwehr von Krankheitserregern beteiligt sind.

Der Vorteil der angeborenen Immunität ist, dass sie innerhalb sehr kurzer Zeit auf Krankheitserreger reagieren kann. Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunreaktion spielen Makrophagen, denn sie phagozytieren Bakterien, die sie mit Hilfe komplementvermittelter „Markierung“ und durch bestimmte Rezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen, die dann die Einwanderung weiterer Abwehrzellen in das infizierte Gewebe bewirken. Dieser Entzündungsvorgang bewirkt den Einstrom von antigenpräsentierenden Zellen in lymphatisches Gewebe, und führt dadurch zur Aktivierung von antigenspezifischen Lymphozyten, wodurch die erworbene Immunität in Gang gesetzt wird (Janeway, 2009).

1.1.2 Die erworbene Immunität

Bestandteile der erworbenen Immunität sind vor allem die B- und T- Lymphozyten sowie die von den B-Zellen sezernierten Antikörper. Zur Regulation der Immunreaktion sind außerdem noch regulatorische T-Zellen von Bedeutung.

Um die spezifische Immunreaktion in Gang zu bringen, bedarf es bis zu 6 Tage Zeit. Nach der Aktivierung von naiven T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen und zusätzliche kostimulatorische Faktoren, differenzieren sie zu Effektorzellen. B-Lymphozyten differenzieren im Kontakt mit T-Helferzellen (TH-Zellen) zu Plasmazellen, die lösliche Antikörper sezernieren, die spezifisch für den zu bekämpfenden Erreger sind. Die Antikörper wirken über vier verschiedene Mechanismen auf den Erreger: Sie verhindern die Ausbreitung des Erregers und seiner Toxine durch Bindung an deren Oberfläche. Sie markieren den Erreger und ermöglichen damit die nachfolgende Eliminierung durch Phagozyten. Sie aktivieren NK-Zellen, Leukozyten, Mastzellen und eosinophile Granulozyten, die dann in der Lage sind, den Erreger durch zytotoxische Sekrete abzutöten. Und sie bewirken durch Aktivierung des Komplementsystems die Phagozytose oder Lyse der Erregerzelle (Vollmar und Dingermann, 2005).

1.1.3 T-Zellen

In der Gruppe der T-Zellen werden die CD8 (cluster of differentiation) -tragenden zytotoxischen T-Zellen und CD4-tragenden T-Helferzellen unterschieden. T-Helferzellen können zu verschiedenen Effektorzellen differenzieren, z.B. zu T-H1 (die vor allem IFN γ sezernieren), T-H2 (die vor allem Il-4 sezernieren), T-H17 (die vor allem Il-17 sezernieren) oder zu regulatorischen T-Zellen (Zhu *et al.*, 2010).

T-Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen und zusätzliche Kostimulanzen aktiviert (Müller *et al.*, 1989). Der Kontakt zwischen antigenpräsentierender Zelle und der T-Zelle funktioniert durch die Erkennung von Peptidfragmenten des Antigens im Zusammenhang mit MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) - Molekülen auf den antigenpräsentierenden Zellen durch den T-Zell-Rezeptor auf den T-Zellen. Dabei erkennen CD4⁺ Zellen ihr Antigen im Kontext von MHC-Klasse-2 Molekülen, CD8⁺ Zellen das ihre im Kontext von MHC-Klasse-1 Molekülen (Parham, 2005).

Hat sich die T-Zelle zu einer T-Effektorzelle weiterentwickelt, reagiert sie auf den Erreger nach Antigenerkennung je nach Zellklasse: Zytotoxische Zellen töten den Erreger durch Sekretion von Toxinen (Perforin und Granzyme). T-H1 Zellen führen zur Aktivierung von infizierten Makrophagen sowie zur Anregung der Proliferation und Entwicklung von B-Zellen zu Plasmazellen, die dann durch Antikörperproduktion den Erreger bekämpfen. T-H2 Zellen

unterstützen durch ihre Il-4-Produktion u.a. die Bildung von Immunglobulin E in Plasmazellen. Eine weitere Methode zur Eliminierung von Erregern stellt die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten durch die T-H17-Zellen dar. Die regulatorischen T-Zellen haben innerhalb der Immunantwort eine konträre Aufgabe, sie unterdrücken T-Zell-Reaktionen und verhindern dadurch überschießende Immunantworten (Zhu *et al.*, 2010).

B- und T-Lymphozyten können zu Gedächtniszellen heranreifen, die dann bei erneutem Antigenkontakt schneller und affiner auf den Erreger reagieren.

1.1.4 Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zellrezeptor besteht aus zwei transmembranen Glykoproteinketten, der α - und der β -Kette. Eine Kette besteht jeweils aus einer Transmembranregion, einem Stielsegment, einer konstanten Region und einer variablen Region. Jede der konstanten und variablen Regionen trägt eine Kohlenhydratseitenkette. Am Stielsegment sind die beiden T-Zell-Rezeptor-Ketten über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden.

Der T-Zell-Rezeptor besitzt eine Antigenbindungsstelle, worüber er das ihm von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentierte Antigen erkennt. Zusätzlich braucht der T-Zell-Rezeptor den CD3-Komplex um das Signal in die T-Zelle weiterzuleiten.

Der CD3-Komplex setzt sich aus 4 Proteinseitenketten zusammen: zwei ϵ -, eine δ - und eine γ -Kette. An dem CD3-Komplex befindet sich zusätzlich noch ein Homodimer aus zwei ζ -Ketten, die nur eine kurze intrazelluläre Domäne aufweisen.

Alle intrazellulären Domänen des CD3-Komplexes tragen sogenannte Immunrezeptor-Tyrosinbasierte aktivierende Motive (ITAM), die bei Antigenerkennung am T-Zell-Rezeptor phosphoryliert werden und notwendig für die Weiterleitung des Signals sind.

Daraufhin folgt eine lange Signalkette, die letztendlich die Aktivierung von drei Transkriptionsfaktoren veranlasst. Die Transkriptionsfaktoren Nf κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und AP-1 (*activating protein-1*) führen zu einer Proliferation und Differenzierung der aktivierten T-Zelle.

Zusätzlich zum CD3-Komplex und T-Zellrezeptor besitzt die Zelle kostimulierende Rezeptoren, über die die Aktivierung der Zelle verstärkt werden kann (Janeway, 2009) (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

1.2 Energetische Voraussetzungen für die ATP-Produktion in T-Zellen

T-Zellen benötigen zur vollständigen Ausführung ihrer Funktionen Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die im Umfeld der T-Zellen vorliegenden Zytokine sowie die Antigene

und kostimulatorischen Signale am T-Zell-Rezeptor bestimmen die Art der Energiegewinnung. Die wichtigsten Energiequellen für T-Zellen sind Glucose und Glutamin. Allerdings scheint nach heutigen Erkenntnissen für Proliferation und Überleben der Zelle hauptsächlich Glukose notwendig zu sein (Maciver *et al.*, 2008).

Naive T-Zellen verbrauchen wenig Energie, die sie bevorzugt aus oxidativer Phosphorylierung beziehen. Diese wird durch Liganden vermittelten Calcium (Ca^{2+}) Einstrom in die Zelle angeregt (Fox *et al.*, 2005). Der Ca^{2+} Einstrom in das Zytosol der Zelle führt durch Aktivierung wichtiger Enzyme im Mitochondrium zur Steigerung der oxidativen Phosphorylierung (Balaban, 2002; McCormack *et al.*, 1993). Für das Überleben der naiven T-Zellen sind vor allem die Interleukine -4 und -7 wichtig (Grossman *et al.*, 2004; Rathmell J.C., 2001).

Eine Effektorzelle hat im Vergleich zu einer naiven T-Zelle einen höheren Energiebedarf. Nach Stimulation einer T-Effektorzelle kommt es, wie oben beschrieben, relativ zügig zu Proliferation, Zellwachstum und Zytokinproduktion. Diese Mechanismen werden durch gesteigerte Glykolyse ermöglicht (Bental *et al.*, 1993). Fette und Aminosäuren stehen nicht zur Energiegewinnung zur Verfügung, da sie zu für das Wachstum notwendigen Zellbestandteilen verstoffwechselt werden. Die Glykolyse ist für die Zelle auch aufgrund der dadurch bedingten Bereitstellung von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials wichtig. NADH entsteht als Nebenprodukt bei der Verstoffwechslung von Pyruvat zu Laktat. Unterstützt wird der Wechsel von oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse durch kostimulatorische Signale wie z.B. CD28-Bindung und Il-2. Die Kostimulation bewirkt die Phosphorylierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) und führt dadurch zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB), die den Ablauf des Glukosestoffwechsels durch eine erhöhte Glukosetransportrate über die Zellmembran begünstigt. Il-2 kann die Steigerung des Glukosestoffwechsels über den JAK (Januskinasen) -STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) -Signalweg beeinflussen (Frauwirth *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 1993).

Neben der Glykolyse kann auch der Pentose-Phosphat-Weg zur Energiegewinnung genutzt werden. Dabei kommt es zur Bildung von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Ribose-5-Phosphat, die für die DNA (Desoxyribonukleinsäure) - und RNA (*Ribonukleinsäure*) -Synthese verwandt werden (Sagone *et al.*, 1974).

Die Energiebilanz pro Molekül Glukose ist bei der Glykolyse (2 Moleküle ATP) sehr viel geringer als bei oxidativer Phosphorylierung (30 Moleküle ATP), trotzdem wählt die T-Zelle diesen Weg zur Energiebereitstellung (Fox *et al.*, 2005). Eine Erklärung für diese Art der Energiegewinnung kann laut Fox *et al.* die Nutzung der bei der Glykolyse entstehenden Stoffwechselprodukte in Form von

NADH zur Nukleotidsynthese und Gluthation-Herstellung sein. Die T-Zelle scheint sogar durch ein hohes NADH/NAD⁺-Verhältnis die oxidative Phosphorylierung zu unterdrücken, um bevorzugt Energie aus Glukose mittels Glykolyse bereitzustellen.

In Zellen gibt es zwei Transportsysteme für Elektronen, die der Atmungskette zur weiteren Energiegewinnung zugeführt werden sollen: den Glycerin-3-Phosphat-Shuttle und den Malat-Aspartat Shuttle. Wahrscheinlich benutzt die Zelle den Glycerol-Phosphat-Shuttle (1,5 mol ATP/1 NADH) um Elektronen für die Atmungskette bereitzustellen. Dieser Schritt bringt weniger Moleküle ATP als der Transport der Elektronen über den Malat-Aspartat-Shuttle (2.25 mol ATP/ 1 NADH), geht aber viel schneller und ermöglicht dadurch eine schnellere ATP-Bereitstellung für die Zelle (Bauer *et al.*, 2004; Salway, 1999).

1.3 Die Rolle der T-Zelle während einer Transplantatabstoßung

Organtransplantationen sind häufig im Rahmen von schwerwiegenden Erkrankungen wie der chronischen Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz oder Leberinsuffizienz notwendig, und sind dann meistens die einzige Möglichkeit der Heilung bzw. des Überlebens des Patienten.

Für das Immunsystem des Menschen bedeutet die Annahme eines fremden Organs unter Wahrung seiner Integrität eine große Herausforderung, weshalb es zunächst versucht, das fremde Organ abzustößen.

Dabei werden akute und chronische Abstoßungsreaktionen unterschieden.

Zwei Arten von Gewebeunterschieden können alloreaktive Immunreaktionen auslösen. Entweder liegen Unterschiede in den MHC-Molekülen vor oder es bestehen Unterschiede in sogenannten Neben-Histokompatibilitätsantigenen von Spender und Empfänger, welche dann als Antigen fungieren, auf die das Immunsystem reagiert (Janeway, 2009).

Dabei werden entweder T-Effektorzellen des Empfängers von antigenpräsentierenden Zellen aus dem Spenderorgan aktiviert (direkte Allogenerkennung) oder die T-Effektorzellen werden von eigenen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, die zuvor allogene Proteine des Spenders aufgenommen haben (indirekte Allogenerkennung) (van den Hoogen, 2010).

Die T-Zellen wandern in das Transplantat und sezernieren Chemokine, die dort eine chronische Entzündung mit Narbenbildung hervorrufen sowie zu weiterer Immunstimulation durch Aktivierung von Komplementfaktoren führen. Dadurch kommt es im Folgenden zum irreversiblen Organversagen und zur Transplantatabstoßung (Wasowska, 2010).

Eine weitere Art der Organabstoßung ist die hyperakute Abstoßungsreaktion. Dabei ist das Immunsystem des Empfängers durch vorherigen Antigenkontakt, zum Beispiel durch Bluttransfusionen, bereits gegen Spenderantigene sensibilisiert. Es bestehen daher schon

Alloantikörper gegen Blutgruppenantigene, die dann nach der Transplantation durch Bindung an α -Gal-Epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) an Endothelzellen die Komplement- und Blutgerinnungskaskade aktivieren und damit zum Gefäßverschluss sowie Absterben des Organs führen (Brenner *et al.*, 2010).

1.4 Immunsuppression

Um Patienten vor den Abstoßungsreaktionen des Körpers zu schützen, werden therapeutisch Immunsuppressiva eingesetzt.

Die heute am häufigsten nach Organtransplantationen verwendeten Immunsuppressiva lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Diejenigen, wie zum Beispiel Kortikosteroide, CyclosporinA und Tacrolimus, die durch Eingriff in die Signalübertragungswege aktivierter T-Zellen die Transkription von Effektormolekülen wie z. B. Zytokinen blockieren, die antiproliferativ wirkenden Medikamente wie Azathioprin, Cyclophosphamid, Rapamycin und Mycophenolatmofetil, die auf das Immunsystem durch Hemmung der DNA-Synthese oder anderer für die Proliferation wichtiger Signalwege auf die Proliferation von T-Zellen Einfluss nehmen sowie die Gruppe der rekombinanten Proteine (sogenannte „Biologicals“). Dabei handelt es sich meist um Antikörper, wie Muromonab CD3 (OKT-3), Basiliximab oder Daclizumab, die für die Aktivierung der T-Zellen wichtige Signale blockieren (Schild und Förstermann, 2009).

Leider weisen diese Medikamente auch viele Nebenwirkungen auf, die für Patienten sehr schädigend sein können. Dazu zählen vor allem neurologische und gastroenterologische Beschwerden, Nephrotoxizität sowie Infektionen und ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen (Vollmar und Dingermann, 2005).

Um Patienten möglichst nebenwirkungsarm zu behandeln, ist es wichtig, Immunsuppressiva richtig zu dosieren. Einerseits soll der Patient vor einer Transplantatabstoßung geschützt sein, andererseits soll er keine Infektion oder andere Folgeerkrankungen aufgrund der Immunsuppression entwickeln. Die richtige Wahl und Dosierung der immunsuppressiven Therapie ist zu einem der wichtigsten Faktoren geworden, die das Langzeit-Überleben von Organen und Patienten nach Transplantationen beeinflussen (Israeli *et al.*, 2007). Daher besteht ein dringender Bedarf, Biomarker zu entwickeln, die den erzielten Grad der funktionellen Beeinträchtigung des Immunsystems anzeigen und die zur Steuerung der immunsuppressiven Therapie verwendet werden können (sog. „Immunmonitoring“).

1.5 Der ImmuKnow-Assay

Ein neues Verfahren zum Immunmonitoring wurde von der Firma Cylex (Columbia, MD, USA) entwickelt und unter dem Namen ImmuKnow[®]-Assay oder Cylex[™] Immune Cell Function Assay

auf den Markt gebracht. Dieser diagnostische Test basiert auf der Messung der Fähigkeit von CD4+ Zellen, nach *in-vitro* Stimulation ATP zu produzieren und ist seit 2002 von der *Food and Drug Administration* in den USA zugelassen.

Bei Verdacht auf eine Infektion bzw. Abstoßungsreaktion nach Transplantation ist die Entnahme einer Gewebeprobe aus dem transplantierten Organ die Methode der Wahl, um diese Vermutung zu verifizieren. Die Kontrolle der Immunsuppressiva-Spiegel im Blut kann helfen, toxische Effekte durch Medikamenten-Überdosierung auszuschließen, trägt jedoch wenig zur Beurteilung der erreichten Immunsuppression bei, da sich Patienten sehr stark in ihrer Reaktivität auf die einzelnen Medikamente unterscheiden können (Israeli *et al.*, 2007).

Die ImmuKnow-Methode beansprucht, per Messung des ATPs, welches von CD4+ Zellen nach Stimulation produziert wird, eine Aussage über eine Über- bzw. Unterdosierung des Immunsuppressivums zu machen (Kowalski *et al.*, 2006). Ähnliche *Assays*, bei denen der ATP-Spiegel zur Messung des Zellmetabolismus und der Zytotoxizität von Chemotherapeutika verwendet wird, sind schon seit dem Jahr 1986 durch Lundin und 1991 durch Andreotti bekannt geworden (Lundin *et al.*, 1986 und Andreotti *et al.*, 1991).

Die durch den ImmuKnow-Test ermittelten ATP-Werte werden in die 3 Bereiche „niedrig“ (<225 ng/ml), „mäßig“ (226-524 ng/ml) und „hoch“ (>525 ng/ml) eingeteilt. „Niedrige“ ATP-Werte nach Immunsuppressivgabe weisen auf eine geringe Immunfunktion des Patienten hin, wohingegen die Immunfunktion von Patienten mit „hohen“ ATP-Werten stark ist. Somit tragen Patienten mit niedrigen ATP-Werten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Infektion, während Patienten mit hohen ATP-Werten die Gefahr einer Abstoßungsreaktion droht (Zeevi *et al.*, 2009; Kowalski *et al.*, 2007).

Bisher konnte für den Test vor allem ein hoher positiv prädiktiver Wert zur Vorhersage einer Abstoßungsreaktion in klinischen Studien belegt werden (Kowalski *et al.*, 2006).

In vielen klinischen Studien konnte ein Benefit dieser nicht-invasiven Immunmonitoring-Methode für den Patienten gezeigt werden. So gibt es beispielsweise klinische Studien zum Immunmonitoring nach Lebertransplantation (Cheng *et al.*, 2011), nach Herztransplantation (Israeli *et al.*, 2010) und nach Lungentransplantation (Thacker *et al.*, 2009).

Vorteile der ImmuKnow-Methode sind zum einen eine schnelle Ermittlung des ATP-Wertes (über Nacht) und die Möglichkeit, eine quantitative Aussage über den gesamten Immunstatus des Patienten treffen zu können. Zum anderen ist eine individuelle Einstellung des Patienten mit dem Therapeutikum besser zu verwirklichen (Kobashigawa *et al.*, 2010) und somit sind die Folgen einer Über – bzw. Unterdosierung des Immunsuppressivums erfolgreicher zu verhindern.

Die Herstellerfirma empfiehlt, diesen Test einmal vor der Operation, dann in den ersten 6 Monaten

nach Transplantation alle 2 Wochen, und 7-12 Monate nach Transplantation monatlich durchzuführen. Ein Jahr nach der Transplantation wird eine vierteljährliche Kontrolle der ATP-Werte der CD4+ Zellen empfohlen (Cylex, 2013).

1.6 Stimulanzen

In dieser Arbeit wurden Lymphozyten auf unterschiedliche Weise stimuliert. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die unterschiedlichen Stimulationsarten geben.

1.6.1 PHA-L

Mit Phytohämagglutinin-L (PHA-L) lassen sich T-Lymphozyten polyklonal stimulieren. Von der Stimulation bleiben die B-Lymphozyten unbeeinflusst. PHA-L gehört zur Gruppe der Lektine und wird aus der Pflanze *Phaseolus vulgaris* gewonnen (Hammarström *et al.* 1982). Es liegt als ein Tetramer von 4 L-Typ Subgruppen vor, die durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden. Jedes Tetramer wiederum besteht aus dem Isolektin L4. PHA-L hat ein Molekulargewicht von 120 kDa. Es bindet bevorzugt an N-Acetylgalactosamine und Galaktose am T-Zellrezeptor und führt dadurch zu Zellagglutination und Mitoseinduktion (Kim *et al.*, 2011).

1.6.2 Anti-CD3 / anti-CD28

Anti-CD3-Antikörper stimulieren die T-Zelle spezifisch über Bindung an den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex. Dadurch kann die oben beschriebene *in vivo* Stimulation der T-Zelle *in vitro* nachgestellt werden. Die Stimulation hat mitogene Wirkung und induziert in der Zelle die Proliferation und die Zytokinproduktion (Lindl und Bauer, 1989).

CD28 ist ein kostimulierender Rezeptor auf T-Zellen. Nach Bindung von anti-CD28 kommt es zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und der PKB. Diese steigert die Expression des Glukosetransporters-1 an der Zellmembran, und fördert dadurch die Glukoseaufnahme und -verstoffwechslung in der T-Zelle, wodurch letztlich die Zellproliferation angeregt wird (Thompson *et al.*, 2002).

1.6.3 PMA / Ionomycin

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) ähnelt in seiner Struktur dem *second messenger* Diacylglycerin und aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC gehört zur Familie der in der Zellmembran verankerten Serin/Threonin Kinasen. Sie bewirkt in der Zelle Zellwachstum und Zellproliferation, Genexpression, Hormonsekretion und hat Einfluss auf diverse Membranfunktionen (Hussaini *et al.*, 2010).

Ionomycin wird zusammen mit PMA zur Stimulation von Zellen eingesetzt. Ionomycin stammt aus dem Bakterium *streptomyces conglobatus* und ist als Ionophore bekannt, da es in der Lage ist, Kationen wie Ca^{2+} über die Zellmembran zu transportieren (Liu et al., 1978). Ionomycin aktiviert Ca^{2+} / Calmodulin –abhängige Signalwege. Es wirkt synergistisch mit PMA in Bezug auf die Aktivierung der PKC und führt zur Hydrolyse des *second messengers* Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat, der wichtig für Zellwachstum und Zellüberleben ist (Geha et al).

1.6.4 Concanavalin A

Concanavalin A (ConA) gehört wie PHA-L zur Gruppe der Lektine und wird aus der Pflanze *Canavalia ensiformis* gewonnen. Die Struktur ist ein Homotetramer mit 4 Subgruppen (Hardman und Ainsworth, 1972). Über Bindung an α -D-Mannose und α -D-Glukosyl-Gruppen auf der Zelloberfläche führt ConA zu Zellagglutination und wirkt mitogen. Es aktiviert neben zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen auch regulatorische T-Zellen, die dann die weitere Immunantwort seitens der B- und T-Zellen supprimieren (Dwyer und Johnson, 1981).

1.6.5 SEB

Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wird von Staphylokokken produziert und gehört zur Gruppe der Superantigene. Es ist ein sehr potentes Mitogen und führt zu polyklonaler T-Zell-Aktivierung. Die Bindung von SEB an die T-Zelle findet an MHC-II-Klasse Proteinen und am T-Zell Rezeptor statt (Fleischer und Schrezenmeier, 1988) und induziert in der T-Zelle die Proliferation sowie die Zytokinproduktion.

1.6.6 OVA- und LLO-Peptid

Das OVA-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) ist aus dem Hühner-Ovalbumin abgeleitet. Es wird von MHC I-Molekülen der C57BL/6 Maus präsentiert, und aktiviert CD8⁺ T-Zellen der OT-I Maus, die einen OVA-spezifischen transgenen T-Zell-Rezeptor trägt (Hogquist et al., 1994). Das LLO-Peptid ist aus dem Listeriolysin O abgeleitet. Das in dieser Arbeit verwendete LLO-Peptid₁₈₉₋₂₀₁ aktiviert Listeriolysin-spezifische CD4⁺ Zellen. Es besitzt wie das OVA-Peptid immundominante Epitope, die in Mäusen über MHC-I- bzw. MHC-II-Komplexe präsentiert werden und starke Zellantworten seitens der CD8⁺ bzw. CD4⁺ Zellen induzieren (Ikonomidis et al., 1994; Kursar et al, 2002) . Die Peptide binden von außen an die MHC-Moleküle der APC, ohne dass sie von den Zellen aufgenommen werden und durch die normalen zellulären Prozessierungswege gehen. Dadurch, dass

sie im Überschuss gegeben werden, verdrängen sie endogene Liganden der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche.

1.7 Infektion mit *Listeria monocytogenes* in der Maus

In einer Studie zum Immuknow-*Assay* wurde berichtet, dass niedrige ATP-Spiegel nicht nur auf ein erhöhtes Infektionsrisiko hinweisen, sondern dass die ATP-Spiegel auch im Verlauf einer manifesten Infektion erniedrigt sind (Israeli *et al.*, 2010). Um diese Aussage zu überprüfen, wurden Versuche an infizierten Mäusen durchgeführt.

Als Infektionsmodell wurde die parenterale Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* (Lm) verwendet.

Dieses ist ein gram-positives stäbchenförmiges Bakterium, das fakultativ-anaerob lebt (Schnupf und Portnoy, 2007).

Die injizierten Listerien gelangen aus dem Darm über die Blutbahn zunächst in die Milz und Leber, wo sie in Makrophagen eindringen. Von dort aus befallen sie via Internalin A und B, welche sie auf ihrer Oberfläche tragen, Nachbarzellen wie Hepatozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen (Shen *et al.*, 2000).

Das Bakterium schützt sich intrazellulär vor einem Abbau im Phagosomen durch die Ausschüttung von Listeriolysin (LLO), welches die Phagosomenmembran zerstört (Bielecki *et al.*, 1990). Um in das Zytosol der Zelle zu gelangen, schüttet das Bakterium die Aktinpolymerase (ActA) aus. Dieses Protein bildet Aktinpolymere, die dem Bakterium außer dem Weg in das Zytosol auch den Weg in Nachbarzellen ermöglichen, und zwar ohne dadurch in die extrazelluläre Umgebung zu gelangen (Kocks *et al.*, 1992).

Die infizierte Maus versucht den Erreger zunächst mit den Mechanismen des angeborenen Immunsystems zu bekämpfen. Es kommt durch NK-Zellen zur Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und dadurch zur Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten. Infizierte Makrophagen produzieren den Tumornekrosefaktor- α (TNF α), IFN γ und CC-Chemokine Ligand 2 (CCL-2), welcher an den Chemokin-Rezeptor von zirkulierenden Monozyten binden kann. Die „angelockten“ Monozyten entwickeln sich durch Kontakt mit freigewordenen bakteriellen Bestandteilen zu TNF α - und Stickstoffmonoxid-Synthase-produzierenden dendritischen Zellen (TipDC), die dann die Eliminierung des Erregers initiieren. Die infizierten Makrophagen und die rekrutierten TipDCs treffen im Bereich der weißen Pulpa der Milz auf CD8⁺ Zellen, denen dort die Antigene präsentiert werden (Serbina *et al.*, 2003).

Von da an beginnt der Organismus mit den zellulären Mechanismen der erworbenen Immunantwort auf den Erreger zu reagieren.

Listerien sezernieren in das Zytosol der Zelle verschiedene Toxine wie LLO und Metalloproteinasen, die in weiteren Phagosomen der Zelle abgebaut werden, T-Zellen präsentiert werden und diese aktivieren (Finelli *et al.*, 1999). Nach Antigenpräsentierung sind zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Proliferation Il-2, IFN- γ und Perforin von großer Bedeutung (Badovinac und Harty, 2000).

Die CD4+ und CD8+ Zellantworten erreichen ihr Maximum an Tag 8 bis 10 nach Infektion (Busch *et al.*, 1998). Die Listerien werden bis Tag 10 vollständig von den CD4+ und CD8+ Zellen aus dem Organismus der Maus eliminiert (Pamer 2004, Wong *et al.*, 2003).

Bei einer erneuten Infektion mit *Listeria monocytogenes* kann das Immunsystem der Maus durch die vorherige Bildung von Gedächtniszellen die Infektion schnell bekämpfen. Zurzeit wird angenommen, dass CD4+ Zellen vorwiegend die Langlebigkeit der CD8+ Gedächtniszellen unterstützen (Sun *et al.*, 2004). Die Gedächtniszellen entwickeln bei erneuter Antigenstimulation ein größeres T-Zell-Rezeptor-Repertoire und zeigen eine erhöhte Sensibilität für das Antigen (Busch und Pamer, 1999).

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte an Milzzellen der Maus untersucht werden, inwieweit sich der intrazelluläre ATP-Spiegel von T-Lymphozyten als Parameter zur Messung ihres Funktionszustands eignet. Dazu wurde eine in den USA neu entwickelte Untersuchungsmethode, der „ImmuKnow-Test“ verwendet, der den ATP-Gehalt der T-Lymphozyten von Patienten nach Stimulation *in vitro* misst, um daraus eine Aussage über Ausmaß und Art der zellulären Immunantwort abzuleiten. Nach Etablierung dieser Methode im Mausmodell sollte ermittelt werden, wie sich verschiedene Stimulationsbedingungen auf den ATP-Gehalt von T-Lymphozyten auswirken.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, wie sich eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* auf die ATP-Spiegel von CD4+ bzw. CD8+ Zellen auswirkt. Dabei wurde zu jeder der genannten Fragestellungen die gemessene iATP (intrazelluläresATP) - Konzentration mit der Zytokinproduktion dieser Zellen nach Stimulation verglichen, um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern in Bezug auf die Zellaktivität besteht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Durchflusszytometer FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) Canto | BD (Heidelberg) |
| Inkubator MCO-20 AIC | Sanyo (Bad Nenndorf) |
| Luminometer Victor | Perkin-Elmer (Rodgau) |
| <i>Magnetic Particle Concentrator</i> , Dynal MPCTM – 96S | Invitrogen |
| Mikroskop | Carl Zeiss (Jena) |
| Mikropipetten | Eppendorf (Hamburg) |
| Motorpipette "Express" | Falcon (Heidelberg) |
| Schüttler Micromix 5 | Siemens |
| Zentrifuge Rotanta 460R | Hettich (Tuttlingen) |
| Neubauer Zählkammer 0,1mm | Marienfeld (Lauda Königshofen) |
| Deckgläser | Marienfeld (Lauda Königshofen) |

3.1.2 Verbrauchsmittel

| | |
|----------------------------------------------------|------------------------|
| Einwegspritzen (verschiedene Größen) | Braun (Melsungen) |
| FACS-Röhrchen, 5ml, PP, Rundboden | BD Falcon(Heidelberg) |
| Handschuhe, Peha Soft Satin | Hartmann |
| Kulturschalen 10cm | Nunc (Roskilde) |
| Mikrotiterplatte | Nunc (Roskilde) |
| Pipettenspitzen, verschiedene Größen | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5ml | Eppendorf AG (Hamburg) |
| <i>Tubes</i> , Cellstar 15ml, 50ml, PP, Spitzboden | Greiner Bio-one |
| <i>Cellstrainer</i> (70 µM) | BD Falcon (Heidelberg) |
| <i>Opti-Plate 96</i> | Perkin Elmer (Waltham) |

3.1.3 Verwendete Medien und Puffer

Medien:

DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) +/- 1%

RPMI komplett:

- RPMI 1640
- 5 % FCS (Fötale Kälberserum)
- 1 % Glutamin
- 0,1 % Gentamycin
- 0,1 % 2-Mercaptoethanol

Puffer:

1. PBS (*phosphate buffered saline*) +/+
5 % FCS

2. PBS +/+
5 % FCS
0,01 % Glutamin

3. PBS +/+
5 % FCS
0,01 % Pyruvat

4. PBS +/+
5 % FCS
0,01 % Glukose

| | | |
|----------------|----------------------------------------|-------|
| Erylysepuffer: | 155 mM NH ₄ CL | Merck |
| | 10 mM KHCO ₃ | Merck |
| | 100µM EDTA | |
| | (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 7,2 | Roth |

Saponinpuffer : 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin)
0,3% Saponin
in DPBS -/- 1x

3.1.4 Lösungen

| | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Bacto Agar | BD (Heidelberg) |
| β -2-Mercaptoethanol (1000x für Zellkultur) | Gibco invitrogen (Karlsruhe) |
| BSA | Sigma (Steinheim) |
| BrefeldinA | Sigma (Steinheim) |
| Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Cell Titer Glo Lumineszenz Cell Viability Assay | Promega (Madison,USA) |
| Cycloheximid | Sigma |
| Dapi, Stock c= 5mg/ml | BD Biosciences |
| 2-Deoxy-D-glucose Grade III | Sigma Aldrich (Steinheim) |
| D(+)-Glucose | Merck (Darmstadt) |
| DPBS | Gibco Invitrogen (Karlsruhe) |
| <i>Dynabeads Biotin Binder</i> | Gibco Invitrogen (Karlsruhe) |
| EDTA 0,5 M, pH 8,0 | Institut für Immunologie, UKE |
| Fc-Rezeptor Block | BD (Heidelberg) |
| FCS | PAA (Paschingen) |
| Gentamycin | Gibco invitrogen (Karlsruhe) |
| Glutamin | Gibco invitrogen (Karlsruhe) |
| IGEPAL CA 630 | Sigma (Steinheim) |
| NRS (Normales Rattenserum) | Jackson Immuno Research (Baltimore) |
| RPMI 1640 | Gibco BRL (Karlsruhe) |
| Saponin | Sigma (Steinheim) |
| SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> 10 %) | Bio Whittaker (Walkersville) |
| TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>) | BD (Heidelberg) |
| Tryptan Blau | Biochrom AG (Berlin) |

3.1.5 Stimulanzen

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------|
| PMA (<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>) | Sigma (Steinheim) |
| Ionomycin | Gibco Invitrogen (Karlsruhe) |
| PHA-L | Sigma (Steinheim) |
| SEB | Sigma (Steinheim) |
| ConA | Sigma (Steinheim) |
| α CD3 | Biolegend (London) |
| α CD28 | BD Biosciences (Heidelberg) |

OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid

JPT (Berlin)

LLO₁₈₉₋₂₀₁ Peptid

JPT (Berlin)

3.1.6 Antikörper

| Spezifität | Fluorochrom | Klon | Firma |
|--------------|-------------|--------------|-------------|
| CD16/CD32 | FITC #13 | 2.4G2 | BD |
| CD4 | PE #4 | RM 4-5 | eBioscience |
| CD4 | Biotin | GK1.5 | eBioscience |
| CD8 | Biotin | 53-6.7 | eBioscience |
| CD8 | PeCy7 #12 | 53-6.7 | BioLegend |
| CD25 | FITC #12 | 7D4 | BD |
| CD62l | APC #64 | MEL-14 | eBioscience |
| TNF α | APC #63 | MP6- XT22 | BD |
| IFN γ | V450 #17 | XMG1.2 | BD |

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

3.1.7 Mauslinien

C57 Bl/6

Charles River (Sulzfeld)

Balb/c

Charles River (Sulzfeld)

Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg gezüchtet.

3.1.8 Bakterienstamm

L. monocytogenes OVA (LmOVA)

bereitgestellt durch Dr. H. Shen
(Philadelphia)

3.2 Methoden

Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte immer unter folgenden Bedingungen:

4° C, 1600 RPM, 5 Min

Alle Versuche wurden auf Eis durchgeführt.

3.2.1 Milzaufreinigung

Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus CO₂ und O₂ betäubt und durch reines CO₂ getötet. Es folgte die Präparation der Milz, die auf Eis in 5 ml PBS +/- bis zur Aufreinigung gelagert wurde.

Für die Aufreinigung der Milzzellen wurde das Milzgewebe zunächst durch ein Metallsieb gerieben. Nach Zentrifugation der gewonnenen Zellsuspension wurde das Zellpellet für 3 Minuten in 3 ml Erylysepuffer resuspendiert und nach Verdünnung mit PBS/-/ durch einen Cell Strainer in ein 50 ml Falcon Tube filtriert. Nach erneutem Zentrifugieren konnte das Zellpellet in 5 ml RPMI komplett aufgenommen werden. Daraufhin folgte das Zählen der aufgereinigten Zellen in einer Neubauer Zählkammer.

3.2.2 Zellstimulation

Um für die FACS-Färbungen und die ImmuKnow-Ansätze die gleichen Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde jeweils ein gemeinsamer Ansatz angesetzt, der erst nach Zugabe des Stimulanz für die jeweiligen Versuche aufgeteilt wurde.

Für die unstimulierten Ansätze und die stimulierten Ansätze wurden jeweils $4 \cdot 10^6$ Zellen in einem Endvolumen von 1 ml in RPMI komplett aufgenommen. Die stimulierten Ansätze enthielten zusätzlich das Stimulanz. Die verwendeten Stimulanzen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt (siehe Tabelle 2).

| Stimulanz | Eingesetzte Konzentration |
|-----------|---------------------------|
| PHA-L | 10 µg/ml |
| αCD3 | 1 µg/ml |
| αCD28 | 1 µg/ml |
| PMA | 50 ng/ml |
| Ionomycin | 1 µM |
| OVA | 10 ⁻⁶ M |
| LLO | 10 ⁻⁵ M |
| SEB | 10 µg/ml |
| ConA | 5 µg/ml |

Tabelle 2: Eingesetzte Konzentration der jeweiligen Stimulanzen.

Aus dem Ansatz wurden 500 µl für den ImmuKnow Ansatz entnommen und auf 4 Näpfe der 96-well-plate verteilt. Somit befanden sich in jedem Napf $0,5 \cdot 10^6$ Zellen.

Die restlichen 500 µl wurden für die Messung im Durchflusszytometer verwendet. In der Regel wurden 2 verschiedene Färbungen angefertigt, daher wurden die 500 µl nochmals auf 2 FACS-Röhrchen verteilt. Jeder Ansatz enthielt somit $1 \cdot 10^6$ Zellen. Nach 4-stündiger Stimulation der Zellen wurde 1 µl Brefeldin A in 50 µl PBS (Endkonzentration 10 µg/ml) zu den Ansätzen, die mit intrazellulären Antikörpern gefärbt werden sollten, gegeben. Brefeldin A verhindert den intrazellulären Proteintransport und die Proteinsekretion, sodass alle intrazellulären Bestandteile in der Zelle für die Messung verbleiben.

3.2.3 Färbung der Zellen

Für die intra- und extrazelluläre Färbung wurden aufgereinigte Milzzellen verwendet. Um unspezifische Antikörperbindungen an den Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen zunächst mit einem Fc-Block und natürlichem Rattenserum für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der extrazelluläre Antikörper (α CD4, α CD8, α CD62l, α CD25) für 20 Minuten in einer Verdünnung mit PBS/- von 1:100 zugegeben. Die Zellen wurden dann nochmals gewaschen und der extrazelluläre Antikörper durch die Zugabe von Paraformaldehyd 2% ig auf den Zellen fixiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln sowie Waschen der Zellen mit PBS/-, folgte eine 5-minütige Inkubation mit Fc-Block und Saponinpuffer. Saponinpuffer wird eingesetzt, um die Zellmembran zu lysieren und somit die Anfärbung von intrazellulären Bestandteilen möglich zu machen. Die Zugabe von intrazellulärem Antikörper (α TNF- α , α IFN γ) erfolgte in einer Verdünnung von 1:100 in Saponinpuffer. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen und konnten dann am Durchflusszytometer gemessen werden.

Falls eine Messung am selben Tag nicht mehr möglich war, wurden die Zellen mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert.

3.2.3.1 CFSE Färbung

Um die Proliferation von Zellpopulationen zu messen, wurden die Zellen vor der Stimulation mit CFSE gefärbt. Dieser Farbstoff ist nicht membrangängig und verbleibt somit in der Zelle. Bei jeder Zellteilung wird Farbstoff an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Abnahme der Fluoreszenz in den nachfolgenden Zellgenerationen kann die Anzahl der Zellteilungen und damit die Proliferation der Zellen beurteilt werden.

$1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in einem 50 ml Falcon-Tube bei 20 °C und 380 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 900 µl resuspendiert und im Wasserbad bei 37 °C für 5 Minuten angewärmt. 100 µl der CFSE Lösung mit einer Konzentration von 50 µM wurden zu den Zellen gegeben, sodass die CFSE-Endkonzentration 5 µM betrug. Dieses Gemisch wurde für

15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und währenddessen alle 3 Minuten geschwenkt. Dann wurde das angewärmte Gemisch mit 50 ml kaltem PBS + 0,1 % BSA-Puffer aufgefüllt und nochmals für 8 Minuten bei 20 °C und 380 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder mit PBS + 0,1 % BSA aufgefüllt und erneut zentrifugiert.

Die mit CFSE gefärbten Zellen wurden dann für 72 Stunden mit dem jeweiligen Stimulanz im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die Zellen für die weitere extrazelluläre Antikörperfärbung verwendet werden (siehe Material und Methoden 3.2.3). Nach der Zellfärbung mit α CD8- und α CD4- Antikörper wurde die Zellproliferation am Durchflusszytometer gemessen.

3.2.3.2 DAPI-Färbung

Mit dem DAPI-Farbstoff werden nur tote Zellen angefärbt. So ist eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich.

Der DAPI Farbstoff wurde mit PBS +/- vorverdünnt, sodass er in einer Konzentration von 50 μ g/ml vorliegt. Diese Vorverdünnung wurde in einem Verhältnis von 1:10 1-5 Minuten vor der Messung am Durchflusszytometer zu den zu messenden Zellen pipettiert.

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Charakterisierung von Zellpopulationen und zur Messung ihrer Zytokinproduktion angewandt.

Für die Durchflusszytometrie werden die zu messenden Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Während der Messung werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet, der die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe anregt, sodass diese Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren und damit ein für sie spezifisches Signal versenden. Neben der Möglichkeit die Emission des Farbstoffes zu messen, ermöglicht diese Messung auch eine Aussage über Zellgröße und Zellgranularität. Die Zellgröße wird mittels des Forwardscatters (FSC) und die Granularität durch den Sidewardscatter (SSC) sichtbar. (Luttmann *et al.*, 2009)

3.2.5 Der ImmuKnow-Assay

Der diagnostische Test ImmuKnow beruht auf der Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts der CD4+ Zellen, und soll eine Aussage über den Immunstatus eines organtransplantierten Patienten ermöglichen. Dazu wird Vollblut des Patienten über Nacht mit PHA-L stimuliert. Anschließend werden die CD4+ Zellen isoliert, und ihr ATP-Gehalt wird nach Lyse der Zellen durch die ATP-abhängige Luziferasereaktion gemessen (s. Abb. 1).

Das Enzym Luziferase gehört zu den Oxygenasen, die Luziferin, ATP und Sauerstoff in Gegenwart von Magnesium zu AMP (Adenosinmonophosphat), Pyrophosphat, CO₂ und Licht umwandeln. Nach Zugabe von Luziferin zu der Probe wird die Lichtemission quantitativ mithilfe eines Luminometers gemessen. Dabei ist das gemessene Licht proportional zu der vorhandenen ATP-Konzentration (Luttmann *et al.*, 2009).

Für die jeweilige Auswertung der Ansätze wurde das Programm ImmuKnow® Data Analysis Calculator™ benutzt.

Der ermittelte ATP-Gehalt der Probe wird in ng/ml Vollblut angegeben.

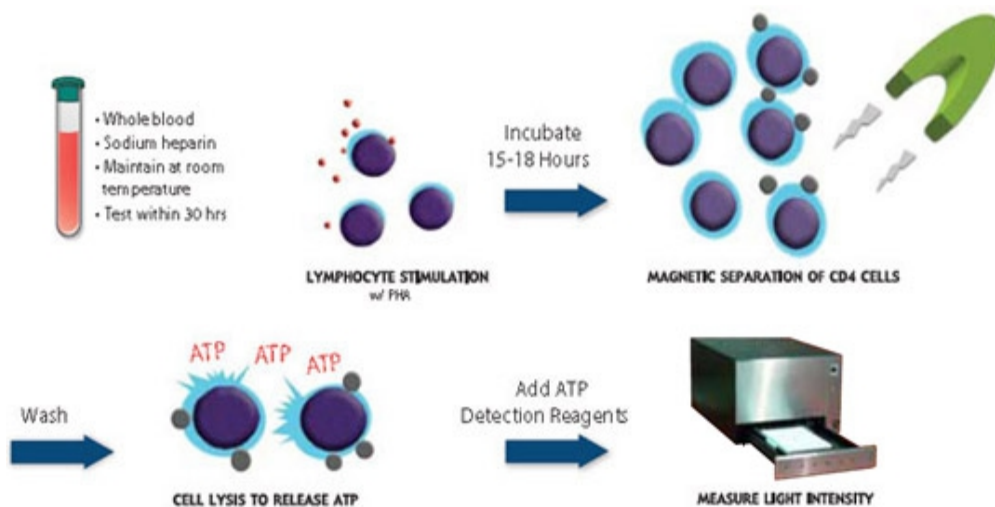


Abb. 1: Darstellung der ImmuKnow Methode, vereinfacht (Cylex, 2009).

In dieser Arbeit wurde der ImmuKnow Assay an Zellen der Maus durchgeführt und nicht das Original Cylex Kit verwendet. Daher unterscheidet sich die Durchführung des hier verwendeten Assays von der von Cylex beschriebenen Versuchsdurchführung in einigen Punkten:

Der ImmuKnow Test erstreckt sich über zwei Tage. Am ersten Tag werden die Milzzellen wie oben beschrieben mit PHA-L in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert (siehe 3.2.2) und je Napf 125 µl auf 96-well-Platten überführt. Die Zellen werden für maximal 24 Stunden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wird dem Ansatz EDTA in einer Konzentration von 20 mM zugefügt und der Ansatz für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach 15 Minuten werden magnetische *Beads* zu den Zellen gegeben. Je nachdem welche Zellpopulation gemessen wird, werden anti-CD4- oder anti-CD8-gekoppelte magnetische *Beads* verwendet. Die Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* wurden zuvor nach Anleitung gewaschen und mit anti-CD4- bzw. anti-CD8-biotinyliertem

Antikörper gekoppelt. Die magnetischen *Beads* mit ihrem jeweils gekoppelten Antikörper wurden dann in einer Verdünnung von 1:20 angesetzt. Pro Napf wurden 50 µl dieser Verdünnung pipettiert und die Ansätze auf dem Schüttler für 30 Sekunden geschüttelt. Danach folgten 2 Inkubationen der Ansätze auf dem Magneten für jeweils 15 Minuten, in denen die magnetischen *Beads* an ihre Zielzellen binden.

Die Ansätze wurden nochmals geschüttelt und anschließend für 2 Minuten auf dem Magneten platziert. Die Zellen blieben nun durch die zustande gekommene Bindung an den *Beads* am Magneten haften, während der Überstand mit den für die Messung nicht benötigten Zellen mit einer Vakuum Pumpe abgesaugt wurde. Es folgten daraufhin drei Waschvorgänge, für die jeweils 200 µl PBS +/- auf die übrig gebliebenen Zellpellets pipettiert wurden und dieses nach 1- bis 2-minütiger Inkubation auf dem Magneten wieder abgesaugt wurde. So sollten möglichst alle Zellen, die nicht spezifisch an die *Beads* gebunden haben, aus der Zellansammlung am Boden der Platte herausgelöst werden.

Nach dem dritten Waschvorgang wurde 200 µl Lysisreagenz auf die Zellen gegeben. In den ersten Versuchen wurde IGEPAL 0,5 % als Lysisreagenz eingesetzt, im Verlauf jedoch durch 7 %iges SDS ersetzt. Die Platte wurde dann für 5 Minuten auf dem Schüttler platziert und danach für eine Minute auf dem Magneten inkubiert. Aus dem jeweiligen Ansatz wurden 50 µl des Zelllysats auf die Messplatte übertragen. Zu dem übertragenen Lysat wurden 150 µl Lumineszenzreagenz gegeben. Nach 3-5 Minuten wurde der ATP-Gehalt der Ansätze am Luminometer gemessen, und wie im Standardverfahren von Cylex mit dem PC-Programm ImmuKnow® Data Analysis Calculator™ ausgewertet. Da die Werte sich dort auf 1 ml Vollblut beziehen, wurden die ATP-Werte für den ImmuKnow Test an der Maus auf $\text{ng}/2 \cdot 10^7$ Zellen umgerechnet.

3.2.6 Listerien-Infektion

Um eine *Listeria monocytogenes* Infektion in der Maus zu induzieren wurden Bakterien vom Stamm LmOVA verwendet. Diese wurden in einer Dosis von $1 \cdot 10^5$ Bakterien pro Maus eingesetzt. Die Injektion erfolgte in eine der lateralen Schwanzvenen der Maus. Zusätzlich wurden Bakterien in der Anzahl von $5 \cdot 10^3$ (Platte 1), $5 \cdot 10^2$ (Platte 2) und $5 \cdot 10^1$ (Platte 3) auf TSB + 0,2 % Agarplatten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Wachstum der Bakterien durch Zählen der Kolonien kontrolliert. Erwartet wurde ein Wachstum auf Platte 1 von über 500 Kolonien, auf Platte 2 von etwa 50 Kolonien und auf Platte 3 von 5 Kolonien. Wurde dies erreicht, konnte von einer erfolgreichen Infektion der Maus ausgegangen werden.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in 5 Abschnitte.

Im ersten Teil wird die Etablierung des *ImmuKnow-Assays* für das Mausmodell vorgestellt.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss unterschiedliche Arten der T-Zell-Stimulation auf die ATP-Produktion in T-Zellen haben. Dabei wurden Einflüsse von verschiedenen T-Zell-Stimulanzen, der Einfluss von Kostimulanzen sowie die Beeinflussung der ATP- und Zytokinproduktion bei Blockierung von CD28 Rezeptoren auf T-Zellen gemessen.

Die zeitliche Entwicklung der ATP- und Zytokinproduktion wird im dritten Abschnitt dargestellt. Dabei liegt der Schwerpunkt besonders auf dem Vergleich des Beginns der ATP- und der TNF α -Produktion in T-Zellen nach Stimulation mit α CD3/ α CD28.

Der vierte Abschnitt des Ergebnisteils befasst sich mit den energetischen Voraussetzungen, die T-Zellen zur Produktion von ATP und Zytokinen benötigen. Es wurde vor allem die Bedeutung von Stoffwechselwegen wie der Glykolyse und der Proteinbiosynthese für die zelluläre Energiegewinnung und das Überleben der Zellen untersucht.

Der letzte Teil zeigt die Auswirkungen einer experimentellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* auf die ATP-Produktion von T-Zellen. Es werden die ATP- und Zytokinproduktionen von nicht infizierten und infizierten Milzzellen gegenübergestellt und die ATP- und Zytokinwerte über einen Zeitraum von 0-9 Tagen sowie die Bedeutung der Art des Stimulanz für die ATP-Synthese in CD4+ und CD8+ Zellen verglichen.

4.1 Etablierung des *ImmuKnow-Assays* im Mausmodell

Bisher wurde der *ImmuKnow-Assay* nur für das Immunmonitoring an menschlichem Vollblut angewandt. Da diese experimentelle Arbeit am Mausmodell durchgeführt wurde, musste der Test für die Maus zunächst etabliert werden.

Mäuse verfügen über sehr geringe Blutmengen in ihrem Körper, das durchschnittliche Gesamtblutvolumen beträgt 7,14 ml / 100 g Körpergewicht (Sluiter *et al*, 1984). Da eine Maus im Durchschnitt 25 g wiegt, beträgt das Gesamtblutvolumen pro Maus etwa 1,785 ml. Daher wurden für den *ImmuKnow-Assay* statt Vollblut, Milzzellen der Maus verwendet. So konnte mit größeren Versuchsansätzen experimentiert werden. Da sich bald zeigte, dass sich Milzzellen unter den bisher gegebenen Versuchsbedingungen anders als Vollblutzellen verhalten, waren Veränderungen des Tests nötig, um verlässliche und mit dem Cyflex *ImmuKnow-Assay* an humanen Zellen durchgeführte Tests vergleichbare Ergebnisse erreichen zu können. Im Folgenden werden die dafür notwendigen Veränderungen vorgestellt.

4.1.1 Erste Ergebnisse nach Durchführung des Assays mit Mausmilzzellen

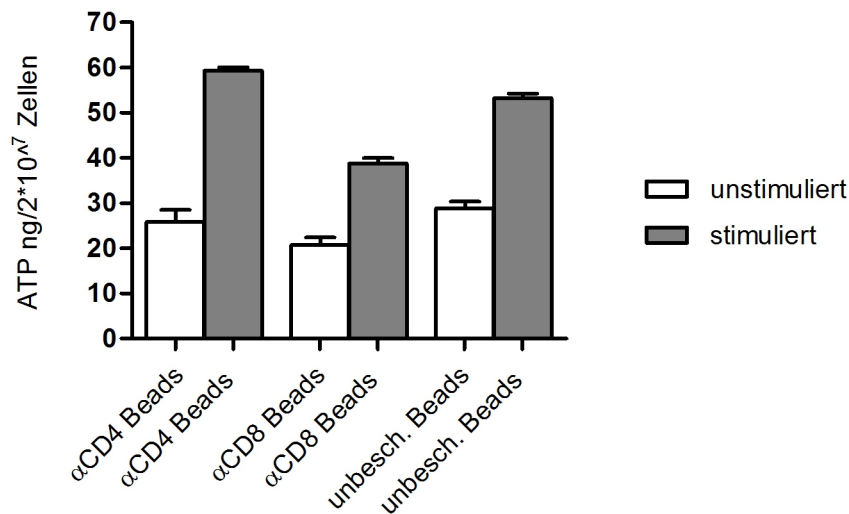


Abb. 2: Darstellung der ATP-Werte in Abhängigkeit von Zelltyp, nach Cylex Protokoll

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37°C mit PHA-L ($10\ \mu\text{g/ml}$) stimuliert (beschichtete Mikrotiterplatte). Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher ungekoppelt oder mit biotinylierten αCD4 - bzw. αCD8 -gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit $200\ \mu\text{l}$ Lysisreagenz ($0,5\ \%$ Igepal) lysiert. Pro Ansatz wurden $50\ \mu\text{l}$ Zelllysat mit $150\ \mu\text{l}$ Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP-Werte unstimuliert / stimuliert (SD =Standardabweichung) in $\text{ng ATP}/2 \cdot 10^7$ Zellen: ungekoppelte *Beads* $28,82$ ($2,95$) / $53,22$ ($2,14$); CD4+Zellen : $25,77$ ($5,38$) / $59,24$ ($1,56$); CD8+Zellen : $20,73$ ($3,31$) / $38,77$ ($2,39$)

Abbildung 2 zeigt die mit der Methode des Cylex Immuknow Assays ermittelten ATP-Werte in Mausmilzzellen. Durch Zellselktion mittels magnetischer *Beads* sollte es möglich sein, die ATP-Werte in CD4+ und CD8+ Zellen zu messen. Als Kontrolle der Selektion wurden ungekoppelte *Beads* verwendet, die keine Zellen binden sollten, sodass in diesen Ansätzen keine messbaren ATP-Werte zu erwarten waren. Die ATP-Werte der Ansätze mit ungekoppelten magnetischen *Beads* zeigten jedoch kaum Unterschiede im Vergleich zu den Ansätzen mit Antikörper-gekoppelten *Beads*. Dies wies darauf hin, dass die Zellseparation unter den verwendeten Bedingungen nicht funktionierte und dass Zellen vor allem unspezifisch an die *Beads* oder den Boden der Stimulationsplatte gebunden waren. Unter allen Selektionsbedingungen waren die ATP-Werte der stimulierten Zellen etwa doppelt so hoch wie die der unstimulierten Zellen. Dies zeigte zwar, dass die Stimulation erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der iATP führte, jedoch war die Steigerung auf das Doppelte sehr viel niedriger als aus entsprechenden Versuchen mit humanen Blutzellen im Cylex Immuknow-Assay zu erwarten war.

Dieser Versuch zeigte also die Notwendigkeit auf, die Bedingungen des Assays für Mauszellen weiter zu optimieren.

4.1.2 Vermeidung von unspezifischer Zellbindung an der Mikrotiterplatte durch Zugabe von EDTA

Um sicherzustellen, dass nur die Zellen im Ansatz nach dem Waschen im Napf der Mikrotiterplatte verbleiben, die auch gemessen werden sollen, wurden weitere Änderungen im Versuchsablauf vorgenommen.

So wurden nach der Stimulation über Nacht die Zellen mit EDTA inkubiert, um eine Ablösung aller Zellen vom Plattenboden zu erreichen und somit eine spezifische Zellselektion via magnetischer *Beads* möglich zu machen.

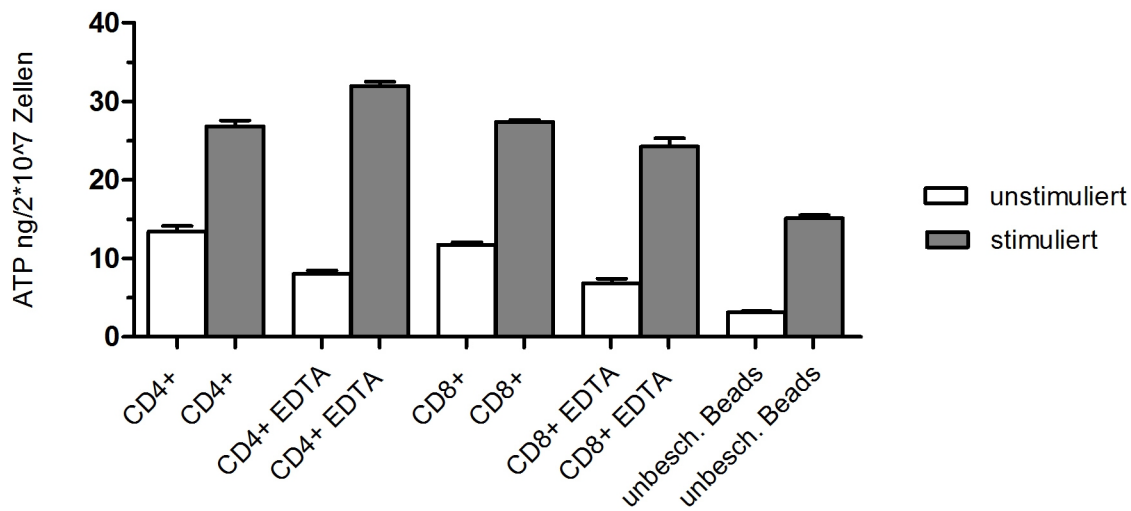


Abb. 3: ATP-Werte nach EDTA-Zugabe

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37°C mit PHA-L ($10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert (beschichtete Mikrotiterplatte). Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert die ungekoppelten oder mit biotinylierten $\alpha\text{CD4-}$ bzw. $\alpha\text{CD8-}$ gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit $200 \mu\text{l}$ Lysisreagenz (Igepal $0,5 \%$) lysiert. Pro Ansatz wurden $50 \mu\text{l}$ Zelllysat mit $150 \mu\text{l}$ Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP Werte unstimuliert / stimuliert (SD) in $\text{ng}/1 \cdot 10^7$ Zellen: ungekoppelte magnetische *Beads* mit EDTA: $3,12 (0,37) / 15,11 (0,83)$; CD4+ $14,43 (1,38) / 26,82 (1,49)$; CD4+ mit EDTA: $8,03 (0,56) / 31,97 (1,06)$; CD8+ : $11,74 (0,65) / 27,38 (0,54)$; CD8+ mit EDTA: $6,86 (1,10) / 24,26 (2,06)$

Abbildung 3 ist zu entnehmen, dass in Ansätzen mit EDTA die Bindung von unspezifischen Zellen am Boden der Mikrotiterplatte verringert werden konnte. Die ATP-Werte waren vor allem in den unstimulierten Ansätzen gegenüber dem Ausgangsversuch (s. Abb. 2) gesunken. Die ATP-Werte in

den stimulierten Ansätzen betragen nach EDTA-Inkubation deutlich mehr als das Doppelte der ATP-Werte in den unstimulierten Ansätzen.

Jedoch waren die ATP-Werte noch immer niedriger und zeigten noch wesentlich geringere Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen als in Versuchen mit humanen Blutzellen im Cylex Immuknow-Assay, bei dem sich die gemessenen ATP-Werte im Mittel zwischen 225 und 525 ng/ml ATP bewegten (Kowalski *et al*, 2006).

Um zu überprüfen, ob trotz der drei Waschvorgänge während der Inkubation mit den magnetischen *Beads* alle Zellen im Versuchsansatz verbleiben, die auf ihre ATP Produktion untersucht werden sollen, wurden die Überstände der jeweiligen Ansätze gesammelt und per Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von CD4+ bzw. CD8+ Zellen untersucht (Abb. 4). Es zeigte sich, dass nur eine sehr geringe Anzahl CD4+ bzw. CD8+ Zellen im Überstand der Ansätze nach Inkubation mit α CD4 bzw. α CD8-gekoppelten magnetischen *Beads* verblieben. Diese Untersuchung bestätigt die Annahme, dass die CD4+ bzw. CD8+ Zellen die jeweiligen magnetischen *Beads* spezifisch binden.

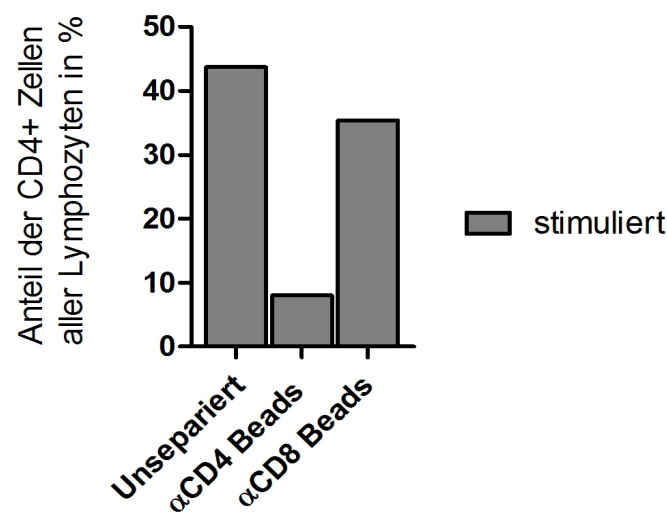


Abb.4: Kontrolle der Zellseparation beispielhaft anhand der CD4+Zellen nach Inkubation mit α CD4+ bzw. α CD8+ *Beads*

Es wurden die Überstände der Näpfe der Mikrotiterplatte von Ansätzen ohne magnetische *Beads* und von Ansätzen, die mit α CD4 bzw. α CD8 *Beads* versehen waren, gesammelt und mittels FACS-Messung auf den Gehalt von CD4+ bzw. CD8+ Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit CD4- und CD8-Antikorpfern gefärbt.

Anteil der CD4+ Zellen aller Lymphozyten in %: Unsepariert 43,7; α CD4 Beads 8,0; α CD8 Beads 35,4

4.1.3 Durchführung des ImmuKnow-Assays auf unbeschichteter Mikrotiterplatte

Um den Einfluss der Mikrotiterplatte, auf der die Stimulation der Zellen über Nacht stattfindet, als mögliche Ursache von unspezifischer Zellbindung zu untersuchen, wurde eine Platte mit

unbeschichtetem Boden verwendet. Der Boden der bis dahin verwendeten Mikrotiterplatte war für die Zellkultur beschichtet, und könnte daher die vermehrte unspezifische Anheftung von Zellen während der Stimulation begünstigen.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, konnte durch Einsatz der unbeschichteten Platte die unspezifische Anheftung von Zellen während der Inkubation noch weiter verringert werden. Sichtbar ist dies vor allem anhand der sehr niedrigen ATP-Werte der unstimulierten und stimulierten Zellen nach Inkubation mit ungekoppelten magnetischen *Beads* im Vergleich zu den deutlich höheren ATP-Werten der Zellen nach Selektion mit CD4- und CD8-gekoppelten magnetischen *Beads*. Ebenfalls konnte der Unterschied zwischen den ATP-Werten der unstimulierten und stimulierten Zellen vergrößert werden. Daraus ergibt sich, dass nicht, wie zuvor angenommen, die magnetischen *Beads* Hauptursache der unspezifischen Zellbindung waren, sondern die bisher verwendeten Platten.

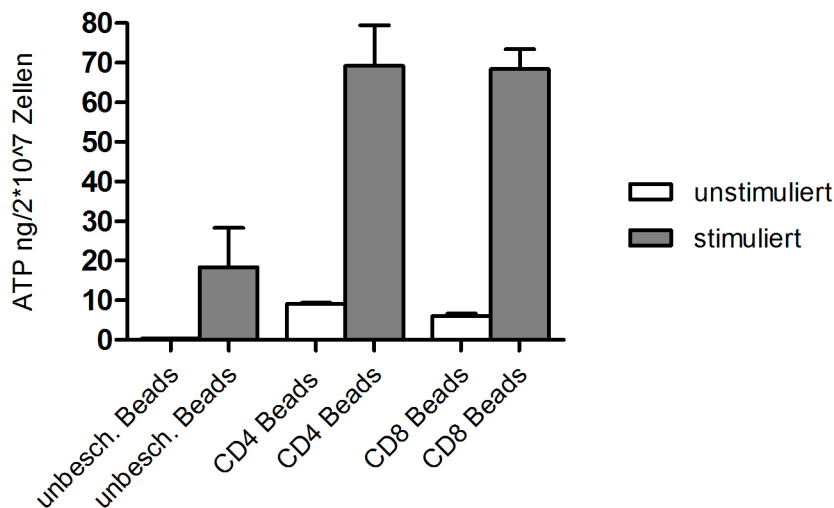


Abb 5: ATP-Werte von CD4+ und CD8+ Zellen auf unbeschichteter Platte

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) stimuliert. Die Stimulation fand auf einer Platte mit unbeschichtetem Boden statt. Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Ansätze (unstimuliert + stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert die vorher ungekoppelt oder mit biotinylierten αCD4- bzw. αCD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 µl Lysisreagenz (Igepal 0,5 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP unstimuliert / stimuliert in ng ATP/1*10⁷ Zellen: unbeschichtete Beads: 0,28 (0,06) / 18,36 (19,88); CD4+: 9,075 (0,55) / 69,22 (20,55); CD8+: 6,06 (1,03) / 68,43 (9,94)

4.1.4. Einfluss von SDS 7% auf die Menge an messbarem ATP in T-Zellen

Bei Verwendung des originalen Cylex Assays an humanen Zellen werden in stimulierten Zellen ATP-Werte von einigen hundert Nanogramm ATP/ml Vollblut, d.h. ca. 10^6 CD4+ Zellen, gemessen (Kowalski *et al*, 2006). Im Gegensatz dazu lagen die in den vorigen Versuchen dieser Arbeit gemessenen Werte bei maximal 70 ng ATP/ $2 \cdot 10^7$ Zellen.

Um die Methodik weiter zu optimieren, wurde die Zusammensetzung des Lysisreagenz überprüft. Bisher wurden die Zellen in dem nicht-ionischen Detergens Igepal lysiert. Da ATP sehr empfindlich gegenüber ATPasen ist, wurde überprüft, ob die Verwendung des denaturierenden ionischen Detergens SDS einen Vorteil bringen könnte. Es zeigte sich, dass die Zelllyse mit SDS 7 % im Vergleich zu dem Cylex Lysisreagenz, zu 0,5 % Igepal (siehe vorige Versuche) und 3 %igem SDS die messbare ATP-Menge erhöhte (Abb. 6).

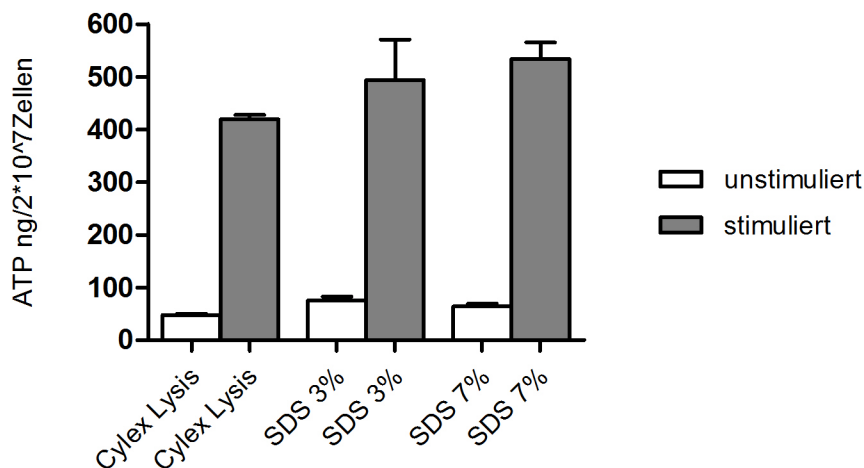


Abb. 6 : ATP-Werte nach Verwendung drei verschiedener Lysisreagenzien

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) stimuliert. Vor der Zellselktion wurden die Ansätze mit EDTA für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert die vorher mit biotinylierten α CD4-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit entweder 200 µl Cylex Lysisreagenz, SDS 3 % oder SDS 7 % lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP-Werte unstimuliert / stimuliert für CD4+ Zellen in ng ATP/ $2 \cdot 10^7$ Zellen: Cylex Lysis: 47,86 (3,4) / 418,8 (17,44); SDS 3 %: 75,60 (14,65) / 493,8 (153,6); SDS 7 %: 64,11 (10,78) / 533,4 (63,0)

4.2 Einfluss unterschiedlicher Arten der T-Zell Stimulation auf die intrazelluläre ATP-Konzentration

4.2.1. ATP-Werte nach Stimulation von CD4⁺ Zellen mit α CD3/ α CD28, PMA/Ionomycin, Concanavalin A und Staphylokokken Enterotoxin B

Dieser Teil der Arbeit zeigt die unterschiedliche Wirkung von verschiedenen Stimulanzien auf die ATP-Produktion in Milzzellen von Mäusen. Für die folgenden Versuche wurden neben PHA-L auch α CD3/ α CD28, PMA/Ionomycin, Concanavalin A und Staphylokokken Enterotoxin B als Stimulanzien verwendet.

Abbildung 7 zeigt die für das jeweilige Stimulanz gemessene ATP-Produktion in CD4⁺ Zellen. Im Vergleich zur Stimulation mit PHA-L führte die Stimulation mit PMA/Ionomycin, α CD3/ α CD28, ConA oder SEB nur zu einem geringen Anstieg der iATP-Konzentration in CD4⁺Zellen.

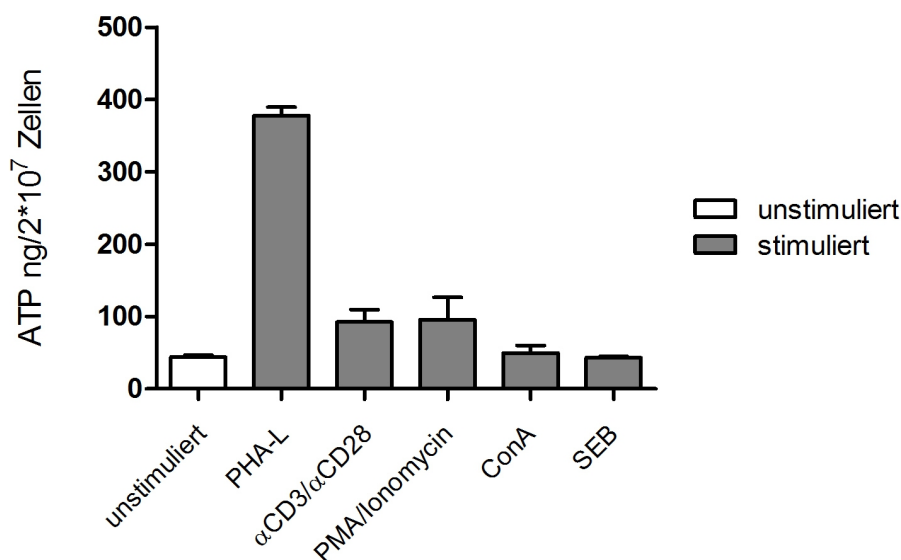


Abb. 7: ATP-Werte in CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, α CD3/ α CD28, PMA/Ionomycin, ConA und SEB

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 μ g/ml), α CD3/ α CD28 (je 1 μ g/ml), PMA/Ionomycin (50 ng/ml; 1 μ M), ConA (5 μ g/ml) und SEB (10 μ g/ml) stimuliert. Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 μ l Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 μ l Zelllysate mit 150 μ l Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP Werte in ng ATP/2*10⁷ Zellen: unstimuliert: 44,18 (4,75); PHA-L: 378,0 (22,74); α CD3/ α CD28: 92,83 (33,66); PMA/Ionomycin: 95,74 (61,74); ConA: 49,52 (21,11); SEB 43,34 (3,05)

Um die intrazelluläre ATP-Konzentration als Maß für die Stimulierbarkeit bzw. Aktivität der Zellen mit einem weiteren Parameter für die Zellaktivierung zu vergleichen, wurde im gleichen Versuch auch die Produktion des Zytokins TNF α per Durchflusszytometrie gemessen.

Unerwarteterweise zeigten die mit PHA-L stimulierten CD4⁺ Zellen, die die höchsten ATP-Werte aufwiesen, nur eine vergleichsweise geringe TNF α Produktion. Umgekehrt verhielt es sich bei den mit PMA/Ionomycin stimulierten Milzzellen. Diese Zellen produzierten im Vergleich zu der gemessenen ATP-Menge viel TNF α . Die mit α CD3/ α CD28 stimulierten CD4⁺ Zellen produzierten nach Stimulation weder große Mengen an ATP noch an TNF α .

Nach ConA- sowie SEB-Stimulation wurden in den Zellen nur ATP-Mengen, die vergleichbar mit denen unstimulierter Zellen sind, gemessen. Die Durchflusszytometriemessung bestätigte diese Beobachtung ebenso für ihre Zytokinproduktion (s. Abb. 8).

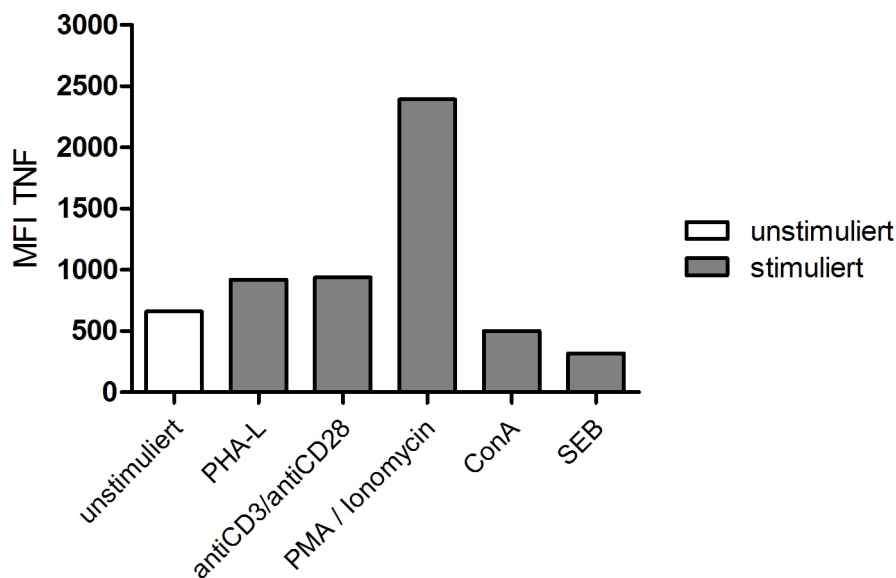


Abb. 8: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) von TNF α in CD4⁺ Zellen

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 μ g/ml), α CD3/ α CD28 (je 1 μ g/ml), PMA/Ionomycin (50 ng/ml; 1 μ M), ConA (5 μ g/ml) und SEB (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit CD4- und TNF α -Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden) und die Fluoreszenzintensitäten im Durchflusszytometer gemessen.

Das Diagramm zeigt die aus den FACS-Plots ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD4⁺ Zellen. MFI TNF α CD4⁺ Zellen in %: unstimuliert 660; PHA-L: 920; PMA + Ionomycin: 2392; CD3/CD28 939; ConA: 500; SEB: 319

4.2.2. Der Einfluss von Kostimulanzen auf die T-Zell-Stimulation

Das Herauffahren des Zellstoffwechsels verbunden mit der Steigerung der ATP-Produktion nach Stimulation wird mit Signalübertragung über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 in Verbindung gebracht (Frauwirth und Thompsen, 2004). Um zu ermitteln, welchen Einfluss die Kostimulanzen CD28 und Ionomycin auf die ATP- und TNF-Produktion in T-Zellen haben, wurden Milzzellen mit PHA-L, mit α CD3 in Kombination mit oder ohne α CD28, oder mit α CD28 alleine stimuliert. Außerdem wurde mit PMA oder Ionomycin alleine oder in Kombination der beiden stimuliert. Die Ergebnisse des durchgeführten ImmuKnow-Assays zeigt Abbildung 9. Da beschrieben ist, dass die Stimulation mit PMA/Ionomycin noch stärker auf CD8⁺ als auf CD4⁺ Zellen wirkt, wurden in diesem Versuch einmalig CD8⁺ Zellen für die Stimulation mit PMA/Ionomycin verwendet. Wie in vorherigen Versuchen war der iATP-Wert in den mit PHA-L stimulierten Ansätzen höher als in den mit α CD3 oder PMA stimulierten Zellen, wobei die letztgenannten Stimulationen an CD8⁺ Zellen durchgeführt wurden und daher nur bedingt vergleichbar sind.

Bei zusätzlichem Einsatz der jeweiligen Kostimulanzen, α CD28 bei α CD3-vermittelter Stimulation und Ionomycin bei PMA-vermittelter Stimulation, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der ATP-Werte.

Diese stimulationsfördernde Wirkung der Kostimulanzen konnte auch für die TNF α -Produktion in den Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 10). Insbesondere die Kombination von PMA und Ionomycin führte zu einer deutlichen Steigerung der TNF α -Produktion in CD4⁺ Zellen. Im Vergleich bewirkt die Stimulation mit α CD28 zusätzlich zu α CD3 nur eine geringe Steigerung der TNF α -Produktion.

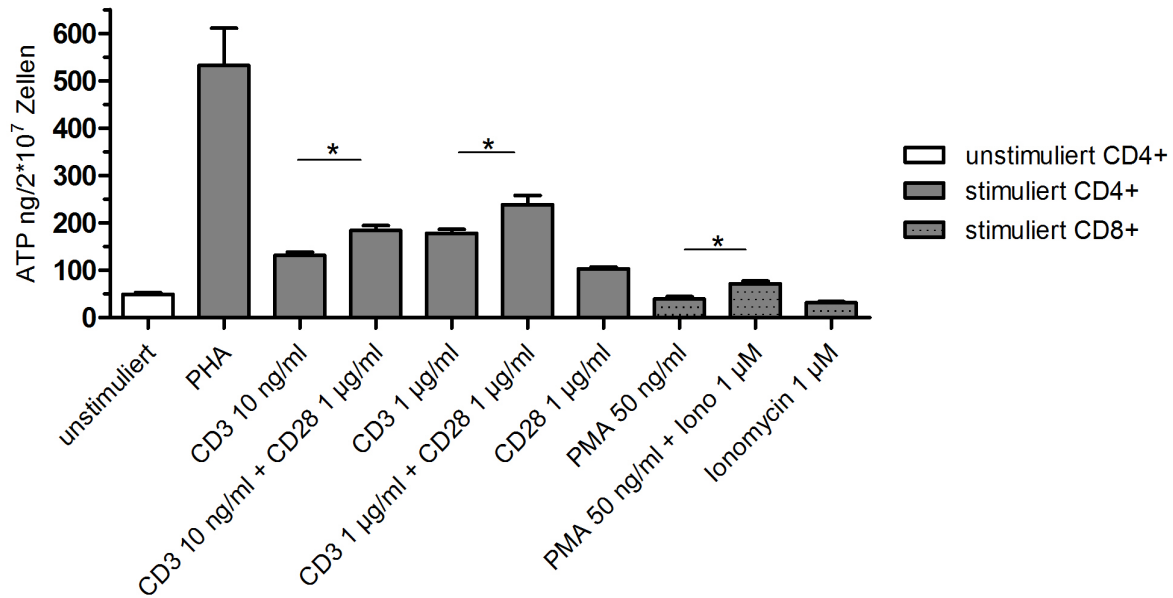


Abb. 9: ATP-Werte nach Stimulation mit PHA-L, α CD3, α CD28, PMA, Ionomycin

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml), α CD3 (10 ng/ml bzw. 1 µg/ml), α CD28 (1 µg/ml), PMA (50 ng/ml) + Ionomycin (1 µM) stimuliert. Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4- bzw. α CD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 µl Lysisreagenz lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz (SDS 7 %) versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt. * = Werte unterschieden sich signifikant. Berechnung der Signifikanz mittels Mann Whitney Test, $p < 0,05$.

ATP-Werte in $\text{ng}/2 \cdot 10^7$ Zellen: unstimuliert 49,15 (8,0); PHA-L: 531,9 (158,1); CD3 10 ng/ml: 131,0 (15,2); CD3 10 ng/ml + CD28 1 µg/ml: 183,9 (20,34); CD3 1 µg/ml: 177,9 (16,32); CD3 1 µg/ml + CD28 1 µg/ml: 238,4 (39,79); CD28 1 µg/ml: 103,0 (7,92); PMA 50 ng/ml: 39,15 (9,82); PMA 50 ng/ml + Iono 1 µM: 71,57 (11,58); Iono 1 µM 31,50 (4,2).

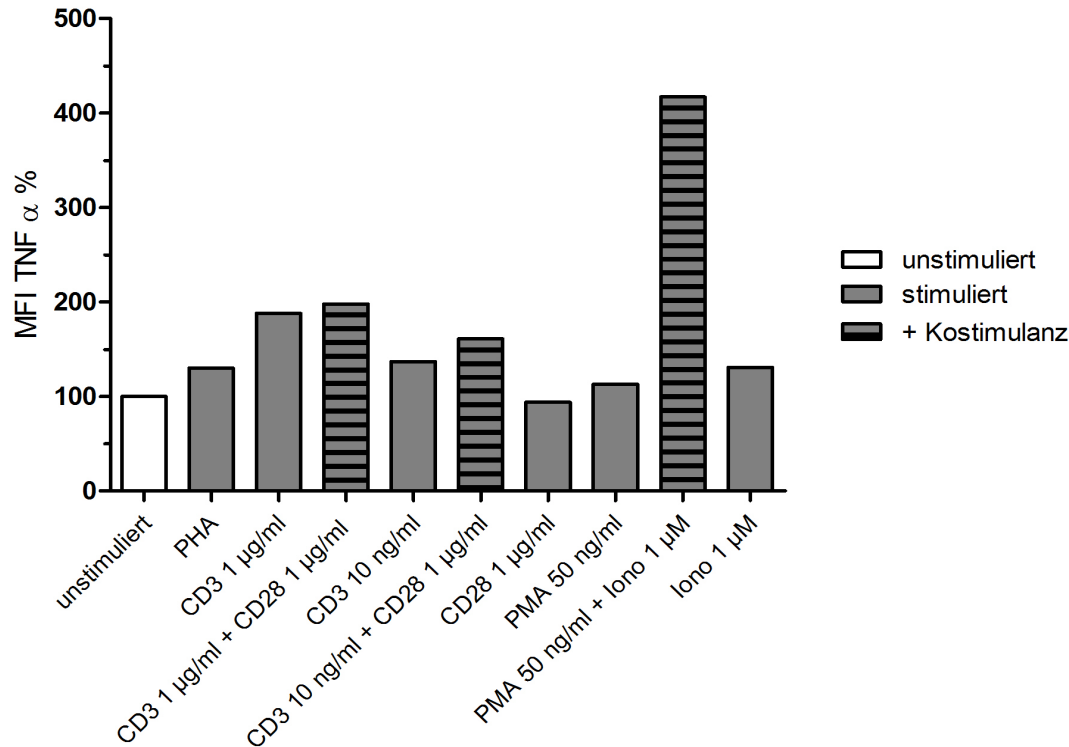


Abb. 10: Mittlere Fluoreszenzintensitäten TNF α CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, α CD3, α CD28, PMA und Ionomycin

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml), α CD3 (10 ng/ml bzw. 1 µg/ml), α CD28 (1 µg/ml), PMA (50 ng/ml) + Ionomycin (1 µM) stimuliert. Die Zellen wurden mit CD4- und TNF α -Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden) und die Fluoreszenzintensitäten im Durchflusszytometer gemessen.

Das Diagramm zeigt die aus den FACS-Plots ermittelten MFI TNF α -positiver CD4⁺ Zellen.

MFI TNF α CD4⁺ Zellen in %: unstimuliert CD4⁺: 100; PHA-L: 130; CD3 1µg/ml: 188; CD3 1 µg/ml + CD28 1 µg/ml: 198; CD3 10 ng/ml: 137; CD3 10 ng/ml + CD28 1µg : 161; CD28 1µg: 94; PMA 50ng/ml: 113; PMA 50 ng/ml + Ionomycin 1 µM: 417; Ionomycin 1 µM: 131

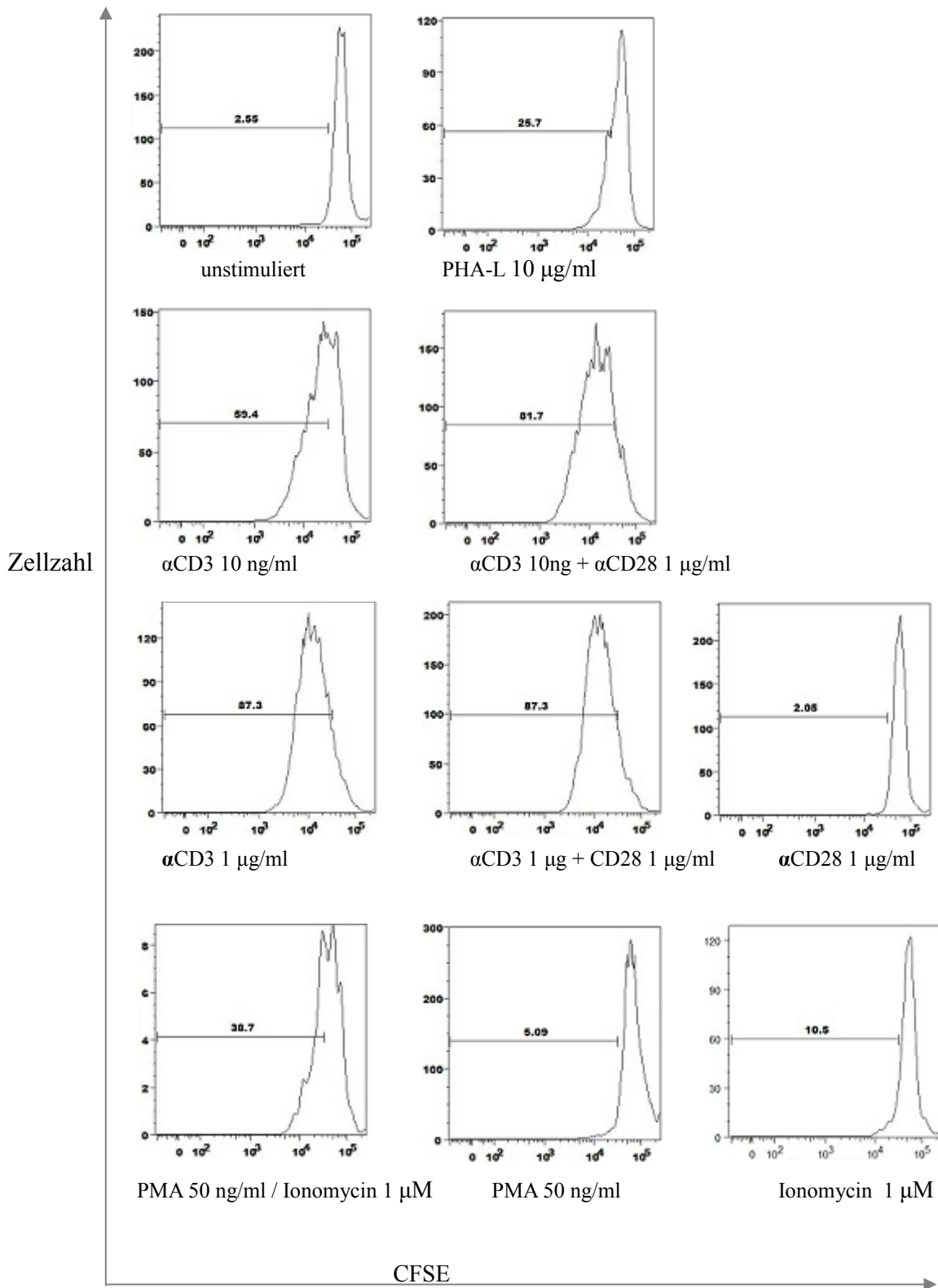


Abb. 11: Proliferation CD4+ Zellen nach Stimulation über 72 Stunden.

1*10⁷ Milzzellen einer Maus wurden gewaschen und in 900 µl PBS+BSA resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurde CFSE zu den Zellen pipettiert und das Gemisch nochmals im Wasserbad für 15 Minuten unter mehrfachem Bewegen des Tubes inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Zellen in "RPMI komplett" über 72 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml),

α CD3 (10 ng/ml bzw. 1 μ g/ml), α CD28 (1 μ g/ml) oder PMA (50 ng/ml) + Ionomycin (1 μ M) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen für die Durchflusszytometriemessung mit CD4- und CD8-gekoppelten Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden). Der Lebend/Tot-Farbstoff DAPI (5 μ g/ml) wurde kurz vor Messung der Zellen am Durchflusszytometer zu dem Ansatz pipettiert. Die Histogramme zeigen den Anteil der proliferierenden CD4+ Zellen nach Stimulation in Prozent. Proliferation der CD4+ in % : unstimuliert 2,55; PHA-L: 25,7; CD3 10 ng/ml: 59,4; CD3 10 ng/ml + CD28 1 μ g/ml: 81,7; CD3 1 μ g/ml: 87,3; CD3 1 μ g/ml + CD28 1 μ g/ml: 87,3; CD28 1 μ g/ml: 2,06; PMA: 5,09; PMA + Ionomycin: 38,7; Ionomycin 1 μ M: 10,5

Als weiterer Parameter der T-Zell Aktivierung wurde auch die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Stimulantien untersucht (Abb. 11). Dazu wurden Zellen mit CFSE gefärbt und über 72 Stunden stimuliert. Nach Stimulation konnten anhand der pro Zellteilung abnehmenden intrazellulären CFSE-Fluoreszenz die proliferierenden CD4+ bzw. CD8+ Zellen ermittelt werden (Daten nur für CD4+ Zellen gezeigt).

Insgesamt proliferierten CD8+ Zellen nach Stimulation stärker als CD4+ Zellen. Dieses Phänomen war bei PHA-L stimulierten Zellen am stärksten ausgeprägt. Von den CD4+ Zellen proliferierten 25,7 % nach PHA-L-Stimulation, von den CD8+ Zellen 84,6 %.

Bei Vergleich der einzelnen Stimulantien ist festzustellen, dass sowohl CD4+ und CD8+ Zellen nach Stimulation mit α CD3 in einer Konzentration von 1 μ g/ml am meisten proliferierten. Dabei brachte bei dieser Konzentration von α CD3 eine zusätzliche Stimulation mit α CD28 keine zusätzliche wachstumsfördernde Wirkung. Wurde α CD3 in einer geringeren Konzentration (10 ng/ml) eingesetzt, so konnte die Proliferation durch das Kostimulanz weiter angeregt werden.

PMA in Kombination mit Ionomycin bewirkte in CD4+ Zellen nur eine geringe Proliferation, in CD8+ Zellen wurde dagegen durch PMA die Proliferation stark angeregt. Wurde allerdings nur PMA oder nur Ionomycin eingesetzt, so waren kaum proliferierende Zellen messbar.

Insgesamt zeigt dieser Versuch, dass CD4+ und CD8+ Zellen ein unterschiedliches Proliferationsverhalten nach Stimulation offenbaren. Zudem haben die verschiedenen eingesetzten Stimulantien unterschiedliche Wirkungen in Bezug auf ATP-, TNF α -Produktion und Proliferation.

4.2.3. Einfluss von CTLA-4 auf die ATP-Produktion in der T-Zelle

Um weitere Informationen über den Einfluss der Kostimulation mit α CD28 zu gewinnen, wurde CTLA-4-Ig (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein lösliches Fusionsprotein von CTLA-4, das eine höhere Affinität zu dem Protein B7 an APC, als CD28 besitzt. Durch den Einsatz von CTLA4-Ig wird also B7 auf antigen-präsentierenden Zellen abgedeckt, und so die CD28-vermittelte Kostimulation verhindert (Lenschow *et al* 1996; Mc Coy *et Le Gros*, 1999).

Abbildung 12 zeigt, dass die ATP-Produktion sowohl in CD4+ als auch in CD8+ Zellen bei Einsatz von α CD28 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit α CD3 gesteigert war. In Gegenwart von CTLA4-Ig war die ATP-Produktion jedoch eher leicht vermindert. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass auch ohne Zugabe von α CD28-Antikörpern ein geringes Maß an Kostimulation durch Interaktion von CD28 mit B7 auf APCs erfolgte, das durch CTLA4-Ig geblockt wurde. Somit unterstreicht auch dieser Versuch, dass die Kostimulation über CD28 wichtig für die die ATP-Produktion im Rahmen der T-Zell-Aktivierung ist.

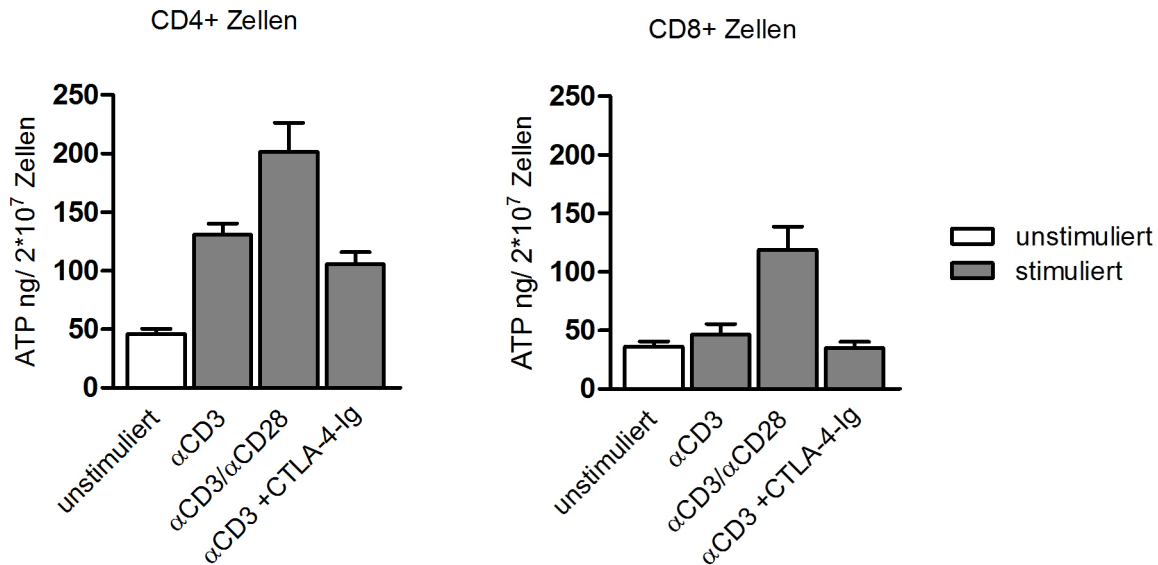


Abb 12: ATP-Werte der CD4+ - und CD8+ Zellen unter Einfluss von CTLA-4

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37°C mit α CD3 ($10 \mu\text{g/ml}$) und/oder α CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Zu einem der nur mit α CD3 stimulierten Ansätze wurde CTLA-4 ($10 \mu\text{g/ml}$) gegeben. Vor der Zellektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellektion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert die mit biotinylierten α CD4- bzw. α CD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit $200 \mu\text{l}$ Lysisreagenz lysiert. Pro Ansatz wurden $50 \mu\text{l}$ Zelllysat mit $150 \mu\text{l}$ Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP-Werte CD4+/CD8+ in $\text{ng}/2 \cdot 10^7$ Zellen: unstimuliert: 45,99 (8,6) / 36,35 (8,3); CD3 $10 \mu\text{g/ml}$ / CD28 $1 \mu\text{g/ml}$: 201,5 (49,7) / 118,9 (39,4); CD3 $10 \mu\text{g/ml}$: 130,7 (19,2) / 46,68 (17,8); CD3 + CTLA-4: 105,4 (18,2) / 34,75 (11,1)

4.3. Zeitliche Abfolge der Effektorfunktionen von T-Zellen

Um die zeitliche Abfolge von ATP- und TNF α -Produktion zu vergleichen, wurden Zellen mit α CD3/ α CD28 über 6, 5, 4, 3, oder 2 Stunden stimuliert. Anschließend wurden iATP und TNF α gemessen, woraus sich die in Abbildung 13 dargestellte Kinetik ergab.

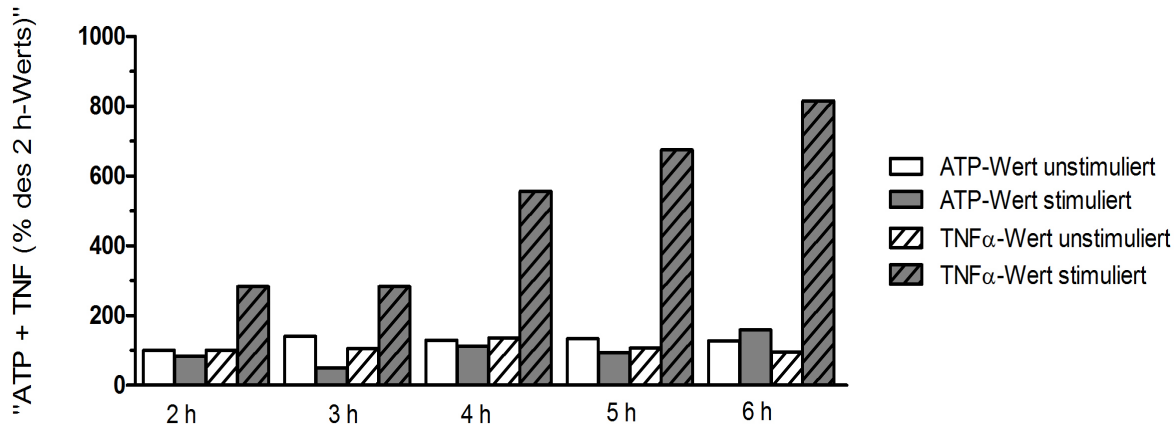


Abb 13: Kinetik der ATP- und TNF α -Produktion von CD4+ Zellen

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 2 bzw. 3, 4, 5 oder 6 bei 37 °C mit CD3/CD28 (10 μ g/ml; 1 μ g/ml) stimuliert. Vor der Zellselktion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4- gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 μ l Lysisreagenz lysiert. Pro Ansatz wurden 50 μ l Zelllysate mit 150 μ l Lumineszenzreagenz (SDS 7 %) versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

Für die Messung von TNF α am Durchflusszytometer wurden wie für den ATP-Assay stimulierte Milzzellen (s.o.) mit CD4- und TNF α -Antikörpern gefärbt (siehe Material und Methoden).

Zum besseren Vergleich sind die ermittelten Werte in Prozent zu dem unstimulierten Absatz nach 2 Stunden angegeben.

ATP unstimuliert / stimuliert und TNF unstimuliert / stimuliert in %: 2 Std.: 100 / 83,72 / 100 / 282,9; 3 Std.: 140,4 / 49,53 / 105,2 / 282,9; 4 Std.: 129,3 / 113,2 / 136 / 556,4; 5 Std.: 134,0 / 92,95 / 106,9 / 674,9; 6 Std.: 128,2 / 159,1 / 94,97 / 815,2

Es zeigte sich eine unterschiedliche zeitliche Entwicklung der ATP- und TNF α -Produktion der CD4+ Zellen. Die ATP-Werte der stimulierten Ansätze sanken zunächst nach 2- und 3-stündiger Stimulation unter die Werte der unstimulierten Ansätze. Erst nach 6-stündiger Stimulation der Zellen zeigte sich ein beginnender Anstieg der ATP-Konzentration über die Werte der unstimulierten Zellen in der Probe. Im Gegensatz dazu war die Zytokinproduktion in den stimulierten Proben schon nach 2-stündiger Stimulation deutlich höher als in den unstimulierten Proben, die während der gesamten Inkubationszeit keine Veränderung der Zytokinproduktion zeigten (Abb. 13 und 14).

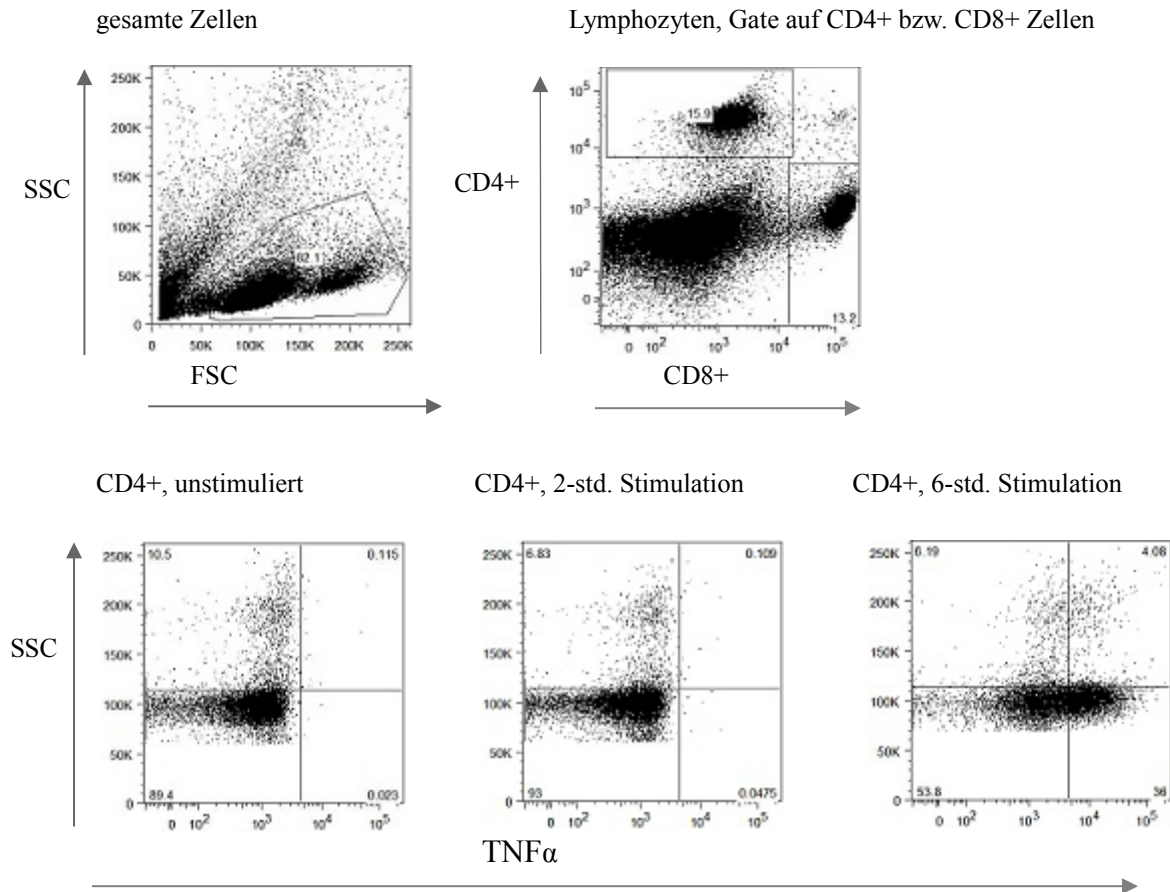


Abb. 14: TNF-Produktion der CD4+Zellen unstimuliert, nach 2-, und 6-stündiger Stimulation

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 2, 3, 4, 5, oder 6 Stunden bei 37 °C mit α CD3/ α CD28 (10 μ g/ml; 1 μ g/ml) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen und mit CD4- und TNF α -gekoppelten Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden).

Die FACS-Plots zeigen exemplarisch die TNF α -Produktion unstimulierter und stimulierter CD4+ Zellen nach 2- und 6-stündiger Stimulation.

4.4 Energetische Voraussetzungen für die ATP Produktion in T-Zellen

In diesem Teil der experimentellen Arbeit wurden die metabolischen Voraussetzungen, die eine T-Zelle zum Überleben sowie zur Produktion von Zytokinen und ATP benötigt, untersucht.

4.4.1 Hemmung der Glykolyse durch Desoxyglukose

Milzzellen von Mäusen in Medien mit verschiedenen Zusammensetzungen wurden mit PHA-L stimuliert, um die Auswirkungen verschiedener metabolischer Zustände auf die intrazelluläre ATP-Konzentration, die Produktion von Zytokinen und das Überleben der Zellen zu untersuchen (s. Abb. 15). Um die Bedeutung der Glykolyse für die Energiegewinnung der T-Zelle zu untersuchen wurde Desoxyglukose eingesetzt. 2-Deoxyglucose ist ein Glucoseanalogon, welches nach Aufnahme in die Zelle zu 2-Deoxy-Glukose-6-Phosphat umgewandelt, jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden kann. 2-Deoxyglukose hemmt das für den folgenden Stoffwechselschritt verantwortliche Enzym Phosphoglukose-Isomerase, wodurch die Glykolyse im Folgenden nicht weiter ablaufen kann (Stafstrom *et al.*, 2008).

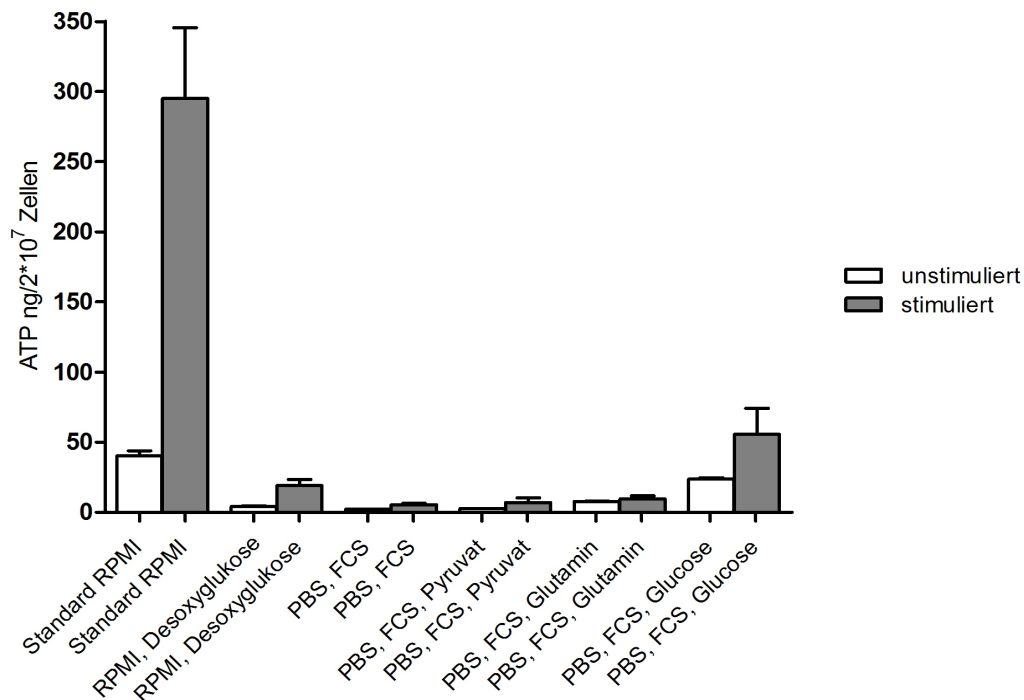


Abb. 15: Auswirkung des Stimulationsmediums auf die ATP-Produktion in CD4+ Zellen

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml entweder in "RPMI komplett", PBS+/+ mit FCS 5 %, PBS+/+ mit FCS 5 % und 0,01 % Pyruvat, PBS+/+ mit FCS 5 % und 0,01 % Glutamin oder in PBS+/+ mit FCS 5 % und 0,01 % Glukose über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) stimuliert. Zu einem in "RPMI komplett" stimulierten Ansatz wurde Desoxyglukose (50 mM) gegeben. Vor der Zellselktion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 µl Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP-Werte unstimuliert / stimuliert in ng/2*10⁷ Zellen: RPMI komplett: 40,22 (7,46) / 295,1 (101,0); RPMI mit Desoxyglukose: 4,18 (1,19) / 19,01 (8,8) PBS+/+ mit FCS: 2,12 (0,37) / 5,54 (1,74); PBS+/+ mit FCS und Pyruvat: 2,57 (0,45) / 7,07 (6,27); PBS+/+ mit FCS und Glutamin: 7,69 (1,08) / 9,39 (4,83); PBS+/+ mit FCS und Glucose: 23,64 (1,91) / 55,55 (37,0)

Abbildung 15 zeigt die Produktion von ATP unter verschiedenen metabolischen Voraussetzungen. Wie gewohnt konnten in CD4+ Zellen in komplettem Medium hohe ATP-Werte gemessen werden. Durch Zugabe von Desoxyglukose wurde die Produktion von ATP nach Stimulation mit PHA-L fast vollständig unterdrückt. Da das komplette RPMI-Medium, in dem diese Versuche stattfanden, u.a. auch Pyruvat enthielt, was als Ausgangssubstrat für die oxidative Phosphorylierung genutzt werden kann, bestätigt die erfolgreiche Hemmung der ATP-Produktion durch die Zugabe von Desoxyglukose die Beobachtungen anderer Gruppen, dass T-Zellen nach Aktivierung zur Produktion von ATP vorwiegend die Glykolyse und nicht die oxidative Phosphorylierung

verwenden (Frauwirth und Thompson, 2004).

In weiteren Ansätzen wurde das komplette RPMI-Medium durch PBS mit definierten Zusätzen ersetzt. In Gegenwart von Glukose war eine geringe ATP-Produktion möglich, die jedoch weit unter den im kompletten Medium erzielten Werten blieb. Die alleinige Bereitstellung von Glutamin oder Pyruvat scheint dagegen keine ATP-Produktion zu erlauben. Da die Zellen gleichzeitig im FACS auf ihr Überleben unter den verschiedenen metabolischen Bedingungen untersucht wurden, konnte die verminderte ATP-Produktion aufgrund von Zelltod ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid

Neben der Bedeutung der Glykolyse wurde auch die Bedeutung der Proteinbiosynthese für die ATP-Produktion in T-Zellen untersucht. Dazu wurde Cycloheximid eingesetzt, welches die Proteinbiosynthese durch Hemmung der Translation inhibiert (Obrig *et al*, 1971). Abbildung 16 zeigt, dass Cycloheximid die Produktion von ATP dosisabhängig hemmte. Bei Einsatz von Cycloheximid-Konzentrationen höher als 10 µg/ml kam es allerdings zu toxischen Effekten, die zum Zelltod führten (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen konnten für CD4+- sowie für CD8+-Zellen gemacht werden.

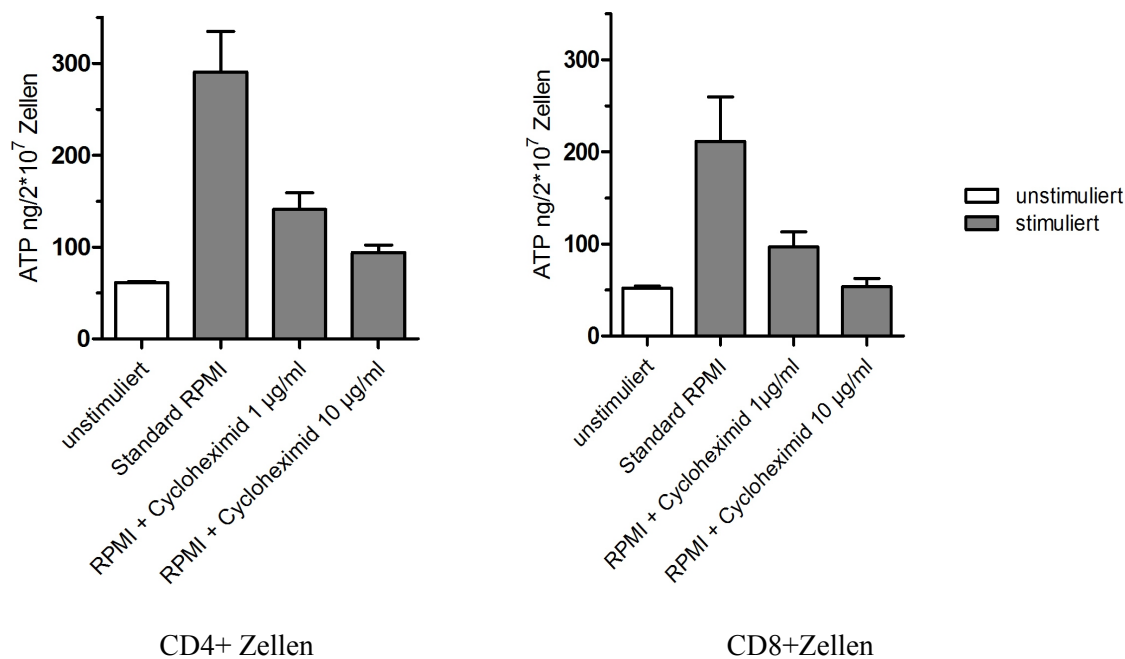


Abb. 16: ATP-Werte nach Hemmung der Proteinbiosynthese

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) stimuliert. Zwei Ansätze wurde Cycloheximid (1 µg/ml bzw. 10 µg/ml) zugegeben. Vor der Zellselktion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4- bzw. α CD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 µl Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

ATP-Werte CD4+Zellen / CD8+Zellen in $ng/2 \cdot 10^7$ Zellen: unstimuliert: 61,3 / 51,93; RPMI komplett: 290,6 / 211,4; RPMI komplett + Cycloheximid 1µg/ml: 141,2 / 96,58; RPMI komplett + Cycloheximid 10µg/ml: 94,07 / 53,46

Um die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid zu überprüfen, wurde auch die Heraufregulation des Aktivierungsmarkers CD25 gemessen (Abb. 17). In diesem Versuch wurde die Aktivierung der Zellen nach Stimulation anhand der Aktivierungsmarker CD25 und CD62L beurteilt. Bei Aktivierung der Zelle wird auf der Zelloberfläche vermehrt CD25 exprimiert und CD62L abgeworfen (CD62L-Shedding) (Waters *et al.*, 2003).

Da für die Heraufregulation von CD25 die Proteinbiosynthese notwendig ist, konnte die Cycloheximid-Wirkung durch diesen Parameter bestätigt werden (siehe Abb.17). Dagegen geschieht das Shedding von CD62L durch Aktivierung einer Protease, und sollte somit unabhängig von einer de-novo Proteinbiosynthese sein.

Die unstimulierten Zellen (Abb. 17a) zeigten kaum CD25, zusammen mit einer hohen Expression von CD62L. Dagegen zeigten PHA-stimulierte Zellen eine Hochregulation von CD25 verbunden

mit dem Verlust von CD62L von der Oberfläche (Abb. 15 b). In Gegenwart von Cycloheximid fand nach Stimulation keine Hochregulation von CD25 statt, obwohl der Verlust von CD62L nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 15 d-e). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Hochregulation von CD25 eine Neusynthese von Proteinen benötigt, während das CD62L-Shedding davon unabhängig ist. Darüber hinaus boten die Ergebnisse eine Kontrolle für die Wirksamkeit des eingesetzten Cycloheximids. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung von CD8+ Zellen erzielt. Zu beobachten ist dabei, dass die Hochregulation von CD25 als Reaktion auf die Stimulation mit PHA-L bei CD8+ Zellen stärker war als bei CD4+Zellen (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigten die Zellen, die in RPMI mit Desoxyglukose stimuliert wurden, keine Beeinträchtigung der Hochregulation von CD25 oder des CD62L-Sheddings im Vergleich zu Zellen, die in normalem RPMI stimuliert wurden (vergleiche Abb. 15b mit 15c). Dies zeigt, dass obwohl die Glykolyse für die Akkumulation von intrazellulärem ATP notwendig ist (siehe vorigen Abschnitt), sie für die Neusynthese von Effektorproteinen zumindest im Zeitraum unmittelbar nach der Zellaktivierung nicht notwendig ist.

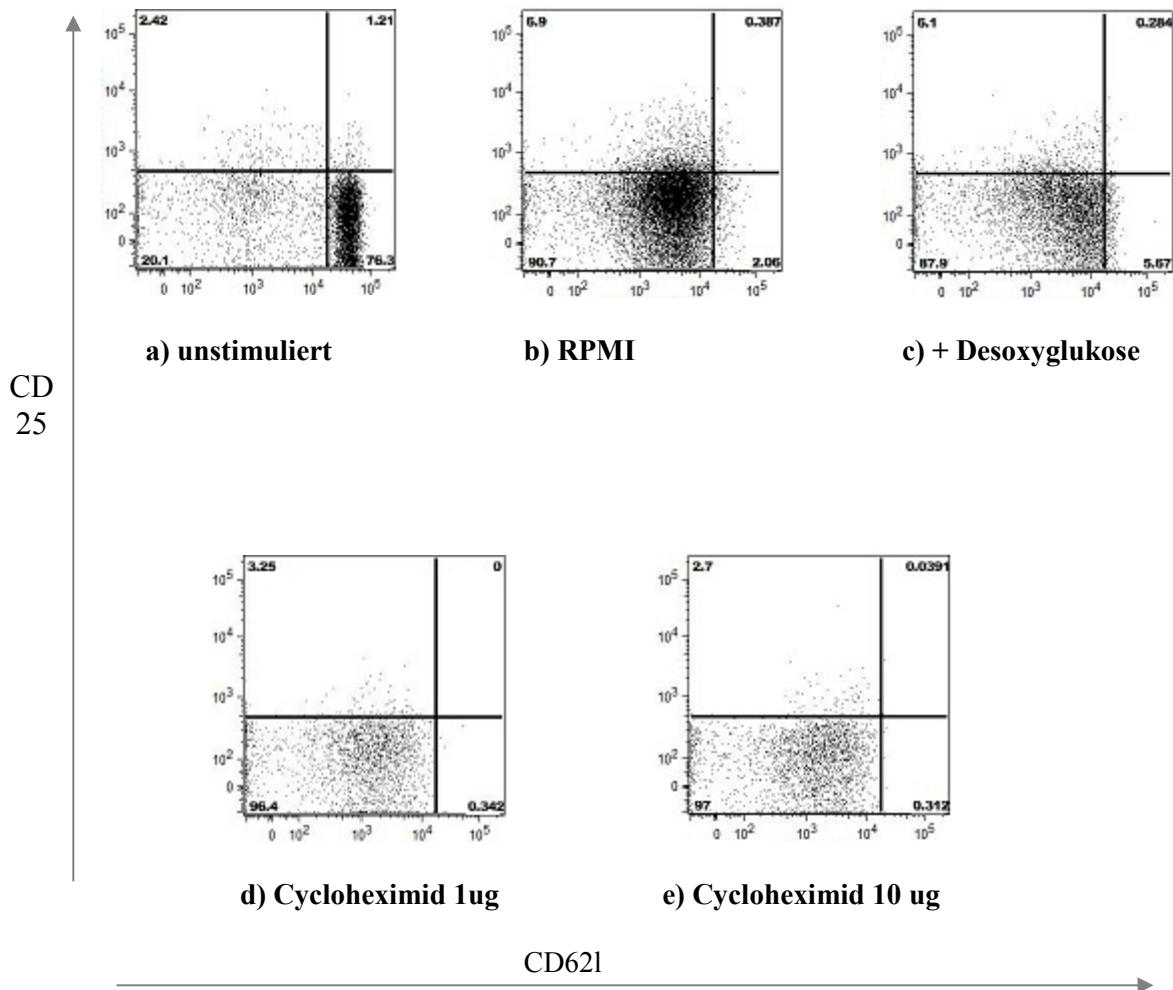


Abb. 17: Aktivierung und Überleben der CD4⁺ Zellen nach PHA-L Stimulation und Zugabe von Cycloheximid und Desoxyglukose.

Milzzellen einer Maus wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) stimuliert. Zwei Ansätzen wurde Cycloheximid (1 µg/ml bzw 10 µg/ml) zugegeben, ein Ansatz erhielt Desoxyglukose (50 mM).

Die Zellen wurden mit CD4-, CD25- und CD62l-Antikörpern gefärbt (siehe Material und Methoden) und ihre Fluoreszenzintensitäten im Durchflusszytometer gemessen.

In den Dotplots ist jeweils die CD25 Expression gegen die CD62l-Expression aufgetragen.

4.5 ATP-Spiegel bei *in vivo*-Infektionen

4.5.1 Einleitung

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung der intrazellulären ATP-Spiegel in T-Zellen im Verlauf einer Infektion untersucht. Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Aussagekraft des ImmuKnow-Assays über eine aktuell ablaufende Infektion im Organismus zu überprüfen.

Dazu wurden Mäuse mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* infiziert und nach spätestens 9 Tagen getötet. In einigen Versuchen exprimierten die Listerien ein Peptid aus dem Hühner-Ovalbumin (OVA), das von CD8⁺ Zellen der T-Zell-Rezeptor-transgenen OT-I Maus erkannt wird. In den Versuchen wurden T-Zellen nicht infizierter mit T-Zellen infizierter Mäuse verglichen. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden parallel zur Messung der intrazellulären ATP-Konzentration das Überleben der Zellen und die intrazelluläre Zytokinproduktion als unabhängiges Maß der Zellaktivierung mittels Durchflusszytometrie gemessen.

4.5.1.1 ATP-Werte in CD8⁺ Zellen nach Stimulation mit PHA-L und OVA-Peptid

Der erste Versuch wurde mit Milzzellen einer C57BL/6 Maus durchgeführt, der vor der Infektion mit Lm-OVA, Zellen einer OT-1-transgenen Maus injiziert wurden. Die CD8⁺ Zellen dieser Maus exprimieren einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für das OVA-Peptid SIINFEKL ist (Wright *et al.*, 2005). Am Tag 9 der Infektion wurden die Milzzellen entnommen, und die iATP-Spiegel der CD8⁺ Zellen nach Stimulation mit dem OVA-Peptid oder PHA-L bestimmt (Abb. 16).

Wie schon in den vorherigen Versuchen gezeigt, produzierten CD8⁺ Zellen einer nicht infizierten Maus nach Stimulation mit PHA-L große Mengen an ATP. Im Vergleich dazu produzierten Zellen aus infizierten Mäusen sowohl nach Stimulation mit PHA-L als auch durch das OVA-Peptid nur geringe Mengen an ATP.

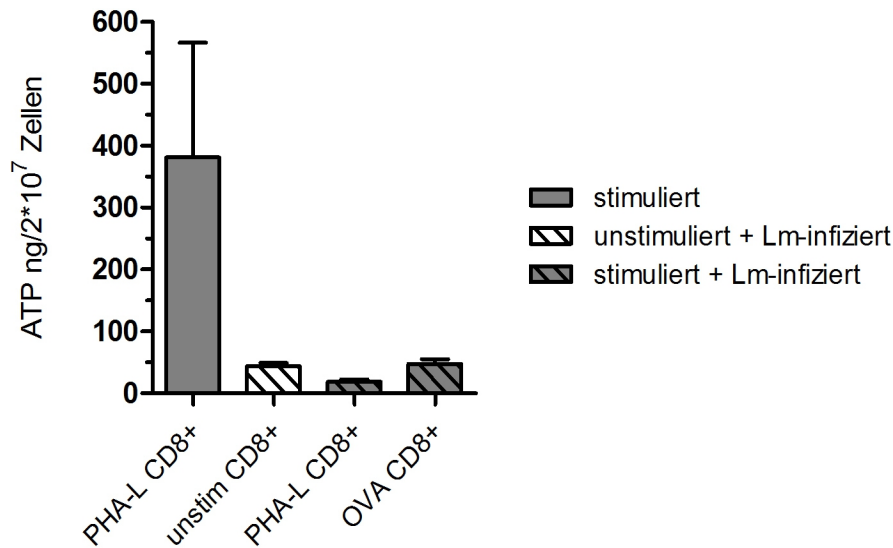


Abb. 18: ATP Produktion CD8+ Zellen (nach OT-1-Transfer) während Infektion mit LM

Milzzellen einer seit 9 Tagen mit *Listeria monocytogenes* infizierten sowie einer nicht infizierten Maus, in denen zuvor ein OT-1 Zell-Transfer vorgenommen wurde, wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 µg/ml) bzw. OVA-Peptid (10^{-6} M) stimuliert. Vor der Zellselktion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselktion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten αCD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 µl Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

Da nicht genügend Zellen zur Verfügung standen, enthält der Versuch keine Kontrollansätze für nicht infizierte unstimulierte Zellen und OVA-Peptid-stimulierte Zellen.

ATP-Werte CD8+Zellen in ng ATP/2*10⁷ Zellen (SD): unstimuliert: 43,87 (14,65); nicht-infizierte Zellen PHA-L: 381,2(371,2); infizierte Zellen PHA-L: 18,63 (11,66); infizierte Zellen OVA-Peptid: 47,65 (21,15)

4.5.2 ATP- und TNF-Werte nach Stimulation von 9 Tage infizierten Mausmilzzellen

Um die Ergebnisse des in Abbildung 18 gezeigten Versuches zu verifizieren und auch um die Reaktion der CD4+ Zellen zu untersuchen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem vorher kein Transfer von OT-1 Zellen stattfand.

Es wurden zwei Mäuse mit Lm-OVA infiziert. Zwei nicht infizierte Mäuse fungierten als Kontrollgruppe. Nach 9 Tagen wurden die CD4+ sowie CD8+ Zellen auf ihre ATP- bzw. Zytokinproduktion während einer Infektion hin untersucht. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit PHA-L, sowie den LLO- und OVA-Peptiden.

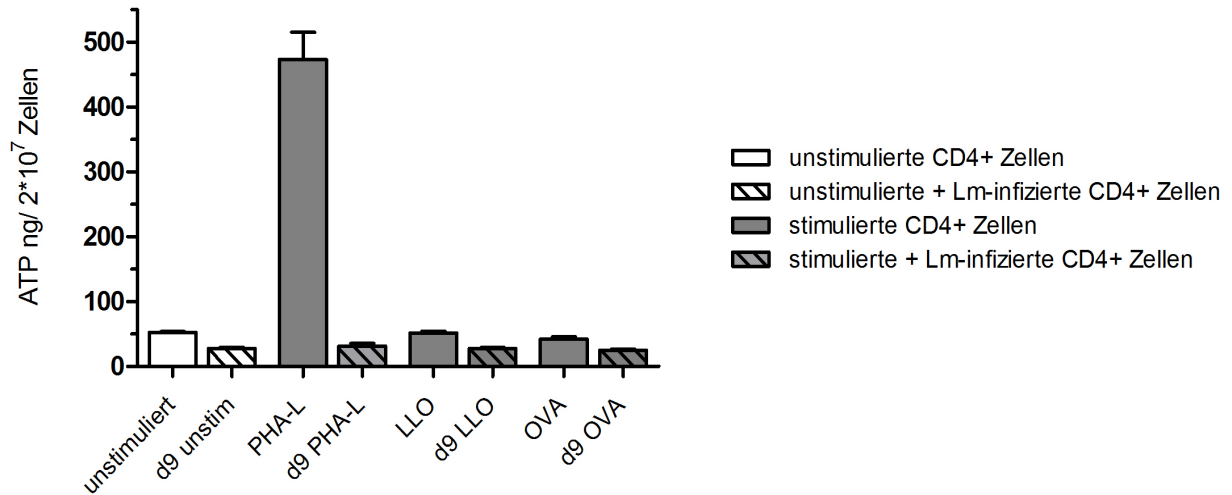


Abb. 19a: ATP-Werte CD4+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, LLO- bzw. OVA-Peptid, nicht infizierte und Lm-infizierte Zellen an Tag 9

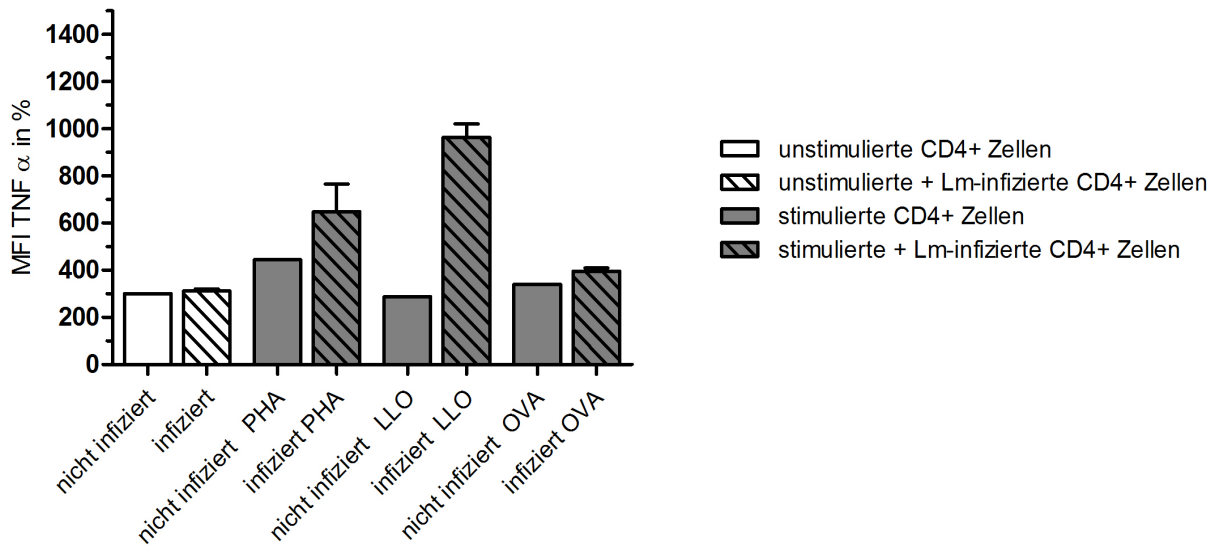


Abb. 19b: MFI TNF α CD4+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, LLO- bzw. OVA-Peptid, nicht infizierte Zellen und Lm-infizierte Zellen an Tag 9

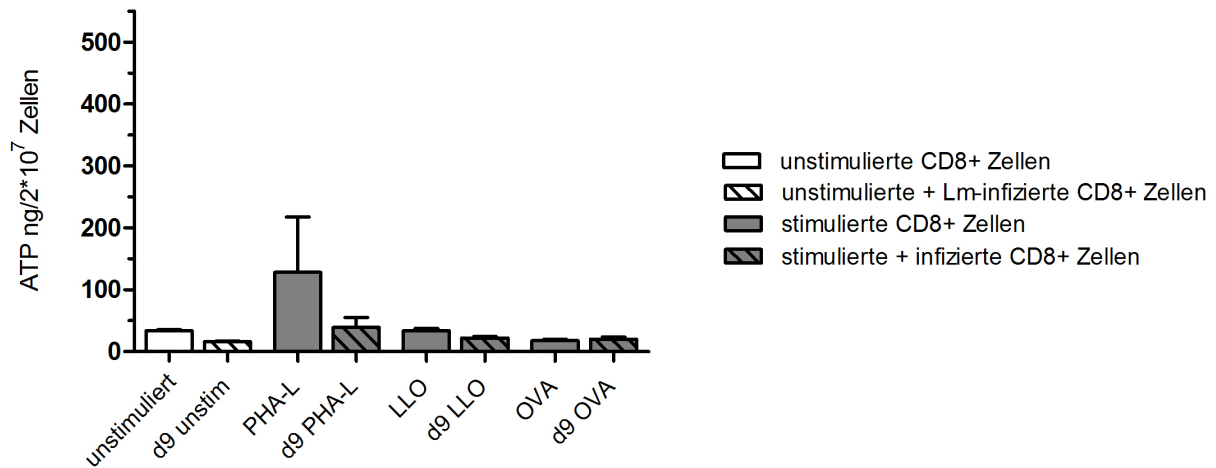


Abb. 19c: ATP-Werte CD8+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, LLO- bzw. OVA-Peptid, nicht infizierte und Lm-infizierte Zellen an Tag 9

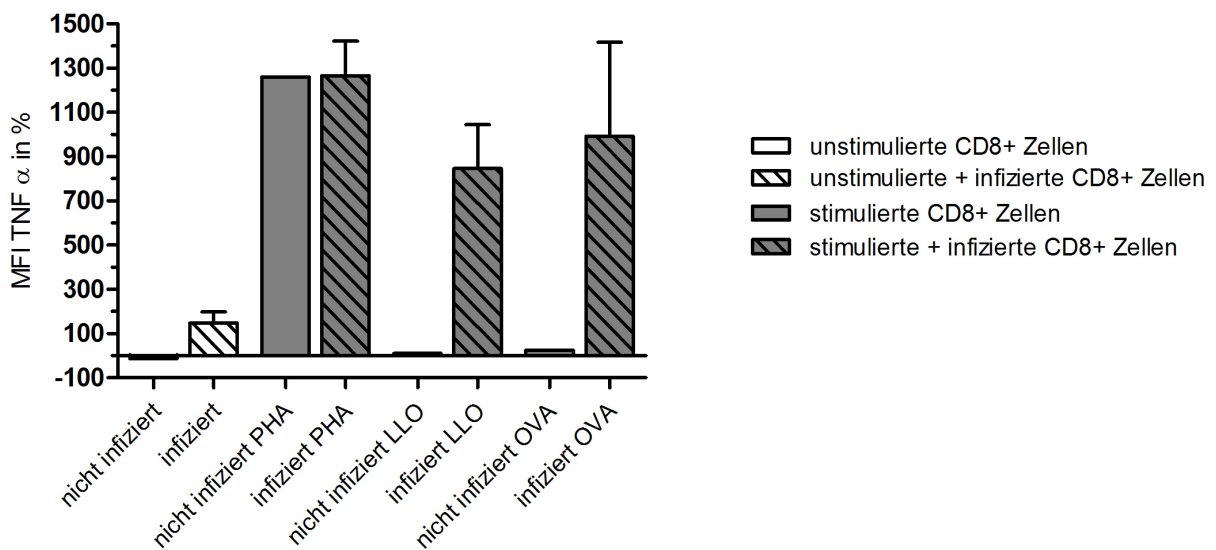


Abb. 19d: MFI TNF α CD8+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L LLO- bzw. OVA-Peptid, nicht infizierte Zellen und Lm-infizierte Zellen an Tag 9

Abb. 19 a-d: ATP-Produktion und TNF α -Produktion über 9 Tage infizierter und nicht infizierter CD4+ und CD8+ Zellen nach Stimulation

Nicht infizierte sowie seit 9 Tagen mit Lm infizierte Mausmilzzellen wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 μ g/ml) bzw. LLO- (10^{-5} M) oder OVA-Peptid (10^{-6} M) stimuliert. Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit biotinylierten α CD4- bzw. α CD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 μ l

Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µl Zelllysate mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die ATP-Konzentration am Luminometer ermittelt (Abb. 17 a + c). Für die Ermittlung der TNF-Produktion wurden Zellen nach Stimulation für die Messung der Fluoreszenzintensitäten am Durchflusszytometer mit CD4-, CD8- und TNF α -Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden).

Abb. 17 b + d zeigen die aus den FACS-Plots ermittelten Mittleren Fluoreszenzintensitäten von TNF α der CD4+ (Abb. 17b) bzw. CD8+ Zellen (Abb. 17d).

*ATP-Werte CD4+ Zellen nicht infiziert / infiziert (SD) in ng ATP/2*10⁷ Zellen: unstimuliert: 52,31 (3,74) / 27,95 (4,18); PHA-L: 473,4 (83,37) / 31,21 (12,12); LLO: 51,68 (5,01) / 27,82 (4,1); OVA: 42,57 (6,09) / 25,07 (5,5)*

MFI TNF α in %: CD4+ Zellen: nicht infiziert unstimuliert: 300; nicht infiziert PHA-L: 444; nicht infiziert LLO: 287; nicht infiziert OVA: 341; infiziert unstimuliert: 312; infiziert PHA-L: 647,5; infiziert LLO: 962,5; infiziert OVA: 396

*ATP-Werte CD8+ Zellen nicht infiziert / infiziert (SD) in ng ATP/2*10⁷ Zellen: unstimuliert: 33,59 (4,15) / 16,26 (3,22); PHA-L: 128,1 (178,6) / 39,42 (44,64); LLO: 33,71 (7,32) / 22,4 (6,04); OVA: 17,65 (4,58) / 20,37 (9,72)*

MFI TNF α in %: CD8+ Zellen: nicht infiziert unstimuliert: -13,10; nicht infiziert PHA-L: 1261; nicht infiziert LLO: 9,83; nicht infiziert OVA: 24,5; infiziert unstimuliert: 147,5 (71,42); infiziert PHA-L: 1266 (221,3); infiziert LLO: 854,5 (280,7); infiziert OVA: 991,5 (600,3)

Wie in den vorherigen Versuchen auch, reagierten sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen nicht infizierter Mäuse auf PHA-L Stimulation mit einer starken ATP-Produktion (Abb. 19 a und c). Im Gegensatz dazu produzierten die Zellen infizierter Mäuse kaum ATP. Bei Stimulation mit den LLO- oder OVA-Peptiden wurde weder in Zellen nicht-infizierter noch infizierter Mäuse eine Erhöhung der iATP-Spiegel beobachtet.

Als Ergänzung zur ATP-Produktion wurde das Überleben der Zellen sowie die Produktion von TNF als weiterer, unabhängiger Aktivierungsparameter für CD4+ und CD8+ Zellen am Durchflusszytometer überprüft.

Die Abbildungen 19 b und d zeigen die TNF α -positiven CD4+ bzw. CD8+ Zellen nach Restimulation mit PHA bzw. den OVA- oder LLO-Peptiden. Die CD4+ Zellen von infizierten Mäusen produzierten nach Restimulation mit PHA-L oder dem LLO-Peptid stärker TNF α als die Zellen von nicht-infizierten Mäusen. Dies steht in auffallendem Kontrast zur Produktion von iATP, welche in den Zellen infizierter Mäuse unterdrückt war (s. Abb. 19 a). Bei den CD8+ Zellen produzierten Zellen infizierter und nicht-infizierter Mäuse vergleichbare Mengen an TNF α nach Restimulation mit PHA-L, während nur die Zellen aus infizierten Mäusen auf die Peptide LLO und OVA reagierten. Auch hier fand sich ein Kontrast zur Produktion von iATP (s. Abb. 19 c).

4.5.3 Kinetik der ATP- und Zytokinproduktion im Verlauf einer *Listeria monocytogenes*

Infektion

Im folgenden Versuch wurde die Reaktion der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen auf Stimulation mit PHA-L und LLO-Peptid im Verlauf einer *Listeria monocytogenes* Infektion untersucht. Dazu wurden an Tag 0, Tag 3, Tag 5, Tag 7 und Tag 9 der Infektion ATP- und Zytokinmessungen vorgenommen.

Die Abbildungen 20 a und c zeigen die ATP-Spiegel von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, die mit PHA-L restimuliert wurden, im Verlauf einer Infektion mit Lm-OVA. Vor der Infektion zeigten die Zellen nach PHA-L Stimulation erwartungsgemäß hohe ATP-Spiegel. Diese sanken im Verlauf der Infektion ab, bei den CD4⁺ Zellen etwas schneller als bei den CD8⁺ Zellen. An Tag 7 und 9 waren keine Erhöhungen der ATP-Spiegel mehr zu messen.

Wenn das LLO-Peptid zur Restimulation eingesetzt wurde, zeigte sich im gesamten Verlauf der Infektion keine messbare Erhöhung der ATP-Spiegel (Abb. 20 e und g).

Zugleich wurde auch die TNF α -Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach PHA-L- bzw. LLO-Peptid-Stimulation gemessen (s. Abb. 20 b und d sowie Abb. 20 f und h). Dabei konnten aus technischen Gründen nur die Messungen bis zu Tag 5 der Infektion ausgewertet werden.

Die Messungen zeigen, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen, im Gegensatz zu der zuvor gezeigten ATP-Produktion, im Verlauf der Infektion steigende Mengen an TNF α produzierten.

Die Zytokinmessung zeigt auch, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen auf Restimulation mit dem LLO-Peptid mit der Produktion von TNF α reagierten. Obwohl LLO als immundominantes Epitop für CD4⁺ Zellen gilt, ist eindeutig zu sehen, dass auch CD8⁺ Zellen im Verlauf der Infektion zunehmend auf die Stimulation mit diesem Peptid mit der Produktion von TNF α reagieren. Dabei bleibt unklar, ob diese Produktion die direkte Folge der Erkennung des Peptids durch CD8⁺ Zellen ist, oder einen *Bystander*-Effekt, der die Stimulation von CD4⁺ Zellen darstellt.

Zusammenfassend zeigt auch dieser Versuch, dass im Verlauf einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* die messbaren ATP-Spiegel in T-Zellen eher abnehmen und dass sich dieser Parameter damit ganz anders als die Produktion von Zytokinen als Messparameter der T-Zell-Aktivierung verhält.

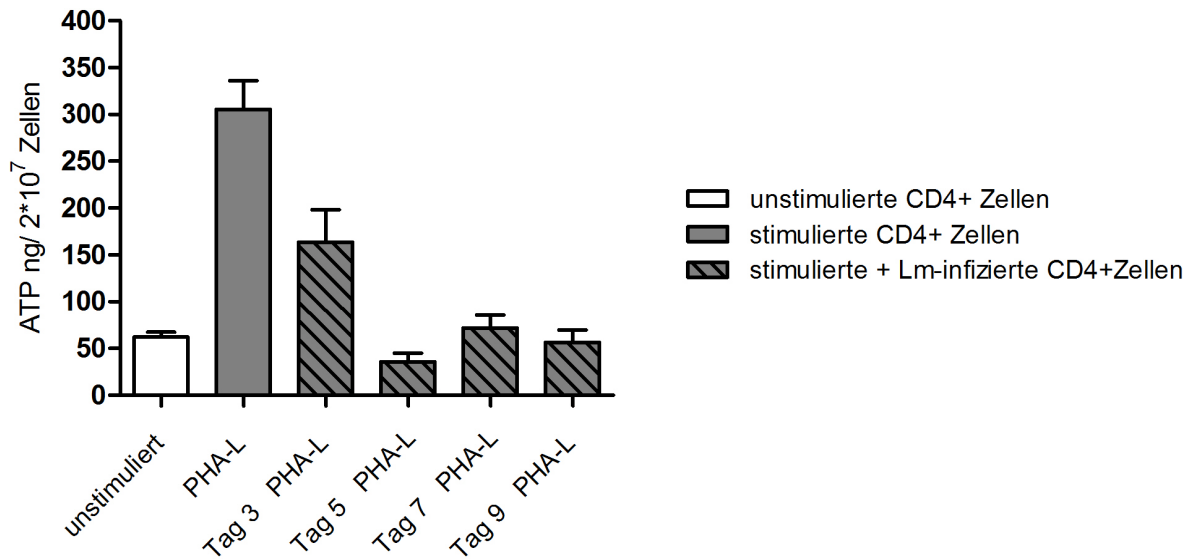


Abb. 20 a: ATP-Werte CD4+-Zellen nach Stimulation mit PHA-L nicht infizierter und infizierter Zellen, Tag 0-9 der Lm-Infektion

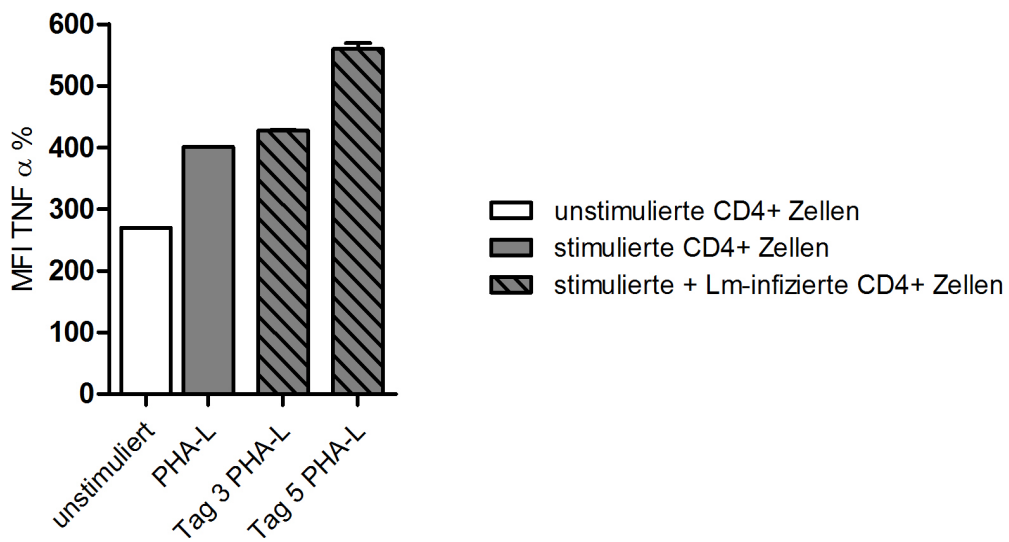


Abb. 20 b: MFI TNF α CD4+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, Tag 0-5 der Lm-Infektion

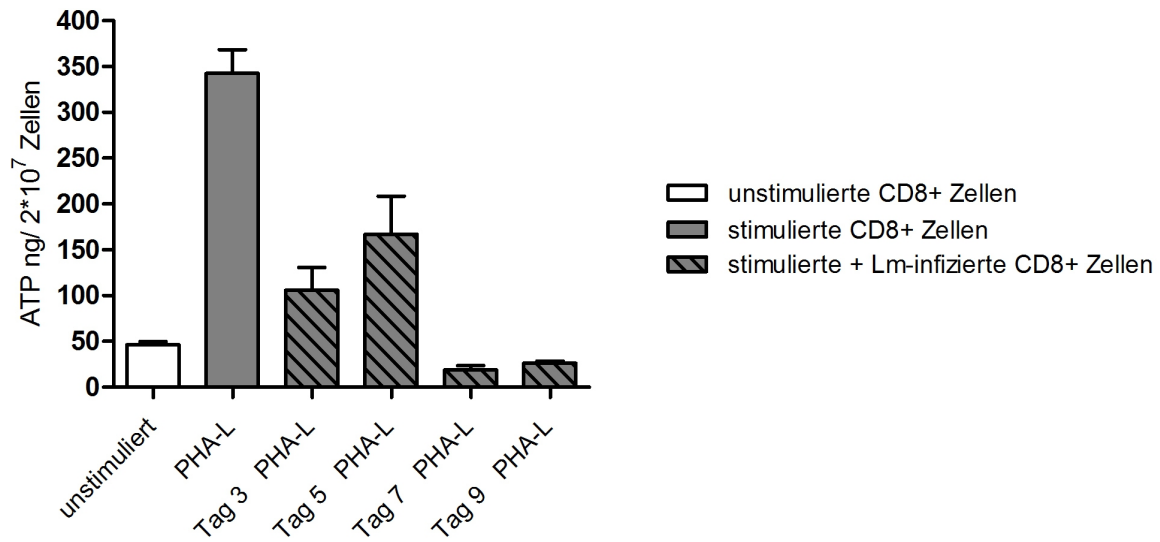


Abb. 20 c: ATP-Werte CD8+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L nicht infizierter und infizierter Zellen, Tag 0-9 der Lm-Infektion

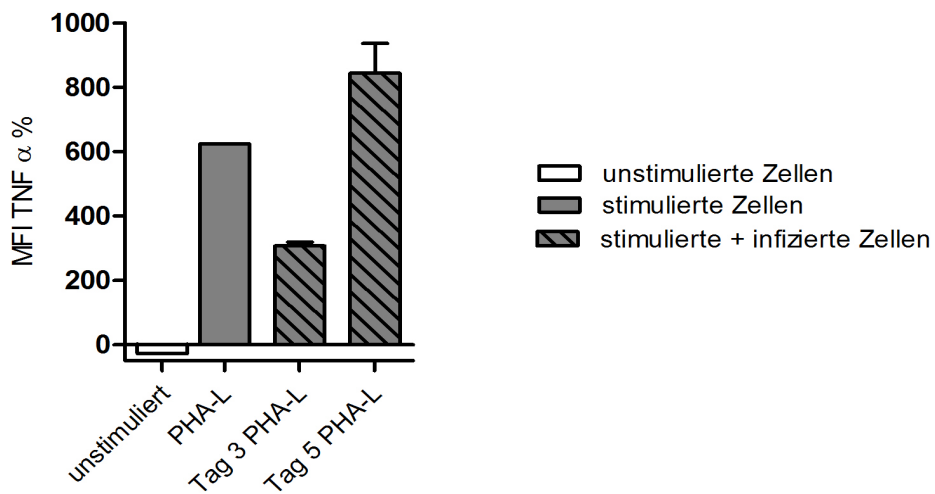


Abb. 20 d: MFI TNFα CD8+ Zellen nach Stimulation mit PHA-L, Tag 0-5 der Lm-Infektion

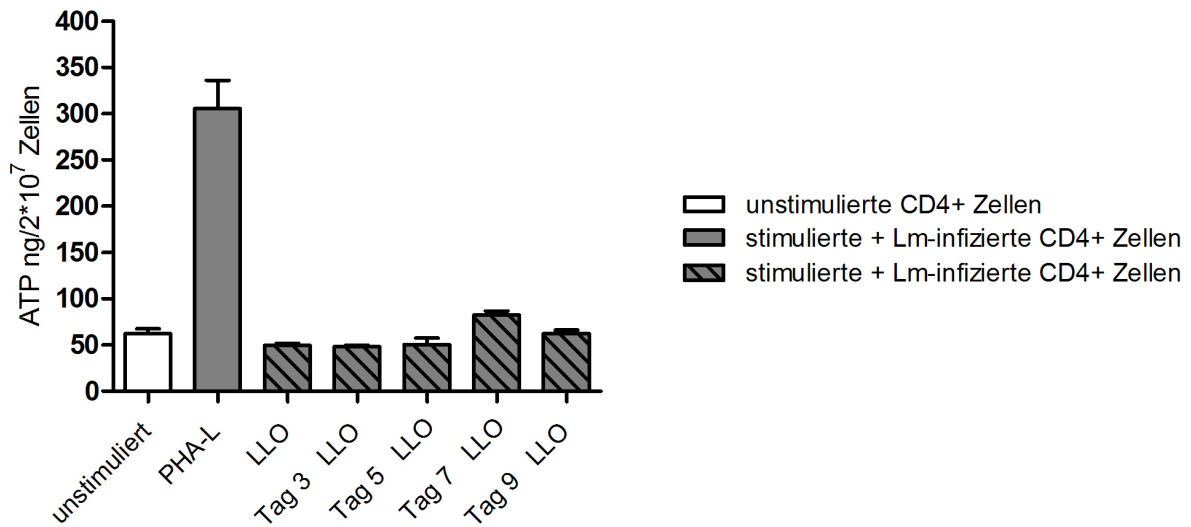


Abb. 20 e: ATP-Werte CD4+-Zellen nach Stimulation mit LLO-Peptid nicht infizierter und infizierter Zellen, Tag 0-9 der Lm-Infektion

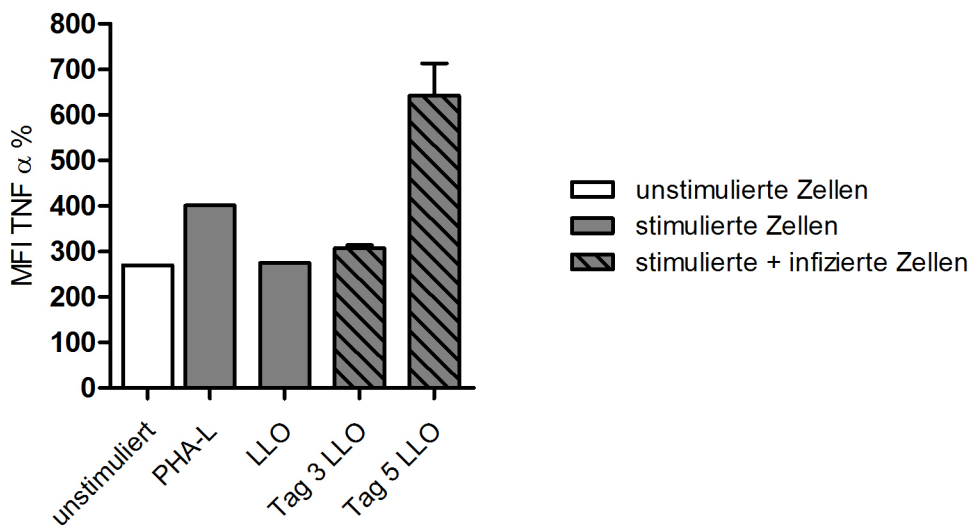


Abb. 20 f: MFI TNF α CD4+ Zellen nach Stimulation mit LLO-Peptid, Tag 0-5 der Lm-Infektion

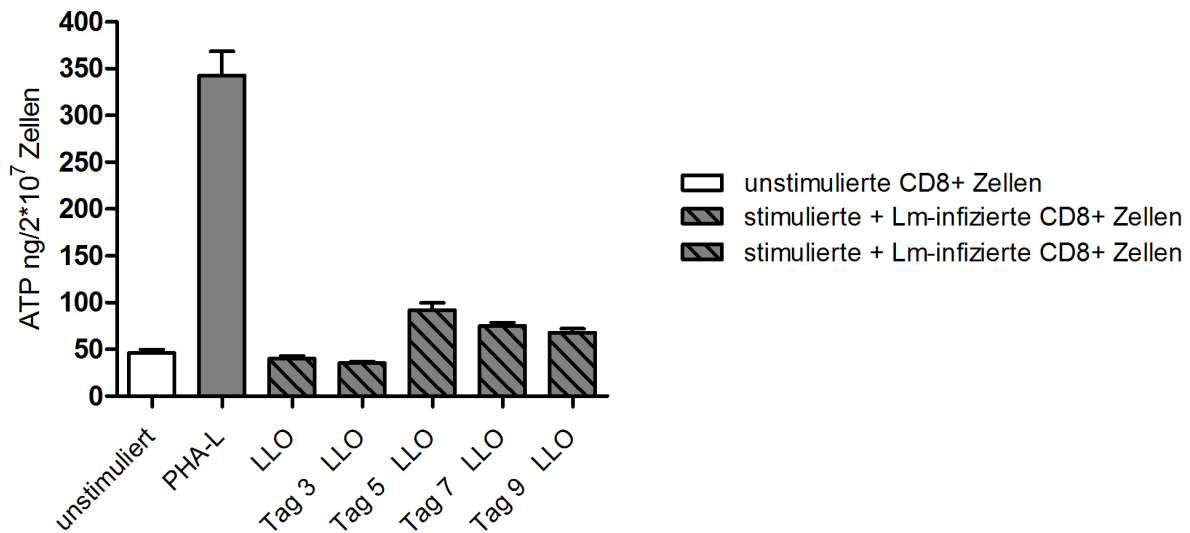


Abb. 20 g: ATP-Werte CD8+-Zellen nach Stimulation mit LLO-Peptid nicht infizierter und infizierter Zellen, Tag 0-9 der Lm-Infektion

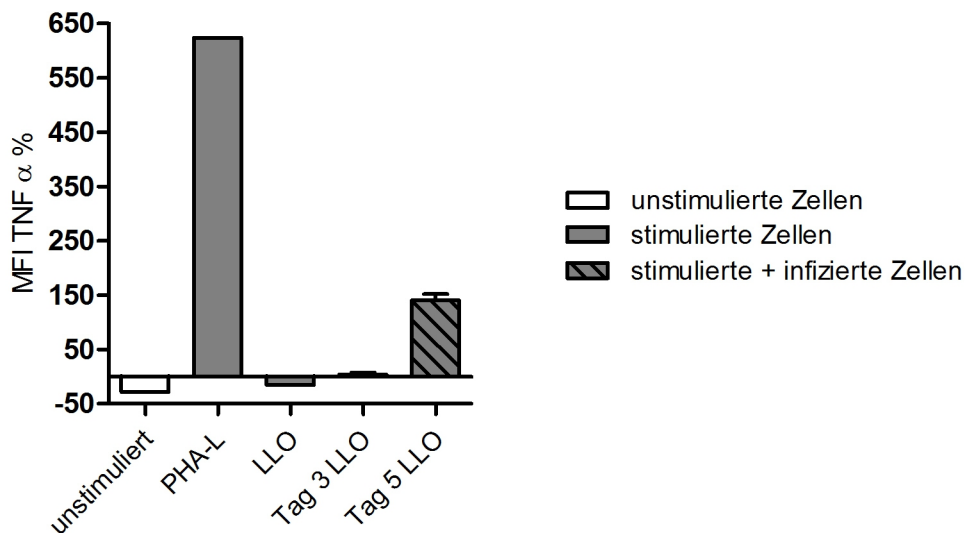


Abb. 20 h: MFI TNF α CD8+ Zellen nach Stimulation mit LLO-Peptid, Tag 0-5 der Lm-Infektion

Abbildung 20 a - h: Kinetik der ATP-Produktionen und TNF α -Produktion L.m.-infizierter CD4+ und CD8+ Zellen nach PHA-L- und LLO-Peptid-Stimulation

Mäuse wurden mit Lm infiziert und an Tag 3, 5, 7 und 9 der Infektion getötet und die Milzen entnommen. Die infizierten und nicht infizierten Milzzellen wurden in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in "RPMI komplett" (s. Material und Methoden) über 24 Stunden bei 37 °C mit PHA-L (10 μ g/ml) bzw. LLO-Peptid (10^{-5} M) stimuliert. Vor der Zellselektion wurden die Ansätze mit EDTA (20 mM) für 15 Minuten inkubiert. Zur Zellselektion wurden die Ansätze (unstimuliert und stimuliert) für 30 Minuten mit Streptavidin-beschichteten magnetischen *Beads* inkubiert, die vorher mit α CD4- bzw. α CD8-gekoppelt worden waren. Nach mehrfachem Waschen wurden die Ansätze mit 200 μ l Lysisreagenz (SDS 7 %) lysiert. Pro Ansatz

wurden 50 µl Zelllysat mit 150 µl Lumineszenzreagenz versetzt und die iATP-Konzentration am Luminometer ermittelt.

Die iATP-Werte wurden in zwei Versuchen ermittelt, ein Versuch beinhaltete Tag 0, 3 und 5; ein weiterer Versuchsansatz die Tage 7 und 9 der Infektion. In den Abbildungen wurden die Versuche zusammengefasst.

Für die Ermittlung der TNF α -Produktion wurden Zellen nach Stimulation für die Messung der Fluoreszenzintensitäten am Durchflusszytometer mit CD4-, CD8- und TNF α -Antikörpern gefärbt (s. Material und Methoden).

Abb. 20 b,d,f und h zeigen die aus den FACS-Plots ermittelten Mittleren Fluoreszenzintensitäten von TNF α der CD4+ bzw. CD8+ Zellen.

*ATP-Werte CD4+ Zellen nicht infiziert / infiziert Tag 0 / 3 / 5 / 7 / 9 (SD) in ng ATP/2*10⁷ Zellen: unstimuliert: 62,13 (15,49); PHA-L: 305,5 (87,27) / 163 (98,23) / 35,92 (26,41) / 71,86 (39,83) / 56,63 (37,67); LLO: 49,52 (6,65) / 48,18 (4,51) / 50,39 (19,73) / 82,62 (11,52) / 62,51 (10,36)*

*ATP-Werte CD8+ Zellen nicht infiziert / infiziert Tag 0 / 3 / 5 / 7 / 9 (SD) in ng ATP/2*10⁷ Zellen: unstimuliert: 46,23 (10,26); PHA-L 342,3 (73,83) / 105,9 (70,84) / 71,86 (39,83) / 56,63 (37,67) / 26,22 (6,76); LLO: 40,3 (7,95) / 35,42 (4,52) / 91,88 (22,80) / 75,11 (10,31) / 67,82 (11,92)*

MFI-Werte in % CD4+ Zellen nicht infiziert / infiziert Tag 0 / 3 / 5 (SD): unstimuliert: 270; PHA-L: 401 / 427,5 (0,71) / 559,5 (13,44); LLO: 275 / 307,5 (9,19) / 642,5 (99,70)

MFI-Werte in % CD8+ Zellen nicht infiziert / infiziert Tag 0 / 3 / 5 (SD): unstimuliert: 27,90; PHA-L: 624 / 307 (16,97) / 843,5 (130,8); LLO: -15,5 / 4,145 (5,056) / 140,5 (16,26)

5 Diskussion

5.1 Etablierung des Immuknow-Assays im Maussystem

Das Ziel dieser Arbeit war es, den von Cylex für die Untersuchung humaner T-Zellen entwickelten ImmuKnow® Assay auf Zellen der Maus zu übertragen, um so das Verhalten des Tests unter verschiedenen kontrollierten Bedingungen, wie z.B. einer experimentell gesetzten Infektion, *in vivo* untersuchen zu können.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Übertragung des Assays auf das Maussystem. Dazu mussten verschiedene Veränderungen im Vergleich zu dem von Cylex vorgeschriebenen Verfahren erprobt und validiert werden. Um den Assay in größerem Umfang machen zu können, wurden statt Blutzellen, Zellen aus den Milzen von Mäusen verwendet, da diese im Vergleich zu Blutzellen in großer Anzahl zu gewinnen sind. Es konnte zudem gezeigt werden, dass für eine verlässliche Funktionsweise die Zugabe von EDTA, die Verwendung einer Platte mit unbeschichtetem Boden sowie der Einsatz von SDS als Lysisreagenz essentiell sind. Durch diese Veränderungen zum ursprünglichen Versuchsprotokoll war es möglich, an Mausmilzzellen Ergebnisse zu erzielen, die denen aus dem Assay an humanen Blutzellen vergleichbar waren.

Bei den Versuchen zur Übertragung des Assays auf das Maussystem war es auch ein wichtiges Ziel, den Assay mit Materialien durchzuführen, die kostengünstiger waren als die des für die Patientenversorgung vermarkteten Cylex Originalkits.

Wie in den Ergebnissen 4.1 gezeigt, traten dabei einige Schwierigkeiten auf. Zunächst schien die Zellselektion mittels magnetischer *Beads* nicht zu funktionieren, denn es wurden auch unter Verwendung von magnetischen *Beads*, die mit keinem Antikörper gekoppelt waren und daher keine Zellen positiv isolieren sollten, signifikante ATP-Konzentrationen gemessen. Jedoch zeigten weitere Versuche, dass die gemessenen ATP-Spiegel vor allem durch unspezifische Zellanheftung an die Mikrotiterplatte bedingt waren. Zunächst wurde eine für die Zellkultur bestimmte Mikrotiterplatte verwendet, die einen beschichteten Boden hat, der es den Zellen erleichtert, sich während ihrer stimulationsbedingten Proliferation an diesem anzuheften. Besonders die Stimulation mit PHA-L führte zur Verklebung der Zellen, wodurch es schneller zu einer Adhäsion am Plattenboden kam. Die Zugabe von EDTA vor der Selektion wirkte sich zwar positiv aus, konnte die Adhäsion der Zellen am Plattenboden jedoch nicht komplett verhindern. Erst der Austausch der bisher verwendeten Mikrotiterplatte gegen eine Mikrotiterplatte ohne Beschichtung reduzierte die unspezifische Adhäsion auf ein vertretbares Maß.

Nachdem die Platte als eine wichtige Fehlerquelle identifiziert worden war, konnte der Assay durch Austausch des Lysisreagenz und Erhöhung der Zellzahl noch weiter optimiert werden. Das zunächst

für das Lysisreagenz verwendete IGEPAL ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches die Tertiärstruktur solubilisierter Proteine nicht angreift. Dadurch ist es möglich, dass nach der Lyse eventuell vorhandene ATPasen weiter wirksam sein können. Durch das Umsteigen auf das ionische Detergenz SDS sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen ATPasen denaturiert werden, die Luziferase jedoch noch weiter aktiv ist. Empirisch stellte sich dabei heraus, dass bei Zelllyse mit SDS 7 % die höchsten ATP-Konzentrationen messbar waren.

Bisher gibt es noch keine weiteren Studien in denen der ImmuKnow *Assay* auf Mauszellen angewendet wurde. Die Übertragung des Tests auf das Maussystem eröffnet große Möglichkeiten, da so Mäuse unter kontrollierten Bedingungen auf gesteigerte Immunreaktionen getestet werden können. Wegen seiner schnellen und praktischen Durchführung wird der Test in der Transplantationsmedizin zur Erkennung von Transplantatabstoßung bzw. Infektionen unter Immunsuppression angewendet. Daher wäre in der Zukunft eine Ausweitung des Tests auch auf murine Blutzellen sinnvoll, so dass dann auch an lebenden Mäusen der individuelle Immunstatus kontrolliert werden könnte. In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Mäuse für die Milzentnahme sakrifiziert, so dass die Möglichkeit, Verlaufswerte an derselben Maus zu erheben, nicht bestand.

Nach erfolgreicher Etablierung des *Assays* konnten in folgenden Versuchen weitere Fragestellungen mithilfe dieser Methode untersucht werden.

5.2 Die ATP-Menge in T-Zellen ist von der Art des Stimulanz abhängig.

In den darauf folgenden Versuchen wurde der Energiestoffwechsel in T-Zellen genauer untersucht. Dazu stellte sich die Frage, ob die gemessenen ATP-Werte in T-Zellen von der Art des Stimulanz abhängig sind. Als polyklonale Stimulanzen wurden neben PHA-L auch α CD3, α CD28, SEB, PMA, Ionomycin und ConA eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich große Unterschiede in Bezug auf die zu messenden iATP-Spiegel je nach Stimulanz gibt. Um diese mit einem anderen Parameter der T-Zell-Aktivierung zu vergleichen, wurde gleichzeitig die Zytokinproduktion von T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung gemessen. Dabei wurde das TNF α ausgewählt, da dieses in vergleichsweise großen Mengen sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ Zellen produziert wird. Eine stark vereinfachte Übersicht über die Ergebnisse bietet die folgende Tabelle:

| | Gemessene ATP-Werte | Gemessene TNF α -Werte |
|---------------|---------------------|-------------------------------|
| PHA-L | +++ | + |
| CD3/CD28 | + | ++ |
| PMA/Ionomycin | + | +++ |
| SEB | - | - |
| ConA | - | - |

Tab. 3: Vereinfachte Übersicht der ATP- und TNF α -Produktion nach Stimulation. (+: schwache Reaktion; ++: mäßige Reaktion; +++: starke Reaktion; -: keine Reaktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen)

Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse in Bezug auf die verwendeten Stimulanzien keine Korrelation zwischen den iATP-Spiegeln und der Zytokinproduktion. PHA-L war in Bezug auf die Höhe des gemessenen ATPs in der Zelle das potenteste Stimulanz, konnte aber die Zytokinproduktion nur schwach induzieren. Im Gegensatz dazu wirkten α CD3/ α CD28 und PMA/Ionomycin weniger stimulierend auf die ATP-Produktion in den Zellen, waren aber gute Induktoren der Zytokinproduktion. Wider Erwarten konnten ConA und SEB in diesen Versuchen weder die ATP- noch die Zytokinproduktion in nennenswertem Maße stimulieren.

Diese Ergebnisse machen zum einen verständlich, warum im Immuknow-*Assay* standardmäßig PHA-L als Stimulanz verwendet wird. Zum anderen weisen sie darauf hin, dass die Messung von intrazellulärem ATP, so wie sie in diesem *Assay* durchgeführt wird, einen grundsätzlich anderen Aspekt der T-Zell Aktivierung misst als beispielsweise die Bestimmung der Zytokinproduktion. Es wird in zukünftigen klinischen Studien zu klären sein, ob die Messung von iATP im Vergleich zu anderen Korrelaten der T-Zell-Aktivierung klinisch nützlichere Informationen zur Abschätzung des Immunstatus eines Patienten liefert.

Letztlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Wirkung der Stimulanzien vor allem darauf zurück zu führen ist, dass sie zu unterschiedlich stark ausgeprägter Verklebung der Zellen führen, so dass die Zellen sich mehr oder weniger stark am Boden der Mikrotiterplatte oder an den zur Selektion eingesetzten *Magnetbeads* anheften. Dadurch würden mehr oder weniger Zellen lysiert und somit in der ATP-Messung erfasst. In diesem Fall würde das Ergebnis der ImmuKnow-Messung möglicherweise nicht die durch Stimulation induzierte ATP-Produktion, sondern einen unspezifischen Effekt der T-Zell-Aktivierung, wie z.B. eine verstärkte Adhäsionsfähigkeit, widerspiegeln. Weitere Studien sind notwendig, um diesen Punkt definitiv zu klären.

Die ATP-Werte wurden nach Stimulation über 24 Stunden gemessen. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen ATP-Spiegeln und Zytokinproduktion könnte also in der unterschiedlichen

Induktion von extrazellulären ATPasen wie CD39 durch verschiedene Stimulanzen liegen. Durch die Expression von CD39 würde ATP vor der Messung am Luminometer bereits verbraucht. CD39 wurde z.B. auf Gedächtniszellen gefunden (Moncrieffe *et al.*, 2010). Diese könnten mitverantwortlich für den Abbau von ATP nach Stimulation sein.

Eine weitere Erklärung für die geringen ATP-Werte nach Stimulation mit Stimulanzen, die spezifisch den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalweg zum Ziel haben, könnte sein, dass die so stimulierten Zellen das produzierte ATP selbst verbrauchen, um ihr eigenes Überleben zu sichern und ihre metabolischen Aufgaben zu erfüllen. ATP wird beispielsweise verbraucht, um das Membranpotenzial der Zelle aufrechtzuerhalten oder Ionenpumpen zu aktivieren (Buttgereit, 2000), sowie um die Effektormechanismen der T-Zelle nach Aktivierung umzusetzen. Zu diesen Effektormechanismen zählen unter anderem die Synthese von DNA und weiterer Zellbestandteile im Rahmen der Proliferation und die Ausschüttung von Zytokinen und Membranproteinen, die weitere Aufgaben im Rahmen der Immunantwort übernehmen.

Eine interessante Beobachtung, die allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht tiefergehend verfolgt wurde, sind die in Abb. 19 dargestellten Unterschiede zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes* im Hinblick auf ihre ATP- und Zytokinproduktion. Obwohl die ATP-Produktion der CD4⁺ Zellen stärker messbar ist, produzieren die CD8⁺ Zellen deutlich mehr TNF α .

5.3 Kostimulanzen haben einen Einfluss auf den ATP- und den Zytokingehalt der Zelle.

Weitere Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten die kostimulierende Wirkung von α CD28 und Ionomycin bei Zugabe zu α CD3 bzw. PMA auf die Erhöhung von ATP- und Zytokinwerten. Es konnte für α CD28 sowie für Ionomycin gezeigt werden, dass sie die Wirkung des Hauptstimulanz (α CD3 bzw. PMA) in Bezug auf die ATP-Menge in den T-Zellen noch verstärken. Schon der alleinige Einsatz von α CD28 bewirkt in den T-Zellen leicht höhere ATP-Werte als in unstimulierten T-Zellen messbar sind.

Ebenso verhielten sich α CD28 und Ionomycin in Bezug auf die Zytokinsynthese. Anti-CD28 sowie Ionomycin führten in Kombination mit ihrem jeweiligen Hauptstimulanz zu einer Erhöhung der TNF α -Produktion. Dabei konnte besonders die stimulationsfördernde Wirkung von Ionomycin gezeigt werden, die TNF α -Synthese konnte um ein Vielfaches gesteigert werden.

Schon Lafferty erkannte 1993, dass die T-Zell-Aktivierung von Kostimulation abhängig ist (Lafferty und Gill, 1993). Laut Jordan und Blueston ist die Kostimulation mit α CD28 umso wichtiger, je niedriger die Konzentration des Hauptstimulanz ist (Bour-Jordan und Blueston, 2002). Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit ebenfalls für α CD28-vermittelte Stimulation gezeigt

werden. Wird α CD3 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, bewirkt α CD28 eine stärkere ATP-Zunahme als in Kombination mit α CD3 in einer Konzentration von 1 μ g/ml.

Um den kostimulierenden Einfluss von α CD28 auf die T-Zellen näher zu untersuchen, wurde CTLA-4-Ig eingesetzt. CTLA-4 ist ein Homolog von CD28, das eine stärkere Bindungsaffinität zu den Bindungspartnern CD80 und CD86 aufweist als CD28. Lösliches CTLA-4-Ig blockiert daher die kostimulatorischen Moleküle auf APCs und verhindert daher die Kostimulation über CD28. CTLA-4-Ig führt in der Zelle zur Suppression von Effektormechanismen (Parry *et al.*, 2005; Greenwald *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von CTLA-4-Ig in Kombination mit α CD3 die ATP-Produktion in T-Zellen leicht vermindert. Die gemessenen ATP-Werte waren nach Inkubation der Zellen mit α CD3 und CTLA-4-Ig geringer als nach alleiniger α CD3-Inkubation. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Kostimulation für die Aktivierung von T-Zellen und zeigt, dass auch ohne α CD28 Zugabe eine geringe Kostimulation durch APC stattfindet, die durch Zugabe von CTLA-4-Ig noch geblockt werden kann.

5.4 T-Zellen benötigen mehr als nur Glukose für die ATP-Produktion.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, welche Energiequellen für die T-Zellen zur ATP-Produktion von Bedeutung sind. Die Hemmung der Glykolyse mittels 2-Deoxyglukose unterdrückte den Anstieg des iATP-Wertes nach Stimulation nahezu vollständig. Die gleichzeitige Bereitstellung von Pyruvat, das zur oxidativen Phosphorylierung verwendet werden kann, konnte die ATP-Produktion nicht erhöhen. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von anderen Autoren (Frauwirth J. *et al.*, 2004; Dziurka *et al.*, 2010; Finlay und Cantrell, 2011), dass T-Zellen nach Stimulation die Glykolyse und nicht die oxidative Phosphorylierung als Mechanismus der Energieproduktion einsetzen. Andererseits stellte sich heraus, dass die Ergänzung von PBS mit Glukose oder anderen einfachen Bestandteilen nicht ausreichte, um eine deutliche, im Immuknow-*Assay* messbare, ATP-Produktion zu ermöglichen. Nur in komplettem RPMI Medium, welches Aminosäuren, Vitamine, Salze, Glucose, FCS, Glutamin, Gentamycin und 2-Mercaptoethanol enthält, konnten erwartungsgemäße ATP-Antworten seitens der T-Zellen auf Stimulation mit PHA-L gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Glukose für die iATP Produktion, zumindest so wie sie durch den Immuknow-*Assay* gemessen wird, notwendig, aber nicht hinreichend ist.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass neben der Glykolyse auch die Proteinbiosynthese für die Energiegewinnung in Form von ATP von Bedeutung ist. Die Hemmung der Proteinbiosynthese unterdrückte jedoch die ATP-Produktion nicht so vollständig wie die Hemmung der Glykolyse.

Eine Erklärung für die höheren iATP Spiegel nach Hemmung der Proteinbiosynthese könnte auch

sein, dass die Zellen bei gehemmter Proteinbiosynthese weniger ATP für ihre Effektorfunktionen verbrauchen. Denn laut Buttgerit *et al.* werden 20% der Energie in Form von ATP für Proteinsynthese aufgewandt, die bei Hemmung dieser in den Zellen nicht mehr stattfinden kann.

5.5 Kinetik der ATP-Produktion nach Stimulation in T-Zellen

Eine weitere Fragestellung, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, befasst sich mit der zeitlichen Abfolge von ATP- und Zytokinantwort in den T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass in den Zellen ein bis zu 6 Stunden kontinuierlicher Anstieg der Produktion von TNF α stattfindet. Da nur ein Zeitraum von 6 Stunden untersucht wurde, kann nicht gesagt werden, ob es danach noch zu weiterer Zytokinproduktion seitens der T-Zelle kommt.

Die gemessenen iATP-Werte blieben in diesem Zeitraum dagegen sehr niedrig, und stiegen erst nach 6-stündiger Stimulation auf höhere Werte als die unstimulierten Zellansätze an. Insbesondere schien es zu frühen Zeitpunkten (z.B. 3 Stunden nach Stimulation) eher zu einem Abfall der iATP Konzentrationen zu kommen. Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Zellen zunächst ATP nettomäßig verbrauchen, um ihre Effektorfunktionen ausüben zu können.

5.6 Eine Infektion mit *Lm* geht mit niedrigen intrazellulären ATP-Spiegeln einher

Im letzten Teil, der einen der Schwerpunkte dieser Arbeit darstellt, habe ich mich mit der Fragestellung auseinandergesetzt, ob sich die Beobachtung, dass die gemessenen iATP-Spiegel während einer Infektion niedriger als zu nicht infizierten Zuständen sind (Israeli *et al.*, 2010), auch im Rahmen einer kontrollierten Infektion im Maussystem bestätigen lässt.

Die Ergebnisse zeigen, dass 9 Tage nach Infektion von Mäusen mit *Lm* die iATP-Spiegel von Milzzellen nach Stimulation der infizierten Milzzellen mit PHA-L signifikant niedriger waren als die von nicht infizierten Mäusen. Diese Beobachtung gilt für CD4 $^{+}$ sowie für CD8 $^{+}$ Zellen. Der Tag 9 wurde als Untersuchungszeitpunkt gewählt, da die T-Zell-Antworten in der Maus nach *Lm* Infektion an Tag 8 am stärksten sind (Pamer, 2004).

Neben dem polyklonalen Stimulator PHA-L wurden als antigenspezifische Stimulanzen für CD4 $^{+}$ bzw. CD8 $^{+}$ T-Zellen das LLO- und das OVA-Peptid verwendet. Bei nicht infizierten Zellen waren bei Verwendung dieser Stimulanzen im Unterschied zu PHA-L erwartungsgemäß keine Steigerungen der iATP-Spiegel messbar. Jedoch blieben auch in infizierten Zellen die iATP-Spiegel niedrig, während die gleichzeitige Messung der Zytokinproduktion zeigte, dass die Zellen durch die antigen-spezifische Stimulation durchaus aktiviert waren. Insgesamt bestätigten also die Versuche mit antigen-spezifischen Stimulanzen die Beobachtung, dass T-Lymphozyten unter Bedingungen einer Infektion nicht in der Lage sind, größere Mengen an iATP zu akkumulieren.

Über den Grund für diese Veränderung im Vergleich zum nicht-infizierten Zustand kann nur spekuliert werden. Möglich ist, dass unter den Bedingungen einer Infektion die metabolische Lage von Lymphozyten dahingehend verändert ist, dass noch größere Mengen von ATP verbraucht werden als bei der Aktivierung ruhender T-Zellen, und daher keine messbaren intrazellulären Überschüsse angehäuft werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Hypothese nicht weiter geklärt werden.

Um zu sehen, wie sich die Fähigkeit zur ATP-Speicherung im Verlauf einer Infektion entwickelt, wurden iATP-Werte infizierter Zellen über einen Zeitraum von 9 Tagen gemessen. Dabei ergab sich, dass die ATP-Werte schon an Tag 3 in Zellen infizierter Mäuse signifikant niedriger waren als die nicht-infizierter Mäuse. Im weiteren Verlauf sanken die ATP-Werte noch weiter. Im Gegensatz dazu erreichte die Zytokinproduktion der infizierten Zellen an Tag 5 und 7 Maximalwerte.

Eine wünschenswerte Weiterentwicklung wäre es, den *Assay* auch bei Mäusen an peripheren Blutzellen durchführen zu können. Dadurch könnten an einer Maus mehrere Messungen vorgenommen werden, und individuelle Verläufe könnten verfolgt werden. In meinen Versuchen war mit der Milzentnahme der Tod des Tieres verbunden, sodass nur an einem Zeitpunkt pro Maus der ATP-Spiegel gemessen werden konnte.

Insgesamt bestätigen meine Versuche am Mausmodell die im humanen System gemachte Beobachtung, dass der ImmuKnow *Assay* im Verlauf einer Infektion erniedrigte intrazelluläre ATP-Spiegel anzeigt. Ob, wie ebenfalls im humanen System beobachtet wurde, die iATP-Spiegel im Verlauf einer akuten Transplantatabstoßungsreaktion ansteigen, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Gleiches gilt für die Ursachen des paradoxen Verhaltens von iATP-Spiegel und Zytokinproduktion als Parameter der T-Zell Aktivierung im Rahmen einer Infektion.

6 Zusammenfassung

Der Immuknow-*Assay* misst den iATP-Gehalt von CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Dieser in den USA etablierte und zugelassene Test wird verwendet, um bei Patienten mit Immunsuppression nach Transplantation eine akute Abstoßungsreaktion von einer Infektion zu unterscheiden. In dieser Arbeit ging es darum, den Test für die Verwendung im Mausmodell zu adaptieren, um seine Aussagefähigkeit unter kontrollierten Bedingungen zu überprüfen. Insbesondere wurde die Messung der iATP-Konzentration mit der Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion (am Beispiel des TNF α) als weiteren gängigen Parameter zur Messung der Funktionalität einer T-Zell-Antwort verglichen. Schließlich wurde im Mausmodell überprüft, ob eine systemische Infektion tatsächlich mit erniedrigten intrazellulären ATP-Spiegeln einhergeht.

Die Adaption des Tests auf Mauszellen wurde genutzt, um das Verhalten von ATP und TNF α nach Stimulation von T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass die Zellen je nach Stimulationsart mit anderen Effektorfunktionen reagierten. So wurde bei Stimulation mit PHA-L die ATP-Produktion, bei Stimulation mit α CD3/ α CD28 die Zytokinproduktion stärker angeregt. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs zeigte, dass die Zytokinproduktion bereits früh nach Stimulation einsetzt, während die Akkumulation der ATP-Produktion erst nach etwa 6 Stunden messbar wird. Die Untersuchung der metabolischen Voraussetzungen für die ATP-Produktion zeigte, dass vorwiegend die Glykolyse für die Produktion von ATP verwendet wird.

Abschließend wurde untersucht, wie sich die ATP- und TNF α -Produktion von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen *in vivo* im Rahmen einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* verhalten. Dabei zeigte sich, dass T-Zellen infizierter Mäuse sowohl nach unspezifischer (PHA-L) als auch Antigen spezifischer Stimulation (LLO- und OVA-Peptide) keine messbare ATP-Akkumulation zeigen, obwohl die gleichen Zellen mit einer gesteigerten Zytokinproduktion reagierten.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit einige der mit dem Immuknow-Test an Patienten gemachten Beobachtungen (Akkumulation von ATP insbesondere nach Stimulation durch PHA; Erniedrigung der ATP-Spiegel im Verlauf einer akuten Infektion) am Mausmodell und zeigt, dass die Messung der iATP-Spiegel einen anderen Aspekt der T-Zell-Aktivierung erfasst als die der intrazellulären Zytokinproduktion. Trotz der Bestätigung der klinischen Nützlichkeit des Immuknow-Tests in zahlreichen klinischen Studien bleiben Fragen zur physiologischen Grundlage des Tests offen.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| α Gal-Epitop | Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AP-1 | <i>activating protein-1</i> |
| APC | antigenpräsentierende Zellen |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BFA | Brefeldin A |
| BSA | bovines Serum Albumin |
| CCL-2 | <i>CC-Chemokine Ligand 2</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CFSE | <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> |
| ConA | <i>Concanavalin A</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FSC | <i>forward scatter</i> |
| G-CSF | <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> |
| iATP | intrazelluläres ATP |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IL | Interleukin |
| ITAM | Immunrezeptor-Tyrosin-basierten aktivierenden Motive |
| JAK | Januskinase |
| LLO | Listeriolysin O |
| Lm | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| LmOVA | <i>Listeria monocytogenes</i> Stamm OVA |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensitäten |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| NAD ⁺ /NADH | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form) |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T-cells</i> |
| Nf κ B | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NRS | normales Rattenserum |
| OKT-3 | Muromonab CD3 |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHA-L | Phytohämagglutinin-L |
| PI3-Kinase | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMA | Phorbol-Myristat-Acetat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SD | <i>Standard Deviation</i> |
| SEB | Staphylokokken Enterotoxin B |
| SSC | <i>side scatter</i> |
| STAT | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| TipDC | TNF α - u. Stickstoffmonoxid-Synthase-produzierende dendritische Zellen |
| TH | T-Helferzellen |
| TNF α | Tumornekrosefaktor- α |
| TSB | <i>Tryptic Soy Broth</i> |

8 Literaturverzeichnis

8.1 Zeitschriften

Andreotti P. E., Thornthwaite J. T., Morse I. S. (1991) ATP tumor chemosensitivity assay. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*: 417-420

Badovinac V. P., Harty J. T. (2000) Adaptive immunity and enhanced CD8⁺ T cell response to *Listeria monocytogenes* in the absence of perforin and IFN-gamma. *Journal of Immunology* 164 (12): 6444-52

Balaban R. S. (2002) Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34: 1259–1271

Bauer D. E., Harris M. H., Plas D. R., Lum J. J., Hammerman P. S., Rathmell J. C., Riley J. L., Thompson C. B. (2004) Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *The FASEB Journal* 18 (11): 1303-5

Bental M., Deutsch C. (1993) Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magnetic Resonance in Medicine* 29 (3): 317-26

Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy D. A. (1990) *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345 (6271): 175-6

Bour-Jordan H., Blueston J. A. (2002) CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology* 22 (1): 1-7

Brand K. A., Hermfisse U. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB Journal* 11 (5): 388-95

Brenner P., Keller M., Beiras-Fernandez A., Uchita S., Kur F., Thein E., Wimmer C., Hammer C., Schmoeckel M., Reichart B. (2010) Prevention of hyperacute xenograft rejection through direct thrombin inhibition with hirudin. *Annals of Transplantation* 15 (4): 30-7

- Busch D. H., Pilip I. M., Vijn S., Pamer E. G. (1998) Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8 (3): 353-62
- Busch D. H., Pamer E. G. (1999) T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *The Journal of Experimental Medicine* 189 (4): 701-10
- Buttgereit F., Burmester G. R., Brand M. D. (2000) Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunology Today* 21 (4): 192-9
- Cheng J. W., Shi Y. H., Fan J., Huang X. W., Qiu S. J., Xiao Y. S., Wang Z., Dai Z., Tang Z. Y., Zhou J. (2011) An immune function assay predicts post-transplant recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137 (10): 1445-53
- Dwyer J. M., Johnson C. (1981) The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clinical and Experimental Immunology* 46 (2): 237-49
- Kim D., Yamasaki Y., Jiang Z., Nakayama Y., Yamanishi T., Yamaguchi K., Oda T. (2011) Comparative study on medicin and phytohemagglutinin (PHA) induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 43 (1): 52-60
- Finelli A., Kerksiek K. M., Allen S. E., Marshall N., Mercado R., Pilip I., Busch D. H., Pamer E. G. (1999) MHC class I restricted T cell responses to *Listeria monocytogenes*, an intracellular bacterial pathogen. *Immunology Research* 19 (2-3): 211-23
- Finlay D., Cantrell D.A. (2011) Metabolism, migration and memory in cytotoxic T-cells. *Nature Reviews Immunology* 11: 109-117
- Fleischer B., Schrezenmeier H. (1988) T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *Journal of Experimental Medicine* 167 (5): 1697-707
- Fox C. J., Hammerman P. S., Thompson C. B. (2005) Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature* 435 (7149): 844-852

- Frauwirth K. A., Thompson C. B. (2004) Regulation of T-Lymphocyte Metabolism. *The Journal of Immunology* 172 (8): 4661-4665
- Frauwirth K. A., Riley J. L., Harris M. H., Parry R. V., Rathmell J. C., Plas D. R., Elstrom R. L., June C. H., Thompson C. B. (2002) The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16: 769-777
- Greenwald R. J., Boussiotis V. A., Lorschach R. B., Abbas A. K., Sharpe A. H. (2001) CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14 (2): 145-55
- Grossman Z., Min B., Meier-Schellersheim M., Paul W.E. (2004) Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. *Nature Review Immunology* 4: 387-95
- Hammarström S., Hammarström M. L., Sundblad G., Arnarp J., Lönngren J. (1982) Mitogenic leucoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (5): 1611–1615
- Hardman K. D., Ainsworth C. F. (1972) Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* 11 (26): 4910-19
- Hogquist, K. A., Jameson S. C., Heath W. R., Howard J. L., Bevan M. J., Carbone F. R. (1994) T-cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17
- Hoogen, v. d. M. W., Hilbrands L. B. (2011) Use of monoclonal antibodies in renal Transplantation. *Immunotherapy* 3 (7): 871-80
- Hussaini I. M., Samson A., Mut M. (2010) PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turkish Neurosurgery* 20 (3): 277-285
- Ikonomidis G., Paterson Y., Kos F.J., Portnoy D.A. (1994) Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine* 180 (6): 2209-18

- Israeli M., Ben-Gal T., Yaari V., Valdman A., Matz I., Medalion B., Battler A., Sredni B., Kristt D., Klein T. (2010) Individualized immune monitoring of cardiac transplant recipients by noninvasive longitudinal cellular immunity tests. *Transplantation* 89 (8): 968-76
- Israeli M., Yussim A., Mor E., Sredni B., Klein T., (2007) Preceding the rejection: In search for a comprehensive post-transplant immune monitoring platform. *Transplant Immunology* 18 (1): 7-12
- Kjer-Nielsen L., Dunstone M. A., Kostenko L., Ely L. K., Beddoe T., Mifsud N. A., Purcell A. W., Brooks A. G., McCluskey J., Rossjohn J. (2004) Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 (20): 7675-80
- Kobashigawa J. A., Kiyosaki K. K., Patel J. K., Kittleson M. M., Kubak B. M., Davis S. N., Kawano M. A., Ardehali A. A. (2010) Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 29 (5): 504-508
- Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P. (1992) L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68 (3): 521-31
- Kowalski R. J., Post D. R., Mannon R. B., Sebastian A., Wright H. I., Sigle G., Burdick J., Elmagd K. A., Zeevi A., Lopez-Cepero M., Daller J. A., Gritsch H. A., Reed E. F., Jonsson J., Hawkins D., Britz J. A. (2006) Assessing relative risks of infection and rejection: A meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 82 (5): 663-668
- Kowalski R. J., Zeevi A., Mannon R. B., Britz J. A., Carruth L. M. (2007) Immunodiagnostics: evaluation of functional T-cell immunocompetence in whole blood independent of circulating cell numbers. *Journal of Immunotoxicology* 4 (3): 225-232
- Kursar M., Bonhagen K., Köhler A., Kamradt T., Kaufmann S.H., Mittrücker H.W. (2002) Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology* 168 (12): 6382-7
- Lafferty K. J., Gill R. G. (1993) The maintenance of self-tolerance. *Immunology and Cell Biology* 71: 209-214

- Lenschow D. J., Walunas T. L., Bluestone J. A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review Immunology* 14 : 233-58
- Lundin A., Hasenson M., Persson J., Pousette A. (1986) Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. *Methods in Enzymology* 133: 27-42
- Maciver N. J., Jacobs S. R., Wiemann H. L., Wofford J. A., Coloff J. L., Rathmell J. C. (2008) Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 949-957
- McCormack J. G., Denton R. M. (1993) Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. *Developmental Neuroscience* 15: 165–173
- McCoy K. D., Le Gros G. (1999) The role of CTLA-4 in the regulation of T-cell immune responses. *Immunology & Cell Biology* 77 (1): 1-10
- Moncrieffe H., Nistala K., Kamhieh Y., Evans J., Eddaoudi A., Eaton S., Wedderburn L. R. (2010) High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *Journal of Immunology* 185 (1): 134-43
- Mut M., Amos S., Hussaini I. M. (2010) PKC Alpha phosphorylates cytosolic NF-Kappa B/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turkish Neurosurgery* 20 (3): 277-285
- Müller D. L., Jenkins M. K., Schwartz R. H. (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annual Review Immunology* 7: 445-80
- Novogrodsky A. (1971) ConcanavalinA Stimulation of rat lymphocyte ATPase. *Biochemica et Biophysica acta* 75918: 343-49

- Obrig T. G., Culp W. J., McKeehan W. L., Hardesty B. (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 246 (1): 174-181
- Pamer E. G. (2004) Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature* 4 (10): 812-823
- Parham P. (2005) Putting a face to MHC restriction. *Journal of Immunology* 174 (1): 3-5
- Parry R. V., Chemnitz J. M., Frauwirth K. A., Lanfranco A. R., Braunstein I., Kobayashi S. V., Linsley P. S., Thompson C. B., Riley J. L. (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 25 (21): 9543-9553
- Rathmell J. C., Farkash E. A., Gao W., Thompson C. B. (2001) IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *Journal of Immunology* 167 (12): 6869-76
- Sagone A. L., Lo Buglio A. F., Balcerzak S. P. (1974) Alterations in hexose monophosphate shunt during lymphoblastic transformation. *Cellular Immunology* 14 (3): 443-52
- Schnupf P., Portnoy D. A. (2007) Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection* 9: 1176-1187
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron C. A., Kuziel W. A., Pamer E. G. (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19 (1): 59-70
- Shen Y., Naujokas M., Park M., Ireton K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103: 501-10
- Sluiter W., Oomens L. W., Brand A., Van Durth R. (1984) Determination of blood volume in the mouse with 51chromium-labelled erythrocytes. *Journal of Immunology Methods* 73 (1): 221-5
- Stafstrom C. E., Roopra A., Sutula T. P. (2008) Seizure suppression via glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose. *Epilepsia* 49 (8): 97-100
- Sun J. C., Williams M. A., Bevan M. J. (2004) CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nature Immunology* 5 (9): 927-33

Teh H. S., Teh S. J. (1997) High concentrations of antigenic ligand activate and do not tolerize naive CD4 t-cells in the absence of CD28/B7 costimulation. *Cellular Immunology* 179 (1): 74-83

Thacker J., Toyoda Y. (2009) Lung and heart-lung transplantation at University of Pittsburgh 1982-2009. *Clinical transplant* 2009: 179-95

Wasowska B. A. (2010) Mechanisms involved in antibody- and complement-mediated allograft rejection. *Immunologic Research* 47 (1-3): 25-44

Waters W. R., Rahner T. E., Palmer M. V., Cheng D., Nonnecke B. J., Whipple D. L. (2003) Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infection and Immunity* 71(1): 317-26

Wong P., Pamer E. G. (2003) CD8 t-cell responses to infectious pathogens. *Annual Review Immunology* 21: 29-70

Wright K. O., Murray D. A., Crispe N. I., Pierce R. H. (2005) Quantitative PCR for detection of the OT-1 transgene. *BMC Immunology* 6: 20

Zeevi, A., McCurry K. R., Carey M. E., Pakstis, D. L., Bentejewski C., Spichty K., Shutt K., Toyoda Y., Crespo M., Zaldonis D., Pilewski J., Kashif R., Husain S. (2009) Experience with immune monitoring in lung transplant recipients: Correlation of low immune function with infection. *Transplantation* 87 (12): 1852-1857

Zhu J., Yamane H., Paul W. E. (2010) Differentiation of effector CD4 t-cell populations. *Annual Review Immunology* 28: 445-89

8.2 Beitragswerke

Lindl T. und Bauer J. (1989) *Zell- und Gewebekultur*, Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen, Oertel B. (Hrg), 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D. (2009) *Der Experimentator Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (Springer), S. 77-104 und S. 207-210

Murphy, Kenneth M., Travers, Paul, Walport, Mark (2009) *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Springer Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg S. 53-71, S. 157-160 und S. 802-811

Pezzutto A, Ulrichs T., Burmester G. R. (2007) Das Immunsystem, Kapitel 1 in *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 1-2

Salway, J. G. (1999) *Metabolism at a glance*. 3. Auflage, Blackwell Science Ltd., Oxford, S. 20-21

Schild H.J. und Förstermann U. (2009) Autoimmunität und Transplantation. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K. (Hrg) 10. Auflage, Urban & Fischer, München, S. 372-79

Vollmar A., Dingermann T. (2005) Die erworbene Immunantwort, Kapitel 3 und Verhinderung der Abstoßung durch Immunsuppressiva, Kapitel 5 in *Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe*. 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 57-62, S. 79-83 und S. 157

8.3 Internetquellen

Cylex ImmuKnow (2013) Longitudinal Assessment of Posttransplant Immune Status, Columbia USA (Online im Internet) URL: <http://www.cylex.net/hcpclinicians/gettoknow.html> (Stand 06.04.2013 13:00)

9 Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Friedrich Haag für die engagierte Betreuung meiner Dissertation und die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Immunologie absolvieren zu können.

Besonders dankbar bin ich Gudrun Dubberke, die mich liebevoll in das experimentelle Arbeiten einführte und mir stets mit Rat und Tat zu Seite stand. Zudem danke ich auch Valea Schumacher für zahlreiche Hilfestellungen zum Arbeiten mit murinen Zellen.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie für die ständige Ermutigung und Unterstützung und besonders meinem Ehemann Johannes Herden, der mir zudem mit Korrekturen und Verbesserungsvorschlägen stets sehr half.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Ausgabe meiner Doktorarbeit.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: