

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik, Institut für Immunologie

Prof. Dr. med. Marcus Altfeld

Kritische Untersuchung der Eignung des ATP-Stoffwechsels von T-Lymphozyten als Parameter für das Immunmonitoring

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jan-Andrei Nicola
aus Hamburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.07.18**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Haag

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Samuel Huber

Inhaltsverzeichnis

Ziele dieser Arbeit	7
Einleitung	8
1.1 ATP als Signalmolekül in der Immunreaktion	8
1.2 Der P2X7-Rezeptor	9
1.3 Abbauprodukte des ATP und ihre Wirkung	10
1.4 Purinnukleotide und P2X7 in der Therapie.....	11
1.5 Die T-Zell-Funktion als Marker zur Bestimmung des Immunstatus	12
Material	14
Methoden	21
3.1 Stimulation von YAC-Zellen (NAD vs. aCD3)	21
3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe	21
3.3 Stimulation von Yac-Zellen in unterschiedlichen Medien	21
3.4 Analyse von Yac-Zellen nach Stimulation in verschiedenen Medien ...	22
3.5 Stimulation von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)	22
3.6 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mittels einer OKT3-Reihe	22
3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mit PHA und MACSiBeads	23
3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli	23
3.9 Kontrolle der Funktionalität des P2X7-Blockers WD3C23	24
3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP	24
3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block	25
3.12 Proliferationsuntersuchungen von PBMCs	25
3.13 Beladung der Zellen mit eFluor	26
3.14 Testen der Apyrase-Aktivität	26
3.15 FACS-Färbung von Zellen	26

3.16 Messung von ATP-Konzentrationen.....	26
3.17 Untersuchung d. Einflusses von POM 1 auf die Luciferase-Aktivität.	27
3.18 Zellzahltests für extrazelluläre ATP-Messungen.....	27
3.19 Untersuchung von extrazellulärem ATP bei P2X7-Block	27
3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen	27
3.21 Aufreinigung von PBMCs aus einem „Buffy Coat“	28
3.22 Isolation von humanen CD4-Zellen aus humanen PBMCs	28
3.23 Einfrieren von PBMCs und CD4-Zellen.....	29
3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen	29
3.25 Durchführung der Platten- und Bead-Tests	29
3.26 Beschichten der CELLection® Biotin Binder Beads	30
3.27 Beschichten der Biotin Binder Beads von invitrogen®.....	30
3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls	30
3.29 Durchführung des ImmuKnow®-Assays mit Thrombozytenzusatz....	31
3.30 Depletion bestimmter Zellarten aus humanem Vollblut.....	31

Ergebnisse _____ 32

4.1 Untersuchungen an murinen Lymphom-Zellen (Yac)	32
4.2 Versuche mit humanen Zellen.....	39
4.3 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen	42
4.3.1 Verhalten auf unterschiedliche Stimuli.....	42
4.3.2 Beschichtetes OKT3 als Stimulus.....	49
4.3.3 PHA und MACSiBeads als Stimulus	51
4.3.4 ATP als Kostimulans.....	56
4.3.5 ATP als Kostimulans und Einfluss des A2A-Rezeptors	60
4.4 Untersuchung der Proliferation humaner PBMCs	63
4.5 Versuche mit dem Cylex™ ImmuKnow®-Kit.....	66
4.5.1 Platten- und Bead-Tests	66

4.5.2 Durchführung des ImmuKnow®-Kits mit depletiertem Vollblut.....	71
4.6 Extrazelluläres ATP als Immunresponse-Parameter	77
Diskussion _____	79
5.1 spezifische Untersuchung des P2X7-Rezeptors	79
5.2 ATP als Kostimulans bei der Aktivierung von CD4-Zellen	81
5.2.1 Verschiedene Stimuli haben unterschiedliche Effekte auf T-Zellen...	81
5.2.2 Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Stimulation und ATP als Kostimulans ...	83
5.2.3 Effekte von ATP, P2X7- und A2A-Rezeptor auf die Proliferation	85
5.3 Kritische Überprüfung des ImmuKnow®-Kits und eigene Zellseparationsversuche.....	88
5.3.1 Das Prinzip der Zellseparation mittels Magnet-Beads auf Mikrotiterplatten ist problembehaftet.....	88
5.3.2 Untersuchungen des ImmuKnow®-Kits	89
5.3.3. Extrazelluläres ATP als Parameter zur Immunstatus-Beurteilung ...	90
5.4 P2X7 im Kontext der aktuellen klinischen Forschung.....	91
Zusammenfassung _____	94
Abstract _____	95
Abkürzungsverzeichnis _____	96
Literatur _____	97
Danksagung _____	106
Lebenslauf _____	107
Eidesstattliche Erklärung _____	108

Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Adenosintriphosphat (ATP)-Stoffwechsels als Marker für den immunologischen Status. Besondere Schwerpunkte lagen dabei auf der Messung von Veränderungen des intrazellulären und extrazellulären ATP-Gehalts und der Interleukin-2-Produktion in murinen Lymphomzellen, humanen mononuklearen Zellen (PBMCs), humanen CD4-Zellen und humanem Vollblut als Reaktion auf verschiedene stimulierende Substanzen. Zusätzlich sollte die Rolle einiger Rezeptoren, wie z.B. des P2X7-Rezeptors, auf der Zelloberfläche bei der Vermittlung des Stimulus zum Zielparameter eruiert werden.

Des Weiteren sollte die Funktionsweise des ImmuKnow®-Assays untersucht werden, ein kommerziell erhältlicher und in den USA zugelassener Assay zur Beurteilung der zellulären Immunität durch Messung der intrazellulären ATP-Konzentration in CD4-Zellen nach Stimulation mittels Phytohämagglutinin. Dabei sollte die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse mit frei zu erwerbenden Materialien überprüft werden.

Ausgehend von diesen Untersuchungen sollten - neben den etablierten Parametern für zelluläre Immunität wie Interleukin 2 (IL-2) und intrazellulärem ATP (iATP) – auch die Freisetzung von ATP im Rahmen der T-Zell-Aktivierung als möglicher weiterer Parameter zur Messung einer Immunantwort geprüft werden. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung verschiedener zellulärer Subpopulationen von Vollblut und der erforderlichen Zellzahl bzw. der erforderlichen Menge an Vollblut für aussagekräftige Ergebnisse.

Einleitung

Seit den ersten Anfängen der Forschung an Purinen und Pyrimidinen durch Wilhelm Scheele im 18. Jahrhundert hat sich das Verständnis der Bedeutung dieser Stoffe rapide verändert. In der Folgezeit stellte sich vor allem Adenin/Adenosin mitsamt seinen phosphorylierten Formen AMP (Adenosinmonophosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und vor allem ATP (Adenosintriphosphat) als ein wichtiger Transmitterstoff des Körpers heraus.

Neben seiner herausragenden Bedeutung als intrazellulärer Energiespeicher spielt ATP auch extrazellulär eine wichtige Rolle als Überträger von Signalen zwischen Zellen. Während sich die früheren Untersuchungen vor allem auf seine Funktion als Neurotransmitter beziehen und diverse Purinozeptoren (P1, P2X, P2Y-Rezeptoren) vorerst in neuronalen Geweben identifiziert wurden, so konnten seit den späten 1980er Jahren in nahezu allen Gewebearten Purinozeptoren gefunden werden [Burnstock et al. 2010].

1.1 ATP als Signalmolekül in der Immunreaktion

Erste Bedeutung des ATP im immunologischen Kontext wurde im Zusammenhang mit der Mastzelldegranulation festgestellt [Diamint und Krüger, 1967]. Seitdem hat sich die Forschung vor allem auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Lymphozyten und ihren ATP-Metabolismus ausgeweitet. ATP stellt sich hier vor allem als auto- und parakriner Transmitter dar, der in der Verstärkung schwacher Signale sowohl bei Neutrophilen über z.B. formyl-Peptid-Rezeptoren [Chen et al. 2010] als auch bei T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor [Filippini et al. 1990] eine wichtige Rolle spielt. Kommt ein stimulierendes Signal, führt dies neben anderen Effekten zu einer vermehrten ATP-Freisetzung der Zellen über Pannexin 1-Kanäle bei humanen Zellen [Chen et al. 2010, Yip et al. 2010, Schenk et al. 2008] oder Connexin 43-Kanäle bei murinen Zellen. Das ausgeschleuste ATP kann jetzt auto- oder parakrin Rezeptoren auf der Zelloberfläche stimulieren, von denen einige selbst auch zu vermehrter ATP-Freisetzung führen. Bei Lymphozyten sind dies vor allem P2X1, P2X4 und P2X7-Rezeptoren. P2X1 und P2X4 werden innerhalb weniger Minuten nach Zellstimulation polarisiert auf der Zelloberfläche verteilt [Woehrle et al. 2010] und können somit an unten beschriebener chemotaktischer Wirkung beteiligt sein. Dagegen zeigt P2X7 eine ständige gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelloberfläche. Dies lässt den Schluss zu, dass P2X7 eine besondere Rolle in der Familie der P2X-Rezeptoren einnimmt, die vor allem in der Signalverstärkung besteht.

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Rolle von ATP als extrazellulärer Signalgeber ist die Chemotaxis - die Führung v.a. der neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd. Die erste Phase jeder Immunantwort setzt zuallererst einen Kontakt zwischen dem Pathogen und Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. neutrophilen Granulozyten, voraus. Diese müssen allerdings zum Ort des Pathogens geleitet werden. Am Infektionsherd werden bestimmte Chemokine gebildet (z.B. CCL2, CXCL8), an deren Konzentrationsgradient sich der Neutrophile nach Austritt aus dem Blutgefäß „entlanghangeln“ kann. Es konnte gezeigt werden, dass ATP vor allem an dem dem Infektionsherd zugewandten Zellpol eine erhöhte Konzentration im Extrazellularraum nahe der Zellmembran aufweist [McDonald et al. 2010]. Während einige Studien ATP nur eine Rolle als einer Art „second messenger“ nach dem Primärkontakt zu den Chemokinen zuschreiben [McDonald et al. 2010], zeigen

andere Studien, dass ATP auch direktes primäres Signal zur Chemotaxis sein kann [Elliot et al. 2009, Chekeni et al. 2010]. Chemotaxis findet auch bei Lymphozyten statt, auch hier konnte eine Polarisierung der extrazellulären ATP-Konzentrationen in der Nähe der Zellmembran nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Studien zu anderen Zellen (Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen) lassen keine konkrete Aussage über diese gerichtete Wirkung von ATP zu, sie zeigen lediglich, dass erhöhte ATP-Konzentrationen auch hier zu einer verstärkten chemotaktischen Wirkung der Chemokine allgemein führen [McCloskey et al. 1999, Müller et al. 2010].

1.2 Der P2X7-Rezeptor

Die ATP-gesteuerte Chemotaxis bei Lymphozyten wird wie oben beschrieben vor allem durch Rezeptoren der P2X-Familie realisiert [Woehrle et al. 2010], wobei der P2X7-Rezeptor vor allem für die Verstärkung schwacher Signale verantwortlich ist. Ein entscheidender Unterschied zwischen P2X7 und anderen Mitgliedern der P2X-Familie ist die sehr viel geringere Affinität des P2X7-Rezeptors zu seinem Liganden ATP: P2X7 weist eine mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von $>100\mu\text{M}$ auf, P2X1 hingegen eine EC_{50} von $0,07\mu\text{M}$ und P2X4 von $10\mu\text{M}$ [Jarvis und Khakh 2009]. Diese niedrige Affinität zu ATP setzt für die P2X7-Stimulation ATP-Konzentrationen voraus, die man lange Zeit für unphysiologisch hoch erachtete. In der Folgezeit konnte jedoch gezeigt werden, dass nahe der Zellmembran lokal durchaus solche hohen ATP-Konzentrationen erreicht werden können [Yip et al. 2009].

Der P2X7-Rezeptor wurde im Jahr 1996 zunächst auf Makrophagen identifiziert [Surprenant et al. 1996], mittlerweile wurde die Oberflächenexpression auch auf anderen Zellen des Immunsystems - Mikroglia, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten [Collo et al. 1997] - sowie auf Endometrium [Slater et al. 2000] und Retina [Ishii et al. 2003] nachgewiesen. Wie alle Rezeptoren der P2X-Familie zählt er zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen, die auf ATP-Stimulation mit einem Ca^{2+} -Einstrom [Jarvis und Khakh 2009] und darauffolgender Interleukin 2-Transkription reagieren [Woehrle et al. 2010]. Neben dem Ca^{2+} -Einstrom kommt es zu einem K^{+} -Ausstrom.

Außerdem kommt es im Verlauf der P2X7-Stimulation zur Ausbildung von Poren in der Zellmembran, durch die dann größere Moleküle die Zellmembran passieren können [Iglesias et al. 2009]. Die molekulare Identität dieser Poren ist noch unklar. Es werden wahlweise Pannexine, Connexine, andere porenbildende Moleküle, oder P2X7 selbst dafür verantwortlich gemacht. Möglicherweise kann ATP auch über diese Poren freigesetzt werden [Qu et al. 2011], dies ist jedoch noch nicht gesichert. Außerdem wurde eine ATP-Freisetzung mittels Exozytose nach P2X7-Rezeptor-Stimulation nachgewiesen [Gutiérrez-Martín et al. 2011].

In Makrophagen und Monozyten geht P2X7-Stimulation mit einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und der Prozessierung von pro-Interleukin- 1β (pro-IL- 1β) [Niemi et al. 2011] einher. Weiterhin kommt es auf vielen Zellen des Immunsystems zum Abschneiden (Shedding) des L-Selektins (CD62L) von der Zelloberfläche, der Verlagerung von Phosphatidylserinresten auf die Außenseite der Zellmembran und schließlich zur Aufnahme von Propidiumiodid (PI) [Di Virgilio et al. 2001, Zenovello et al. 1990].

P2X7-Aktivierung führt also letztendlich zum Zelltod, der in Makrophagen über Caspase-1-Aktivierung nach einem massiven K^+ -Ausstrom vermittelt wird [Kahlenberg und Dubyak 2004]. Der massive K^+ -Ausstrom wird dabei wohl v. a. durch die Ionenkanalaktivität von P2X7 vermittelt. Dieser Apoptose-Mechanismus ist vor allem für Makrophagen beschrieben, wobei die von Makrophagen phagozytierten Pathogene im Gegensatz zu anderen Apoptose-Mechanismen mit zerstört werden. Die Effektorfunktionen des P2X7-Rezeptors sind vor allem abhängig von der stimulierenden ATP-Konzentration: Während Konzentrationen im mikromolaren Bereich lediglich zu einem Ca^{2+} -Einstrom führen [Baricordi et al. 1996 und Adinolfi et al. 2005], so kommt es erst bei millimolaren Konzentrationen zur Ausbildung der Pannexin-Poren und konsekutiver Apoptose.

Im Jahre 2003 wurde ein alternativer P2X7-Aktivator neben ATP gefunden: die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)-abhängige kovalente ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribosyl-Transferasen (ARTC-2) auf der Zelloberfläche [Seman et al. 2003]. Die dafür notwendigen NAD-Konzentrationen liegen im unteren mikromolaren Bereich, sodass NAD ein wichtiger physiologischer Stimulus für P2X7 sein könnte.

1.3 Abbauprodukte des ATP und ihre Wirkung

Nicht nur ATP selbst dient als Signalmolekül. Im Extrazellularraum wird ATP zu ADP, AMP und schließlich Adenosin abgebaut, die alle auch über spezifische Rezeptoren auto- und parakrin Signale an die Zelle abgeben. Die Hydrolyse von ATP wird zunächst durch Ectonukleosidasen und -nukleotidasen in verschiedenen Schritten zu AMP durchgeführt [Zimmermann 2000]. Auf Lymphozyten zählen hierzu CD39 (ATP-Diphosphohydrolase), das vor allem auf B-Zellen exprimiert wird, und CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase), das sowohl auf B- als auch auf T-Zellen exprimiert wird [Borsellino et al. 2007]. Die Hydrolyse von AMP zu Adenosin wird durch die alkalische Phosphatase katalysiert [Zimmermann 2000].

ADP bindet vor allem an P2Y-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die auch durch ATP aktiviert werden können und wie die P2X-Rezeptoren überwiegend stimulierende Wirkung entfalten.

Adenosin gibt über P1-Rezeptoren, die weiter in A1-A3-Rezeptoren unterteilt werden, Signale an die Zelle. Vorherrschend sind auf Lymphozyten vor allem A2A und A2B-Rezeptoren, die eine überwiegend inhibierende Wirkung auf die Zellen ausüben [Huang et al. 1997]. Der Umwandlungsschritt von AMP zu Adenosin hat somit eine große Bedeutung, da von einem stimulierenden in einen inhibierenden Transmitter umgewandelt wird, die Steuerung der an ihm beteiligten Enzyme spielt eine große Rolle für die Feinabstimmung der Immunantwort.

Der ATP-Metabolismus in T-Lymphozyten mit zentraler Bedeutung des P2X7-Rezeptors ist auszugsweise in nachfolgender Graphik schematisch dargestellt:

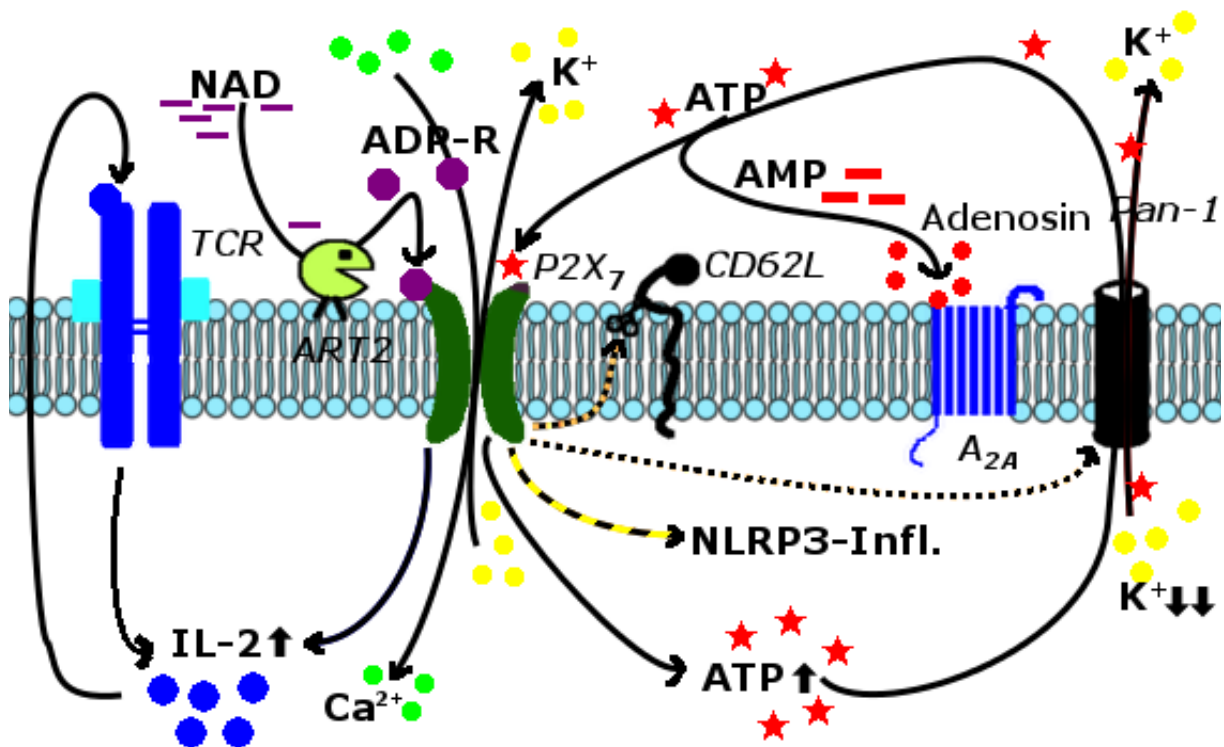


Abb. 1: Auszugsweise Darstellung des ATP-Metabolismus in T-Zellen

P2X7-Aktivierung kann über ATP selbst oder über NAD-Ribosylierung durch ART2 erfolgen. Nach Aktivierung kommt es zu K⁺-Ausstrom und Ca²⁺-Einstrom mit konsekutivem CD62L-Shedding, NLRP3-Inflammasom-Aktivierung sowie Steigerung der Interleukin-2 und ATP-Produktion. Überschreitet die stimulierende ATP-Konzentration einen Schwellenwert kommt es außerdem zum Einbau von Pannexin-1-Poren in die Zellmembran, durch die ATP freigesetzt werden kann. Das ATP im Extrazellularraum wird zu Adenosin abgebaut und kann jetzt über A_{2A}- oder A_{2B}-Rezeptoren überwiegend inhibierend auf T-Zellen wirken.

1.4 Purinnukleotide und P2X7 in der Therapie

Das Prinzip der Manipulation purinabhängiger Signale (purinerges Signaling) findet bereits jetzt Anwendung in der Therapie. Zur Vorbeugung atherothrombotischer Ereignisse ist Clopidogrel schon seit vielen Jahren in der klinischen Anwendung. Es bindet mit hoher Affinität an den P_{2Y12}-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche und verhindert so die Aktivierung dieser Thrombozyten durch ADP. Ebenso hat Theophyllin als Adenosinrezeptor-Antagonist einen festen Stellenwert in der Asthmatherapie. Auf vielen anderen medizinischen Gebieten finden sich vielversprechende Ansätze. So konnte für ATP beispielsweise ein neuroprotektiver Effekt gezeigt [Inoue 1998] und eine Bedeutung bei der Langzeitpotenzierung zugeschrieben werden, der elektrophysiologischen Grundlage des Lernens [Fujii et al. 1999].

Gerade im Kreis der immunologisch-rheumatologischen sowie der neoplastischen Krankheiten scheint ATP und den P2X-Rezeptoren - insbesondere dem P2X7-Rezeptor - eine besondere Rolle zuzukommen. So wurde beispielsweise Mepacrin lange Zeit zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Mepacrin entfaltet

eine seiner Hauptwirkungen über die Senkung des Prostaglandin E₂-Spiegels, ein Effekt der auch durch Blockade von P₂Y-Rezeptoren verursacht werden kann [Needleman et al. 1974]. Im Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass große Mengen ATP in der Synovialflüssigkeit arthritischer Gelenke vorkommen [Burnstock 2006] und dass dieses ATP auch zu einer Prostaglandin-Produktion über P₂Y-Rezeptoren führen kann, ist die besondere Bedeutung des ATP-Stoffwechsels in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ersichtlich [Burnstock 2006].

Auch im Bereich der onkologischen Erkrankungen spielt der ATP-Metabolismus eine wichtige Rolle: Im Tumorgewebe zeigt sich oft ein deutlich erhöhter ATP-Spiegel, hervorgerufen entweder durch kontrollierte Freisetzung oder Zelltod der Tumorzellen [Raffaghello et al. 2006]. Gleichzeitig wurde auf Zellen vieler Tumore eine erhöhte Expression von P₂X₇-Rezeptoren festgestellt. Die Bedeutung von P₂X₇ für Wachstum und Proliferation der Krebszellen kann je nach Art des Krebses unterschiedlich sein. Während der P₂X₇-Rezeptor in bestimmten Krebsentitäten wohl funktionslos ist, zeigt sich auf humanen Melanomzellen ein anti-apoptotischer Effekt [Deli et al. 2007], auf Neuroblastomzellen hingegen eine pro-proliferative Wirkung von P₂X₇ [Raffaghello et al. 2006].

1.5 Die T-Zell-Funktion als Marker zur Bestimmung des Immunstatus

Messungen von T-Zellfunktionen werden für vielfältige diagnostische Fragestellungen herangezogen. Verfahren, die auf der Messung der Interferon- γ -Konzentration beruhen, werden seit vielen Jahren zur Diagnostik der Tuberkulose angewandt und sind in der klinischen Anwendung gut etabliert. Ihre Überlegenheit gegenüber anderen Tuberkulose-Diagnostika, insbesondere dem Tuberkulin-Hauttest, bezüglich Sensitivität und Spezifität ist gut belegt [Sester et al. 2011]. Zur Zeit sind zwei kommerzielle Tests für die Diagnostik von Tuberkulose zugelassen, die beide auf der Messung der Interferon- γ -Produktion von Effektor-T-Lymphozyten nach Kontakt mit tuberkulose-spezifischen Antigenen beruhen. Während der QuantiFERON-TB®-Test der Firma QUIAGEN GmbH die Interferon-Konzentration im Plasma mittels eines ELISAs misst [Quiagen GmbH 2018], wird beim T-SPOT.TB®-Test der Firma Oxford Immunotec Ltd. die sogenannte ELISPOT-Technik verwendet, dass heißt der Anteil Interferon- γ produzierender Effektor-T-Zellen wird bestimmt [Oxford Immunotec Ltd 2018].

Immunologische Diagnostik umfasst neben der Erkennung bestimmter Infektionen aber auch die Erfassung des Immunstatus eines Patienten, beispielsweise bei der Dosisfindung immunsupprimierender Medikamente nach Organtransplantation. Die Patienten müssen postoperativ innerhalb eines schmalen Bereiches eingestellt werden. Wird das Immunsystem zu sehr supprimiert besteht die Gefahr opportunistischer Infektionen, bei zu geringer Suppression die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Zum Überwachen der richtigen Dosierung zeigten sich vor allem zwei Ansätze als vielversprechend.

Die Interleukin-6-Konzentration in entsprechenden Körperflüssigkeiten des fraglichen Infektionsherdes erwies sich als guter Parameter zur Feststellung bzw. Ausschluss einer tatsächlichen Infektion. Eine Untersuchung zu lebertransplantierten Patienten zeigte hier bezüglich lokaler Infektionen einen klaren Vorteil von IL-6 gegenüber anderen Markern, wie beispielsweise Procalcitonin [Kunz et al. 1998].

Ein zweiter Ansatz ist hier die Beobachtung der Entwicklung des intrazellulären ATPs von CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation. Dieser Ansatz eignet sich besonders gut zur

Dosisanpassung von Immunsuppressiva, die ihre Wirkung gezielt durch die Herabsetzung der Funktionalität von T-Zellen entfalten.

Der ImmuKnow®-Assay der Firma Cylex™ beruht auf der Messung der intrazellulären ATP-Konzentration in CD4+ T-Lymphozyten nach Stimulation dieser T-Zellen. Vollblut-Proben des zu testenden Patienten werden unstimuliert oder mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert über Nacht im Inkubationsschrank gelagert. Am nächsten Tag werden die CD4+ T-Zellen mittels anti-CD4-Beads positiv isoliert. Die an den Beads gebundenen CD4+ Zellen werden dann lysiert und die ATP-Konzentration im Lysat wird bestimmt. Bei immunkompetenten Patienten kann ein kräftiger Anstieg des intrazellulären ATP nach PHA-L-Stimulation gemessen werden, bei immunkompromittierten Patienten ist ein verminderter oder überhaupt kein Anstieg mehr messbar.

Zur Interpretation der Ergebnisse wird die ATP-Konzentration der PHA-stimulierten CD4-Zellen in 3 Kategorien eingeteilt:

ATP-Konzentration (ng/ml)	Immunzell-Antwort	transplantierte Patienten	augenscheinlich gesunde Patienten
≤ 225	niedrig	40 %	6 %
226-524	moderat	52 %	66 %
≥ 525	hoch	8 %	28 %

Tabelle aus der Produktinformation zum Cylex™ Immune Cell Function Assay ImmuKnow® (Prod. Nr: 4400). Die Daten wurden ermittelt aus den Ergebnissen einer Multicenter-Studie [Kowalski et al. 2003].

Zur Interpretation der Ergebnisse wird immer eine Normalkontrolle (Blutprobe einer immunkompetenten Person) mitgeführt. Dabei werden verschiedene Parameter zur Qualitätskontrolle herangezogen. So muss die ATP-Konzentration im Lysat der stimulierten Zellen über einem bestimmten Wert liegen, während sie bei unstimulierten Zellen 60ng/ml nicht überschreiten darf.

Die klinische Relevanz des ImmuKnow®-Tests bei transplantierten Patienten wurde inzwischen in zahlreichen Studien untersucht. Dabei zeigte die Mehrzahl der Studien einen Vorteil des ImmuKnow®-Assays bei der Überwachung der immunsuppressiven Therapie gegenüber vorher angewandten diagnostischen Methoden, wie z.B. der Überwachung des Ciclosporin- oder Tacrolimus-Spiegels [Kowalski et al. 2003, Israeli et al. 2007].

Eine weitere traditionell zur Beurteilung der zellulären Immunität z. B. nach Impfungen durchgeführte Untersuchung ist die Bestimmung der lymphoproliferativen Aktivität. Auch hier scheint der ImmuKnow®-Assay zumindest gleichwertig zu sein mit einer Tendenz zu höherer Sensitivität [Sottong et al. 2000]. Ein großer Vorteil des ImmuKnow®-Assays gegenüber anderer Test-Systeme ist die Arbeit mit Vollblut. So wird die in vivo-Situation am ehesten abgebildet, zumal die meisten Immunsuppressiva in Erythrozyten gespeichert werden [Jusko et al. 1995, Yatscoff et al. 1990] und so z.B. bei der Bestimmung der lymphoproliferativen Aktivität vor der Untersuchung herausgefiltert werden.

Material

2.1 Zelltypen:

<u>Yac-hh-Zellen</u>	Kultivierbare murine T-Lymphom-Zelllinie, die seit einigen Jahren im Institut in Kultur ist. Yac-Zellen entstanden ursprünglich durch die Inokulation des murinen Leukämie-Virus in eine neugeborene A/Sn-Maus und können von der Firma Sigma Aldrich erworben werden.
<u>RPMI-Zellen</u>	Kultivierbare humane B-Lymphom-Zelllinie, die seit einiger Zeit im Institut in Kultur ist. RPMI-Zellen wurden ursprünglich dem peripheren Blut eines 61-jährigen Mannes mit multiplen Myelomen / Plasmozytomen entnommen und können bei der Firma Sigma Aldrich erworben werden.
<u>PBMC</u>	Die Aufbereitung der PBMC erfolgte aus CMV-negativen Buffy Coats des transfusionsmedizinischen Labors des UKE, die dort bei der Aufbereitung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblut anfallen.
<u>humanes Vollblut</u>	Verwendet wurde mein eigenes Blut, die Abnahme erfolgte mittels Krankenhaus-üblicher Butterfly-Nadeln.

2.2 Puffer, Zellkulturmedien und Lösungen:

verw. Name	Produktname	Firma	sonstiges
<u>RPMI komplett</u>	RPMI Medium 1640 (1x) 500ml	Gibco	+ L-Glutamin (5ml) + FCS (25ml) + Natrium-Pyruvat (5ml) + Mercapto (5ml)
<u>RPMI-Hunger</u>	RPMI Medium 1640 (1x) 500ml	Gibco	+ L-Glutamin (5ml) + Natrium-Pyruvat (5ml) + Mercapto (5ml) im Ggs. zu RPMI komplett kein zusätzliches FCS
<u>PBS--</u>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Gibco	für unsteriles Arbeiten wurde die 10-fach- Stocklösung mit AquaDest 1:10 verdünnt, für steriles Arbeiten die vorgefertigte 1-fach-Lösung verwendet
<u>PBS++</u>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, +CaCl ₂ , +MgCl ₂	Gibco	

verw. Name	Produktname	Firma	sonstiges
<u>PBS -- mit BSA</u>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Gibco	für unsteriles Arbeiten wurde die 10-fach-Stocklösung mit AquaDest 1:10 verdünnt, für steriles Arbeiten die vorgefertigte 1-fach-Lösung verwendet. Hinzu kamen 0,02% Bovines Serumalbumin (BSA)
<u>Lyse-Puffer 1</u>	7% Natriumdodecylsulfat (SDS) in PBS--		
<u>Annexin-Puffer (10x Stock)</u>	Aqua ad iniectabilia	Braun	+ 1,4M NaCl + 25mM CaCl ₂ in 100mM HEPES, pH 7,4
<u>FICOLL-Paque</u>	Ficoll-Paque™ PLUS endotoxin tested	GE Healthcare	
<u>Freezing solution</u>	40% RPMI komplett 40% FCS 20% DMSO		
<u>3% Essigsäure</u>	Acedic Acid	Sigma-Aldrich	vermischen von 30ml des Stocks mit 970ml AquaDest
<u>AquaDest</u>	Aqua ad iniectabilia	Braun	

2.3 Antikörper und Zellfarbstoffe:

verw. Name	Produktname	Firma
<u>eFluor-Farbstoff</u>	Cell Proliferation Dye eFluor®	eBioscience Thermofisher
<u>DAPI</u>	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride	Sigma-Aldrich
<u>Propidiumiodid (PI)</u>	Propidium iodide	Sigma-Aldrich

Antigen	Produktname	Klon	Isotyp	Firma
<u>hCD28-Antikörper</u>	CD28 Monoclonal Antibody	CD28.2	mIgG1, κ	eBioscience Thermofisher
<u>hCD3 (nicht stimulierend)</u>	FITC Mouse Anti-Human CD3	UCHT1	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD3 (stimulierend)</u>	Functional Grade Purified anti-human CD3	OKT3	mIgG2a	eBioscience Thermofisher
<u>mCD3 (stimulierend)</u>	Functional Grade Purified anti-mouse CD3e	KT3	Rat IgG2a	eBioscience Thermofisher
<u>hCD25</u>	APC Mouse Anti-Human CD25	M-A251	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD69</u>	PE Mouse Anti-Human CD69	L78	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD38</u>	FITC Mouse Anti-Human CD38	HIT2	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD39</u>	CD39 Monoclonal Antibody (eBioA1), PE-Cyanine7	eBioA1	mIgG1, κ	eBioscience Thermofisher
<u>hCD4</u>	CD4 Monoclonal Antibody (OKT4), Alexa Fluor 700	OKT4	mIgG2b, κ	eBioscience Thermofisher
<u>hCD4</u>	FITC Mouse Anti-Human CD4	RPA-T4	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD8 (biotinyliert)</u>	Biotin Mouse Anti-Human CD8	RPA-T8	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hCD14 (biotinyliert)</u>	CD14 Monoclonal Antibody (61D3)	61D3	mIgG1, κ	eBioscience Thermofisher
<u>hCD15 (biotinyliert)</u>	CD15 Monoclonal Antibody (HI98)	HI98	mIgM, κ	eBioscience Thermofisher
<u>hCD62L</u>	FITC Mouse Anti-Human CD62L	DREG-56	mIgG1, κ	BD Biosciences
<u>hMHC-2</u>	PE anti-human HLA-DR Antibody	L243	mIgG2a, κ	BioLegend
<u>mP2X7</u>	-	K1G	mIgG1, κ	AG Nolte
<u>hP2X7</u>	-	L4	mIgG1, κ	AG Nolte

2.4 Stimulationsstoffe, Beads, sonstige lösliche Stoffe

verw. Name	Produktname	Firma
<u>BSA</u>	Probumin® Bovine Serum Albumin Universal Grade, Powder	Merck Millipore
<u>EDTA</u>	EDTA, Disodium Salt, Dehydratied, Molecular Biology Grade	Merck Millipore
<u>L-Glutamin</u>	L-Glutamine (200mM)	Gibco
<u>Natrium-Pyruvat</u>	Sodium pyruvate (100mM)	Gibco
<u>Mercapto</u>	MEM, non essential amino acids, 10mM	Gibco
<u>FCS</u>	Fetal Bovine Serum (inaktiviert)	Gibco
<u>PHA-L</u>	eBioscience™ Phytohemagglutinin-L (PHA-L) Solution (500x)	ThermoFisher
<u>Ionomycin</u>	Ionomycin calcium salt from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich
<u>PMA</u>	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich
<u>DMSO</u>	Dimethyl Sulfide (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich
<u>DNase</u>	DNase I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich
<u>POM 1</u>	POM 1 sodium metatungstate 50mg	TOCRIS bioscience
<u>ATP</u>	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich
<u>NAD+</u>	β-Nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt	Sigma-Aldrich
<u>Beads für die Isolation von Zellen</u>	CELLlection™ Biotin Binder Kit	ThermoFisher
<u>MACSiBeads</u>	T Cell Activation / Expansion Kit (enthält zur Selbstbeschichtung von Beads mit anti-human CD2-, CD3-, CD28-Antikörper sowie MACSiBead Particles)	Miltenyi Biotec

2.5 Kits

verw. Name	Produktname	Firma
<u>ImmuKnow®-Kit</u>	ImmuKnow® Immune Cell Function Assay	CYLEX
<u>murines IL-2-Kit</u>	Mouse IL-2 ELISA MAX™ Deluxe Sets	Biolegend
<u>humanes IL-2-Kit</u>	Human IL-2 ELISA MAX™ Deluxe Sets	BioLegend
<u>Isolation humaner CD4-Zellen</u>	Dynabeads® FlowComp™ Human CD4	invitrogen
<u>„untouched“-Kit zur Isolation von CD4-Zellen</u>	Dynabeads® Regulatory CD4+CD25+ T Cell Kit	invitrogen
<u>Biotin Binder Beads</u>	Dynabeads® Biotin Binder	invitrogen
<u>CELLlection Kit</u>	CELLlection™ Biotin Binder Kit	invitrogen
<u>Kit zur Messung der ATP-Konzentration</u>	CellTiter Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega

2.6 verwendete 96-Mikrotiter-Platten

verw. Name	Produktname	Firma
<u>Messplatte</u>	OptiPlate™-96 White Opaque 96-well Microplate	PerkinElmer
<u>Greiner Mikrotiter-Platte (=Greiner untreated)</u>	Greiner CellStar 96 Well Suspension Culture	Greiner bio-one
<u>NUNC - untreated</u>	Nunc® Microwell 96 well polystyrene plate, non-treated, pinchbar-design	ThermoScientific Nunc
<u>Greiner - low-cell-binding</u>	96 Well Microplatte, non-binding, transparent	Greiner bio-one
<u>nunc hydrocell - Platte</u>	Nunc Hydrocell 96U MicroWell Round Bottom	ThermoScientific Nunc
<u>nunc low-cell-binding Platte</u>	Nunc Low Cell Binding Microplatte	ThermoScientific Nunc

2.7 Verbrauchsmaterialien:

verw. Name	Produktname	Firma
<u>Falcon-Tube(15ml / 50ml)</u>	CELLSTAR® TUBES 15ml CELLSTAR® TUBES 50ml	greiner bio-one
<u>Kryo-Röhrchen</u>	CryoTube vials 1,8ml	Thermo Scientific NUNC
<u>FACS-Tubes</u>	verschiedene	BD Biosciences
<u>Pipettenspitzen</u>	verschiedene Größen	Eppendorf
<u>serologische Pipetten</u>	verschiedene Größen	BD Falcon
<u>Zellkultur-Schalen (Petry-Schalen)</u>	T-25, T-75, T-225	Greiner
<u>Erlenmeyer-Kolben</u>		PP Corning
<u>Handschuhe</u>	Safeskin	Kimberly-Clark
	Vibrant	Aurelia
<u>Mülltütchen</u>	Plastibrand	Brand
<u>Blutentnahmenadeln</u>	BD Vacutainer® Safety-Lok	BD
<u>Vollblutröhrchen</u>	Plasma Tube, Li-Heparin	BD

2.8 Laborequipment:

verw. Name	Produktname	Firma
<u>Pipetten</u>	Research Type	Eppendorf
<u>Pipettenständer</u>	Pipetteboy	Integra
<u>„Reck“ zum Einfrieren</u>	StrataCooler® Cryo preservation module	Stratagene™
<u>Inkubationsschrank</u>	MCO-20AIC Professional CO ₂ Cell Culture Incubator	SANYO
<u>ELISA Reader</u>	VICTOR ³ Multilabel Reader 1420	PerkinElmer
<u>FACS-Gerät „FACS- Canto“</u>	BD FACS Canto II	Becton Dickinson
<u>FACS-Gerät „FACS- Calibur“</u>	BD FACSCalibur	Becton Dickinson
<u>Zentrifugen</u>	ROTANTA 460R	Hettich

verw. Name	Produktname	Firma
	RC 26 Plus	Sorvall
	Biofuge pico	Heraeus
<u>Plattenschüttler 1</u>	Titramax 1000	Heidolph
<u>Plattenschüttler 2</u>	MICROMIX	SIEMENS
<u>Vortexer</u>	1 Reax 1R	Heidolph
	vortex mixer SA8	stuart
<u>Roller</u>	analogue tube roller SRT6	stuart
<u>Gefrierschrank</u>	Komfort	Liebherr
<u>Kühlschrank</u>	ProfiLine	Liebherr
<u>Wasserbad</u>	Typ 1007	Gesellschaft für Labortechnik
<u>Tank mit flüssigem Stickstoff</u>	K series	Taylor-Wharton
<u>sterile Werkbank</u>	BSB4	GELAIR
	HeraSafe	Heraeus
<u>Autoklaver</u>	Varioclave	H+P Labortechnik

2.9 Elektronik und Software:

Produktname	Firma	Verwendung
<u>CanonScan 9800F</u>	Canon	Dokumente Scannen
<u>FlowJo®, Version 9.3.3</u>	FlowJo LLC	Dot-Plot-Diagramme und Berechnung der medianen Fluoreszenzintensitäten
<u>GraphPad Prism® 5.0</u>	GraphPad Software	alle statistischen Berechnungen, alle Balkendiagramme

Methoden

3.1 Stimulation von YAC-Zellen (NAD vs. aCD3)

Das Beschichten der entsprechenden Wells der Platte findet mind. 24h vor Ansetzen des Versuches statt. Der aCD3-Antikörper zum Beschichten ist der Klon KT3 und liegt in einer Stock-Konzentration von 1mg/ml vor. Die entsprechende Verdünnung des Antikörper-Stocks findet in PBS-- statt. In die Wells, die nicht beschichtet werden sollen, wird lediglich PBS-- pipettiert. Es werden je 100µl/Well pipettiert. Die Platte wird über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag mind. 2x in 200µl PBS--/Well gewaschen vor Ansetzen des Versuches. Die Yac-hh-Zellen werden einen Tag vor Ansetzen auf RPMI-Hunger-Medium umgesetzt.

Zum Ansetzen des Versuches werden die Zellen zu je $3 \cdot 10^4$ Zellen in 200µl/Well verteilt und gemäß Schema NAD (Endkonzentration: 20µM) hinzupipettiert. Die Zellen werden sodann für 3h in den Inkubationsschrank gestellt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die für die FACS (Fluorescent activated cell sorting)-Färbung bestimmten Zellen in FACS-Röhrchen überführt und gemäß Protokoll gefärbt (s. u.). Die restlichen Wells werden zentrifugiert (5min, 1500rpm, 4°C). Danach wird der Überstand abgenommen und zum Teil für die IL-2-Messung bei -20°C eingefroren, teilweise zur Messung der extrazellulären ATP-Konzentration verwendet. Der Rest des Überstandes wird verworfen, hinzugegeben werden 200µl/Well Lyse-Puffer 1 und die Platte für 5min bei 200rpm auf den Plattenschüttler zur Lyse der Zellen im Pellet gestellt. Danach wird im Lysat die ATP-Konzentration bestimmt.

3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe

Yac-hh-Zellen werden der Petrischale entnommen, gezählt und auf die entsprechende Zellkonzentration mittels RPMI-komplett-Medium gebracht. Die Zellsuspension wird dann auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen zu je 200µl/Well (die Zellzahl/Well schwankt von Versuch zu Versuch) und gemäß Schema mit verschiedenen NAD-Konzentrationen stimuliert (0µM, 0,1µM, 0,3µM, 1µM, 3µM, 10µM, 30µM, 100µM), teilweise wird 1U/Well Apyrase hinzugegeben. Die Zellen werden so für 3h im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, sodann wird die Mikrotiter-Platte bei 1500rpm für mind. 5min zentrifugiert. Der Überstand wird nun teilweise für eine ATP-Konzentrationsbestimmung abgenommen, teilweise verworfen. Das Zellpellet wird mind. 2x gewaschen (Resuspension in 200µl/Well PBS-- und erneute Zentrifugation) und anschließend lysiert mit 200µl/Well Lysepuffer 1 für 5min auf dem Plattenschüttler bei 200rpm. Einige Wells werden für die FACS-Färbung verschiedener Oberflächenproteine verwendet (CD62L: Klon MEL-14, Annexin: #556419 der Firma BD) und mittels Propidiumiodid oder DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) zur Bestimmung der Zelltod-Rate gefärbt.

3.3 Stimulation von Yac-Zellen in unterschiedlichen Medien

Die in RPMI komplett-Medium suspendierten Zellen werden 3x gewaschen (Zentrifugation für 5min bei 1600rpm, Dekantieren des Überstandes und Resuspension des Pellets in PBS--) und nach dem letzten Waschgang im entsprechenden Medium (PBS-- oder PBS++) resuspendiert. Sodann werden die entsprechenden Wells mit 20µM NAD⁺ stimuliert (10mM-Stock wurde 1:10 in PBS-- vorverdünnt und anschließend 1:50 Verdünnung im Well (4µl auf 200µl)). Die Inkubation wird im Brutschrank durchgeführt (5% CO₂, 37°C). Nach der Inkubation erfolgt dann Zentrifugation, Abnahme eines Teils des Überstandes zur ATP-Konzentrations-Bestimmung, Verwerfen des restlichen Überstandes und Lyse des

Zellpellets (200µl/Well des Lysepuffers 1, 5min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) auf dem Plattenschüttler bei 200rpm) und ATP-Konzentrationsbestimmung im Lysat („intrazelluläres ATP“). Teilweise werden einzelne Wells zur Bestimmung der Zelltod-Rate mittels Propidiumiodid oder DAPI-Färbung verwendet.

3.4 Analyse von Yac-Zellen nach Stimulation in verschiedenen Medien

Die Zellen werden der Petrischale entnommen und zentrifugiert (1600rpm, 4°C, 5min), anschließend in 4ml RPMI komplett resuspendiert und gezählt. Im Anschluss erfolgt die erneute Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im jeweiligen Medium (RPMI komplett, RPMI Hunger, PBS++, PBS--). Nach nochmaliger Zentrifugation und Resuspension im jeweiligen Medium findet dann die Überführung von je $5 \cdot 10^5$ in 600µl in FACS-Tubes statt und 20µM NAD oder 500µM ATP werden hinzugegeben.

Nach 3h Inkubation im Inkubationsschrank bei 37°C und 5%CO₂ erfolgt dann die FACS-Färbung und die durchflusszytometrische Messung. Die Zellen werden auf CD62L (Klon: MEL-14) und Propidiumiodid angefärbt.

3.5 Stimulation von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Einen Tag vor Versuchsdurchführung werden die Zellen gemäß Protokoll aufgetaut und über Nacht in der Petrischale in RPMI-komplett im Inkubationsschrank bei 5% CO₂ und 37°C gelagert. Am nächsten Tag werden die Zellen in RPMI komplett auf einer Greiner Mikrotiter-Platte zu je 200µl/Well ausplattiert. Teilweise werden die Wells mit unterschiedlichen PHA-L-Konzentrationen stimuliert (0µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml), teilweise mit 0,5µg/ml WD3C23 blockiert. Der PHA-Stock weist eine Konzentration von 1mg/ml auf, sodass folgende Volumina verwendet wurden: 2µl des Stocks auf 200µl für 10µg/ml PHA-L, 1µl auf 200µl für 5µg/ml PHA, für den 2,5µg/ml PHA-Ansatz wird der Stock 1:2 in RPMI vorverdünnt, dann 1µl auf 200µl. Der WD3C23-Stock weist eine Konzentration von 1,4mg/ml auf, sodass nach einer 1:100-Vorverdünnung in RPMI komplett je 7,2µl auf 200µl/Well gegeben werden, um eine Konzentration von 0,5µg/ml zu erreichen. Nach dem Ansetzen wird die Mikrotiter-Platte über Nacht in den Inkubationsschrank gestellt.

Nach ca. 18h wird die Mikrotiter-Platte dem Inkubationsschrank entnommen und bei 1500rpm und 4°C für mind. 5min zentrifugiert. Es wird Überstand für die extrazelluläre Interleukin-2 und ATP-Messung abgenommen (der Überstand für die Interleukin-2 Messung wird meist auf eine separate Greiner-Mikrotiter-Platte überführt und bei -20°C eingefroren, um die Messung an einem späteren Zeitpunkt durchzuführen). Anschließend erfolgt die Separation der CD4+ Zellen mittels selbstbeschichteter aCD4-Biotin-Binder-Beads von Cylex®. Dann findet die Lyse der isolierten CD4-Zellen mit IGEPAL 2% + SDS 2% für 5min auf dem Plattenschüttler bei 200rpm statt. Dann wird die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt.

3.6 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mittels einer OKT3-Reihe

Einen Tag vor Ansetzen des Versuches werden die humanen CD4-Zellen gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und über Nacht in der Petrischale im Inkubationsschrank gelagert. Außerdem werden die Platten (Greiner-Mikrotiter, NUNC - low-cell-binding, NUNC - hydrocell) mindestens einen Tag vor Ansetzen des Versuches mit OKT3 in verschiedenen Konzentrationen beschichtet. Dazu werden die Platten folgendermaßen beschichtet: Der OKT3-Stock (1mg/ml) wird zunächst 1:1000 verdünnt (2,5µl auf 2497,5 PBS--, enthält 1µg/ml OKT3), davon wird dann erneut eine 1:3 Verdünnung hergestellt

(800µl auf 1600µl PBS--, enthält 0,33µg/ml OKT3), hiervon erneut eine 1:3 Verdünnung (600µl auf 1200µl PBS--, enthält 0,11µg/ml OKT3). Von den OKT3-Verdünnungen werden je 200µl/Well in die entsprechenden Wells überführt.

Das Ansetzen des Versuches erfolgt folgendermaßen: Die CD4-Zellen werden der Petrischale entnommen, zentrifugiert, in RPMI komplett resuspendiert und gezählt in 3% Essigsäure. Dann wird die CD4-Zellsuspension mit RPMI komplett auf das benötigte Volumen aufgefüllt und auf die Mikrotiterplatten zu je 200µl/Well überführt. Zusätzlich zu dem beschichtenden OKT3 werden aCD28-Antikörper (Klon: CD28.2, Cat#: 302926) in einer Konzentration von 0,5µg/ml hinzugegeben. Es werden je 4 Wells/Ansatz präpariert, auf der Greiner-Mikrotiter-Platte werden zusätzlich Ansätze für die FACS-Färbung präpariert. Nach Ansetzen werden die Zellen über Nacht in den Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt.

Am nächsten Tag werden die Wells für die FACS-Färbung in FACS-Tubes überführt und gemäß Schema gefärbt (CD4: Klon RPA-T4, IgG1, BD; CD3: Klon UCHT1, IgG1, BD; DAPI; zur Durchführung siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“). Die Platten werden zentrifugiert (1500rpm, 4°C, 10min) und ein Teil der Überstände wird für die Interleukin 2-Messung abgenommen und bei -20°C eingefroren. Ein weiterer Teil der Überstände wird für die Messung des extrazellulären ATP verwandt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“). Nach Abnahme des gesamten Überstandes werden die Pellets mit 2% SDS + 2% IGEPAL für 5min auf dem Plattenschüttler lysiert. Anschließend wird die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt.

3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mit PHA und MACSiBeads

Einen Tag vor Versuchsansatz werden die humanen CD4-Zellen gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“). Am nächsten Tag werden die in RPMI komplett suspendierten Zellen mit wechselnder Zellkonzentration zu je 200µl/Well auf eine Greiner-Mikrotiterplatte verteilt. Der Ansatz für die 18h-Inkubation wird stimuliert mit 10µg/ml PHA-L (2µl des 1mg/ml-Stocks auf 200µl/Well) bzw. mit MACSiBeads (Bead/Zell-Verhältnis mind 1:1). Über Nacht werden die Zellen in den Inkubationsschrank gestellt (37°C, 5% CO₂). Am nächsten Tag werden nach definierten Zeitpunkten die Ansätze der weiteren Stimulationszeiten ebenfalls nacheinander stimuliert, so dass alle Ansätze zum selben Zeitpunkt gemessen werden können.

Für die Messung werden die Platten zunächst zentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C) und die Überstände für die Messung des extrazellulären ATP (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“) und Interleukin 2 (siehe „3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen“) abgenommen. Das Pellet eines Wells eines jeden Ansatzes wird in PBS-- resuspendiert und zu je der Hälfte in 2 FACS-Tubes überführt und FACS-gefärbt. Um alle Marker messen zu können, müssen pro Ansatz 2 FACS-Tubes angefärbt werden, für die Liste der verwendeten Antikörper siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“.

Die restlichen Zellpellets eines Ansatzes werden mit 200µl/Well 2% IGEPAL und 2% SDS für 5min auf dem Plattenschüttler bei 200rpm lysiert und die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli

Einen Tag vor Versuchsansatz werden die humanen CD4-Zellen gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“). Am

nächsten Tag werden sie ausplattiert auf einer Greiner-Mikrotiter-Platte in verschiedenen Zellzahlen in 200µl RPMI komplett pro Well und verschiedene Stimulanzen gemäß Schema hinzugegeben. Vom PHA-Stock (1mg/ml) werden je 2µl auf 200µl im Well überführt (Zielkonzentration 10µg/ml). Die MACSiBeads werden in einem Bead/Zell-Verhältnis von 1:1 hinzugegeben. Von einer 1:20 Vorverdünnung des Phorbol-12-Myristol-13-Acetat (PMA)-Stock (10ng/ml) werden je 1µl auf 200µl/Well gegeben (Zielkonzentration 25ng/ml). Der Ionomycin-Stock (750mg/l) wird nach 1:7,5 Vorverdünnung zu je 1µl/200µl im Well überführt (Zielkonzentration 500ng/ml). Das OKT3 (Stock: 1mg/ml) wird nach 1:5 Vorverdünnung ebenfalls zu je 1µl/ 200µl im Well hinzugegeben (1µg/ml) und der aCD28-Antikörper (Stock: 50µg/ml, Klon: 28.2 der Firma BioLegend) zu je 2µl/200µl im Well (Zielkonzentration 500ng/ml) hinzugefügt. Nach Ansetzen des Versuches wird die Mikrotiter-Platte über Nacht in den Inkubationsschrank gestellt (37°C, 5% CO₂).

Am nächsten Tag wird die Mikrotiter-Platte zentrifugiert und einige Überstandes für die Messung des extrazellulären ATP (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“) und Interleukin 2 („3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen“) abgehommen. Das Pellet eines Wells eines jeden Ansatzes wird in PBS-- resuspendiert, auf 2 FACS-Tubes verteilt und FACS-gefärbt (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“). Pro Ansatz werden je zwei FACS-Tubes gefärbt, um alle Marker anfärben zu können (Schema unten). Die restlichen Zellpellets werden mit 2% IGEPAL + 2% SDS für 5min auf dem Plattenschüttler bei 200rpm lysiert und die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt (siehe „3.16 Messung der ATP-Konzentration“).

Schema der FACS-Färbung:

FACS-Tubes „A“:

aCD25: M-A251, mIgG1K, APC-konj. (Allophycocyanin)
aCD69: Klon L78, mIgG1K, PE-konj. (Phycoerythrin)
aCD38: Klon HIT2, mIgG1K, FITC-konj. (Fluorescent Isothiocyanate)
aCD39: Klon eBioA1, mIgG1K, PE-Cy7-konj.
aCD4: Klon OKT4, AF700-konj. (Alexa Fluor 700)
DAPI

FACS-Tubes „B“:

aCD4: Klon SK3, APC-konj.
aCD62L: Klon DREG-56, FITC-konj.
aMHC-2: Klon L243, mIgG2K
DAPI

3.9 Kontrolle der Funktionalität des P2X7-Blockers WD3C23

Humane CD4-Zellen werden gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und die in RPMI komplett suspendierten Zellen zu je 200µl in FACS-Tubes überführt. Teilweise findet eine Vorinkubation mit 0,5µg/ml WD3C23 30min im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ statt. Nach der Vorinkubation werden gemäß Schema 3mM ATP hinzugegeben, danach intubieren die Zellen erneut für 2h. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen FACS-gefärbt auf Annexin und DAPI (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“).

3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP

Einen Tag vor Versuchsansatz werden die humanen CD4-Zellen gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und in RPMI komplett suspendiert über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Am nächsten Tag werden die Zellen in unterschiedlicher Konzentration in RPMI komplett suspendiert zu je 200µl/Well auf einer Greiner-Mikrotiterplatte ausplattiert und teilweise mit 2,5µg/ml für 30min mit WD3C23 vorinkubiert, bevor ATP in verschiedenen Konzentrationen - 1mM (2µl des 100mM-Stocks auf 200µl im Well) und 3mM (6µl des 100mM-Stocks auf 200µl im Well) - und MACSiBeads in einem Bead/Zell-Verhältnis von mind. 1:1 hinzugegeben werden. Die Zellen werden nun über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Eine Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit werden in alle Wells 5U/ml Apyrase hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit (18h-20h) wird die Platte zentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C) und Überstand für die Messung des extrazellulären ATP (Erfolgskontrolle für Apyrase-Behandlung, siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“) und Interleukin 2 (siehe „3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen“) abgenommen, der restliche Überstand wird verworfen. Das Pellet eines Wells eines jeden Ansatzes wird in PBS-- resuspendiert, in FACS-Tubes überführt und auf CD62L, Annexin und DAPI FACS-gefärbt (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“). Die restlichen Pellets werden mit 200µl 2% IGEPAL + 2% SDS/Well für 5min bei 200rpm auf dem Plattenschüttler lysiert und die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block

Einen Tag vor Versuchsansatz werden die humanen CD4-Zellen gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und in RPMI komplett suspendiert über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Am nächsten Tag werden die Zellen in unterschiedlicher Konzentration zu je 200µl/Well auf einer Greiner-Mikrotiter-Platte ausplattiert und teilweise mit verschiedenen Konzentrationen SCH58261 (0; 0,6nM; 6nM; 60nM; 600nM) für 30min vorinkubiert, bevor ATP in verschiedenen Konzentrationen - 1mM (2µl des 100mM-Stocks auf 200µl im Well) und 3mM (6µl des 100mM-Stocks auf 200µl im Well) - sowie MACSiBeads in einem Bead/Zell-Verhältnis von mind. 1:1 hinzugegeben werden und erneut über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wird.

Eine Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit werden in alle Wells 5U/ml Apyrase hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit (18h-20h) wird die Platte zentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C) und Überstände für die Messung des extrazellulären ATP (Erfolgskontrolle für Apyrase-Behandlung, siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“) und Interleukin 2 (siehe „3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen“) abgenommen, der restliche Überstand wird verworfen. Das Zellpellet eines Wells eines jeden Ansatzes wird in PBS-- resuspendiert, in FACS-Tubes überführt und auf CD62L, Annexin und DAPI FACS-gefärbt (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“). Die restlichen Pellets werden mit 200µl 2% IGEPAL + 2% SDS/Well für 5min bei 200rpm auf dem Plattenschüttler lysiert und die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

3.12 Proliferationsuntersuchungen von PBMCs

Einen Tag vor Versuchsansatz werden die humanen PBMCs gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und in RPMI komplett suspendiert über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Am Tag des Versuchsansatzes erfolgt dann das „Beladen“ der Zellen mit eFluor (siehe „3.13 Beladung der Zellen mit eFluor“) als Proliferationsmarker, dann werden

die Zellen auf einer Greiner Mikrotiter-Platte zu je 200µl/Well ausplattiert. Teilweise 30-minütige Vorinkubation mit 2,5µg/ml WD3C23 (P2X7-Blocker) oder 600nM SCH58261 (A2A-Blocker). Nach der Vorinkubation wird dann 1µg/ml OKT3 als Stimulans zur Proliferation und teilweise 3mM ATP als Kostimulans hinzugegeben. Da Vorversuche zeigten, dass von den 3mM ATP nach 24h nur noch 1mM ATP zu messen waren, werden jeden Tag 2mM ATP „nachgefüllt“. Die FACS-Messung wird an den Tagen 3,4,5 und 6 nach Stimulation durchgeführt. Zusätzlich zum eFluor werden die Zellen noch auf CD4 und DAPI gefärbt.

3.13 Beladung der Zellen mit eFluor

Die PBMCs werden zweimal in PBS-- gewaschen, schließlich in eFluor-Lösung (in einer Konzentration von 2µM in PBS--) resuspendiert. Die Zellkonzentration in der eFluor-Lösung sollte 10^7 Zellen / ml nicht überschreiten, das Mindestvolumen muss 0,5ml sein (auch für weniger als $5 \cdot 10^6$ Zellen).

Die Zellen werden für 10 Minuten im Inkubationsschrank (37°C, Dunkelheit) gelagert. Nach der Inkubationszeit wird das 4-5fache an Volumen an eisgekühltem RPMI komplett Medium mit 10% FCS hinzugegeben und die Zellen anschließend für 5min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden im Anschluss 3x in RPMI komplett gewaschen.

3.14 Testen der Apyrase-Aktivität

Auf einer Greiner-Mikrotiter-Platte werden Wells mit 200µl 3mM ATP in PBS-- gefüllt und mit 5U/ml (1U/Well) oder 2,5U/ml (0,5/Well) Apyrase versetzt. Dann wird die Platte im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 0, 15, 30, 45, 60 und 90min. wird die ATP-Konzentration bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“), jedoch ohne eine ATP-Standardkurve mit zu messen. Die Entwicklung der Lumineszenz-Rohdaten gibt dann Aufschluss über die Effektivität der zugegebenen Apyrase.

3.15 FACS-Färbung von Zellen

Die notwendige Konzentration des fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurde im Labor austitriert. Die Färbung findet teilweise in PBS--, teilweise in RPMI komplett Medium statt. Nach Überführung der Zellsuspension wird der fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben und die FACS-Tubes in Dunkelheit für 20-30min inkubiert. Dann werden die FACS-Tubes mit PBS-- auf 5ml aufgefüllt und bei 1200rpm, 4°C für 10min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100-200µl PBS-- + BSA resuspendiert.

Für die Annexin-Färbung werden die Zellen statt in PBS-- oder RPMI komplett in speziellem Annexin-Puffer resuspendiert und 30min inkubiert.

Für die Propidiumiodid und DAPI-Färbung werden lediglich 2µl direkt vor der durchflusszytometrischen Messung zu den schon anderweitig FACS-gefärbten Zellen gegeben.

3.16 Messung von ATP-Konzentrationen

Zur Messung wird das Lumineszenz-Reagenz CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay von Promega® verwendet. Je 50µl/Well der Flüssigkeit, deren ATP-Konzentration bestimmt werden soll, werden auf eine Messplatte pipettiert. Dann werden je 150µl/Well des Lumineszenz-Reagenz hinzugegeben. Sodann wird im Zeitraum von 3-10min. die Lumineszenz bei 450nm bestimmt.

Bei jedem Ansatz werden 2 Standard-Kurven mit definierten Mengen ATP mitgemessen (1000ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml und 0ng/ml ATP). Die

Standards werden mittels eines ATP-Stocks von 100mM hergestellt. Verdünnt wird in PBS--.

3.17 Untersuchung d. Einflusses von POM 1 auf die Luciferase-Aktivität

Es wird eine 10ng/ml ATP-Lösung hergestellt und mit einer mit verschiedenen konzentrierten POM 1-Lösungen 1 + 1 gemischt. Die ATP-Konzentration in diesen Lösungen beträgt also 5ng/ml. Die POM 1-Konzentrationen beträgt 0, 10µM, 20µM, 40µM, 50µM, 60µM, 80µM und 100µM. Nach definierten Zeitpunkten (3, 9, 14, 19, 24, 29min) wird gemäß Protokoll die ATP-Konzentrationsbestimmung mittels Luciferin und Luciferase durchgeführt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

3.18 Zellzahltests für extrazelluläre ATP-Messungen

Die aufgereinigten humanen CD4-Zellen werden gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und in verschiedenen Zellkonzentrationen auf einer Greiner Mikrotiter-Platte ausplattiert. Hinzugegeben wird je 1µl des POM 1-Stocks (10mM) zu 200µl im Well (entspricht 50µM POM 1). Zu den stimulierten Ansätzen kommen verschiedene Konzentrationen an MACSiBeads hinzu. Die Zellen werden jetzt für 30min im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Mikrotiter-Platte zentrifugiert (1300rpm, 10min, 5°C) und die ATP-Konzentration im Überstand bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

Zellzahl / Well	Beadzahl / Well	
1*10 ⁵	1*10 ⁵	doppelte Beadzahl wie für Maximalstimulation
1*10 ⁶	5*10 ⁵	Maximalstimulation (laut Hersteller)
2*10 ⁶	1*10 ⁶	Maximalstimulation (laut Hersteller)

3.19 Untersuchung von extrazellulärem ATP bei P2X7-Block

Die aufgereinigten humanen CD4-Zellen werden gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und auf einer Greiner Mikrotiter-Platte in RPMI komplett zu je 200µl/Well ausplattiert. Die entsprechenden Wells werden mit 0,7µg/ml WD3C23 für 20min vorinkubiert. Entsprechende Wells werden zu verschiedenen definierten Zeitpunkten mit MACSiBeads stimuliert, sodass die verschiedenen Stimulationszeiten gemeinsam gemessen werden können. Die Mikrotiter-Platte wird bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte zentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C), anschließend die ATP-Konzentration im Überstand bestimmt (siehe „3.16 Messung von ATP-Konzentrationen“).

3.20 Messung von Interleukin 2-Konzentrationen

Die Interleukin 2 (IL-2) - Messungen werden mit dem ELISA MAX™ Deluxe Set für humanes IL-2 durchgeführt. Mindestens einen Tag vor der Durchführung des Elisass (Enzyme-linked immunosorbent assay) müssen die mitgelieferten Platten mit dem Coating-Antikörper beschichtet werden. Dafür werden je 100µl/Well der

mitgelieferten Capture Antibody-Solution in jedes Well gegeben und mind. über eine Nacht bei 6°C gelagert.

Am Tag der Elisa-Durchführung wird die Capture Antibody Solution verworfen und die Wells 3x gewaschen (300µl/Well PBS--, verwerfen). Anschließend wird das mitgelieferte Assay Diluent zu je 200µl/Well verteilt und eine Stunde auf dem Plattenschüttler bei 200rpm inkubiert.

Die zu messenden Proben werden zu je 100µl/Well aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben werden 2 Standardkurven zur Konzentrationsberechnung mitgemessen. Dann erfolgt 2h Inkubation bei 200rpm auf dem Plattenschüttler und danach erneut 3-maliges Waschen.

Dann wird die mitgelieferte Detection Antibody Solution zu je 100µl/Well verteilt und eine Stunde bei 200rpm auf dem Plattenschüttler inkubiert, anschließend werden die Wells 4 Mal gewaschen. Schließlich wird die mitgelieferte Avidin-HRP Solution zu je 100µl/Well verteilt und erneut für 30 Minuten auf dem Plattenschüttler bei 200rpm inkubiert, anschließend werden die Wells 5 Mal gewaschen.

Abschließend erfolgt die Zugabe der mitgelieferten TMB Solution zu je 100µl/Well und eine 20-minütige Inkubation in Dunkelheit, dann wird 2-fach konzentrierte Schwefelsäure als Stopplösung zu je 100µl/Well hinzugegeben. Nun kann die Messung der Absorption bei 450nm innerhalb von 30 Minuten erfolgen und daraus die Interleukin 2-Konzentration anhand der mitgemessenen Standardkurven berechnet werden.

3.21 Aufreinigung von PBMCs aus einem „Buffy Coat“

Zunächst wird der Buffy Coat 1:2 (1+1) in PBS-- verdünnt, sodann werden max. 30ml des verdünnten Buffy Coats auf 20ml FICOLL-Paque-Lösung in einem 50ml Falcon-Tube vorsichtig aufgeschichtet, sodass keine Vermischung stattfindet. Danach wird zentrifugiert (Raumtemperatur, 25min, bei 1500rpm, ohne Bremse) und die Leukozytenteppe in ein neues Falcon-Tube überführt. Es wird 3 Mal gewaschen: Tube auf 50ml mit PBS-- auffüllen, danach für 10min bei 1500rpm und bei 4°C zentrifugieren (beim ersten Waschgang 1800rpm), dann verwerfen des Überstandes. Nach dem letzten Waschgang erfolgt die Resuspension des Pellets in 10-20ml RPMI komplett und die Zellen werden in einer Zählkammer in 3% Essigsäure gezählt. Abschließend wird erneut zentrifugiert (1300rpm, 5min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in RPMI komplett resuspendiert.

3.22 Isolation von humanen CD4-Zellen aus humanen PBMCs

Die Isolation wird mittels des Dynabeads® FlowComp™ Human CD4-Kits gemäß Protokoll durchgeführt.

Die PBMCs werden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml im Isolation Buffer (PBS-- + 0,1% BSA + 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) in einem Falcon-Tube suspendiert. Hinzu kommen je 50µl des mitgelieferten FlowComp®-aCD4-Antikörpers pro 1ml Zellsuspension, anschließend erfolgt eine 10-minütige Inkubation bei 6°C. Nach der Inkubation wird 4ml Isolation Buffer pro 1ml Zellsuspension hinzugegeben und erneut zentrifugiert (8min, 350g). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in dem ursprünglichen Volumen Isolation Buffer zur Ausgangskonzentration von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml resuspendiert. Hinzugeben werden 150µl der FlowComp® Bead-Suspension pro 1ml Zellsuspension und nochmals für 10min bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Nun wird das Falcon-Tube auf den Magneten umgesetzt, nach mind. 1 Minute wird der Überstand abgenommen und das Pellet in Isolation Buffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird 2 Mal

wiederholt. Schließlich wird das Pellets im mitgelieferten FlowComp® Release Buffer resuspendiert und erneute 10min bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Nach der Inkubation wird die Zellsuspension 10 Mal auf- und abpipettiert und das Falcon-Tube auf den Magneten umgesetzt. Nach mind. 1 Minute wird der Überstand (dieser enthält nun die CD4-Zellen) in ein neues Tube überführt. Es wird 4ml Isolation Buffer pro 1ml Zellsuspension hinzugegeben und zentrifugiert (8min, 350g). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet im gewünschten Medium resuspendiert. Nach jeder CD4-Zell-Aufreinigung werden diese per FACS-Färbung auf „Reinheit“ überprüft: Färbung auf CD3, CD8 und CD4 (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“).

3.23 Einfrieren von PBMCs und CD4-Zellen

500µl in RPMI komplett suspendierte Zellen werden in ein Kryo-Röhrchen vorgelegt, dann werden 500µl der Freezing solution hinzugegeben. Zur Herstellung der Freezing solution werden 40% RPMI komplett, 40% FCS und 20% DMSO durch einen Sterifilter gegeben.

3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen

9ml RPMI komplett werden in ein 50ml Falcon-Tube vorgelegt und auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Das Aliquot eingefrorener PBMCs oder CD4-Zellen wird ebenfalls im Wasserbad erwärmt und schnellstmöglich in das Falcon-Tube überführt. Sodann findet ein 3-maliges Waschen statt: Die Zellsuspension wird für 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert, dann wird das Pellet in 10ml RPMI komplett resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrift erfolgt die Resuspension in 2ml RPMI komplett und eine 45-minütige Inkubation in DNase 1 (10U/ml) im Inkubationsschrank (37°C, 5% CO₂). Dann wird erneut 2 Mal gewaschen.

3.25 Durchführung der Platten- und Bead-Tests

Die Versuche werden durchgeführt, um verschiedene Mikrotiter-Platten oder verschiedene Beads hinsichtlich ihrer Eigenschaft, unspezifisch Zellen zu binden, zu untersuchen. Wenn hierzu PBMCs verwendet wurden, werden diese einen Tag vor Versuchsansatz gemäß Protokoll aufgetaut und über Nacht in der Petrischale im Inkubationsschrank bei 5%CO₂ und 37°C gelagert. Wenn humanes Vollblut verwendet wird, wird es kurz vor Versuchsansatz abgenommen und in verschiedenen Verhältnissen in RPMI verdünnt.

Die Zellsuspensionen werden zu je 200µl/Well (PBMC) oder 125µl/Well (verdünntes Vollblut) auf die entsprechenden Mikrotiter-Platten aufgetragen und teilweise mit 10µg/ml PHA-L stimuliert. Nach kurzem Aufschütteln auf dem Plattenschüttler wird der Ansatz über Nacht in den Inkubationsschrank gestellt.

Am nächsten Tag erfolgt dann ein „Umsetzen“ der Zellsuspension auf eine „frische“ Reihe der Mikrotiter-Platte, wenn die unspezifischen Bindungen an der Platte selbst getestet werden sollen. Dann werden Beads hinzugegeben mit einem Bead/Zell-Verhältnis von mind. 1 (mindestens genauso viele Beads/Well wie berechnete Zellen im Well waren). Wenn nicht anders angegeben, wird die Bead-Separation gemäß ImmuKnow®-Protokoll durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“). Der (erste) Überstand der Bead-Separation wird FACS-gefärbt auf CD3, CD4 und CD8, um zu messen, wie die Population der CD4-Zellen im Überstand nach der Separation abnimmt im Vergleich zu Negativkontrollen.

Mit dem Bead-Zell-Pellet wird dann eine Lyse mittels 200µl/Well des Lysepuffer 1 für 5min bei 200rpm auf dem Plattenschüttler durchgeführt. Sollen die unspezifischen Bindungseigenschaften einer Platte getestet werden, so werden die nach dem Umsetzen „leeren“ Wells nach 3-maligem Waschen mit 200µl/Well PBS-- ebenfalls

wie Pellets behandelt und lysiert. Anschließend wird gemäß Protokoll die ATP-Konzentration im Lysat bestimmt.

3.26 Beschichten der CELlection® Biotin Binder Beads

Es werden stets mindestens 25µl der Bead-Suspension beschichtet. Alle Schritte fanden gemäß CELlection® Biotin Binder Kit-Protokoll statt. Zunächst wird die Bead-Suspension 2 mal in 1ml PBS-- in einem Eppendorf-Tube gewaschen. Nach dem letzten Waschen erfolgt eine Resuspension in PBS-- im ursprünglichen Volumen. Sodann wird 1µg des biotinylierten Antikörpers hinzugegeben, anschließend wird 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Tube-Roller inkubiert. Dann wird erneut 2 Mal gewaschen in je 1ml PBS--. Nach dem letzten Waschung wird das Pellet in PBS-- im ursprünglichen Volumen resuspendiert.

3.27 Beschichten der Biotin Binder Beads von invitrogen®

Die gewünschte Menge der Bead-Suspension wird in ein Eppendorf-Tube überführt und mit PBS-- auf 1 - 1,5ml aufgefüllt. Dann wird das Eppendorf-Tube auf einen hierfür vorgesehenen Magnet gestellt, nach mind. 1 Minute der Überstand abpipettiert, erneut mit PBS-- auf 1-1,5ml aufgefüllt und das „Bead-Pellet“ mittels Vortexer resuspendiert. Nach erneutem Aufstellen auf den Magnet und Abpipettieren des Überstandes werden die Beads in ca. 800µl PBS-- resuspendiert und die gewünschte Menge biotinylierter Antikörper hinzugegeben (ca. 1µg Antikörper auf $1 \cdot 10^7$ Beads (=25µl Bead-Suspension)). Danach wird für mindestens 30 Minuten auf dem Roller bei Raumtemperatur inkubiert, dann wird erneut 2 Mal gewaschen (Aufsetzen auf Magnet, nach mind. 1 Minute Abnahme des Überstandes und Resuspension in 1-1,5ml PBS--). Nach dem letzten Waschen erfolgt eine Resuspension in PBS-- im ursprünglichen Volumen.

3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls

Die Durchführung erfolgt streng nach dem Cylex®-Protokoll: Die zu messende Zellsuspension wird 1:4 (250µl + 750µl) in sample diluent verdünnt, sodann 25µl/Well in die mitgelieferten 8-Well-Stripes überführt und dann erneut in 100µl/Well sample diluent verdünnt. Die Platte wird kurz auf dem Plattenschüttler (MICROMIX von SIEMENS, Programm 17) aufgeschüttelt und über Nacht 15h-18h in den Inkubationsschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt. Am nächsten Tag erfolgt erneut ein 3-minütiges Aufschütteln und die Hinzugabe von 50µl/Well der Bead-Suspension. Nach kurzem Aufschütteln wird dann für 15 Minuten inkubiert, erneut kurz aufgeschüttelt und nochmal 15 Minuten inkubiert. Nach letztmaligem kurzem Aufschütteln wird der Stripe mit den Wells auf den mitgelieferten Magneten aufgesetzt und nach 2-minütigem Warten der Überstand abgenommen (Dieser Überstand wird teilweise in FACS-Tubes überführt und FACS-gefärbt zur Kontrolle). Danach erfolgt 3-maliges Waschen mit 200µl/Well des mitgelieferten Wash buffers (nach dem letzten Waschung wird erneut aufgeschüttelt und der Stripe wieder auf den Magneten aufgesetzt). Vor Abnahme des Überstandes stehen die stripes stets mind. 1 Minute ruhig auf dem Magneten.

Dann werden 200µl/Well Lysis reagent hinzugegeben, 5 Minuten auf dem Plattenschüttler aufgeschüttelt, und erneut auf den Magneten aufgesetzt. Nach 2-minütigem Warten werden nun 50µl des Überstands bzw. des Lysats auf eine Messplatte überführt und 150µl/Well des mitgelieferten luminescence reagents hinzugegeben. Nach kurzem Aufschütteln wird nun die Lumineszenz im ELISA-Reader nach 3-10min gemessen. Zusätzlich zu den zu messenden Proben werden

stets gemäß Protokoll 2 Kalibrator-Kurven mitgemessen zur Berechnung der ATP-Konzentration aus den Lumineszenzwerten.

3.29 Durchführung des ImmuKnow®-Assays mit Thrombozytenzusatz

Die PBMCs und vorisolierten CD4-Zellen werden gemäß Protokoll aufgetaut (siehe „3.24 Auftauen eingefrorener PBMCs und CD4-Zellen“) und bei Zellkonzentrationen von $2,5 \cdot 10^6$ PBMCs/ml bzw. $1,5 \cdot 10^6$ CD4-Zellen/ml in RPMI komplett suspendiert. Dies entspricht am ehesten den entsprechenden Konzentrationen in humanem Vollblut. Die PBMC- und CD4-Zell-Suspensionen werden neben dem humanem Vollblut teilweise mit 1:2 in RPMI komplett, teilweise in einem Thrombozytenkonzentrat 1:2 verdünnt. Mit all diesen Proben wird der ImmuKnow®-Assay durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“).

3.30 Depletion bestimmter Zellarten aus humanem Vollblut

1 Tag vor Versuchsansatz wurden CELLection® Biotin Binder Beads mit verschiedenen Antikörpern beschichtet (siehe dazu „3.26 Beschichten der CELLection® Biotin Binder Beads“) und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Es werden je 300µl humanes Vollblut pro Ansatz verwendet, die Menge an hinzugegebener Bead-Suspension hängt von der zu erwartenden zu depletierenden Zellzahl ab. Die Depletion findet in einem 16ml-Falcon-Tube statt.

biotinylierter Antikörper	Menge an Bead-Suspension für 300µl Vollblut	Anzahl der Beads in dem Volumen Bead-Suspension	erwartete zu depletierende Zellzahl	Klon ID
a-human-CD15	13µl	$5 \cdot 10^6$	12 - 33 * 10^5	HI98
a-human-CD14	10µl	$4 \cdot 10^6$	2,5 - 6,5 * 10^5	61D3
a-human-CD4	10µl	$4 \cdot 10^6$	3 - 6,9 * 10^5	RPA-T4
a-human-CD8	10µl	$4 \cdot 10^6$	1,5 - 3,5 * 10^5	RPA-T8

Vor Zugabe der beschichteten Beads wird das Blut 1:2 in PBS-- + BSA verdünnt. Nach Zugabe des jeweiligen Volumens beschichteter Beads findet eine 20-minütige Inkubation auf dem Roller bei 6°C statt. Dann wird das Tube in den Magnet gestellt und nach 2 Minuten der Überstand abgenommen. Der Überstand ist das depletierte Vollblut. Zur Erfolgskontrolle der Depletion wird ein Teil des depletierten Vollblutes FACS-gefärbt.

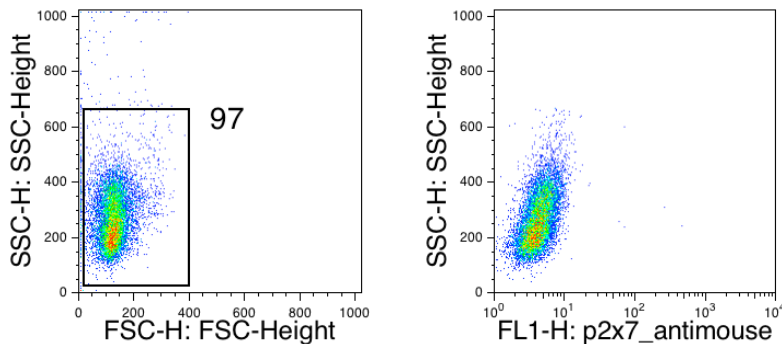
Anschließend wird das ImmuKnow®-Kit mit dem unterschiedlich depletierten Vollblut gemäß Protokoll durchgeführt. Das depletierte Vollblut wird hier genauso behandelt wie unbehandeltes humanes Vollblut (bei der ersten Verdünnung des ImmuKnow®-Protokolls in „sample diluent“ wurde berücksichtigt, dass das depletierte Vollblut schon 1:2 in PBS- - + BSA verdünnt worden ist, sodass keine 1:5 Verdünnung, sondern lediglich ein 1:2,5 Verdünnung in „sample diluent“ vorgenommen wurde).

Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an murinen Lymphom-Zellen (Yac)

Zunächst wurde die in der Einleitung beschriebene Aktivierung des P2X7-Rezeptors mit seinen Auswirkungen auf Yac-hh-Zellen untersucht. Dazu wurde zunächst mittels FACS-Färbung die P2X7-Expression auf Yac-hh-Zellen gemessen.

Zur Darstellung der Gating-Strategie ist hier beispielhaft der anti-murin-P2X7 gefärbte Ansatz mit Yac-Zellen dargestellt:



mediane Fluoreszenzintensitäten der Yac-Zellen:

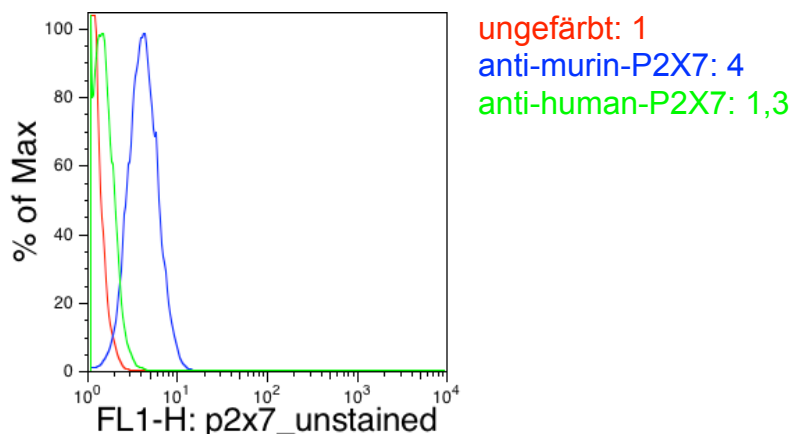


Abb. 2 Yac-hh-Zellen exprimieren P2X7

Zur Erfassung der Oberflächenexpression von P2X7 wurden Yac-Zellen mittels fluoreszenzmarkierter anti-murin-P2X7-Antikörper untersucht (siehe „3.15 FACS-Färbung von Zellen“). Als Negativkontrolle wurden auch anti-human-P2X7-Antikörper verwendet.

Der durchflusszytometrische Nachweis von P2X7-Rezeptoren auf der Oberfläche der Yac-hh-Zellen gelang gut.

Nun wurde der dosisabhängige Effekt einer NAD-Stimulation auf Yac-hh-Zellen bezüglich intra- und extrazellulärer ATP-Konzentration und bezüglich der Oberflächenexpression von CD62L und Annexin untersucht. Dazu wurden Yac-hh-Zellen mit unterschiedlichen Dosen zwischen 1µM und 100µM NAD stimuliert. NAD führt nach kovalenter Bindung der ADP-Ribose-Einheit an den P2X7-Rezeptor durch die Adenosin-Ribosyl-Transferase (ART) zu einer hochspezifischen Aktivierung von P2X7.

Die ATP-Konzentration im Extrazellularraum zeigte einen deutlichen Anstieg mit steigender stimulierender NAD-Konzentration.

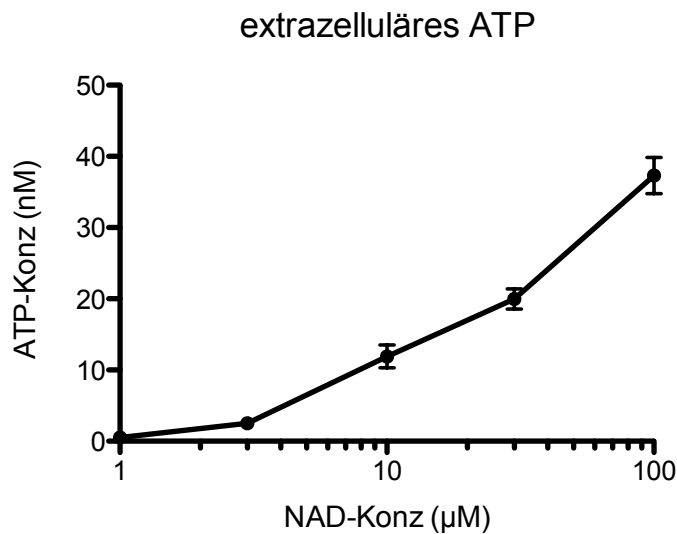


Abb. 3 zunehmende NAD-Stimulation führt zu vermehrter extrazellulärer ATP-Konzentration Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigender NAD-Konzentration stimuliert. Im Anschluss Zentrifugation und Messung der ATP-Konzentration im Überstand (siehe „3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe“, Zellzahl: $1 \cdot 10^5$ /Well).

Diese Beobachtung konnte in zahlreichen Wiederholungen bestätigt werden und ist hochsignifikant ($p = 0,0026$).

Auch für das intrazelluläre ATP zeigte sich eine Dosisabhängigkeit von der stimulierenden NAD-Konzentration, wenn auch schlecht reproduzierbar auf Grund großer Variabilitätskoeffizienten. Zusätzlich wurden zur Messung des Einflusses der auto- und parakrinen ATP-Feed-Forward-Loop parallele Ansätze mit Zusatz von 1U/Well Apyrase untersucht.

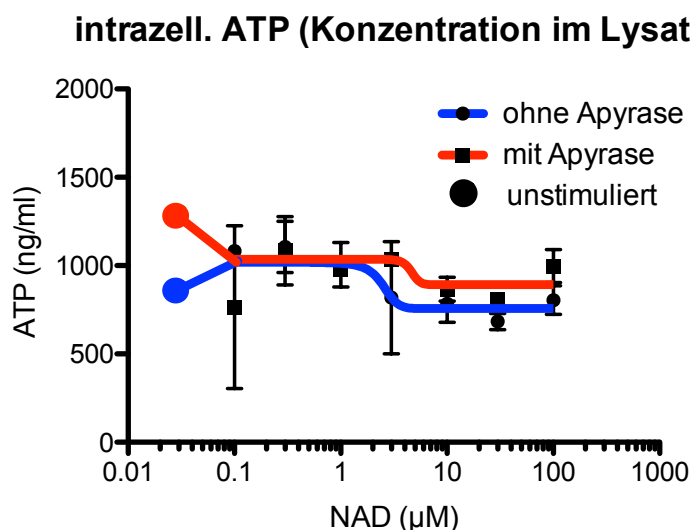


Abb. 4 NAD-Stimulation führt zu verminderter intrazellulärer ATP-Konzentration, durch Apyrase wird dieser Effekt teilweise aufgehoben Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigenden NAD-Konzentrationen stimuliert, teilweise mit Apyrase-Zusatz. Im Anschluss erfolgte dann Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Bestimmung der ATP-Konzentration (siehe „3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe“, Zellzahl $5 \cdot 10^4$). Die Ansätze mit und ohne Apyrase zeigen bei stimulierenden NAD-Konzentrationen ab $3 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$ im paarweisen T-Test einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Trotz schlechter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind eindeutige Trends auszumachen: Bei höheren stimulierenden NAD-Konzentrationen sinkt der intrazelluläre ATP-Spiegel. Dieser Trend scheint durch Zugabe von Apyrase zumindest teilweise aufgehoben zu werden. Objektiviert und quantifiziert wurde dies mittels einer Dose-Response-Regression vom Inhibitionstyp: Hier zeigte sich eine Anhebung der erreichten Mindest-ATP-Konzentration bei Apyrase-Zugabe von ca. 750ng/ml auf ca. 900ng/ml ATP. Ferner konnte durch die Apyrase-Zugabe eine „Rechts-Verschiebung“ der Kurve erzeugt werden. Während die IC₅₀-Konzentration ohne Zugabe von Apyrase bei 2,5µM NAD liegt, liegt sie bei Apyrase-Zugabe bei 4,65µM NAD.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die länger andauernde auto- bzw. parakrine ATP-Stimulation vor allen Dingen für die ATP-Freisetzung zuständig ist, der initiale Stimulus über den P2X7-Rezeptor mittels ADP-Ribose vor allem für die intrazelluläre ATP-Produktion. Die initiale Stimulation mittels NAD bzw. ADP-Ribose wird von der Apyrase nicht blockiert. Eine Verzerrung durch vermehrten Zelltod bei höherkonzentrierten Stimuli konnte durch FACS lebend/tot-Färbung mittels Propidiumiodid oder DAPI ausgeschlossen werden.

Außerdem wurde das dosisabhängige CD62L-Shedding und Annexin-Shift auf NAD-Stimulation untersucht.

Zur Demonstration soll hier die Gating-Strategie sowie beispielhaft die Annexin- und CD62L-Färbung der unstimulierten und der maximal NAD-stimulierten Ansätze gezeigt werden

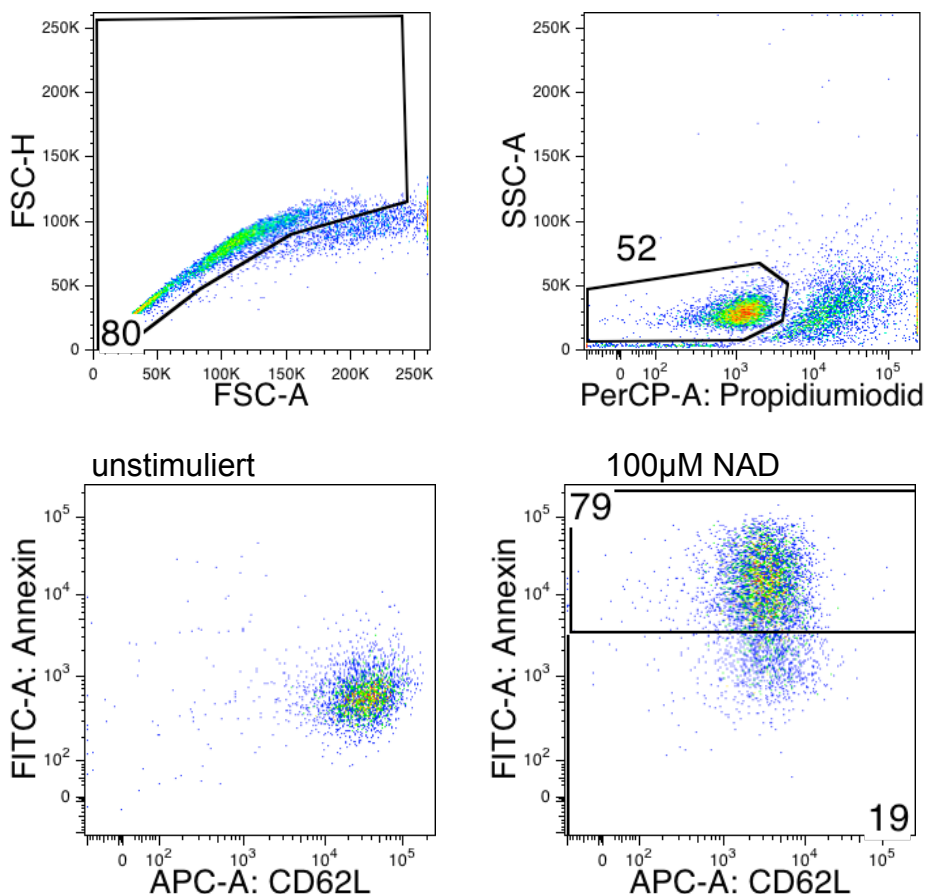


Abb. 5 Für die Analyse der Oberflächenmarker werden zunächst die Singlets, dann die lebenden Zellen ausgewählt Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigenden NAD-Konzentrationen stimuliert, teilweise mit Apyrase-Zusatz. Im Anschluss daran erfolgte eine FACS-Analyse der CD62L- und Annexin-Expression (siehe „3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe“).

Auch hier werden beim Auftragen der medianen Fluoreszenzintensitäten eindeutige Trends sichtbar.

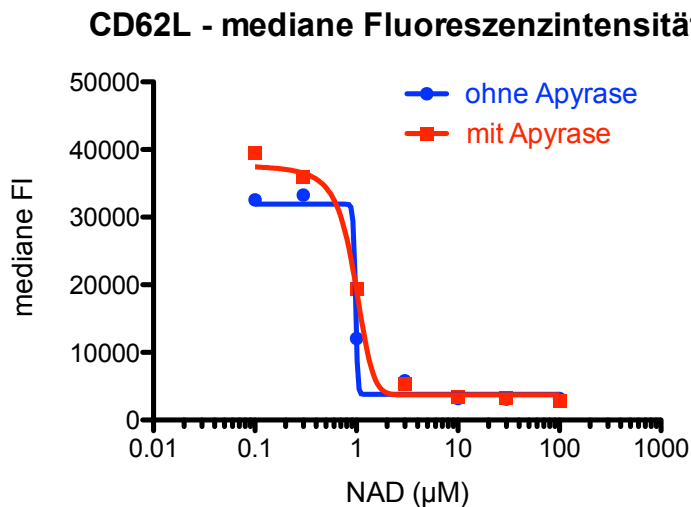


Abb. 6 NAD-Stimulation führt dosisabhängig zu CD62L-Shedding. Apyrase hat keine Effekt
 Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigenden NAD-Konzentrationen stimuliert, teilweise mit Apyrase-Zusatz. Im Anschluss daran erfolgte eine FACS-Analyse der CD62L-Expression (siehe „3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe“).

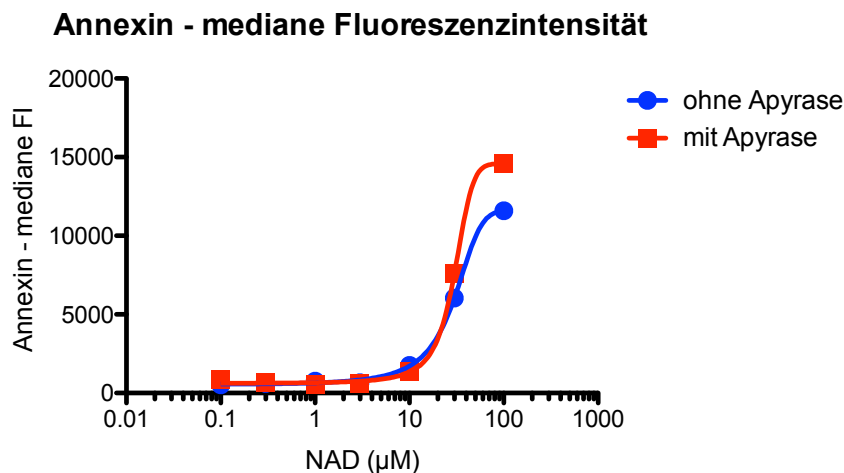


Abb. 7 NAD-Stimulation führt dosisabhängig zu Phosphatidylserin-Shift. Apyrase hat keinen Effekt
 Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigenden NAD-Konzentrationen stimuliert, teilweise mit Apyrase-Zusatz. Im Anschluss daran erfolgte eine FACS-Analyse mittels Annexin zur Detektion von Phosphatidylserin-Resten auf der Zelloberfläche (siehe „3.2 Stimulation von Yac-Zellen mittels einer NAD-Reihe“).

Gut zu sehen ist das dosisabhängige CD62L-Shedding mit steigender NAD-Konzentration. Außerdem ist der mit steigender NAD-Konzentration zunehmende Annexin-Shift als Zeichen der P2X7-Aktivierung zu sehen. Ferner zeigt sich, dass die errechnete mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des CD62L-Sheddings niedriger liegt als die errechnete EC_{50} des Annexin-Shifts. Das CD62L-Shedding benötigt also eine geringere stimulierende NAD-Konzentration als der Annexin-Shift. Der Eindruck, dass in den Ansätzen mit Apyrase-Zusatz eine höhere Annexin-Expression auftritt, konnte in Wiederholungen nicht reproduziert werden.

Da die P2X7-Aktivierung von einem Ca^{2+} -Einstrom gefolgt ist, der dann in der Folge die weiteren Effekte vermittelt, wurde im Folgenden getestet, inwiefern die Konzentration extrazellulärer divalenter Kationen Einfluss auf den Anstieg von extra- und intrazellulärem ATP hat. Hier wurde neben NAD ($20\mu\text{M}$) auf ATP ($500\mu\text{M}$) als Stimulus zurückgegriffen.

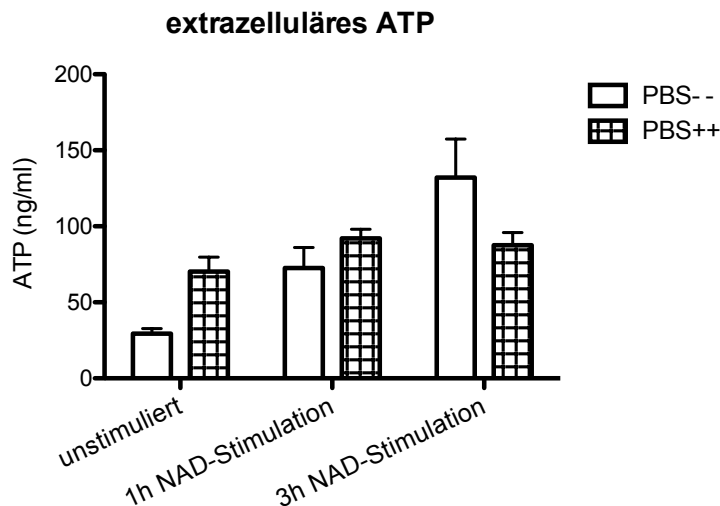


Abb. 8 Für eine P2X7-vermittelte ATP-Freisetzung ist kein extrazelluläres Kalzium notwendig

Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiter-Platte in PBS++ oder PBS- - ausplattiert und mit $20\mu\text{M}$ NAD stimuliert (siehe „3.3 Stimulation von Yac-Zellen in unterschiedlichen Medien“, Zellzahl $1 \cdot 10^5/\text{Well}$). Dann erfolgten Zentrifugation und Messung der ATP-Konzentration im Überstand.

Die Zelltodrate ist zu vernachlässigen, sie schwankt zwischen 6,4%-10,8% und ist unabhängig von Stimulation oder Medium. Der Versuch zeigt einen signifikanten Anstieg des extrazellulären ATP in PBS++ (mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) und PBS-- (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) nach beiden gemessenen Zeitpunkten. Außerdem ist die ATP-Konzentration im unstimulierten Falle im PBS++-Puffer signifikant höher. Eine mögliche Erklärung könnte unspezifischer Ca^{2+} -Einstrom im PBS++ Medium mit konsekutiver intrazellulärer ATP-Steigerung und ATP-Freisetzung sein. Gleichzeitig scheint das Vorhandensein extrazellulären Kalziums keine Voraussetzung für die Effektorwirkung des P2X7-Rezeptors zu sein: Im PBS-- Medium ist ebenfalls ein klarer Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration nach NAD-Stimulation messbar.

Außer der extrazellulären ATP-Konzentration wurde auch die intrazelluläre ATP-Konzentration im Zelllysat gemessen. Hier zeigten sich jedoch große Variabilitäten in den Messwerten, die sich außerdem in wiederholten Versuchsdurchführungen widersprachen. Eine zuverlässige Aussage ist daher nicht möglich.

Neben der Entwicklung des extra- und intrazellulären ATP wurde auch die Entwicklung der Oberflächenmarker in den verschiedenen Medien untersucht. Die FACS-Analyse von CD62L (L-Selectin) zeigt im Hinblick auf verschiedene Stimuli eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien.

CD62L - mediane Fluoreszenzintensität

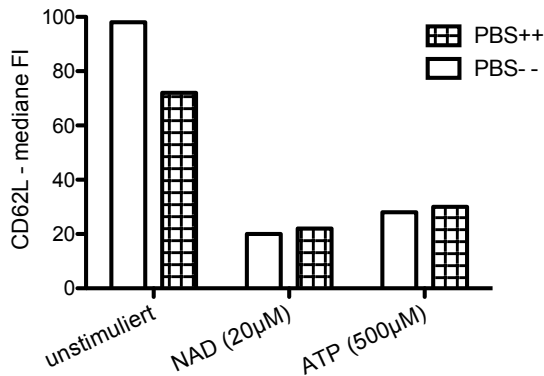


Abb. 9 Für P2X7-vermitteltes CD62L-Shedding ist kein extrazelluläres Kalzium notwendig

Yac-Zellen wurden auf einer Mikrotiter-Platte in PBS++ oder PBS- - ausplattiert und mit NAD oder ATP stimuliert (siehe „3.3 Stimulation von Yac-Zellen in unterschiedlichen Medien“, Zellzahl $1 \cdot 10^5$ /Well). Dann folgte eine FACS-Analyse der CD62L-Expression.

Trägt man die medianen Fluoreszenzintensitäten nebeneinander auf, so zeigt sich ein eindeutiger Trend: Sowohl NAD- als auch ATP-Stimulation erzeugt ein gut sichtbares CD62L-Shedding.

Gleichzeitig zeigt sich in den PBS-Medien eine Art Vorstimulation. Vor allem im PBS++ Medium scheint bei einem Teil der Zellen auch ohne adäquaten Stimulus CD62L-Shedding stattgefunden zu haben.

Ferner wurde nun untersucht, welchen Einfluss die T-Zell-Rezeptor-Stimulation auf die Entwicklung von intra- und extrazellulärem ATP - gegebenenfalls im Zusammenspiel mit der P2X7-Stimulation mittels NAD - hat.

Dazu wurde erneut die Entwicklung von intra- und extrazellulärem ATP und einiger Oberflächenproteine an Yac-hh-Zellen auf NAD und / oder anti-CD3-Antikörper als Stimulus untersucht. NAD führt wie beschrieben zu einer P2X7-Stimulation, während der anti-CD3-Antikörper KT3 zu einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors führt.

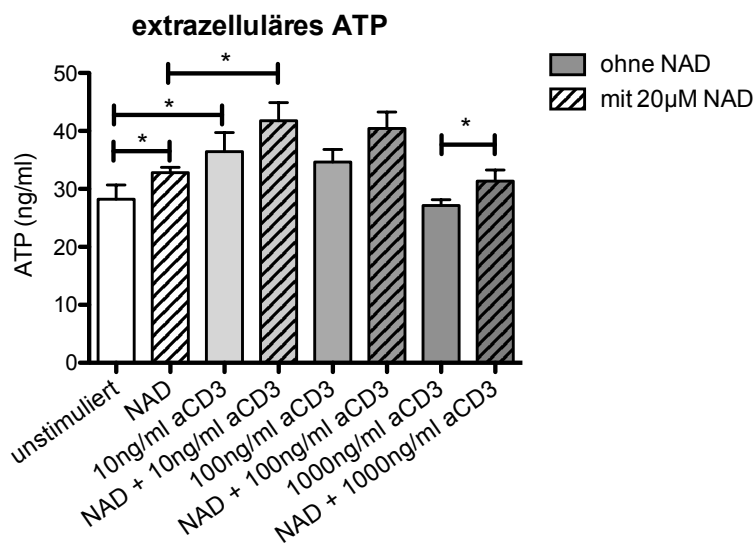


Abb. 10 P2X7-Kostimulation führt zu erhöhten extrazellulären ATP-Spiegeln

Yac-Zellen wurden mit unterschiedlich konzentriertem immobilisiertem anti-CD3-Antikörper (KT3) sowie teilweise mit $20 \mu\text{M}$ NAD stimuliert (siehe „3.1 Stimulation von Yac-hh-Zellen (NAD vs. aCD3)“, Zellzahl $3 \cdot 10^4$ in $200 \mu\text{l}$ /Well). Dann erfolgten Zentrifugation und Bestimmung der ATP-Konzentration im Überstand. * = $p < 0,05$

Alle Anstiege des extrazellulären ATP nach Stimulation gegenüber den unstimulierten Zellen sind signifikant (außer 1µg/ml anti-CD3). Außerdem haben alle Ansätze mit NAD-Zusatz signifikant höhere extrazelluläre ATP-Konzentrationen als die analogen Ansätze ohne NAD-Zusatz ($p < 0,01$ bei 1-way-ANOVA)

Neben der extrazellulären ATP-Konzentration wurde auch die ATP-Konzentration im Zelllysat bestimmt.

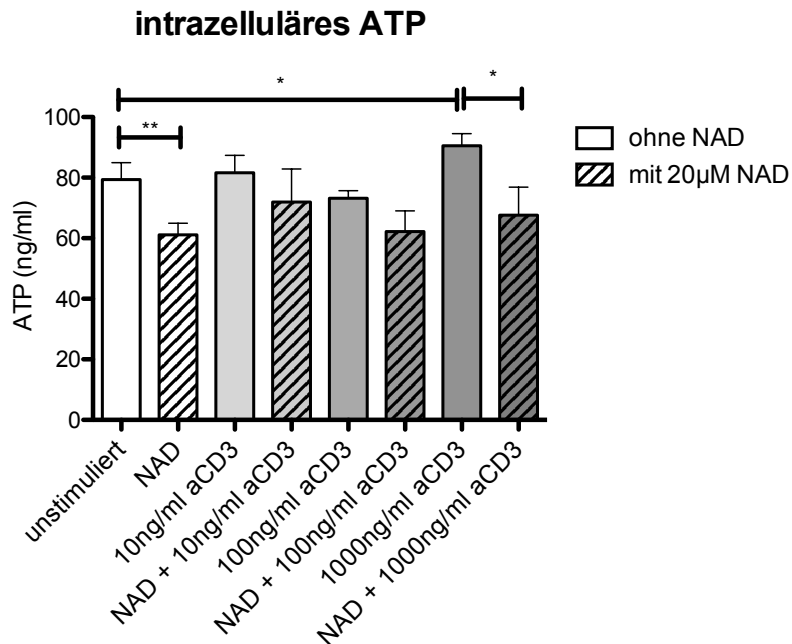


Abb. 11 P2X7-Kostimulation führt zu erniedrigten intrazellulären ATP-Konzentrationen

Yac-Zellen wurden mit unterschiedlich konzentriertem immobilisiertem anti-CD3-Antikörper (KT3) sowie teilweise mit 20µM NAD stimuliert (siehe „3.1 Stimulation von Yac-hh-Zellen (NAD vs. aCD3)“, Zellzahl $3 \cdot 10^4$ in 200µl/Well). Dann erfolgten Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Bestimmung der ATP-Konzentration im Lysat. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Bei 1µg/ml anti-CD3-Beschichtung steigt der intrazelluläre ATP-Spiegel (iATP) signifikant an, bei NAD-Stimulation sinkt der iATP-Spiegel signifikant ab. Bei NAD-Kostimulation ist der iATP-Wert signifikant niedriger als ohne NAD-Kostimulation (außer bei 10ng/ml aCD3-Beschichtung). Im paarweisen T-Test zeigt sich bei NAD-Kostimulation signifikant weniger ATP im Lysat ($p = 0,016$, Signifikanzbestimmung durch paarweisen T-Test). Der Abfall des iATP bei NAD-Stimulation wird teilweise durch die anti-CD3-Beschichtung kompensiert, dies wird besonders bei der 10ng/ml anti-CD3-Beschichtung (+/- NAD) deutlich.

Alleinige T-Zell-Rezeptor-Stimulation mittels des anti-CD3-Antikörpers führt also zu einer vermehrten intrazellulären ATP-Produktion, das ATP verbleibt aber vorerst in der Zelle. Erst die zusätzliche NAD-Stimulation führt auch zu einer vermehrten Freisetzung, die aber nicht vollständig von vermehrter ATP-Synthese in der Zelle kompensiert wird. Dies erklärt, dass die extrazellulären ATP-Spiegel bei NAD-Kostimulation signifikant höher, während die intrazellulären Spiegel signifikant niedriger sind.

4.2 Versuche mit humanen Zellen

Die Beobachtungen und Resultate, die an Untersuchungen mit Yac-Zellen gefunden wurden, warfen die Frage auf, inwiefern die Beobachtungen auf humane, im Blut zirkulierende Zellen, übertragen werden können.

Dazu wurden zunächst aus humanem Vollblut (teilweise auch aus Buffy Coats) gemäß Protokoll aufgereinigte PBMCs (Peripheral Blood Monoclonar Cells) mit PHA-L stimuliert. PHA ist ein aktivierender Ligand des T-Zell-Rezeptors. Erwartet wurde ein Anstieg der extrazellulären Interleukin-2-Konzentration sowie eine vermehrte intrazelluläre ATP-Produktion in den T-Zellen. Um außerdem den Effekt des P2X7-Rezeptors zu untersuchen, wurden zusätzlich analoge Ansätze mit dem P2X7-Blocker WD3C23 angesetzt.

Zunächst musste WD3C23 auf seine Effektivität geprüft werden. Dazu wurden humane RPMI-Zellen mittels ATP stimuliert und teilweise vorher mit WD3C23 inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mittels Annexin FACS-gefärbt und analysiert.

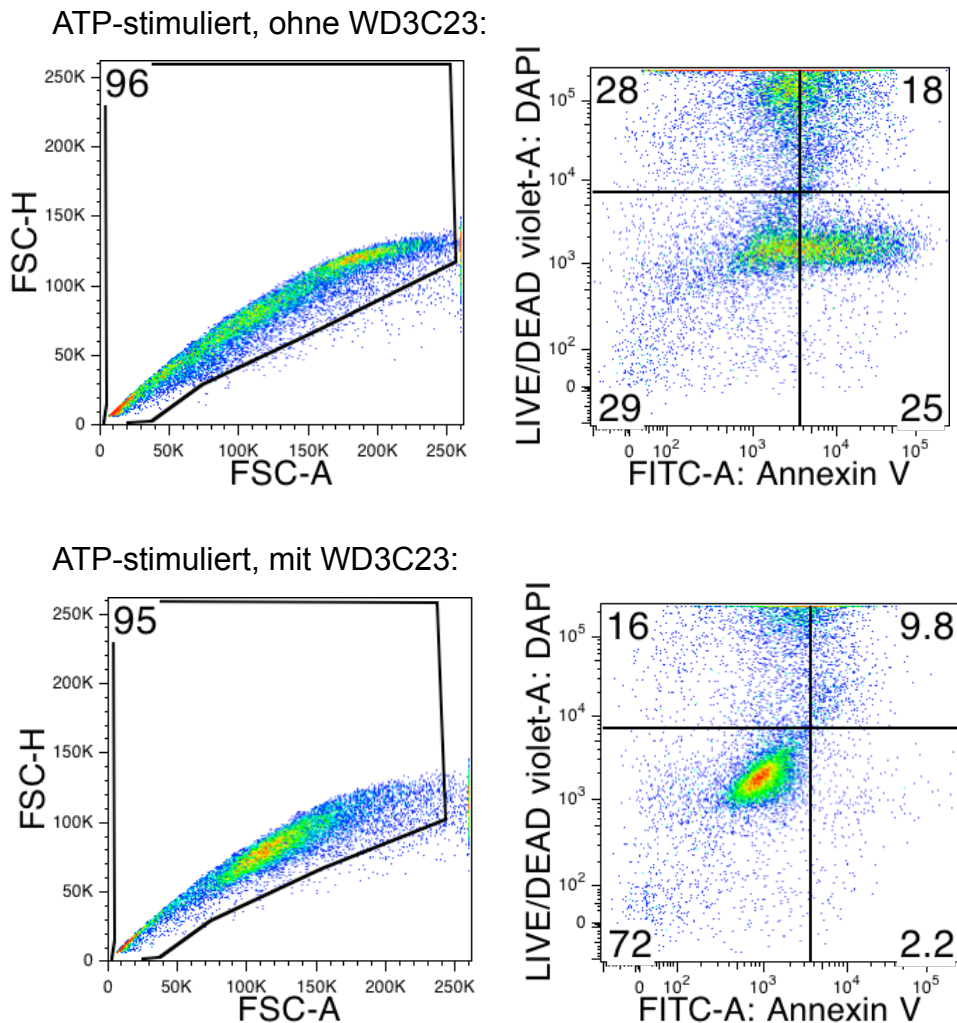


Abb. 12 WD3C23 blockiert den P2X7-Rezeptor

Humane RPMI-Zellen wurden mit ATP stimuliert (siehe „3.9 Kontrolle der Funktionalität des P2X7-Blockers WD3C23“). Durch Zugabe des P2X7-Blockers WD3C23 konnte der durch ATP hervorgerufene Phosphatidylserin-Shift vollständig antagonisiert werden.

Da es bei P2X7-Stimulation bekanntermaßen zum Phosphatidylserin-Shift (also zur Verlagerung negativer Phosphoglyceride von der Innenseite der Membran zur Außenseite, die mittels Annexin durchflusszytometrisch angefärbt werden können) kommt, sollte nach ATP-Stimulation vermehrt Annexin auf der Oberfläche nachweisbar sein. Der Effekt konnte durch WD3C23 blockiert werden. WD3C23 zeigte also den gewünschten P2X7-Block.

Die Entwicklung des extrazellulären Interleukin-2 zeigte erwartungsgemäß einen Anstieg nach PHA-L-Stimulation.

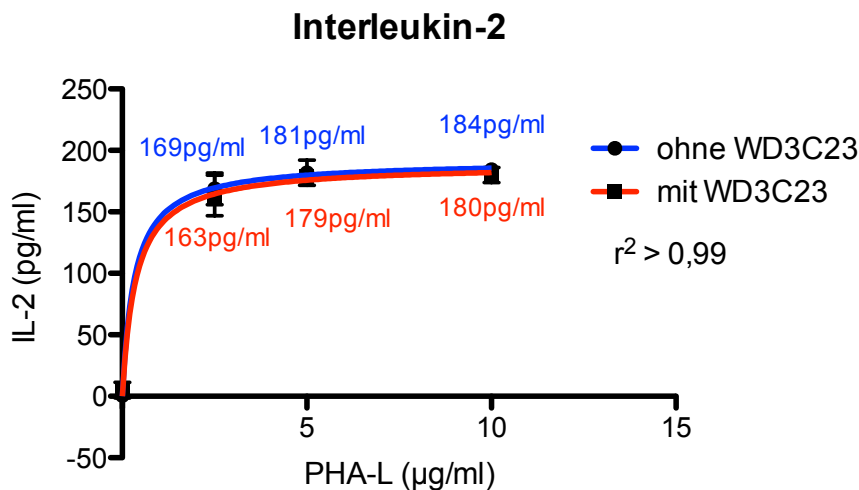


Abb. 13 Die Interleukin 2-Produktion steigt unabhängig vom P2X7-Rezeptor mit der stimulierenden PHA-L-Konzentration PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen PHA-L über Nacht stimuliert (siehe „3.5 Stimulation von PBMCs“, Zellzahl $2 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ /Well). Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben. Dann folgten Zentrifugation und Messung der IL2-Konzentration im Überstand.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle angemerkt, dass die errechneten Interleukin 2 - Konzentrationen außerhalb der gemessenen Standard-Kurve lagen, die ihren oberen Grenzwert bei 125 pg/ml hat. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine zuverlässige Konzentrationsberechnung bis zu Konzentrationen von 250 pg/ml erfolgen konnte.

Die Entwicklung des Interleukin-2 im Extrazellularraum zeigt eine Sättigungskinetik, die maximale Interleukin-2-Produktion ist bei 5 µg/ml PHA-L schon nahezu erreicht. P2X7-Block hat keinen Einfluss auf die Interleukin 2-Produktion.

Die Werte für die ATP-Konzentration im Extrazellularraum schwanken sehr stark und folgen keinem einheitlichen Trend. Es zeigte sich in mehreren Versuchen ein Trend zu leicht erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen bei höheren stimulierenden PHA-Konzentrationen. Dieser Trend scheint unabhängig von P2X7 zu sein, da er durch WD3C23-Zugabe nicht beeinflusst wird. Der nur geringe Anstieg des ATP im Überstand wird vermutlich auf das Vorhandensein hochaktiver extrazellulärer ATPasen zurückzuführen sein.

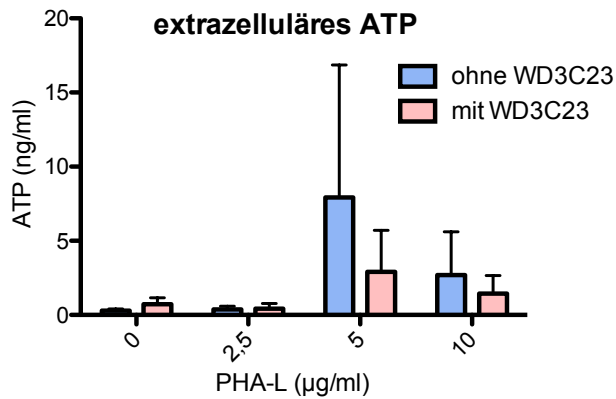


Abb. 14 PHA-L scheint zu erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen zu führen

PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen PHA-L über Nacht stimuliert (siehe „3.5 Stimulation von PBMCs“, Zellzahl $2 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ /Well). Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben. Dann erfolgten Zentrifugation und Messung der ATP-Konzentration im Überstand.

Untersuchungen zur intrazellulären ATP-Konzentration in der CD4-Zell-Subpopulation konnten in diesem Zusammenhang nicht erfolgen, da spätere Versuche die Unzuverlässigkeit der Magnet-Bead-Separation auf Mikrotiterplatten zeigten.

In späteren Versuchen wurde die Bead-Separation der CD4-Zellen mittels Biotin Binder Beads® bezüglich Effektivität und Spezifität untersucht (siehe „4.5.1 Platten und Bead-Tests“). Diese Beobachtungen führten zu der Erkenntnis, dass sinnvolle Aussagen nur dann spezifisch über die CD4-Zellen zu treffen sind, wenn diese vor der Stimulation aufgereinigt und isoliert stimuliert werden. Natürlich können in einem solchen Versuchsaufbau keine Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen stattfinden.

4.3 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen

Die Isolation der CD4-Zellen wurde mittels des FlowComp®-Kits von invitrogen™ aus PBMCs oder Vollblut durchgeführt. Nach jeder Depletion wurde eine FACS-Färbung zur Kontrolle sowohl der aufgereinigten CD4-Zellen als auch des CD4-depletierten Überstandes durchgeführt.

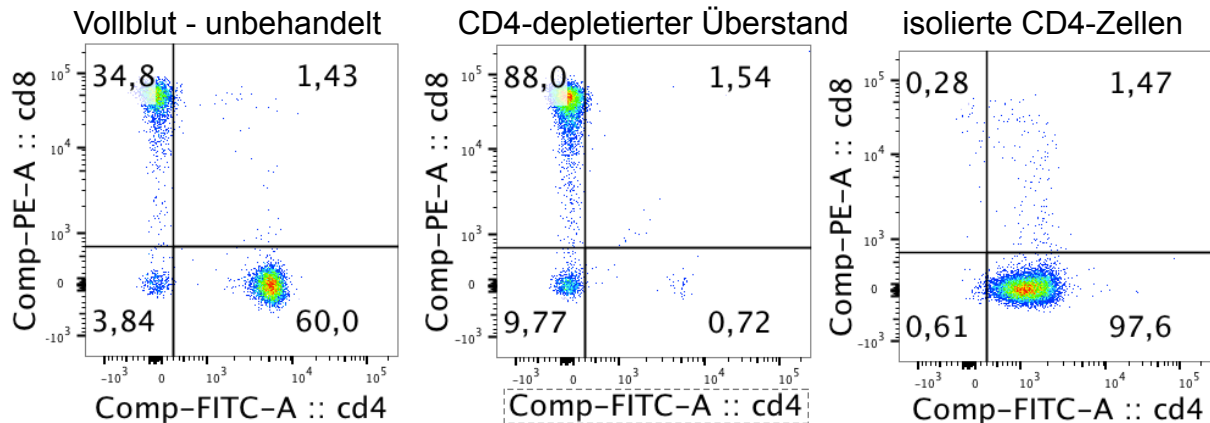


Abb. 15 Die Aufreinigung von CD4-Zellen hat eine hohe Spezifität

Die Aufreinigung von CD4-Zellen aus PBMCs oder aus Vollblut erfolgte streng nach Protokoll des FlowComp® -Kits (siehe „3.22 Isolation von humanen CD4-Zellen aus humanen PBMCs“). Sowohl die aufgereinigten Zellen als auch der Überstand wurden auf CD3, CD4 und CD8 angefärbt. Gating-Strategie: Mittels FSC-A/FSC-H (Forward-Scatter) wurden die Dubletten ausgeschlossen, sodann auf die Haupt-Lymphozyten-Population gated. Schließlich wurden alle CD3⁺ ausgewählt und sind hier dargestellt.

Die CD4-Aufreinigung zeigte gute Ergebnisse sowohl bezüglich der Reinheit der isolierten CD4-Zellen als auch auf die CD4-Depletion aus dem Überstand bezogen.

4.3.1 Verhalten auf unterschiedliche Stimuli

Zunächst wurde die Entwicklung des extra- und intrazellulären ATP und der Interleukin 2-Produktion auf T-Zell-Rezeptor-Stimulation untersucht und die Reaktion auf verschiedene Stimuli gemessen.

Im Extrazellarraum war in keinem der Ansätze ATP messbar, die ATP-Messung im Zelllysat zeigte folgende Resultate:

intrazelluläres ATP (relativ zu unstimuliert)

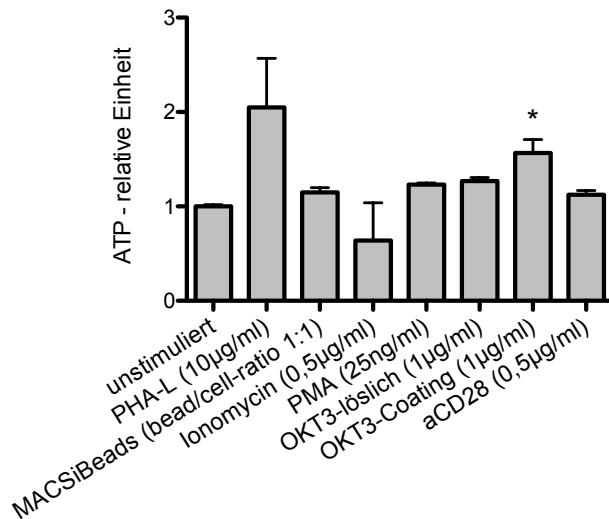


Abb. 16 Die intrazelluläre ATP-Konzentration steigt am stärksten nach PHA-L, schwächere Anstiege nach immobilisiertem OKT3 und MACSiBead-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Am nächsten Tag erfolgten dann Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Messung der ATP-Konzentration im Lysat (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Darstellung aus mehreren Versuchen kombiniert. Um die unterschiedlichen Zellzahlen pro Well in den unterschiedlichen Versuchen vergleichbar zu machen, wurden die Relationen zum unstimulierten Ansatz dargestellt. * $p < 0,05$

Nur das lösliche PHA-L verursacht einen relevanten Anstieg der ATP-Konzentration im Lysat (wenn auch nicht signifikant). Die ATP-Konzentrationen nach Stimulation mittels beschichtetem OKT3 ist nur leicht, aber signifikant höher als auf unstimuliertem Niveau (Faktor 1,6). Die Stimulation mittels löslichem OKT3 hat keinen Effekt auf die intrazelluläre ATP-Konzentration.

Bezüglich der Interleukin 2-Produktion zeigt sich ein anderes Bild:

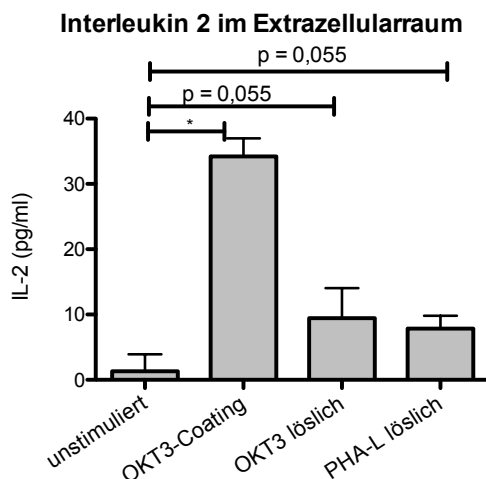


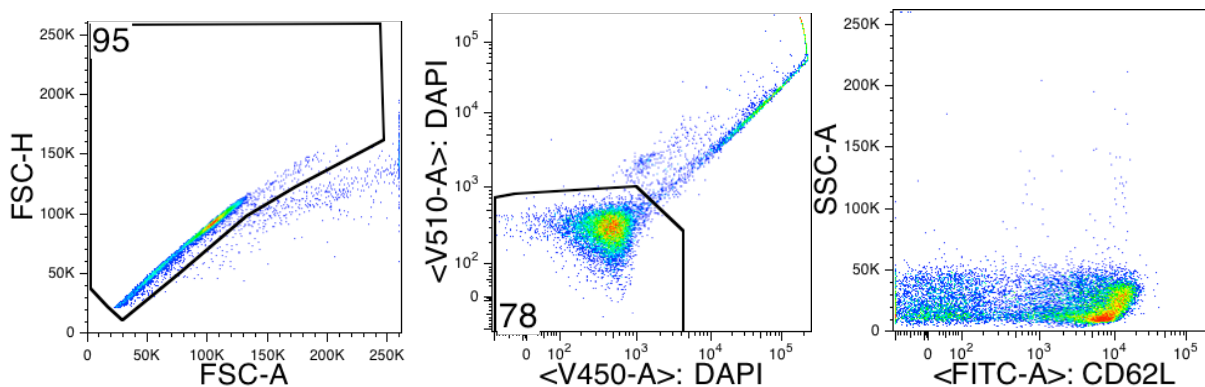
Abb. 17 Immobilisiertes OKT3 ist der potenteste Stimulus für die Interleukin 2-Produktion

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert, am nächsten Tag erfolgten dann Zentrifugation und Messung der IL2-Konzentration im Überstand (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“, Zellzahl $0,4 \cdot 10^5$ /Well). Die Darstellung ist aus mehreren Versuchen kombiniert. Um die unterschiedlichen Zellzahlen pro Well in den unterschiedlichen Versuchen vergleichbar zu machen, wurden die Relationen zum unstimulierten Ansatz dargestellt. * $p < 0,05$

Die höchste Interleukin 2-Produktion resultiert aus immobilisiertem OKT3 als Stimulus, dennoch lässt sich auch auf lösliches OKT3 und auf PHA eine erhöhte Interleukin 2-Produktion erkennen (nicht signifikant). OKT3-Stimulation führt also vor allem zu einer Interleukin 2-Produktion, während eine Stimulation der CD4-Zellen mit PHA-L vor allem zu einem Anstieg des intrazellulären ATP führt.

Außerdem wurde die Entwicklung verschiedener Oberflächenmarker mittels FACS-Färbung untersucht.

Zunächst ist die Gating-Strategie für die Analyse der medianen Fluoreszenzintensitäten beispielhaft am unstimulierten Ansatz dargestellt: Dazu wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen, anschließend anhand der DAPI-Färbung die lebenden Zellen ausgewählt und diese dann weiter analysiert.



In der CD38-Färbung zeigen sich zwei abgrenzbare Populationen, deren Anteile sich unter den verschiedenen Stimuli verändern. Die Entwicklung kann am besten durch die mediane Fluoreszenzintensität dargestellt werden.

CD38 - mediane Fluoreszenzintensität

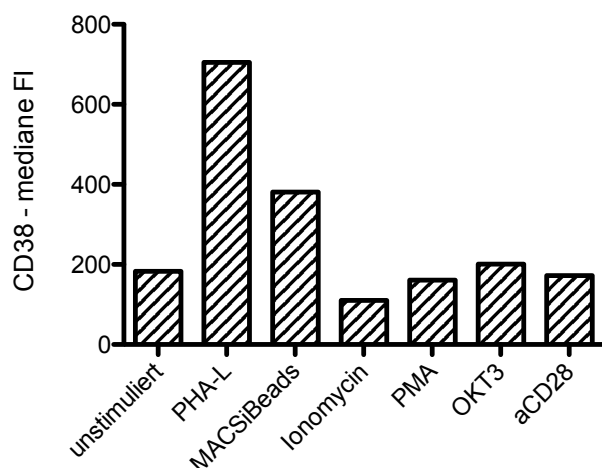


Abb. 18 PHA-L ist der potenteste Stimulus für die CD38-Expression, auch MACSiBead-Stimulation führt zu vermehrter CD38-Expression Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf CD38 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

In der CD4-Färbung zeigen sich klare Veränderungen in der medianen Fluoreszenzintensität.

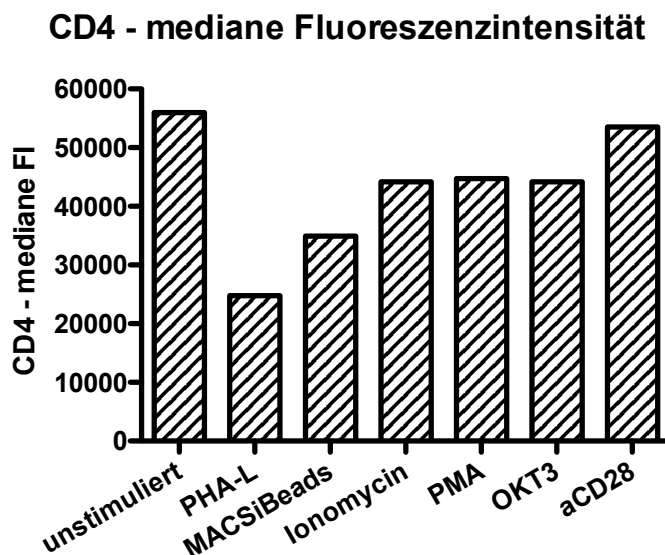


Abb. 19 PHA- und MACSiBead-Stimulation führen zu verminderter CD4-Expression

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf CD4 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Bezüglich der Entwicklung des CD69 zeigt sich ein durchmisches Bild: Teilweise bilden sich positive und negative Populationen, teilweise zeigt sich eine Veränderung der medianen Fluoreszenzintensität einer einzigen homogenen Population.

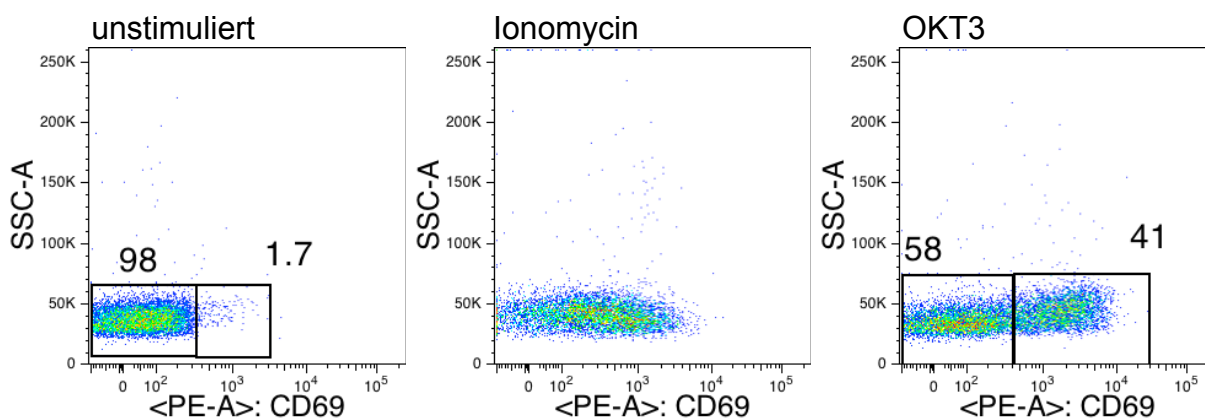


Abb. 20 Je nach Stimulus zeigt die CD69-Expression entweder die Ausbildung zweier Subpopulationen oder eine homogene Population

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf CD69 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Dargestellt sind ausgewählte Dot-Plot-Diagramme nach oben aufgeführtem Gating.

Die Veränderung der CD69-Expression kann am besten durch die mediane Fluoreszenzintensität erfasst werden.

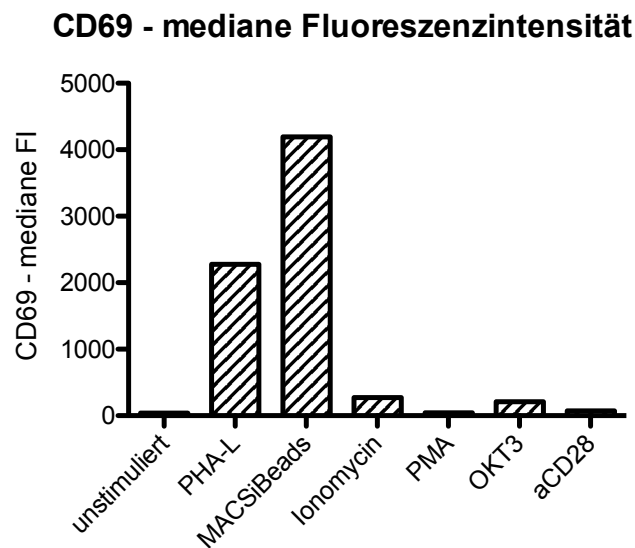


Abb. 21 Nach PHA- und MACSiBead-Stimulation kommt es zu einer Hochregulation von CD69 auf der Zelloberfläche Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf CD69 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Bezüglich der Entwicklung des CD62L zeigt sich eine Ausbildung von CD62L+ und CD62L- Subpopulationen, deren Anteile sich in der medianen Fluoreszenzintensität abzeichnen.

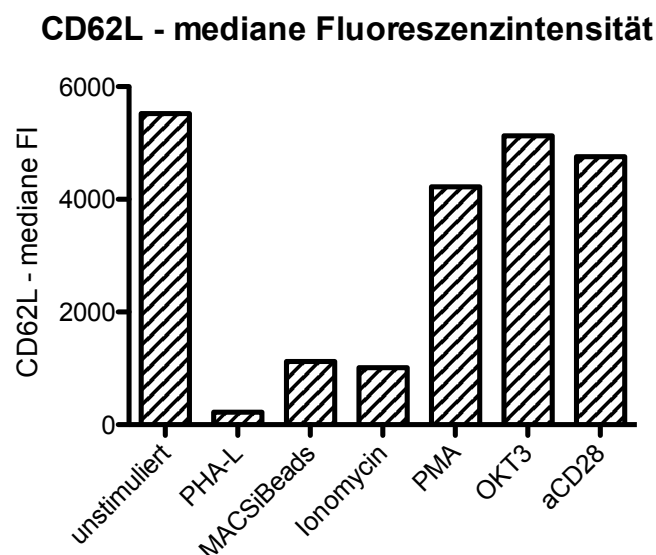


Abb. 22 PHA, MACSiBeads und Ionomycin sind potente Stimuli für das CD62L-Shedding Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf CD62L (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

PHA-L ist der potenteste Initiator des CD62L-Sheddings, einen klaren Effekt haben auch MACSiBead- und Ionomycin-Stimulation. PMA, OKT3 und alleiniges anti-CD28 haben keinen Effekt auf die CD62L-Expression.

Die CD25-Anfärbung zeigt stets homogene Zellpopulationen, deren mediane Fluoreszenzintensitäten sich bei unterschiedlichen Stimuli jedoch verändern.

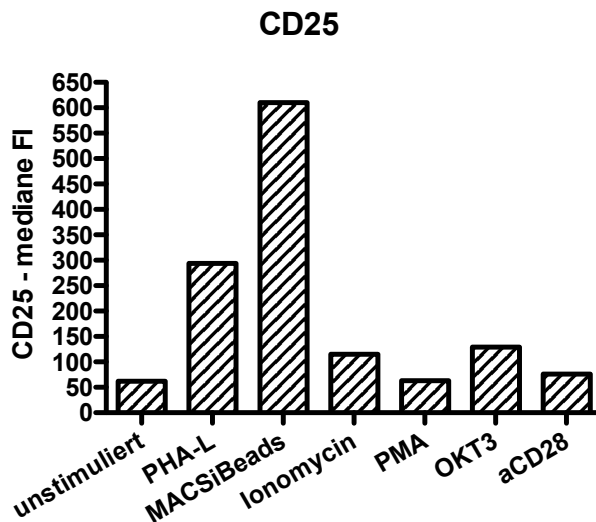


Abb. 23 CD25 wird nach MACSiBead-Stimulation hochreguliert, weniger stark bei PHA-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte dann eine FACS-Färbung der Zellen auf CD25 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Ein ähnliches Bild wie das CD25 zeigt die Entwicklung des MHC-2 (Major Histocompatibility Complex). Auch hier zeigt sich stets eine homogene Population, deren mediane Fluoreszenzintensität sich unter den unterschiedlichen Stimuli verändert.

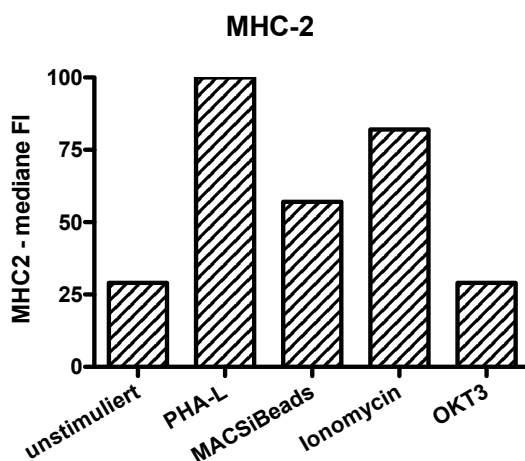


Abb. 24 Starke Hochregulation von MHC-2 nach PHA- und Ionomycin-Stimulation, weniger stark nach MACSiBead-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Färbung der Zellen auf MHC-2 (siehe „3.8 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mit verschiedenen Stimuli“). Nach oben genannter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

PHA-L-Stimulation führt zu einer Hochregulation von CD25, CD69 und CD38 (bezüglich der CD38-Hochregulation ist PHA-L sogar der potenteste Stimulus). Außerdem ist PHA-L der potenteste Stimulus in Bezug auf das CD62L-Shedding. MACSiBead-Stimulation (anti-CD2 / anti-CD3 / anti-CD28) führt zu einer CD25 und CD69-Hochregulation (hier sind die MACSiBeads der maximale Stimulus). Bezüglich des CD62L-Sheddings ist der Effekt der MACSiBeads signifikant, jedoch geringer als bei PHA-Stimulation. Stimulation mittels löslichem OKT3 zeigt lediglich in Bezug auf die CD25- und die CD69-Expression einen Effekt.

4.3.2 Beschichtetes OKT3 als Stimulus

Zur genaueren Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei T-Zell-Rezeptor-Stimulation wurden weitere Versuche mit unterschiedlichen OKT3-Konzentrationen durchgeführt. Vor Ansatz des Versuches mussten die Mikrotiterplatten mit OKT3 beschichtet werden (zur genauen Versuchsdurchführung siehe „3.6 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mittels einer OKT3-Reihe“), zunächst wurden also verschiedene Platten hinsichtlich ihrer Bindungs-Eigenschaften verglichen. Die Versuche wurden auf verschiedenen Platten durchgeführt, die Höhe der gemessenen Antwort-Parameter (ATP und IL-2) ließen dann indirekt Rückschlüsse auf die Effektivität des Stimulus und damit auf die Bindungs-Eigenschaft der Platte zu.

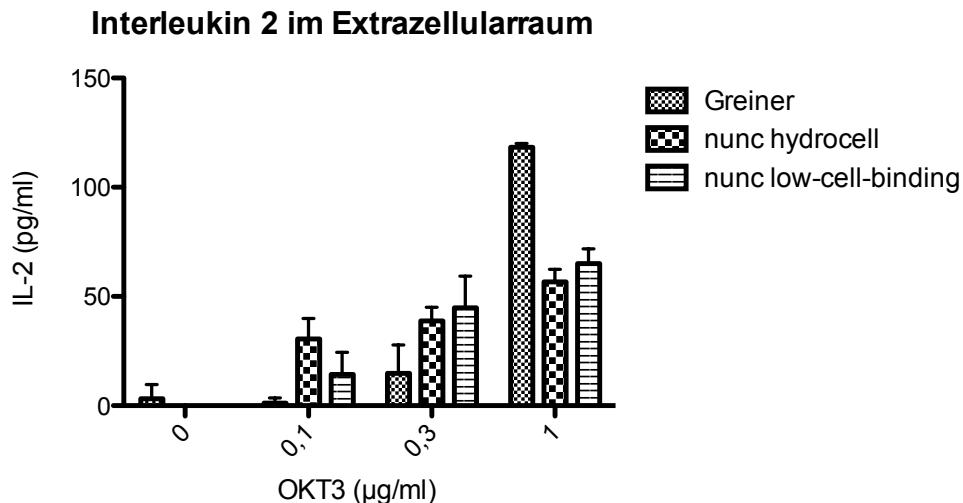


Abb. 25 Die Interleukin 2-Produktion steigt unabhängig von der verwendeten Mikrotiterplatte mit zunehmender OKT3-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten mit steigenden Konzentrationen immobilisierter OKT3 über Nacht stimuliert, anschließend erfolgten Zentrifugation und Messung der IL 2-Konzentration im Überstand (siehe „3.6 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mittels OKT3-Reihe“, Zellzahl $0,5 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ / Well).

Der Anstieg der Interleukin 2-Produktion steigt mit zunehmender OKT3-Beschichtungs-Konzentration an. Bei der höchsten Konzentration an OKT3 von $1 \mu\text{g/ml}$ ist auf der Greiner®-Platte die höchste Interleukin 2-Antwort. Ein Effekt, der vermutlich auf bessere Bindungs-Eigenschaften der Greiner®-Platte zurückzuführen ist. Die Oberflächen der NUNC®-Platten weisen bekanntermaßen schlechtere Protein-Bindungs-Eigenschaften auf.

Das Messergebnis des unstimulierten Ansatzes passt ebenfalls zu diesen Beobachtungen: Trotz fehlendem Stimulus ist auf der Greiner-Platte eine leichte Interleukin 2-Antwort zu sehen. Dieses Phänomen lässt sich am ehesten mit einer leichten Stimulation der Zellen durch die „klebrige“ Oberfläche der Greiner-Platte erklären: Durch das Haften der CD4-Zellen an der Oberfläche der Greiner-Platte findet eine leichte „Vorstimulation“ statt.

Bezüglich des intrazellulären ATP-Gehalts zeigt sich ein ähnliches Bild

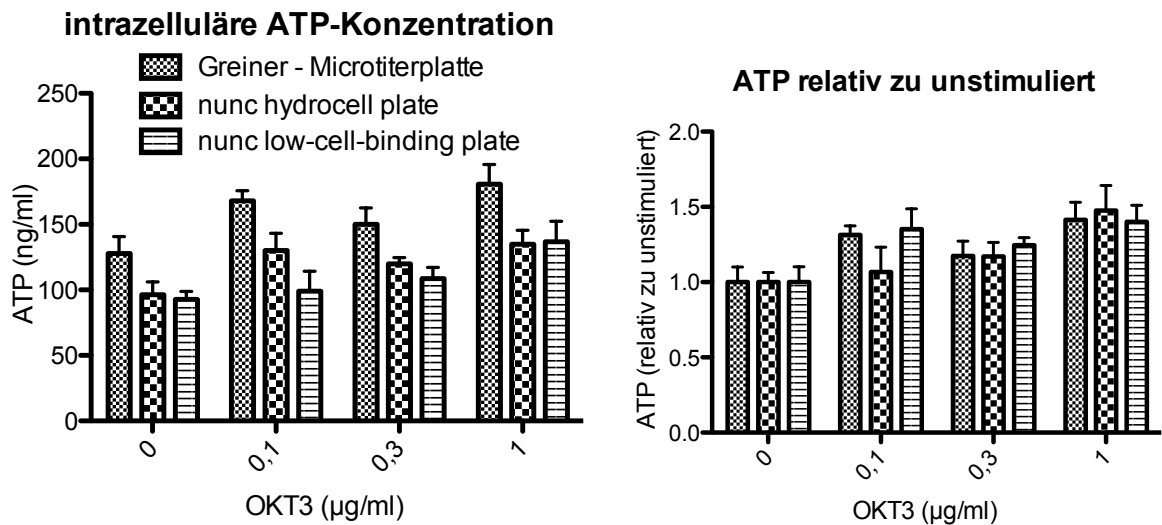


Abb. 26 Der relative Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration nach OKT3-Stimulation ist dosisabhängig und unabhängig von der verwendeten Mikrotiterplatte

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten mit steigenden Konzentrationen von immobilisiertem OKT3 über Nacht stimuliert. Im Anschluss erfolgten Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Messung der ATP-Konzentration im Lysat (siehe „3.6 Stimulation aufgereinigter CD4-Zellen mittels OKT3-Reihe“, Zellzahl $0,5 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ / Well).

links: gemessene absolute ATP-Konzentration im Lysat

rechts: gemessene ATP-Konzentrationen in Relation zum unstimulierten Ansatz der jeweiligen Mikrotiterplatte

Betrachtet man die Entwicklung der relativen Einheiten, so ergibt sich ein ähnliches Bild auf allen Platten: ein kontinuierlicher Anstieg mit zunehmender OKT3-Stimulation mit einem maximalen Anstieg auf das 1,5-fache bei $1 \mu\text{g/ml}$ OKT3-Beschichtung.

Auch die Oberflächenexpression von CD3 und CD4 sowie die Granularität zeigen klar eine Dosisabhängigkeit von der stimulierenden OKT3-Konzentration.

Zusammenfassend lässt sich eine klare Dosisabhängigkeit aller gemessenen Parameter von der stimulierenden OKT3-Konzentration erkennen. Die Greiner®-Platte scheint den NUNC®-Platten bezüglich der Stimulation nicht unterlegen zu sein, die unspezifische Stimulation durch eine „klebrige“ Plattenoberfläche ist vernachlässigbar klein.

4.3.3 PHA und MACSiBeads als Stimulus

Da sich PHA-L und MACSiBeads in den in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Beobachtungen als die potentesten Stimuli mit unterschiedlichen Effekten zeigten, sollte der zeitliche Verlauf nach diesen beiden Stimuli nun näher untersucht werden. Erneut waren keine Aussagen über das extrazelluläre ATP zu machen, lediglich nach 30-60min waren überhaupt kleinste Konzentrationen an ATP im Extrazellularraum nachweisbar.

Der intrazelluläre ATP-Gehalt zeigt folgenden Verlauf:

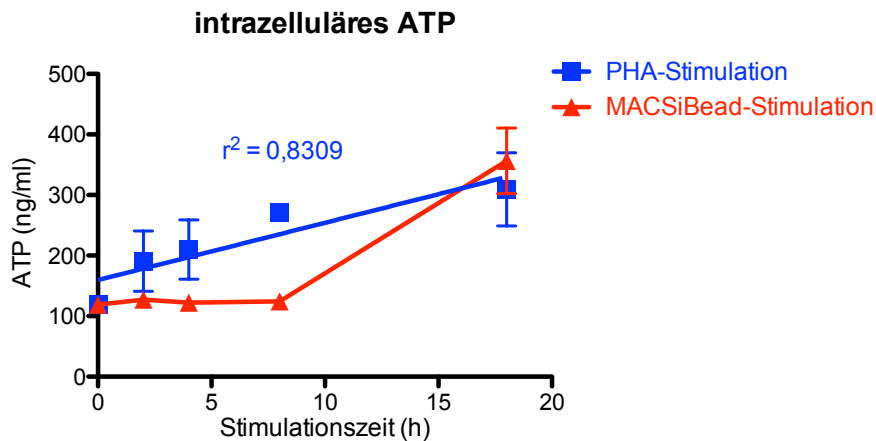


Abb. 27 Der Anstieg des intrazellulären ATP erfolgt nach PHA-Stimulation kontinuierlich, nach MACSiBead-Stimulation sprunghaft Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“, Zellzahl $0,7 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ /Well). Dann erfolgten Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Messung der ATP-Konzentration im Lysat.

Während man nach PHA-Stimulation einen kontinuierlichen Anstieg des intrazellulären ATP-Gehalts über die Zeit sieht, scheint der Anstieg bei Bead-Stimulation „sprunghaft“ zu geschehen. Diese kontinuierliche bzw. sprunghafte Charakteristik konnte in mehreren Versuchen bestätigt werden.

Das Interleukin 2 zeigt ebenfalls eine charakteristische Entwicklung über die Zeit:

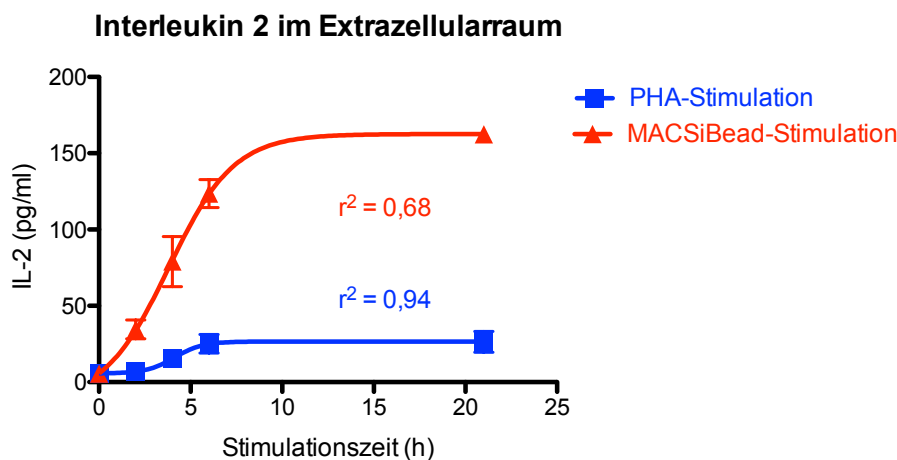
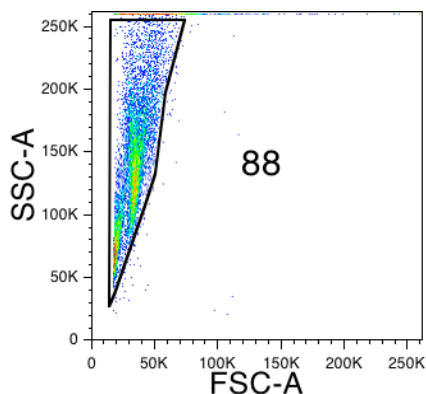


Abb. 28 Die Interleukin 2-Produktion erfolgt vor allem nach MACSiBead-Stimulus Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“, Zellzahl $0,7 \cdot 10^5$ in $200 \mu\text{l}$ /Well). Dann erfolgten Zentrifugation und Messung der Interleukin 2-Konzentration im Überstand. Die Interpolation erfolgte mittels Dose-Response-Kurve.

Es zeigt sich sowohl bei PHA- als auch bei MACSiBeads-Stimulation ein Anstieg des Interleukin 2, der eine Sättigungskinetik zeigt. Der Anstieg bei Bead-Stimulation ist aber ein Vielfaches höher (Faktor ca. 6,1). Die unterschiedliche Entwicklung beider Kurven ist hochsignifikant.

Für die Untersuchung der Oberflächenparameter mittels FACS-Färbung muss bei der Versuchsanordnung eine Besonderheit beachtet werden. Vor dem Gating der Ansätze muss ein Gate definiert werden, indem sich die MACSiBeads befinden, um diese ausschließen zu können. So wurde ein FACS-Röhrchen nur mit MACSiBeads gemessen, anhand dessen man einen Bereich von Messereignissen feststellen konnte, der den MACSiBeads entsprach. Das so gefundene Gate kann auf die Ansätze mit den Zellen übertragen und die Beads so ausgeschlossen werden.

ungefärbte MACSiBeads



88% der Beads werden durch das Gate erfasst, die restlichen Beads „kleben“ auf der Achse und können so erfasst werden.

Die Demonstration der Gating-Strategie soll hier beispielhaft am unstimulierten Ansatz erfolgen:

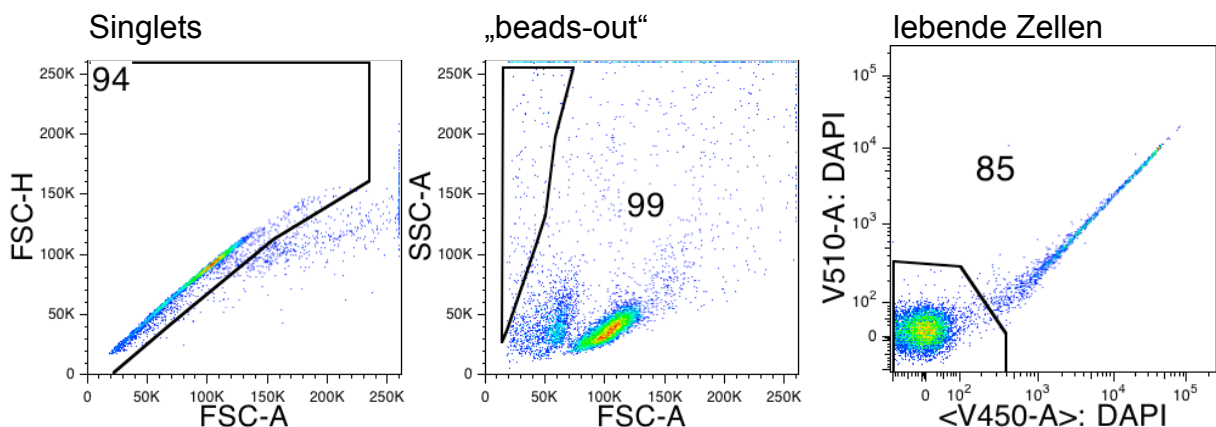


Abb. 29 Gating-Strategie zur FACS-Analyse der Oberflächenmarker

Dargestellt ist die nicht-gegate Kontrolle, in der nur ungefärbte Beads (ohne Zellen) durchflusszytometrisch gemessen wurden. Weiterhin wird die Gating-Strategie anhand des unstimulierten Ansatzes gezeigt. Zunächst wurden die Dubletten ausgeschlossen, dann das durch die Kontrolle definierte Gate auf die Ansätze übertragen, um die Beads auszuschließen. Schließlich wurde auf die lebenden Zellen gated (DAPI-negativ). Zur Berechnung der medianen Fluoreszenzintensitäten wurden anschließend noch die Zellen von der Analyse ausgeschlossen, die sich außerhalb des gemessenen Bereichs für den SSC (Sideward-Scatter) befanden.

Bezüglich der CD38-Expression zeigt sich eine Auffälligkeit dahingehend, dass sich bei der MACSiBead-Stimulation eine Verschiebung der Anteile von CD38-positiv und

CD38-negativen Zellen einstellt, während sich bei der PHA-Stimulation eher eine homogene Population mit wechselnder Fluoreszenzintensität darstellt.

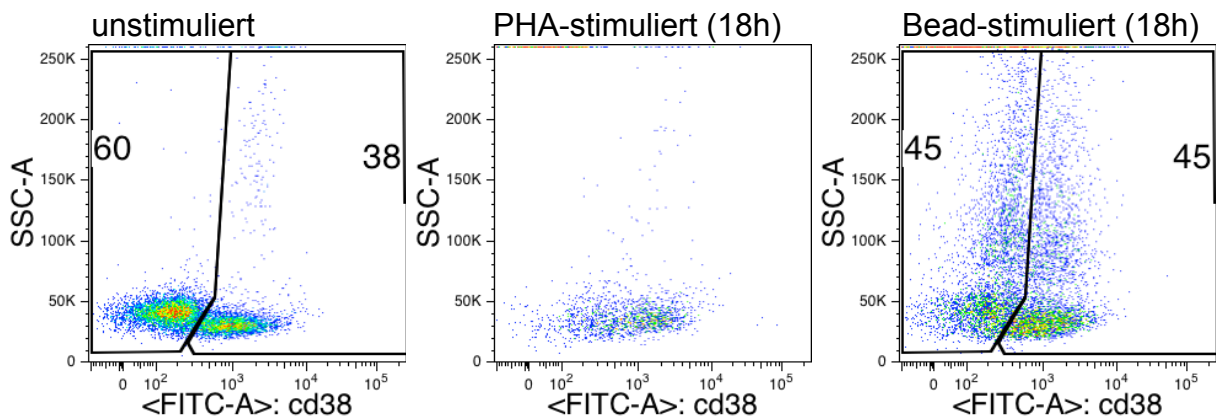


Abb. 30 Bei PHA-Stimulation zeigt sich eine einheitliche Zellpopulation, bei MACSiBead-Stimulation bilden sich CD38+ und eine CD38- Populationen Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“). Im Anschluss erfolgte die FACS-Färbung auf CD38. Dargestellt sind ausgewählte Dot-Plot-Diagramme nach Durchführung oben aufgeführter Gating-Strategie.

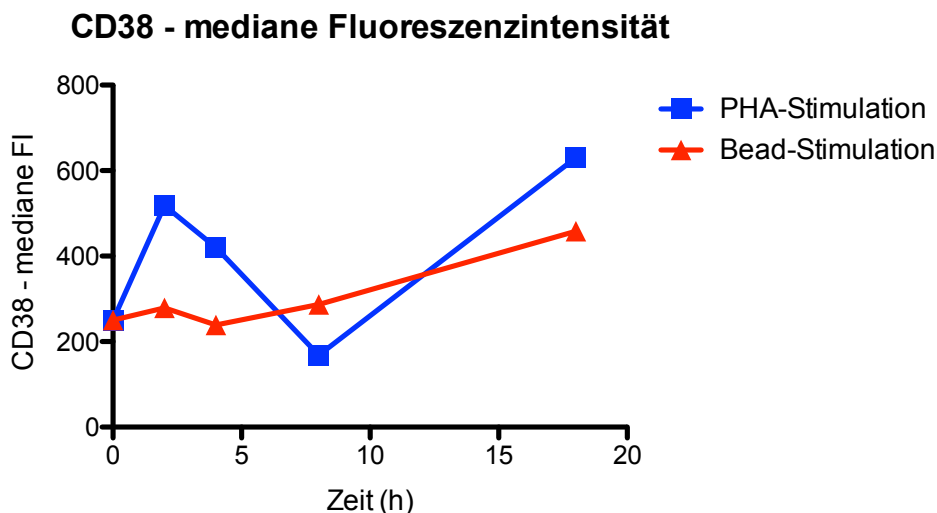


Abb. 31 Nach Bead-Stimulation erfolgt die Hochregulation von CD38, nach PHA-Stimulation ist die CD38-Expression schwankend Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“). Im Anschluss erfolgte die FACS-Färbung auf CD38. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Gut zu sehen ist die Zunahme des Anteils CD38-positiver Zellen bei Bead-Stimulation mit zunehmender Stimulationszeit. Bei den PHA-stimulierten Ansätzen zeigt sich zunächst eine Zunahme der medianen Fluoreszenzintensität nach 2h Stimulationszeit, dann im Folgenden eine Abnahme bis zu 8h nach Stimulation. Nach 18h ist dann erneut ein Anstieg der CD38-Expression zu sehen. Dieser Verlauf konnte in Wiederholungen bestätigt werden.

Die Entwicklung des CD69 weist ein ähnliches Bild auf. Hier zeigt sich sowohl bei PHA- als auch bei MACSiBead-Stimulation eine Ausbildung zweier Populationen (CD69-positiv und -negativ).

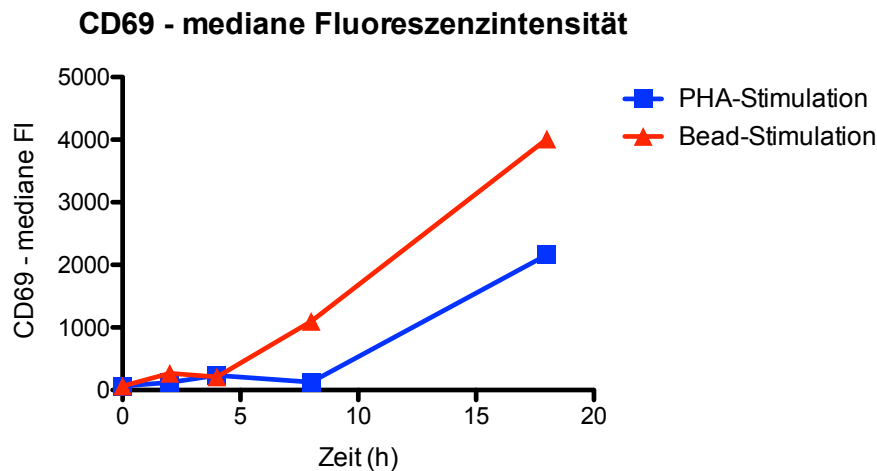


Abb. 32 Sowohl nach PHA als auch nach MACSiBead-Stimulation kommt es zur Hochregulation von CD69 auf der Zelloberfläche Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“). Im Anschluss erfolgte die FACS-Färbung auf CD69. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Auf beide Stimuli zeigt sich nach einer Stimulationszeit von 4 Stunden ein signifikanter Anstieg der CD69-Expression, der bei MACSiBead-Stimulation noch stärker ausgeprägt ist.

Auch bezüglich der CD62L-Expression zeigt sich eine klare Entwicklung zweier Subpopulation (CD62L-positiv und -negativ)

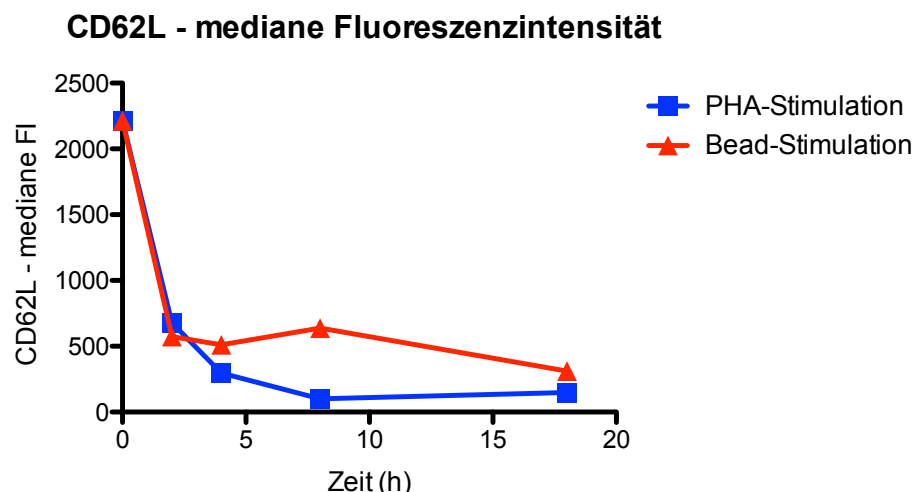


Abb. 33 Das CD62L-Shedding scheint nach PHA-Stimulation schneller die Talsohle zu erreichen als nach MACSiBead-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“). Im Anschluss erfolgte die FACS-Färbung auf CD62L. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Bei beiden Stimuli ist ein klares CD62L-Shedding mit zunehmender Stimulationszeit sichtbar. Der Anteil der CD62L-negativen Zellen nimmt mit der Zeit zu.

In Bezug auf die Expression von CD4 und CD25 zeigt sich über die verschiedenen Stimulationszeiten stets eine homogene Zellpopulation, die über die Zeit ihre Fluoreszenzintensität verändert.

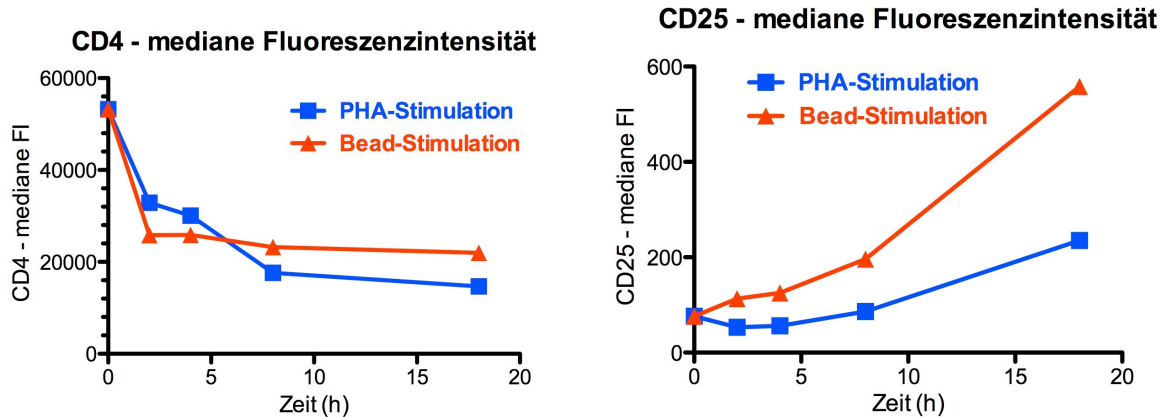


Abb. 34 CD4 wird nach PHA- und MACSiBead-Stimulation herunterreguliert, die CD25-Expression steigt vor allem nach MACSiBead-Stimulation Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit PHA oder MACSiBeads stimuliert (siehe „3.7 Zeitkurven für die Stimulation von CD4-Zellen mittels PHA und MACSiBeads“). Im Anschluss erfolgte die FACS-Färbung auf CD4 und CD25. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Auf beide Stimuli ist eine signifikante Abnahme der CD4-Expression und eine signifikante Zunahme der CD25-Expression erkennbar. Die Zunahme der CD25-Expression ist bei Bead-Stimulation stärker ausgeprägt.

4.3.4 ATP als Kostimulans

Neben der Stimulation über den T-Zell-Rezeptor sollte die Rolle von purinergen Rezeptoren - vorrangig des P2X7-Rezeptors - für die Stimulation der CD4-Zellen untersucht werden. Dazu wurde zusätzlich zur MACSiBead-Stimulation mit ATP in verschiedenen Konzentrationen kostimuliert. Außerdem wurden jeweils parallele Ansätze mit Zugabe des P2X7-Blockers WD3C23 mitgemessen, um eine etwaige Rolle des P2X7-Rezeptors zu eruieren. Zur genauen Versuchsdurchführung siehe „3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP“. Wie beschrieben wurde vor Messung der intrazellulären ATP-Konzentration Apyrase hinzugegeben, um eine Verfälschung durch das exogen hinzugefügte ATP bei der ATP-Konzentrationsbestimmung zu vermeiden. Dafür musste zunächst getestet werden, ob die hinzugegebene Apyrase-Konzentration ausreichend war, um die exogen hinzugefügte ATP-Konzentration von maximal 3mM abzubauen.

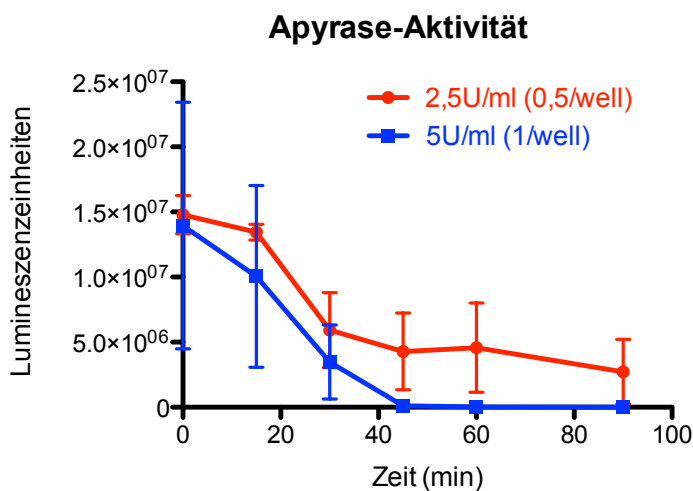


Abb. 35 Apyrase-Konzentrationen von 5U/ml reichen aus um 3mM ATP abzubauen

Zum Test der Apyrase-Aktivität wurde eine Mikrotiterplatte mit Suspensionen von ATP-Konzentrationen von 3mM mit verschiedenen Konzentrationen Apyrase behandelt. Dann erfolgte die Messung der ATP-Konzentration (siehe „3.14 Testen der Apyrase-Aktivität“) zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt sind die Lumineszenz-Einheiten, da keine ATP-Standard-Kurve mitgemessen wurde.

Gut zu sehen ist, dass nur eine Apyrase-Konzentration von 5U/ml in der Lage ist, nach 45min eine ATP-Konzentration von 3mM abzubauen. Nach 45min ist bei einer Apyrase-Konzentration von 5U/ml kaum noch Lumineszenz messbar.

So konnten also wie beschrieben die Zellen über Nacht stimuliert werden und sodann die intrazelluläre ATP-Konzentration sowie die extrazelluläre Interleukin 2-Konzentration bestimmt werden.

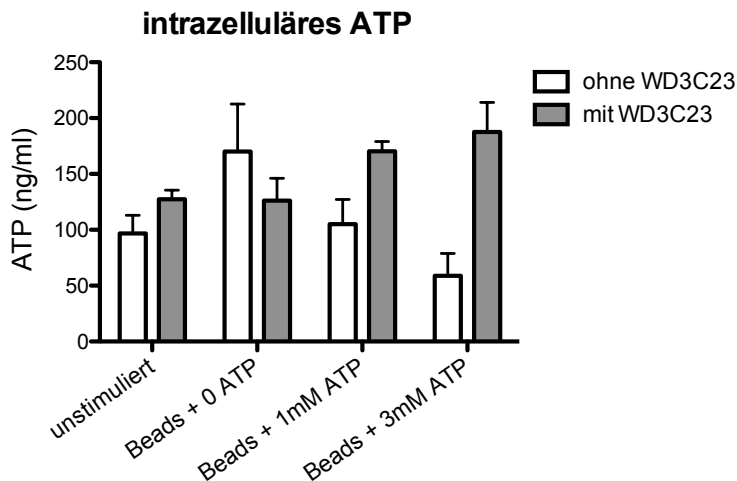


Abb. 36 ATP-Kostimulation führt P2X7-abhängig zu verminderter intrazellulärer ATP-Konzentration Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausplattiert und mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert (siehe „3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP“, Zellzahl $1,2 \cdot 10^5$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ /Well). Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben. Dann erfolgten Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Messung der ATP-Konzentration im Lysat.

Gut sichtbar ist erneut die Zunahme der intrazellulären ATP-Konzentration nach Bead-Stimulation. Bei steigender ATP-Kostimulation nimmt die intrazelluläre ATP-Konzentration aber wieder ab, ein Effekt, der durch den P2X7-Blocker WD3C23 teilweise wieder aufgehoben werden kann. Der Versuch wurde mehrfach auch mit geringeren ATP-Konzentrationen wiederholt.

Betrachtet man alle Durchführungen der Versuchsanordnung so zeigt sich ein sichtbarer Effekt aber erst ab einer ATP-Konzentration von 1mM. Für die kostimulatorischen ATP-Konzentrationen von 1mM und 3mM ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit dem P2X7-Blocker WD3C23 und den Ansätzen ohne ihn feststellbar ($p < 0,05$; Signifikanztest mit paarweisem T-Test).

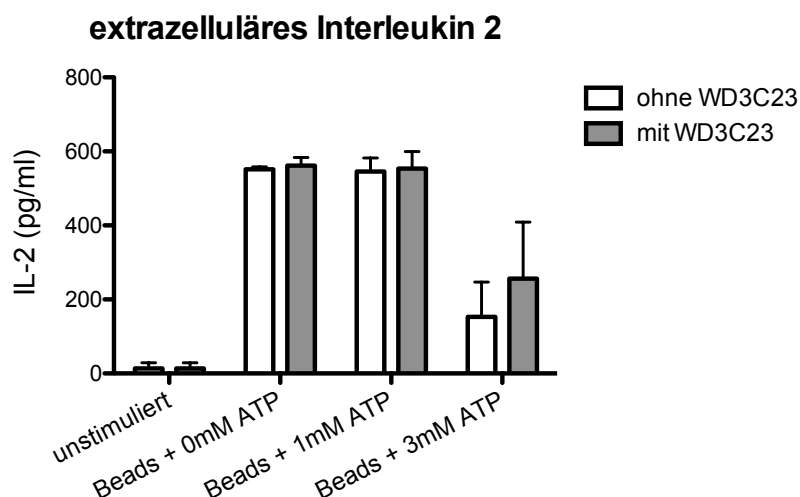


Abb. 37 ATP-Kostimulation führt zu verminderter Interleukin 2-Produktion, teilweise P2X7-abhängig Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausplattiert und mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert (siehe „3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP“, Zellzahl betrug $1,2 \cdot 10^5$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ /Well). Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben. Dann erfolgten Zentrifugation und Messung der Interleukin 2-Konzentration im Überstand.

Der Einfluss der ATP-Kostimulation auf die Interleukin 2-Produktion ist ebenfalls gut zu sehen: Ab 3mM ATP-Kostimulation nimmt die Interleukin 2-Produktion stark ab. Dieser Effekt scheint durch Zugabe des P2X7-Blockers teilweise aufgehoben werden zu können (Effekt in mehreren Versuchen beobachtet).

Für die Darstellung der FACS-Färbungen diverser Oberflächenmarker wird zunächst die Gating-Strategie anhand des unstimulierten Ansatzes gezeigt:

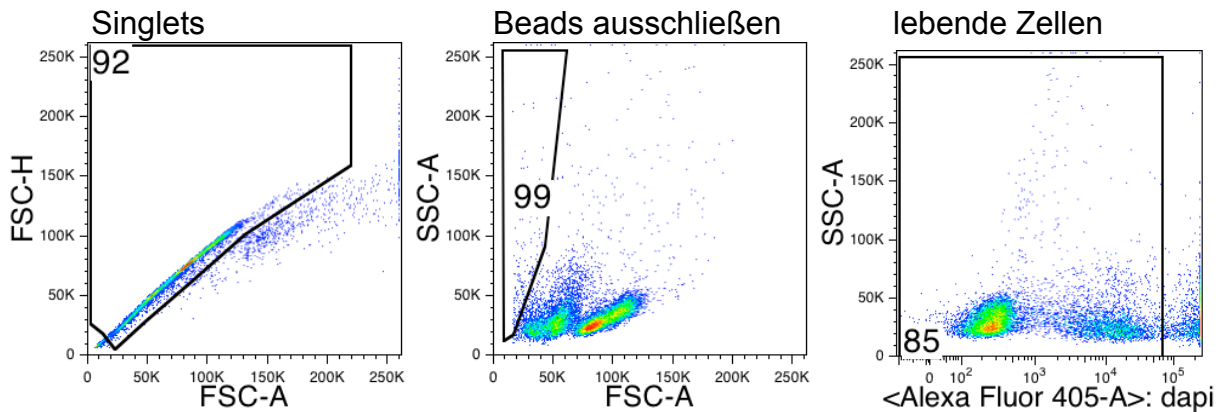


Abb. 38 Gating-Strategie zur FACS-Analyse der Oberflächenmarker

Die Gating-Strategie wird anhand des unstimulierten Ansatzes gezeigt. Zunächst wurden die Dubletten ausgeschlossen, dann das durch die Kontrolle definierte Gate auf die Ansätze übertragen, um die Beads auszuschließen. Schließlich wurde auf die lebenden Zellen gegatet (DAPI-negativ). Zur Berechnung der medianen Fluoreszenzintensitäten wurden außerdem noch die Zellen von der Analyse ausgeschlossen, die sich außerhalb des gemessenen Bereichs für den SSC (Sideward-Scatter) befanden.

Bezüglich der CD62L-Expression zeigte sich das schon bekannte Shedding mit zunehmender kostimulierender ATP-Konzentration, die Ansätze mit P2X7-Blocker neigten zu erhöhter CD62L-Expression, der Effekt war jedoch schlecht reproduzierbar.

CD62L - mediane Fluoreszenzintensität

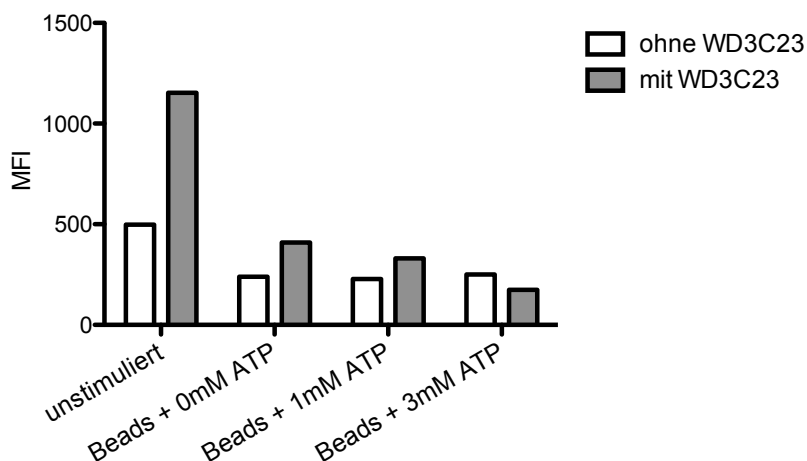


Abb. 39 ATP-Kostimulation führt zu zunehmendem CD62L-Shedding, der Effekt scheint P2X7-vermittelt Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausplattiert und mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert (siehe „3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP“). Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben. Dann erfolgte eine FACS-Färbung auf CD62L. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

Schließlich wurde der durch Annexin erfassbare Phosphatidylserin-Shift unter ATP-Kostimulation untersucht: Dieser war mit zunehmender ATP-Konzentration stärker ausgeprägt. Die Versuchsansätze mit P2X7-Blockade zeigten widersprüchliche Ergebnisse, sodass hier keine konkreten Aussagen getätigt werden können.

Annexin - mediane Fluoreszenzintensität - Ansätze ohne WD3C23

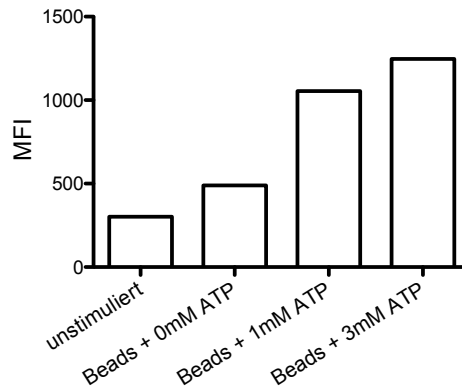


Abb. 40 ATP als Kostimulans führt dosisabhängig zu vermehrtem Phosphatidylserin-Shift

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausplattiert und mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert (siehe „3.10 Stimulation von CD4-Zellen mit MACSiBeads und ATP“). Dann erfolgte eine FACS-Färbung mittels Annexin. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität berechnet.

ATP als Kostimulans führt also zu vermindertem intrazellulärem ATP, verminderter Interleukin 2-Sekretion sowie zu vermehrtem CD62L-Shedding und Phosphatidylserin-Shift. Der Abfall des intrazellulären ATP, der IL2-Sekretion und der CD62L-Expression können zumindest teilweise durch einen P2X7-Block antagonisiert werden.

4.3.5 ATP als Kostimulans und Einfluss des A2A-Rezeptors

Neben dem auto- und parakrinen Feedback wird ATP auch über extrazelluläre ATPasen zu Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und schließlich Adenosin abgebaut. Auch Adenosin hat wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben einen auto- und parakrinen Effekt auf Lymphozyten, im Gegensatz zu den Purinnukleotiden allerdings vorwiegend inhibierend. A2A ist einer dieser Adenosin-Rezeptoren, der auf CD4-Zellen exprimiert wird (siehe „1.3 Abbauprodukte des ATP und ihre Wirkung“).

Um den Effekt dieser A2A-Rezeptor-Stimulation durch Adenosin zu untersuchen, wurden Versuchsansätze mit dem A2A-Blocker SCH58261 durchgeführt. Ähnlich der Versuchsanordnung mit dem P2X7-Blocker WD3C23 wurden Zellen mit MACSiBeads und verschiedenen Konzentrationen an ATP stimuliert (siehe zum Vergleich den vorherigen Abschnitt 4.3.4 „ATP als Kostimulans“). Hinzu kamen unterschiedliche Konzentrationen des A2A-Blockers SCH58261. Zur genauen Versuchsdurchführung siehe „3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block“. Erneut wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt und die extrazelluläre Interleukin 2-Konzentration gemessen.

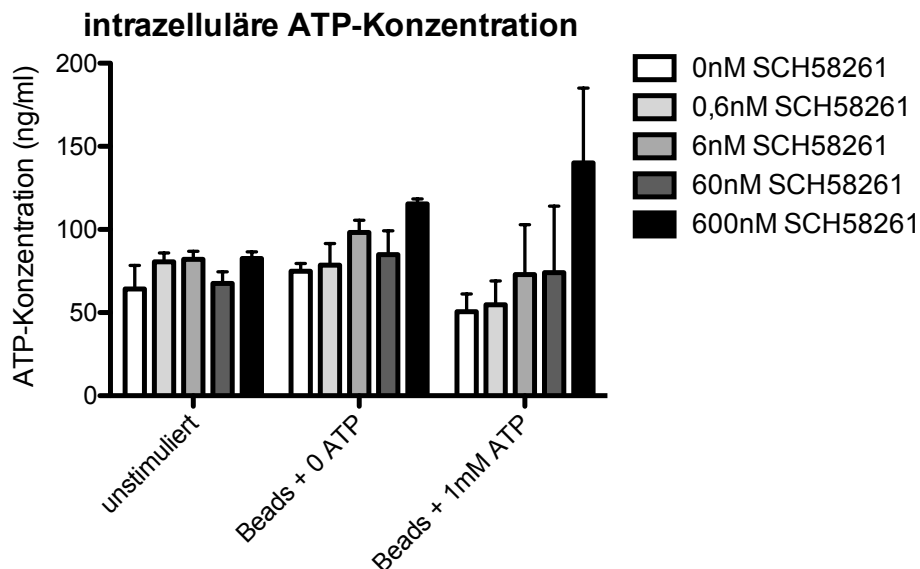


Abb. 41 Ein A2A-Block kann den ATP-stimulierten Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration abfedern Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen des A2A-Blockers SCH58261 hinzugegeben (siehe „3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block“, Zellzahl $1 \cdot 10^5$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ /Well). Nach Stimulation erfolgten Zentrifugation, Lyse des Zellpellets und Messung der ATP-Konzentration im Lysat.

Der Anstieg des intrazellulären ATP mit steigender A2A-Blocker-Konzentration ist signifikant ($p < 0,05$, 2-way ANOVA). Bei ATP-Kostimulation kann man den schon beschriebenen Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration beobachten. Auch dieser Abfall kann durch A2A-Rezeptor-Block antagonisiert werden.

Auch bezüglich der Interleukin 2-Produktion zeigt SCH58261 einen Effekt: Bei A2A-Rezeptor-Block sind tendenziell höhere IL-2-Konzentrationen messbar. Ferner wird die Beobachtung früherer Untersuchungen bestätigt, dass eine ATP-Kostimulation von 3mM die IL2-Produktion hemmt. Auch hier muss einschränkend erwähnt werden, dass die gemessenen IL-2-Konzentrationen außerhalb des Bereiches der

Standardkurve liegen (oberer Grenzwert 125pg/ml) und deshalb in ihrer absoluten Höhe kritisch betrachtet werden müssen.

Interleukin 2 im Extrazellularraum

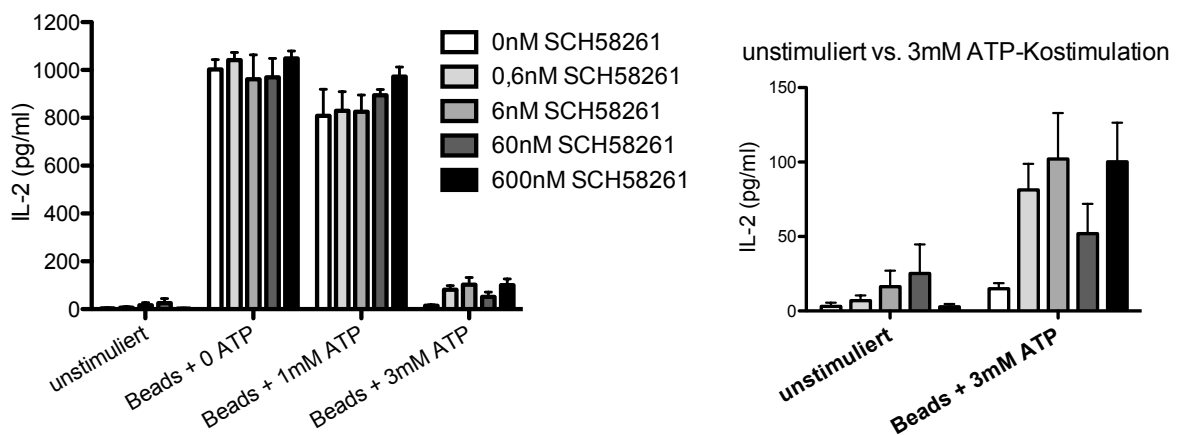


Abb. 42 Die Interleukin 2-Produktion ist bei A2A-Block signifikant erhöht

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen des A2A-Blockers SCH58261 hinzugegeben (siehe „3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block“, Zellzahl $1 \cdot 10^5$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ /Well). Anschließend erfolgten Zentrifugation und Messung der Interleukin 2-Produktion im Überstand.

Auch die Oberflächenexpression von CD62L weist eine interessante Entwicklung auf. Zu seiner Untersuchung wird die oben beschriebene Gating-Strategie angewandt: Ausschluss der Dubletten und Beads, dann Selektion der lebenden Zellen (DAPI-negativ).

CD62L - mediane Fluoreszenzintensität

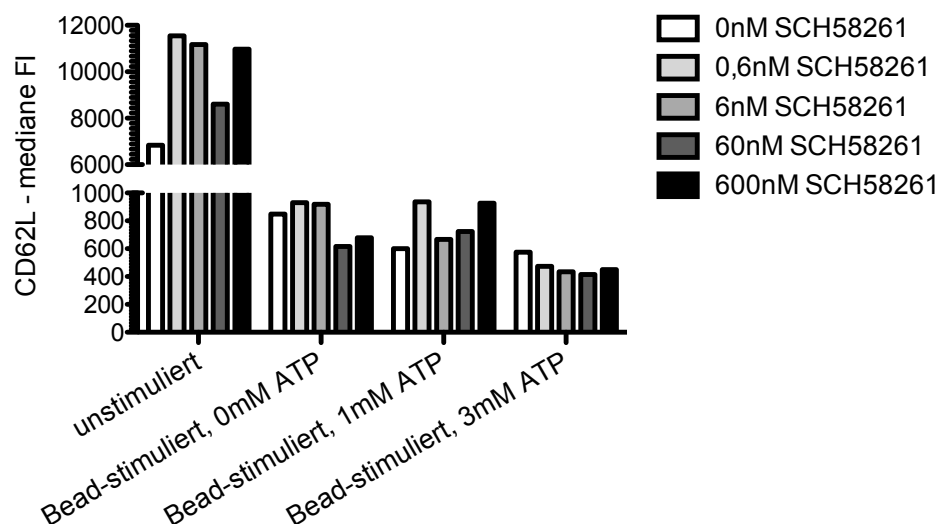


Abb. 43 A2A-Blockade hat keinen Effekt auf das ATP-induzierte CD62L-Shedding

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen des A2A-Blockers SCH58261 hinzugegeben (siehe „3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block“). Dann erfolgte eine FACS-Färbung auf CD62L. Nach oben aufgeführter Gating-Strategie wurde dann die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet.

Gut zu sehen ist das stimulationsabhängige CD62L-Shedding. Dieses Shedding nimmt mit steigender ATP-Kostimulation signifikant zu ($p < 0,0001$, 2-way-ANOVA). Der A2A-Block hat keinen Effekt auf das Ausmaß des CD62L-Sheddings.

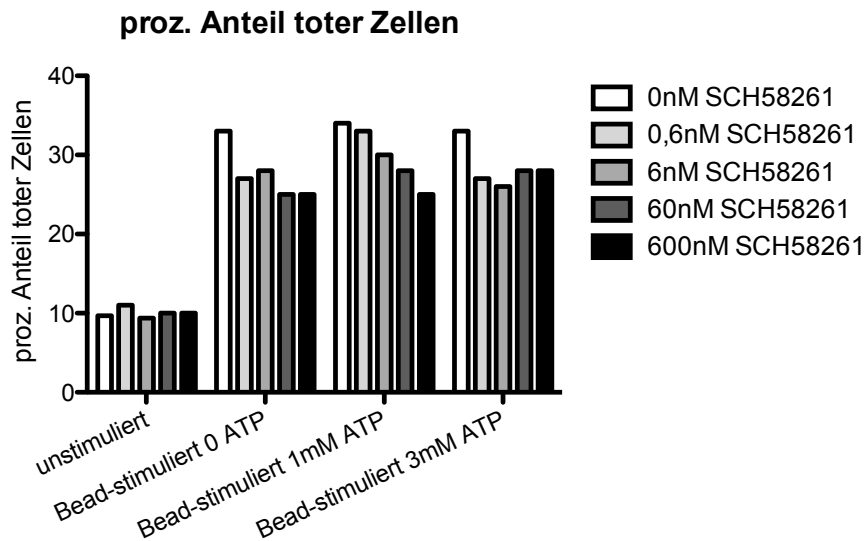


Abb. 44 A2A-Block hat einen protektiven Effekt gegen Zelltod

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit MACSiBeads sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen über Nacht stimuliert. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen des A2A-Blockers SCH58261 hinzugegeben (siehe „3.11 Stimulation von CD4-Zellen mit A2A-Block“). Dann erfolgte eine FACS-Färbung mittels DAPI und die Bestimmung der toten Zellen (DAPI-positiv) nach Ausschluss der Dubletten und der MACSiBeads.

Klar sichtbar ist der zunehmende Zelltod bei Bead-Stimulation ($p < 0,0001$, 2-way-ANOVA). Der A2A-Blocker SCH58261 hat einen protektiven Wert auf die Zellen ($p < 0,05$, 2-way ANOVA).

4.4 Untersuchung der Proliferation humaner PBMCs

Nach der Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimuli und Blockaden auf ATP, Interleukin 2 und Oberflächenmoleküle wurde nun der Einfluss auf die Proliferation nicht isolierter CD4-Zellen untersucht. Zur genauen Durchführung siehe „3.12 Proliferationsuntersuchungen von PBMCs“. Untersucht wurde der Effekt von ATP auf die Proliferation sowie die Blockade des P2X7-Rezeptors durch WD3C23 oder des A2A-Rezeptors durch SCH58261.

Die Messung der Proliferation wurde mittels des Proliferations-Farbstoffs eFluor 670 durchgeführt, die Messungen fanden an den Tagen 3-6 nach Stimulation statt.

Für das Gating wird beispielhaft der Ansatz der unstimulierten Zellen 3 Tage nach Stimulation dargestellt:

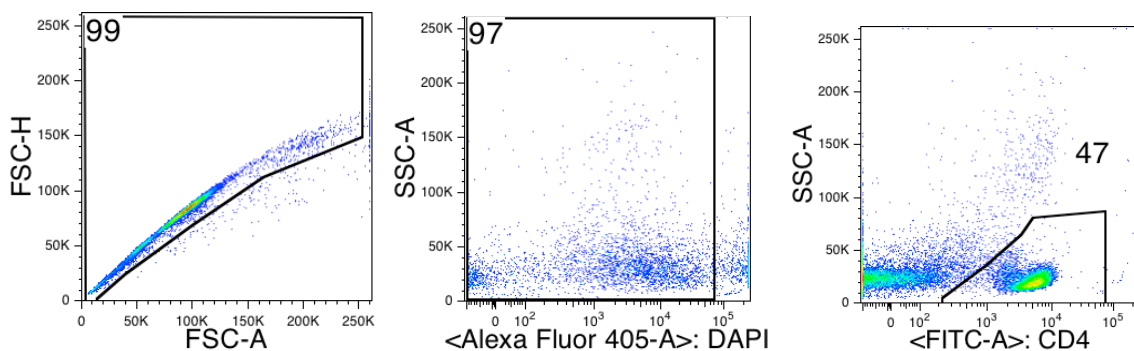
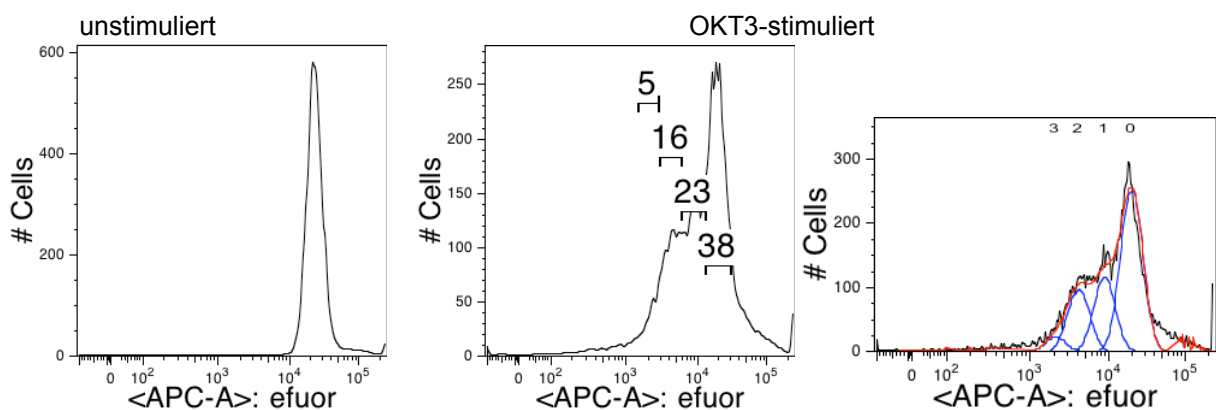


Abb. 45 Gating-Strategie zur FACS-Analyse der Oberflächenmarker

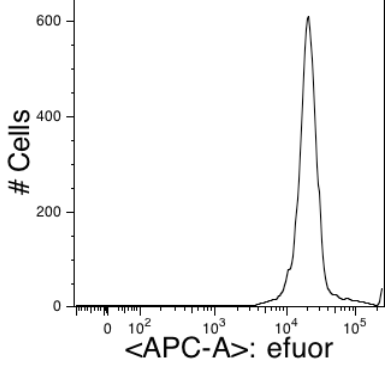
Humane PBMCs wurden mit eFluor beladen und mittels immobilisiertem OKT3 zur Proliferation angeregt. Teilweise wurden verschiedene Substanzen zugegeben (siehe „3.12 Proliferationsuntersuchungen von PBMCs“). An verschiedenen Tagen nach Stimulation wurden einige Ansätze fluorezenzzytometrisch analysiert. Die Gating-Strategie ist hier beispielhaft am unstimulierten Ansatz dargestellt: Ausschluss der Dubletten, dann Selektion der lebenden Zellen (DAPI-negativ) und schließlich Auswahl der CD4-Zellen.

Im Folgenden sind die selektierten CD4+ Lymphozyten ausgewählter Ansätze aufgeführt.

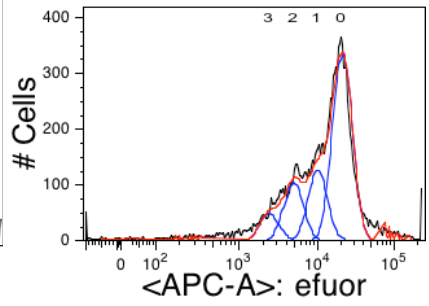
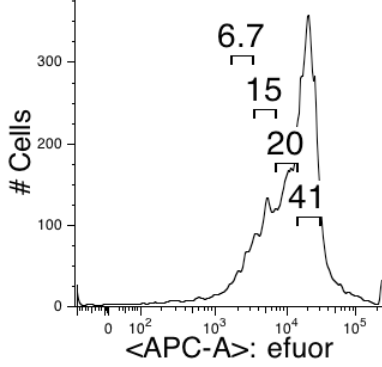
Tag 3 nach Stimulation:



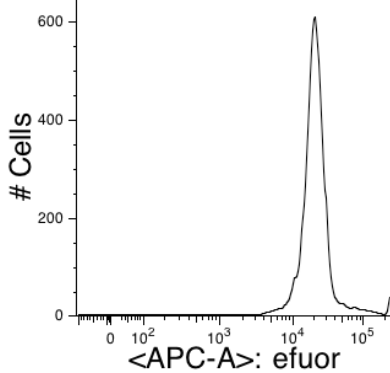
OKT3-stimuliert + P2X7-Block



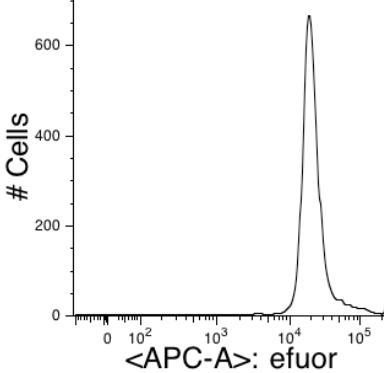
OKT3-stimuliert + A2A-Block



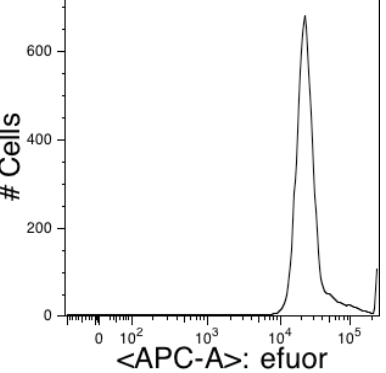
OKT3-stimuliert + 3mM ATP



OKT3, 3mM ATP + P2X7-Block

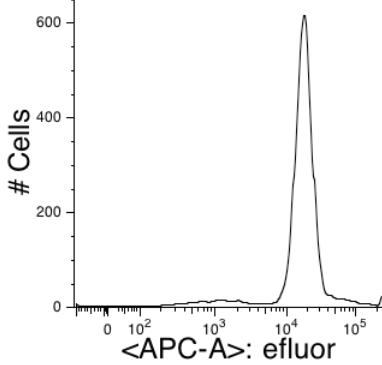


OKT3, 3mM ATP + A2A-Block

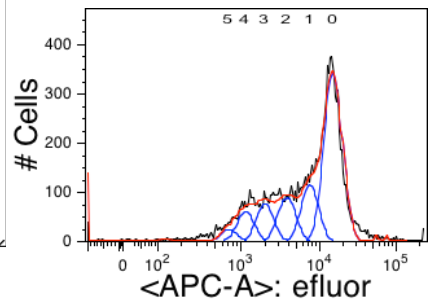
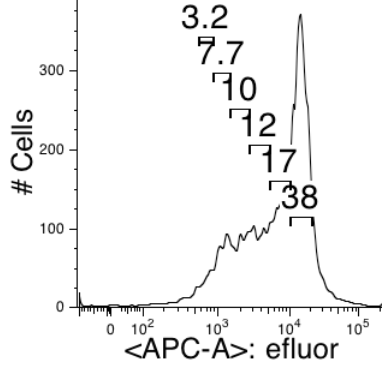


Tag 6 nach Stimulation

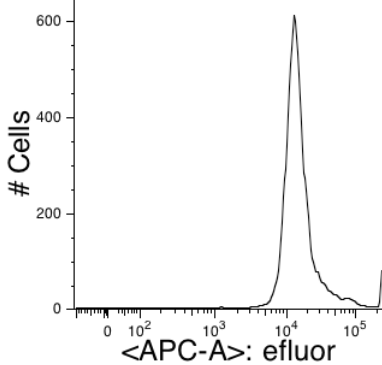
unstimuliert



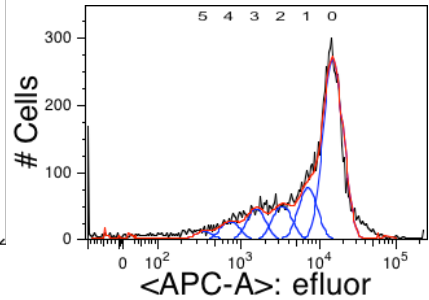
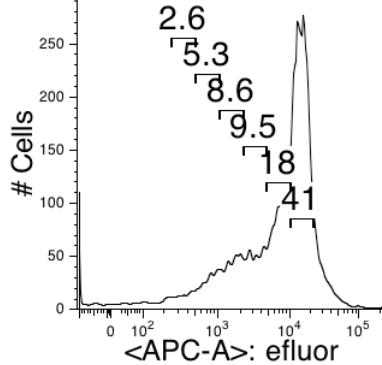
OKT3-stimuliert



OKT3-stimuliert + P2X7-Block



OKT3-stimuliert + A2A-Block



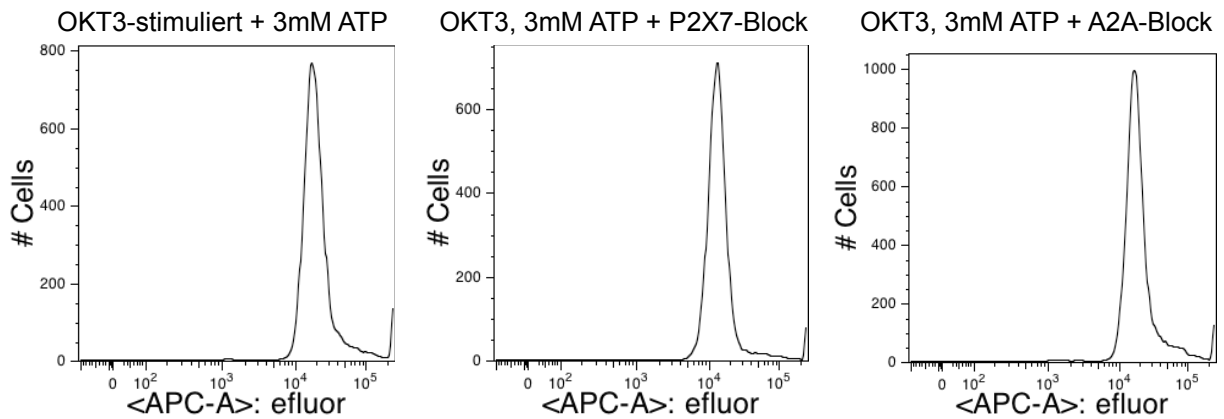


Abb. 46 P2X7-Block und ATP hemmen die Proliferation humaner PBMC

Humane PBMCs wurden mit eFluor beladen und auf Mikrotiterplatten mittels immobilisiertem OKT3 zur Proliferation angeregt. Teilweise wurden verschiedene Substanzen zugegeben (siehe „3.12 Proliferationsuntersuchungen von PBMCs“). An verschiedenen Tagen nach Stimulation wurden einige Ansätze fluoreszenzzytometrisch analysiert. Nach oben durchgeführter Gating-Strategie wurde anhand der efluor-Färbung der CD4-Zellen ihre Proliferationsrate analysiert.

Die Ansätze am 4. und 5. Tag zeigten keine Besonderheiten, auf ihre Darstellung kann in diesem Rahmen also verzichtet werden.

Die Proliferation kann durch ATP vollständig inhibiert werden, ebenso durch P2X7-Block. Der A2A-Inhibitor hat keinen signifikanten Effekt gegenüber dem stimulierten Ansatz ohne Blockade. Es zeigte sich zwar eine Tendenz zu verminderten Proliferationsindizes, der Effekt war aber nicht signifikant.

Das Blockieren der Proliferation durch eine ATP-Kostimulation kann weder durch einen P2X7-Block (WD3C23-Zugabe) noch durch einen A2A-Block (SCH58261-Zugabe) aufgehoben werden.

4.5 Versuche mit dem Cylex™ ImmuKnow®-Kit

Das ImmuKnow®-Kit der Firma Cylex™ ist ein kommerzielles Kit zur Bestimmung des Immunstatus eines Patienten, das unter anderem in der medizinischen Forschung aber auch zur Verlaufskontrolle organtransplantierte Patienten zum Einsatz kommt. Es beruht auf der Messung der intrazellulären ATP-Konzentration in CD4-Zellen vor und nach Stimulation mittels PHA. Zur genauen Beschreibung des Assays siehe „1.5 Die T-Zell-Funktion als Marker zur Bestimmung des Immunstatus“.

Um neben CD4+ ggf. auch andere T-Zell-Subpopulationen untersuchen zu können, wurden zunächst die Bedingungen für die Aufreinigung bestimmter Zell-Subpopulationen unter Verwendung frei verkäuflicher Materialien (Mikrotiterplatten und Magnet-Beads) untersucht.

4.5.1 Platten- und Bead-Tests

Zunächst wurden einige Mikrotiterplatten auf unspezifische Bindungseigenschaften hin untersucht. Dazu wurden sowohl Vollblut als auch PBMCs auf unterschiedlichen Platten inkubiert und teilweise mit PHA stimuliert - gemäß ImmuKnow®-Protokoll. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells der Platte jedoch nicht der Bead-Separation unterzogen sondern entleert und gewaschen, sodass bei einer idealen „nicht-klebrigen“ Platte keine Zellen im Well und somit kein ATP messbar gewesen sein dürfte.

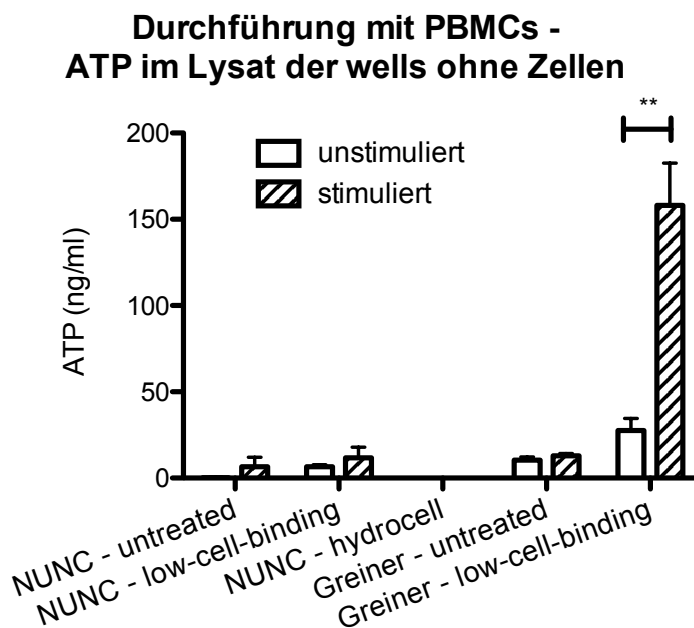


Abb. 47 Unspezifische Bindung von PBMCs an verschiedenen Mikrotiterplatten nach PHA-Stimulation. PBMCs wurden auf verschiedenen Mikrotiterplatten ausplattiert und teilweise mit PHA stimuliert. Die Stimulationszeiten sind an das ImmuKnow®-Protokoll angelehnt. Statt der Separation mittels Magnet-Beads wurden die Wells der Mikrotiterplatten nach der Stimulation entleert. Dann wurden „Zellyse“ und Messung der ATP-Konzentration gemäß ImmuKnow®-Protokoll durchgeführt (siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“, Zellzahl $3 \cdot 10^5$ PBMC in $200 \mu\text{l}$ /Well). Dargestellt sind die ATP-Konzentrationen in den „Lysaten“. Signifikanztests erfolgten mit zweiseitigem T-Test. ***= $p < 0,01$

Durchführung mit Vollblut - ATP im Lysat der wells ohne Zellen

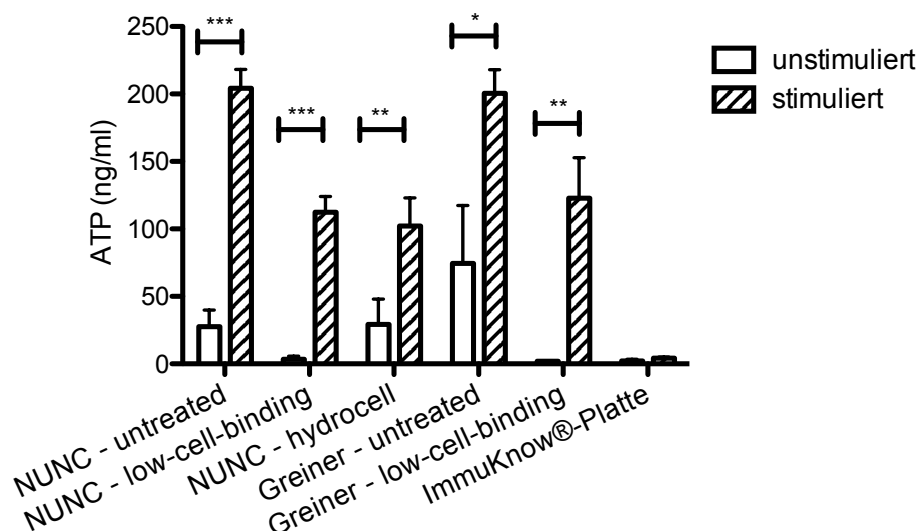


Abb. 48 Unspezifische Bindung von Zellen aus Vollblut an verschiedenen Mikrotiterplatten nach PHA-Stimulation. Vollblut wurde auf verschiedenen Mikrotiterplatten gemäß ImmuKnow®-Protokoll (25µl Vollblut mit 100µl „sample diluent“) ausplattiert und teilweise mit PHA stimuliert. Die Stimulationszeiten sind an das ImmuKnow®-Protokoll angelehnt. Statt der Separation mittels Magnet-Beads wurden die Wells der Mikrotiterplatten nach der Stimulation entleert. Dann wurden „Zellyse“ und Messung der ATP-Konzentration gemäß ImmuKnow®-Protokoll durchgeführt (siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“, Zellzahl $3 \cdot 10^5$ PBMC in 200µl/Well). Dargestellt sind die ATP-Konzentrationen in den „Lysaten“. Signifikanztests erfolgten mittels zweiseitigem T-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

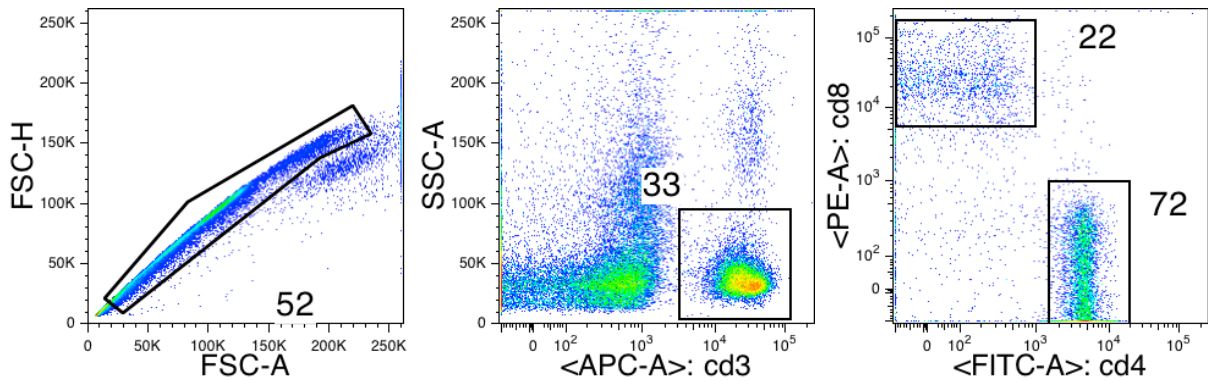
Es zeigte sich, dass an allen getesteten Platten Zellen aus Vollblut unspezifisch haften blieben, außer an der Platte des ImmuKnow®-Kits. Wurde der Versuch mit PBMCs durchgeführt, so zeigte sich nur auf der „low cell binding“-Platte von Greiner ein relevanter Anstieg nach PHA-Stimulation.

Versuche, die Zellen mittels fluoreszierenden Antikörpern anzufärben, die an der Plattenoberfläche unspezifisch haften bleiben, schlugen fehl.

Neben den Platten wurden auch die separat erworbenen Magnet-Beads auf unspezifische Bindungen untersucht. Dies geschah, indem PBMCs stimuliert wurden und mittels Magnet-Beads die CD4-Zellen separiert werden sollten. Zur Kontrolle der Effektivität der Bead-Separation wurden die Überstände nach der Bead-Separation FACS-gefärbt. Je effektiver die Bead-Separation also war, desto weniger CD4-Zellen durften im Überstand nachweisbar sein. Zur Kontrolle wurden immer auch Ansätze mit anti-murin-CD4-Beads mitgemessen. Um einen etwaigen Einfluss der Platte, auf der die Separation stattfand, auszuschließen, wurden verschiedene Mikrotiterplatten getestet (Greiner-Cellstar® und NUNC® hydrocell).

An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die Separation mittels der magnetischen Beads in Analogie zum ImmuKnow®-Protokoll aber entgegen den Herstellerempfehlungen der Magnet-Beads auf den Mikrotiterplatten mit jeweils 25µl Vollblut pro Well stattfand. Die Beipackzettel der Magnet-Bead-Hersteller empfahlen stets die Separation in Falcon-Tubes sowie eine Mindestmenge von 1ml Vollblut mit entsprechend größeren Mengen an Beads. Zur genauen Versuchsdurchführung siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“.

Zunächst sei hier die Gating-Strategie zur FACS-Analyse der Überstände beispielhaft anhand des Überstands des unstimulierten Ansatzes auf der Greiner-Platte dargestellt, der mit anti-human-CD4-Beads separiert wurde.



So wurden die Anteile der CD4+ und der CD8+ Zellen in allen Ansätzen ermittelt:

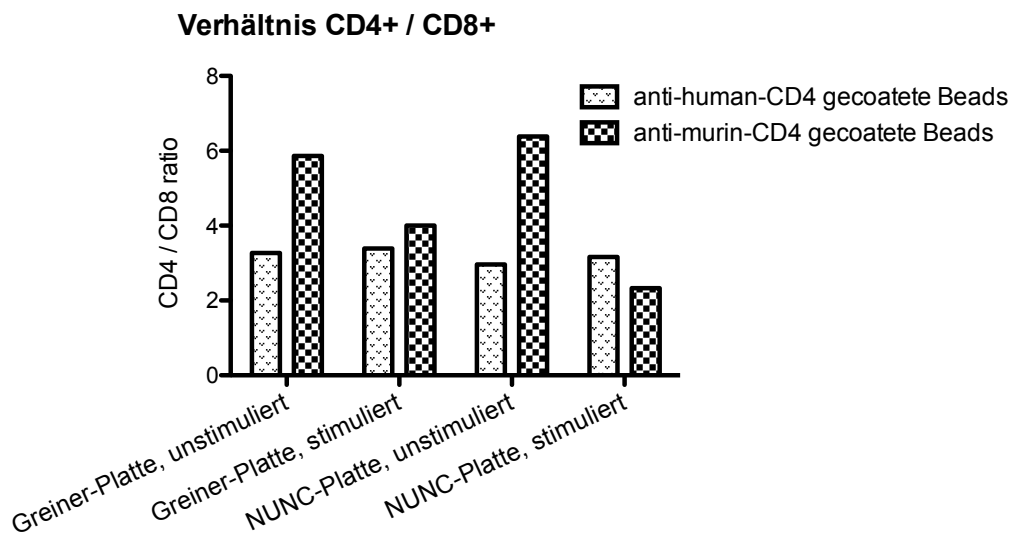


Abb. 49 Die Separation von CD4-Zellen mittels selbstbeschichteter Magnet-Beads auf Mikrotiterplatten funktioniert nicht PBMCs wurden auf Mikrotiterplatten ausplattiert und teilweise mit PHA stimuliert. Nach Stimulation erfolgte das Umsetzen der Zellen auf neue Wells und die Durchführung der Separation mittels verschiedener Magnet-Beads gemäß ImmuKnow®-Protokoll (siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“). Dargestellt ist die FACS-Analyse der Überstände bei der Bead-Separation. Bei erfolgreicher Bead-Separation ist also eine Abnahme des Anteils an CD4+ Zellen zu sehen und damit eine Abnahme des CD4/CD8-Quotienten. Für das Gating wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen, dann die CD3+ Zellen selektiert. Von den CD3+ Zellen wurde dann der prozentuale Anteil der CD4+ und CD8+ Zellen bestimmt.

In den Überständen der Separation mittels anti-human-Beads ist gegenüber den Überständen der Separation mittels anti-murin-CD4-Beads nicht der erwartete niedrigere Anteil CD4+ Zellen zu sehen.

Gleichzeitig wurden die ATP-Konzentrationen im Lysat der an den Beads gebundenen Zellen gemessen.

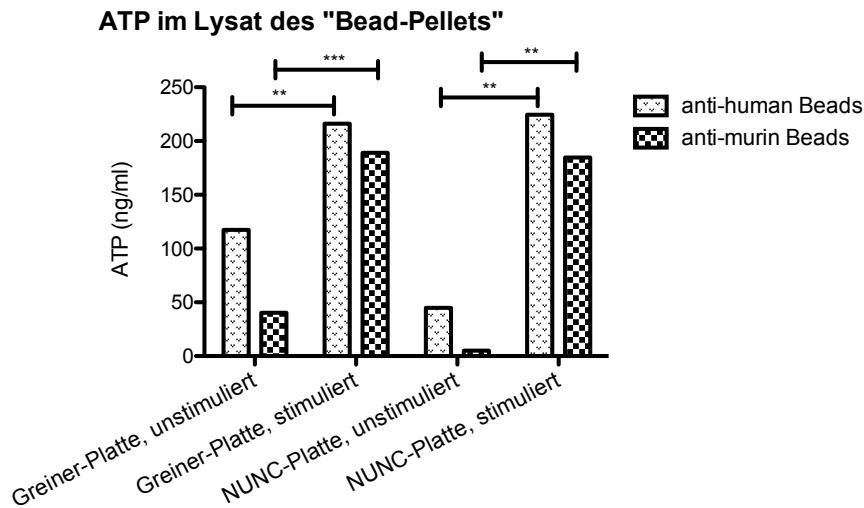


Abb. 50 An selbstbeschichteten Magnet-Beads bleiben unspezifisch Zellen haften, deren ATP-Gehalt bei PHA-Stimulation steigt. PBMCs wurden auf verschiedenen Mikrotiterplatten ausplattiert und teilweise mit PHA stimuliert. Nach Stimulation erfolgte das Umsetzen der Zellen auf neue Wells und die Durchführung der Separation mittels verschiedener Magnet-Beads und Lyse des Pellets gemäß ImmuKnow®-Protokoll. Dann erfolgte die Messung der ATP-Konzentration im Lysat (siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“). Als Negativkontrollen wurden anti-murin-CD4-beschichtete Magnet-Beads verwendet. **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$

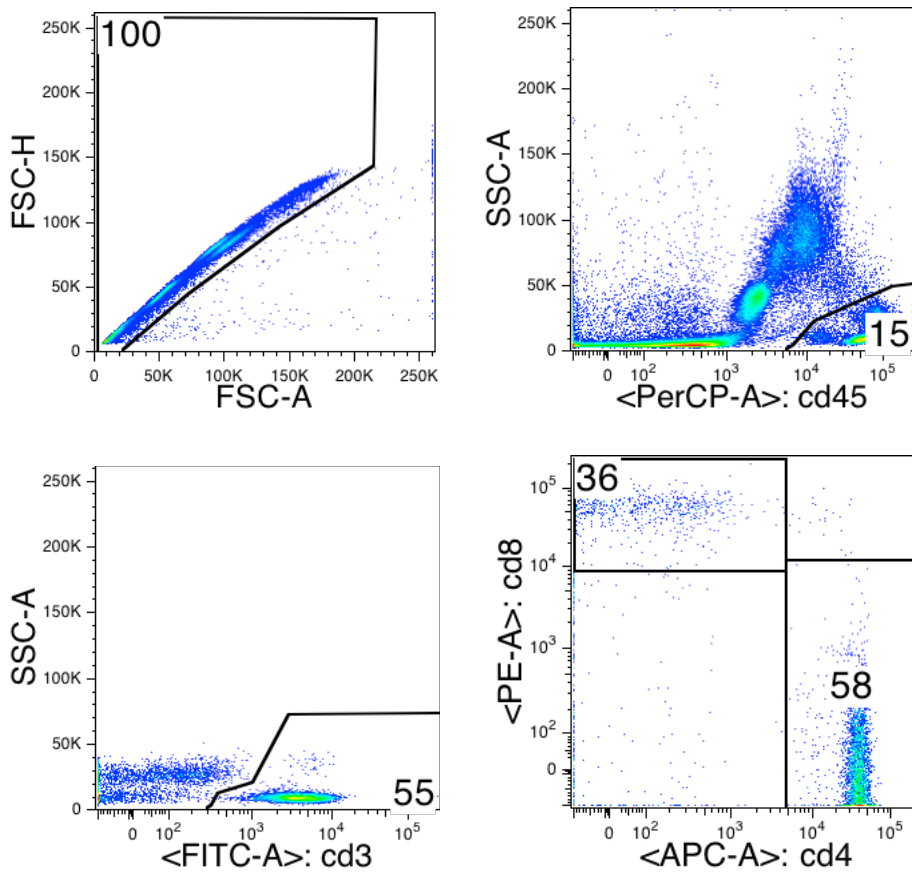
Auch an den anti-murin-CD4-Beads konnte man den Effekt der Stimulation sehen, nahezu in demselben Ausmaß wie bei den anti-human-CD4-Beads. Da mit humanen PBMCs gearbeitet wurde, muss es sich um unspezifisch an die Beads gebundene Zellen handeln.

Da bereits bei Verwendung von PBMCs erhebliche unspezifische Zell-Bindungen an die Beads bestanden, ist es nicht verwunderlich, dass Versuchsdurchführungen mit Vollblut ähnliche Ergebnisse zeigten.

Die Bead-Separation unterlag starken Schwankungen, da zu viele Zellen unspezifisch an den selbst-beschichteten Magnet-Beads „hängen“ blieben: Auch an den anti-Maus-CD4-beschichteten Beads konnte man nach Stimulation einen erhöhten ATP-Gehalt messen, obwohl mit humanen Zellen gearbeitet wurde. Außerdem war die Höhe der gemessenen ATP-Konzentrationen nicht mit dem Anteil an CD4-Zellen vereinbar, der im Überstand nach Bead-Separation fehlte. Gerade nach Stimulation scheinen die Zellen sehr „klebrig“ zu werden, d.h. sie bleiben im stimulierten Zustand vermehrt unspezifisch an der Bead-Oberfläche haften. Obwohl an Plattenoberfläche bei der Verwendung von PBMCs keine Zellen unspezifisch haften blieben, war bei Verwendung von Vollblut die unspezifische Bindung von Zellen an die Plattenoberfläche erheblich. Lediglich die ImmuKnow®-Platte war frei von unspezifischen Bindungen.

Gerade mit Hinblick auf die mangelhafte CD4-Depletion im Überstand bei der Separation von CD4-Zellen mittels Magnet-Beads aus PBMCs stellte sich die Frage nach der Effektivität bei der CD4-Separation aus Vollblut auch im Vergleich zu den Cylex™ Beads des ImmuKnow®-Kits. Dazu wurde der Versuch erneut mit Vollblut durchgeführt und die Überstände nach der vermeintlichen CD4-Depletion durch Cylex™-Beads FACS-gefärbt.

Die Gating-Strategie wird hier beispielhaft am Überstand des Ansatzes gezeigt, der mit anti-human-CD4-Beads separiert wurde:



Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen aller CD3-Zellen

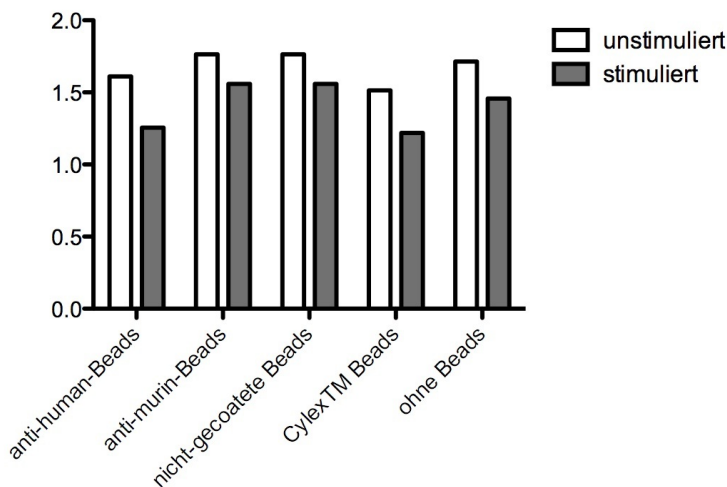


Abb. 51 Auch bei Verwendung der Cylex™-Beads ist die CD4-Depletion unzureichend

Vollblut wurde gemäß ImmuKnow®-Protokoll auf Mikrotiterplatten ausplattiert und teilweise mit PHA stimuliert. Nach Stimulation erfolgte das Umsetzen der Zellen auf neue Wells und die Durchführung der Separation mittels verschiedener Magnet-Beads gemäß ImmuKnow®-Protokoll (siehe „3.25 Durchführung der Platten- und Beadtests“). Dann erfolgte die FACS-Analyse der Überstände bei der Bead-Separation. Bei erfolgreicher Bead-Separation ist also eine Abnahme des Anteils an CD4+ Zellen zu sehen.

oben: Für das Gating wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen, dann die CD45+ und schließlich die CD3+ Zellen selektiert. Von den CD3+ Zellen wurde dann der prozentuale Anteil der CD4+ und CD8+ Zellen bestimmt.

unten: Verhältnis von CD4+ Zellen zu CD8+ Zellen im Überstand. Eine Abnahme des Verhältnisses steht für eine vermehrte CD4-Depletion aus dem Überstand. Für das natürliche Verhältnis siehe die Balken ganz rechts „ohne Beads“.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine unzureichende CD4-Depletion im Überstand auch bei Verwendung der Cylex™ Beads. Die Depletion durch die Cylex™ Beads war vergleichbar mit der durch die selbst-beschichteten anti-human-CD4 Beads. Sie betrug lediglich 3-4% aller CD3-Zellen (von 61% auf 57%-58%). Die gemessene ATP-Konzentration betrug nach Stimulation ca. 360ng/ml, was einer Gesamtmenge an ATP von 72ng/Well entspricht. Bei einer Lymphozytenzahl im Vollblut von 5000/μl (oberer Referenzwert gesunder Menschen) und einem Anteil von 80% T-Lymphozyten (ebenfalls oberer Referenzwert) entsprechen 4% Depletion bei einer Vollblutmenge von 25μl/Well einer absoluten Zellzahl von ca. 2600 Zellen. Das mittlere Volumen von aktivierten T-Zellen liegt zwischen 400-450fl [June et al. 1987]. Geht man von Volumina von 450fl aus, so ergibt sich ein intrazelluläres Gesamtvolumen von $2600 * 450 * 10^{-15}l$, auf das sich die 72ng ATP verteilen. Die intrazelluläre ATP-Konzentration beträgt somit $72 * 10^{-9}g / 1,17 * 10^{-9}l = 61,5g/l$. Die Molmasse von ATP beträgt 507,2g/mol, sodass sich eine molare intrazelluläre ATP-Konzentration von ca. 120mM ergibt. Diese Konzentration ist nicht physiologisch.

Da trotz der schlechten CD4-Depletion hohe ATP-Level messbar waren - so hoch, dass sie mit der absoluten Zahl an depletierten CD4-Zellen nicht vereinbar waren - verfestigte sich der Zweifel daran, dass das ImmuKnow®-Kit spezifisch den ATP-Gehalt von CD4-Zellen misst.

4.5.2 Durchführung des ImmuKnow®-Kits mit depletiertem Vollblut

Zur endgültigen Überprüfung des ImmuKnow®-Kits wurde daher folgende Überlegung angestellt: Bei der Aufreinigung der CD4-Zellen zeigte sich eine gute Depletion aus dem Überstand. D.h. bei diesem Überstand handelte es sich um Vollblut ohne CD4-Zellen. Würde man mit diesem Überstand den ImmuKnow®-Assay durchführen, so dürfte kein ATP messbar sein, da keine CD4-Zellen zum Messen vorhanden waren.

Es wurde also dieses „depletierte Vollblut“ genutzt und der ImmuKnow®-Assay durchgeführt. Parallel wurde der ImmuKnow®-Assay auch mit vorher aufgereinigten CD4-Zellen durchgeführt, die in physiologischer Konzentration in RPMI-Medium verdünnt wurden.

Erneut wurden die Überstände der Bead-Separation FACS-gefärbt um den Erfolg der Bead-Separation anhand der CD4-Depletion im Überstand ermessen zu können. Zur Veranschaulichung der Gating-Strategie wird hier zunächst der unstimulierte Vollblut-Ansatz ohne Bead-Separation gezeigt:

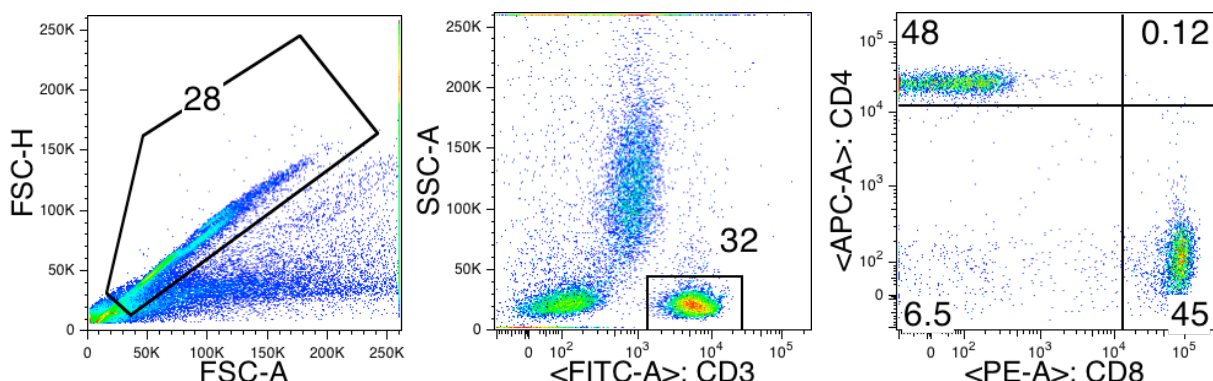


Abb. 52 Gating-Strategie zur FACS-Analyse der CD4-Depletion bei Bead-Separation

Zunächst wurden die Dubletten ausgeschlossen, dann wurden die CD3-positiven Zellen ausgewählt.

Im folgenden sind nur die CD3+ Zellen aller Ansätze gezeigt:

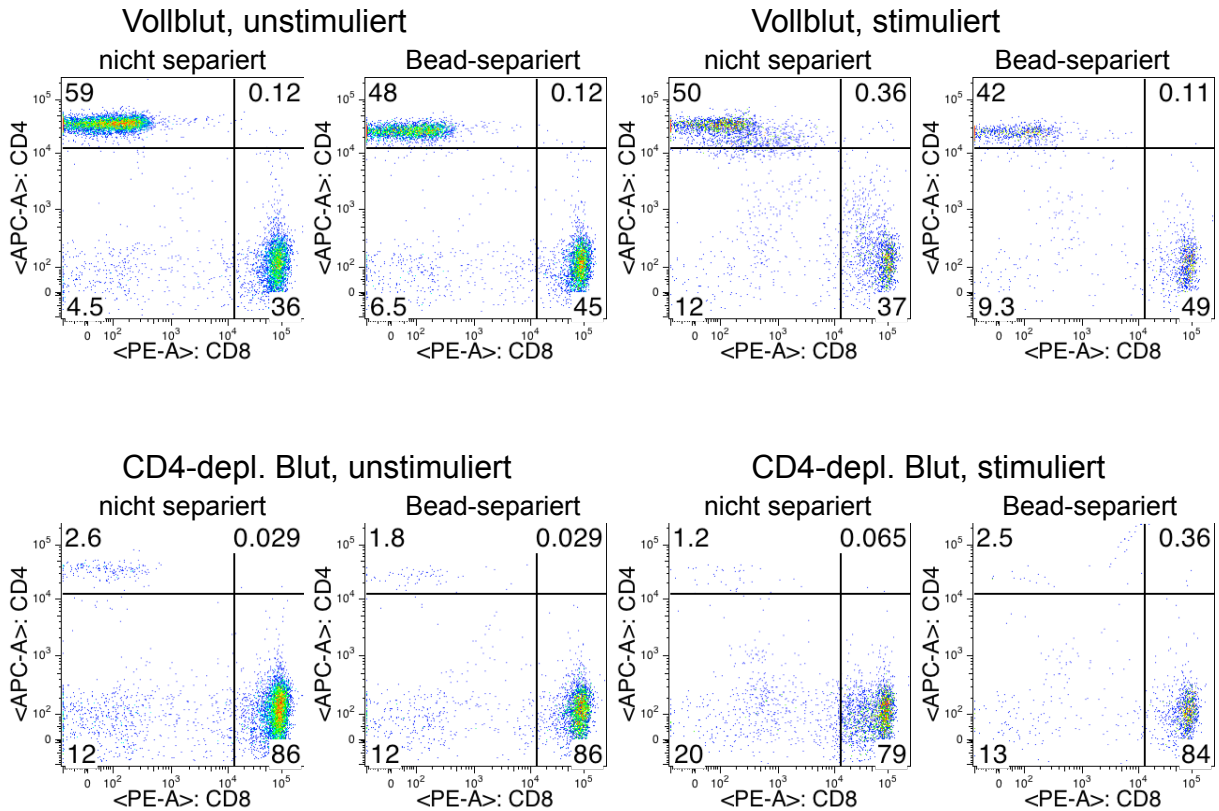


Abb. 53 Bei Vollblut werden durch die CylexTM-Beads ca. 1/5 der CD4-Zellen depletiert, im CD4-depletierten Blut sind kaum CD4-Zellen nachweisbar Der ImmuKnow®-Assay wurde mit Original-Materialien mit Vollblut und CD4-Zell-freiem Vollblut durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“). Im Anschluss wurden die bei der Bead-Separation anfallenden Überstände auf CD4 und CD8 FACS-gefärbt. Dargestellt sind die Dot-Plot-Diagramme nach oben aufgeführter Gating-Strategie.

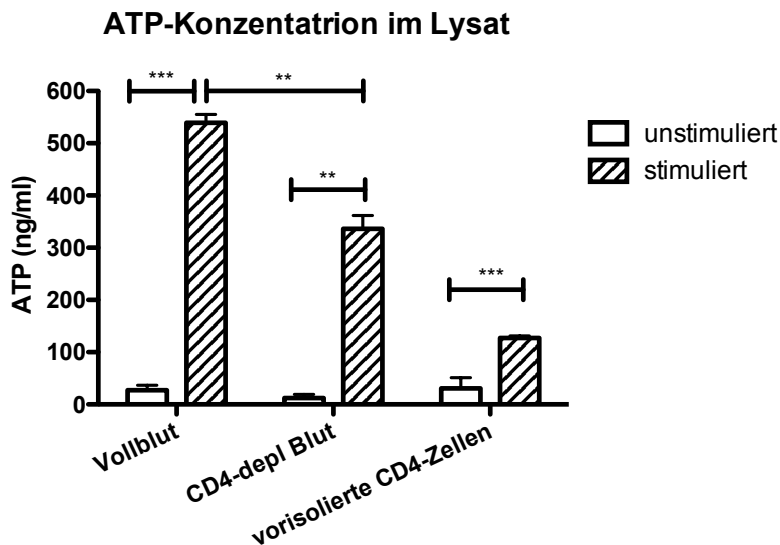


Abb. 54 Auch in CD4-Zell-freiem Vollblut misst der ImmuKnow®-Assay einen signifikanten ATP-Anstieg Der ImmuKnow®-Assay wurde mit Original-Materialien mit Vollblut, mit CD4-Zell-freiem Vollblut und mit aufgereinigten CD4-Zellen durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“). Die mittels ImmuKnow® gemessenen ATP-Konzentrationen sind aufgetragen. Die Signifikanztest erfolgten mit zweiseitigem T-Test. **= p < 0,01; ***= p < 0,001

Auch bei CD4-depletiertem Vollblut war ein erheblicher Anstieg des intrazellulären ATP nach PHA-Stimulation sichtbar, wenn auch nicht so hoch wie bei unbehandeltem Vollblut. Die Differenz entspricht ungefähr dem ATP-Gehalt der aufgereinigten CD4-Zellen. Die Beobachtung konnte in mehreren Wiederholungen bestätigt werden (Beobachtung in 3 von 4 Versuchen). Der ImmuKnow®-Assay misst also nicht ausschließlich das intrazelluläre ATP der CD4-Zellen.

Im Folgenden wurde nun versucht, die Zellpopulation auszumachen, die außer den CD4-Zellen für die gemessenen ATP-Konzentrationen verantwortlich ist. Dazu wurde unterschiedlich depletiertes Vollblut hergestellt und der ImmuKnow®-Assay damit durchgeführt.

Zur Kontrolle des Depletionserfolgs wurden entsprechende Proben vor dem Ansetzen des Versuchs FACS-gefärbt:

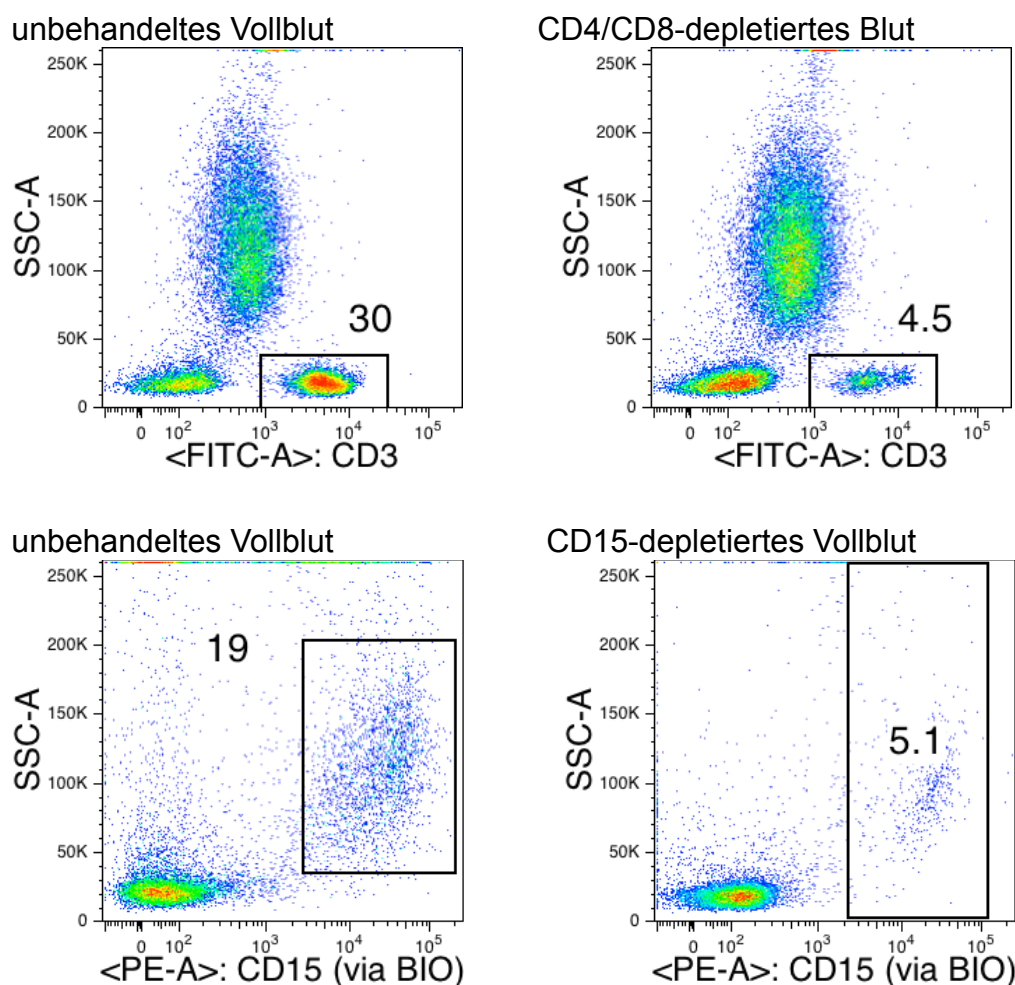


Abb. 55 Die Depletion von CD4/CD8-Zellen und CD15-Zellen ist erfolgreich

Zur weiteren Untersuchung des ImmuKnow®-Assays wurde CD15-depletiertes und CD4/CD8-depletiertes Vollblut hergestellt (siehe „3.30 Depletion bestimmter Zellarten aus humanem Vollblut“). Gating-Strategie: lediglich die Dubletten wurden herausgegatet. Dargestellt sind die CD3 und CD15-Färbungen der einzelnen Ansätze.

Die Depletion verlief erfolgreich. Der Anteil der CD15+ Zellen konnte durch die Depletion von 19% auf 5% um annähernd 75% gesenkt werden, der Anteil der CD3+ Zellen wurde von 30% auf 4,5% reduziert. Die verbliebenen CD3-positiven Zellen

waren zu 50% CD8+ Zellen. CD4-positive Zellen waren in diesem Ansatz nicht nachweisbar.

Auch die Überstände nach Durchführung der Bead-Separation des ImmuKnow®-Assays wurden angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

Die FACS-Färbung wies ebenfalls einige Auffälligkeiten auf: So zeigte sich bei unbehandeltem Vollblut durch die Bead-Separation eine Abnahme der CD15+ Zellen ebenso deutlich wie eine Abnahme der CD14+ Zellen.

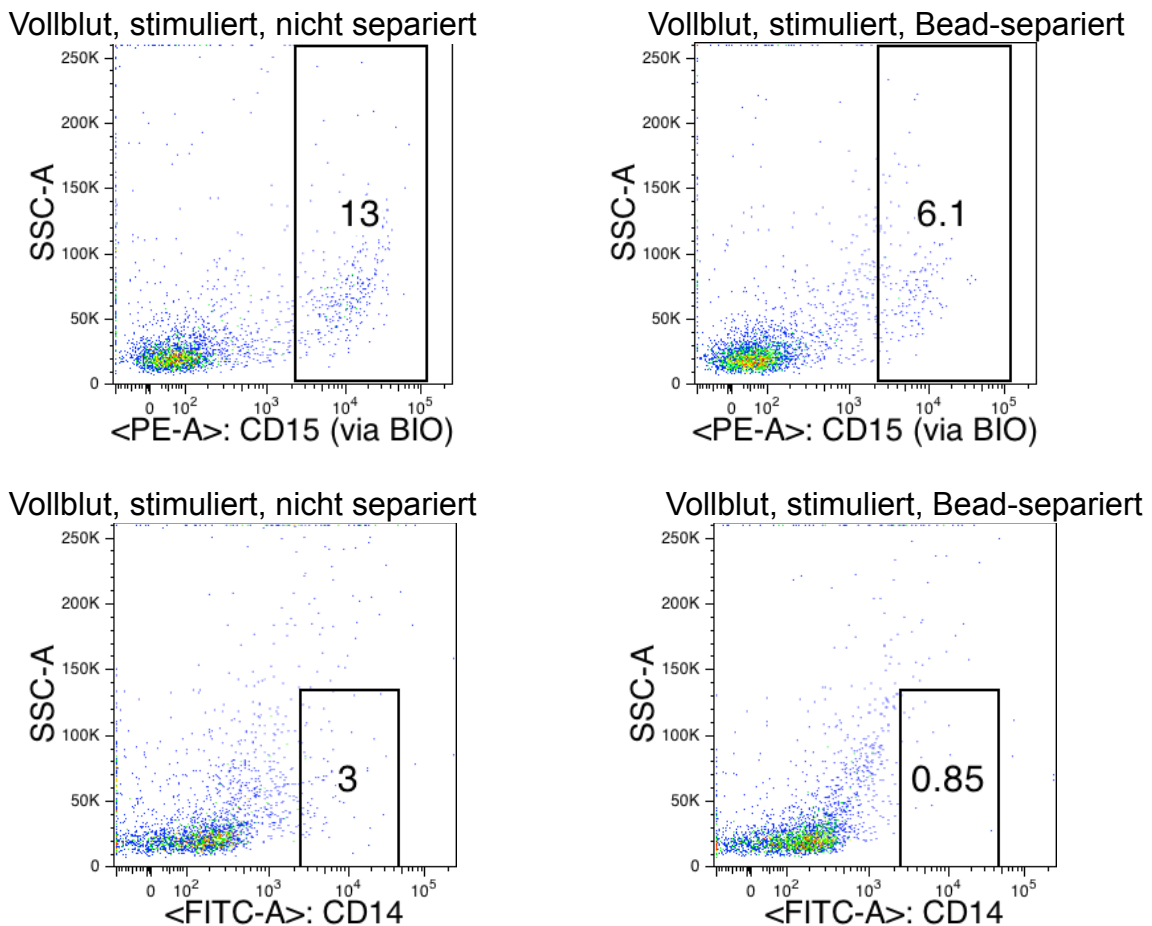


Abb. 56 Die Separation mittels Cylex™-Beads führt zum Absinken der CD15- und CD14-positiven Zellen

Der ImmuKnow®-Assay wurde mit unbehandeltem Vollblut, mit CD4-depletiertem, mit CD4- und CD8-depletiertem und mit CD15-depletiertem Blut durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“). Dann erfolgte die FACS-Färbung der Überstände nach der Separation mittels der Cylex™-Magnet-Beads. Dargestellt sind ausgewählte Dot-Plot-Diagramme nach Ausschluss der Dubletten.

Es zeigt sich eine klare Abnahme der CD15+ und der CD14+ Zellen bei der Bead-Separation, sodass der Verdacht aufkommen könnte, diese Zellpopulationen tragen zu den gemessenen ATP-Spiegeln bei.

Ein anderes Bild ergibt sich hingegen bei Betrachtung der gemessenen ATP-Spiegel:

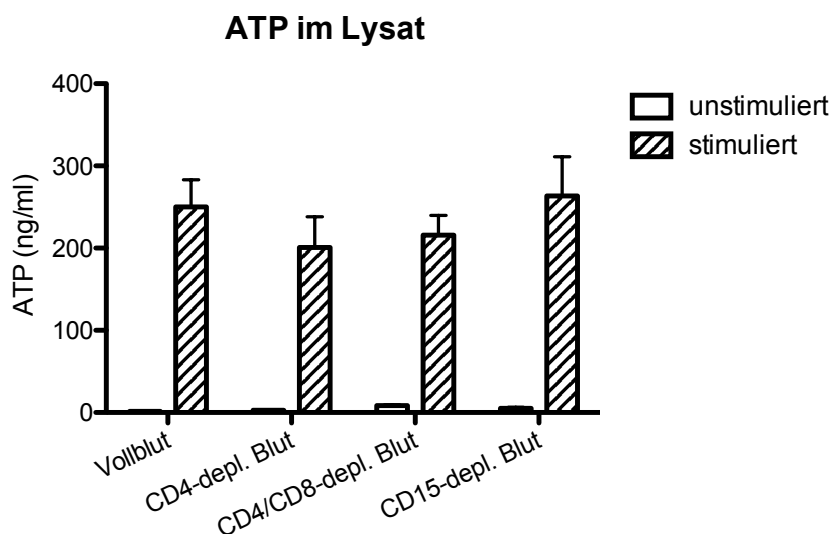


Abb. 57 Weder CD4- noch CD8- oder CD15-positive Zellen sind für die vom ImmuKnow®-Assay gemessenen ATP-Konzentrationen verantwortlich Der ImmuKnow®-Assay wurde mit unbehandeltem Vollblut, mit CD4-depletiertem, mit CD4- und CD8-depletiertem und mit CD15-depletiertem Blut durchgeführt (siehe „3.28 Durchführung des ImmuKnow®-Protokolls“). Dargestellt sind die mittels des ImmuKnow®-Assays gemessenen ATP-Konzentrationen.

Obwohl die CD14- und CD15-Depletion im Überstand nach Bead-Separation dies nahelegt, tragen weder die CD14+ noch die CD15+ Zellen signifikant zur gemessenen ATP-Konzentration im Lysat bei (keine signifikanten Unterschiede zwischen den stimulierten Ansätzen zwischen Vollblut und CD15-depletiertem Blut, Signifikanztest mit zweiseitigem T-Test).

In weiteren Versuchen sollte daher die Rolle der Thrombozyten näher geklärt werden, die bekanntermaßen bei Aktivierung „klebrig“ werden, d.h. zur Adhäsion neigen.

Dazu wurden Vollblut, PBMCs und aufgereinigte CD4-Zellen jeweils mit Thrombozyten-Konzentraten gemischt und mit ihnen der ImmuKnow®-Assay durchgeführt. Sollten die Thrombozyten wirklich verantwortlich sein, so würden in den Ansätzen mit Thrombozyten-Zusatz höhere ATP-Spiegel zu messen sein. Die Resultate waren aufschlussreich:

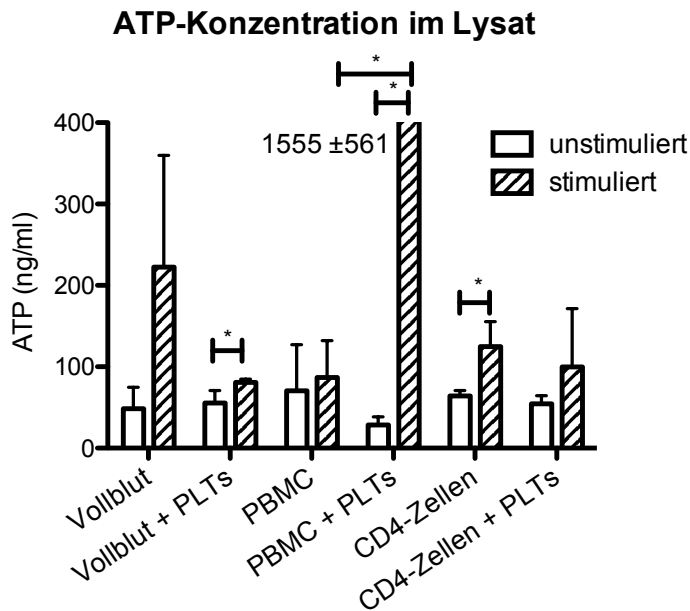


Abb. 58 Thrombozytenzusatz zu PBMCs führt zu hohen ATP-Spiegeln, die beim ImmuKnow®-Assay gemessen werden Der ImmuKnow®-Assay wurde mit verschiedenen Zellsuspensionen durchgeführt, u.a. wurden Thrombozytenkonzentrate zu Vollblut, PBMCs und aufgereinigten CD4-Zellen hinzugegeben (siehe „3.29 Durchführung des ImmuKnow®-Assays mit Thrombozyten-Zusatz“). Dargestellt ist die vom ImmuKnow®-Assay gemessene ATP-Konzentration. Signifikanztests mit zweiseitigem T-Test. *= $p < 0,05$

Ein klarer Unterschied war zwischen den beiden Versuchsansätzen mit PBMCs mit und ohne Thrombozytenzusatz feststellbar, die Messdaten der Ansätze mit Vollblut und mit aufgereinigten CD4-Zellen bedürfen einer genaueren Betrachtung. Insgesamt geben die Beobachtungen jedoch einen Hinweis darauf, dass die Thrombozyten für die gemessenen ATP-Spiegel verantwortlich sein könnten.

Vollblut, PBMCs, CD4-Zellen und Thrombozytenkonzentrate stammten nicht von demselben Spender. Eventuell auftretende immunologische Reaktionen wurden bei der Versuchsdurchführung nicht berücksichtigt.

Bei den unstimulierten Ansätzen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne zusätzliche Thrombozyten-Zugabe. Bei den stimulierten Ansätzen waren die Ergebnisse auf den ersten Blick widersprüchlich: Während sich bei den Ansätzen mit Vollblut nach Stimulation eine verminderte intrazelluläre ATP-Konzentration bei Thrombozytenzugabe zeigte, zeigte sich bei den Ansätzen mit PBMCs und Thrombozytenzusatz ein massiver Anstieg nach Stimulation. In dem Ansatz mit isolierten CD4-Zellen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Ansätzen mit und ohne Thrombozytenzugabe. Zieht man jedoch bisherige Untersuchungen zu Thrombozyten zu Rate, so lässt sich die Beobachtung durchaus erklären. Das Ergebnis wird im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen und Veröffentlichungen ausführlich in der Diskussion (Kapitel 5.3.2, „Untersuchungen des ImmuKnow®-Kits“) erörtert.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine Separation bestimmter zellulärer Subpopulationen auf einer Mikrotiterplatte mit erheblichen Problemen behaftet ist. Für eine effektive Selektion bestimmter Zellen muss daher ein anderer technischer Ansatz gefunden werden.

4.6 Extrazelluläres ATP als Immunresponse-Parameter

Wie durch die Untersuchungen mit Yac-hh-Zellen gezeigt werden konnte geht die Stimulation dieser Lymphozyten auch mit einem Anstieg des extrazellulären ATP einher (Abb. 3). Es stellte sich daher die Frage, ob dieses Phänomen auch bei humanen CD4-Zellen zu beobachten ist. Bei den Untersuchungen mit PHA und MACSiBead-Stimulation von aufgereinigten humanen CD4-Zellen war stets kein ATP im Extrazellularraum nachweisbar. Lediglich bei Versuchsansätzen mit Stimulationszeiten von 30min bis 2h waren kleinste ATP-Konzentrationen nahe 0 im Extrazellularraum zu messen.

Dieses Phänomen wurde auf die Aktivität extrazellulärer ATPasen - z. B. CD39 - zurückgeführt, deren Aktivität im Folgenden durch den CD39-Hemmer POM-1 gehemmt werden sollte. POM-1 wird ein inhibitorischer Effekt auf die Luciferase-Aktivität zugeschrieben [Clayton et al. 2011], sodass ein solcher Effekt auf die Messung der ATP-Konzentrationen zunächst ausgeschlossen werden musste.

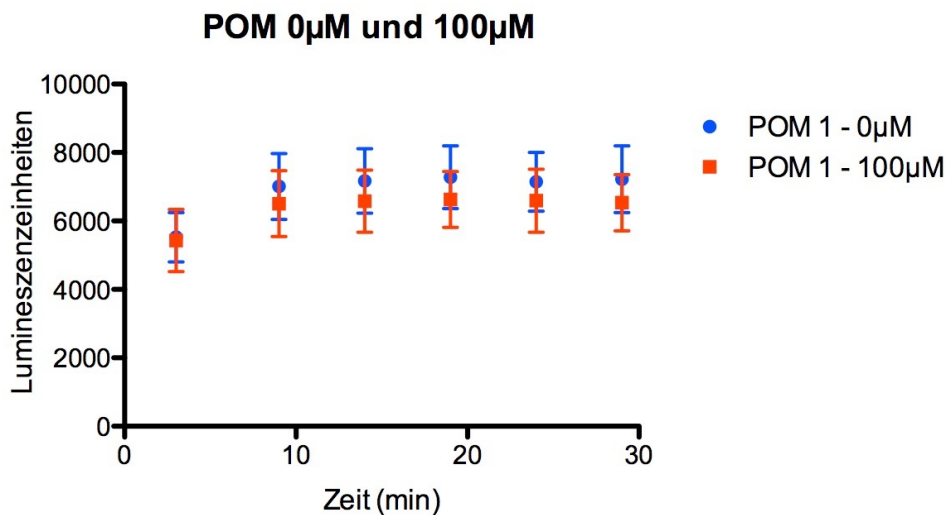


Abb. 59 POM-1 hemmt bei einer Konzentration von 100 μ M die Luciferase-Aktivität signifikant, jedoch nicht in relevantem Ausmaß Um einen Einfluss von POM-1 auf die Luciferase-Aktivität auszuschließen wurde Luciferase zu einem Gemisch von POM-1 und 10ng/ml ATP hinzugegeben (siehe „3.17 Untersuchung des Einflusses von POM 1 auf die Luciferase-Aktivität“). Zu definierten Zeitpunkten wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die gemessene Lumineszenz ist in arbiträren Einheiten angegeben.

Es zeigte sich eine leichte Tendenz bei der maximal getesteten POM 1-Konzentration von 100 μ M zu einer verminderten Luciferase-Aktivität. Dieser Unterschied war zwar signifikant ($p < 0,05$ im gepaarten T-Test), jedoch aufgrund der geringen Höhe nicht relevant.

Die aufgereinigten humanen CD4-Zellen wurden also mit MACSiBeads stimuliert. Parallel wurde mittels POM 1-Zugabe versucht die ATPase-Aktivität soweit zu hemmen, dass das freigesetzte ATP im Extrazellularraum nicht zerstört wird. Nächster Schritt war das Finden der optimalen Zellzahl zur Bestimmung des extrazellulären ATP. Dazu wurden Zellen in verschiedenen Konzentrationen mit MACSiBeads stimuliert und parallel mit 50 μ M POM 1 inkubiert.

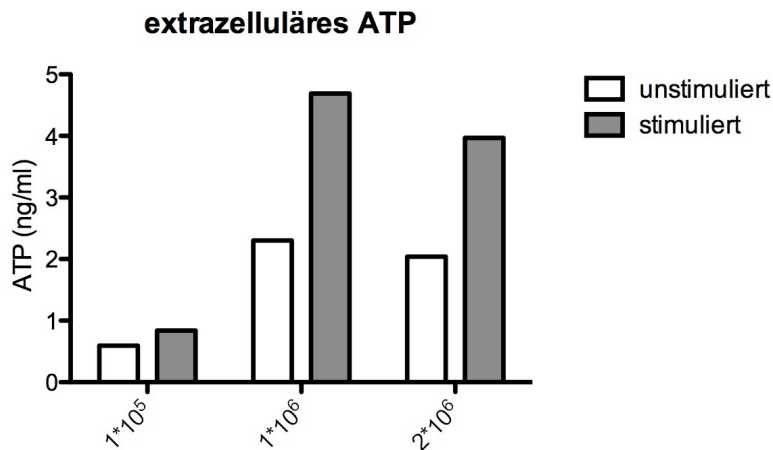


Abb. 60 Für einen messbaren Anstieg des extrazellulären ATP sind 10^6 Zellen / Well nötig

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden in verschiedenen Zellzahlen ausplattiert und mittels MACSiBeads für 60min unter Zugabe von $50\mu\text{M}$ POM-1 stimuliert (siehe „3.18 Zellzahltests für extrazelluläre ATP-Messungen“). Dann erfolgte eine Zentrifugation und die Messung der ATP-Konzentration im Überstand.

Für eine sinnvolle Auswertung des extrazellulären ATP ist eine Zellzahl von mindestens $1 \cdot 10^6$ Zellen in $200\mu\text{l}$ /Well erforderlich.

Im Folgenden wurde nun der zeitliche Verlauf der extrazellulären ATP-Konzentration sowie ein etwaiger Effekt einer P2X7-Blockade untersucht.

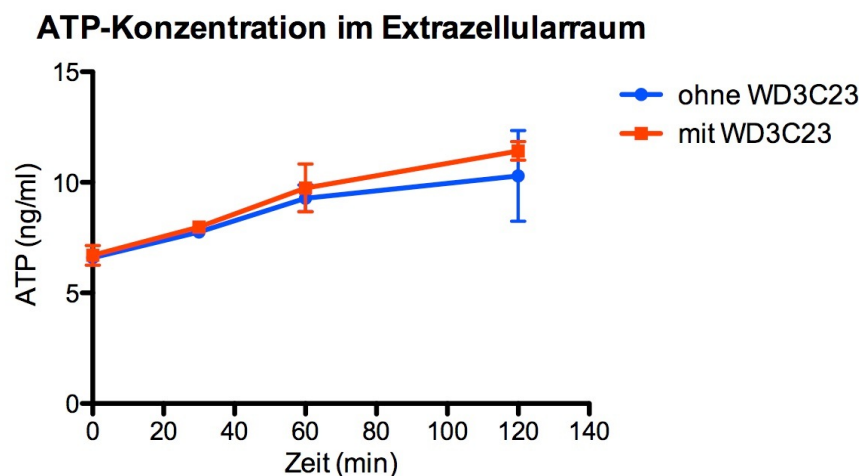


Abb. 61 P2X7-Block hat keinen Einfluss auf die ATP-Freisetzung nach MACSiBead-Stimulation

Aufgereinigte CD4-Zellen wurden mit MACSiBeads stimuliert. Teilweise wurde der P2X7-Blocker WD3C23 hinzugegeben (siehe „3.19 Untersuchung von extrazellulärem ATP bei P2X7-Block“, Zellzahl $1,9 \cdot 10^6$ /Well, Stimulation mit $1,5 \cdot 10^6$ Beads /Well). Dann erfolgte eine Zentrifugation und die Messung der ATP-Konzentration im Überstand.

Gut zu sehen ist der Anstieg des extrazellulären ATP um ca. das Doppelte, ein Effekt der in gleichem Ausmaß bei P2X7-Blockade vorhanden ist.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich also folgendes festhalten: Eine Messung der extrazellulären ATP-Konzentration von CD4-Zellen als Parameter für die zelluläre Immunität erfordert die Zugabe eines ATPase-Inhibitors wie POM 1 und eine Mindestzahl von $1 \cdot 10^6$ CD4-Zellen/Well. P2X7-Blockade scheint keinen Einfluss auf den Verlauf der ATP-Freisetzung zu haben.

Diskussion

5.1 spezifische Untersuchung des P2X7-Rezeptors

Initial richtete sich der Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit auf das Verhalten muriner CD4⁺ Lymphomzellen (Yac-hh-Zell-Linie), insbesondere deren Verhalten bei Stimulation des P2X7-Rezeptors. Die Stimulation des P2X7-Rezeptors erfolgte mittels NAD-abhängiger ADP-Ribosylierung in Gegenwart der ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimierten ADP-Ribosyl-Transferasen (ARTC2) [Seman et al. 2003]. Hier zeigte sich zunächst dosisabhängig eine Steigerung der extrazellulären ATP-Konzentration mit steigender stimulierender NAD-Konzentration (Abb. 3) verbunden mit einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration (Abb. 4). Bei Zugabe von Apyrase, einem ATP-spaltenden Enzym, in den Extrazellularraum fand diese Verringerung der intrazellulären ATP-Konzentration erst bei höheren Konzentrationen statt und war weniger ausgeprägt (Abb. 4).

Die Beobachtungen stehen in Einklang mit den von Qu et al. [2013] und Gutiérrez-Martín et al. [2011] gezeigten Ergebnissen einer durch P2X7-ausgelösten ATP-Freisetzung. Die Entwicklung der intrazellulären ATP-Konzentration zeigt, dass es zumindest im beobachteten Zeitraum von 3 Stunden über den P2X7-vermittelten Ca²⁺-Einstrom zwar zur gesteigerten oxidativen ATP-Synthese kommt [Schenk et al. 2008], netto jedoch der ATP-Ausstrom aus der Zelle überwiegt. Die Bedeutung der autokrinen Stimulation des P2X7-Rezeptors durch von der Zelle selbst freigesetztes ATP konnte gut durch Apyrase-Zugabe gezeigt werden: Die intrazelluläre ATP-Konzentration zeigte sich bei Apyrase-Behandlung signifikant höher als bei Stimulation ohne Apyrase-Zusatz. Der beschriebene „Feed-Forward“-Mechanismus - die Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zur Synthese und Freisetzung von ATP, welches dann autokrin erneut P2X7-Rezeptoren stimuliert - scheint also eine entscheidende Bedeutung in der Verstärkung des Signals zu haben.

Ähnliche Beobachtungen der ATP-Freisetzung durch murine T-Zellen sind bereits von Schenk et al. [2008] gemacht worden, wobei hier eine Stimulation der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor und nicht spezifisch über P2X7 stattfand. Gutiérrez-Martín et al. [2011] zeigten die Freisetzung von ATP nach alleiniger P2X7-Stimulation an murinen Neuroblastom-Zellen.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die Stimulation von P2X7 als Zusatz zur klassischen Aktivierung des T-Zell-Rezeptors eine Auswirkung auf den ATP-Metabolismus hat (Abb. 10 und 11). Hier zeigte sich tendenziell ein Anstieg der extra- und intrazellulären ATP-Konzentration nach alleiniger T-Zell-Rezeptor-Stimulation. Bei simultaner Stimulation des P2X7-Rezeptors mittels NAD zeigten sich stets erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentrationen und verminderte intrazelluläre ATP-Konzentrationen gegenüber den Ansätzen mit alleiniger Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Während die alleinige T-Zell-Rezeptor-Stimulation also gleichermaßen zur Synthese und Freisetzung von ATP führt (das intrazelluläre ATP steigt), führt gleichzeitige P2X7-Stimulation über NAD netto zu einem größeren ATP-Ausstrom aus der Zelle, der nicht komplett durch Neusynthese ausgeglichen wird (das intrazelluläre ATP sinkt). Dies ist in Einklang mit den Beobachtungen von Ledderose et al. [2014], die zeigen, dass nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation ATP mitochondrial vermehrt synthetisiert und anschließend freigesetzt wird.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass dieser Mechanismus durch P2X7 moduliert und damit die Immunantwort der CD4-Zelle beeinflusst werden kann.

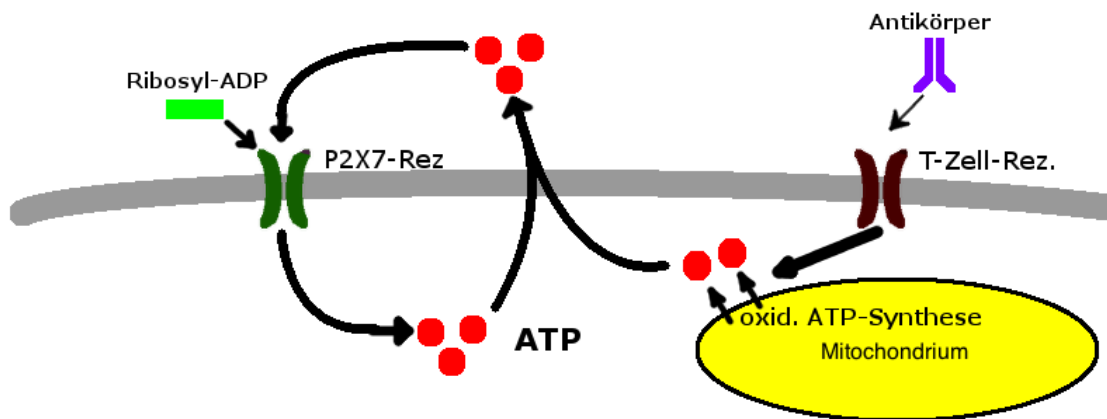


Abb. 62 schematische Darstellung des ATP-Signaling in CD4-Zellen

Nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation findet vor allem mitochondrial Synthese von ATP statt, das dann freigesetzt wird. Dieses führt zu einer P2X7-Stimulation. P2X7-Stimulation hingegen führt zur weiteren Freisetzung von ATP, das autokrin ebenfalls den P2X7-Rezeptor aktivieren kann. ADP-Ribosyltransferasen können die Ribosyl-ADP-Einheit aus NAD kovalent an P2X7 anheften, und bewirken damit seine Aktivierung. Antikörper stimulieren den T-Zell-Rezeptor.

Während andere P2X-Rezeptoren erst nach einem initialen Stimulus und polarisiert (d.h. nur lokal) exprimiert werden, nimmt P2X7 nicht zuletzt aufgrund seiner gleichmäßigen Verteilung über die gesamte Zelloberfläche eine gesonderte Stellung unter den P2X-Rezeptoren ein [Woehrle et al. 2010]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass P2X7 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Detektion ungerichteter Signale vor allem in der Frühphase der T-Zell-Aktivierung spielt. Das durch P2X7-Stimulation initiierte CD62L-Shedding stellt ebenfalls einen wichtigen Schritt in dieser frühen Aktivierungsphase eines Lymphozyten dar.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Seman et al. [2003] konnte auf den murinen Lymphomzellen ein von der stimulierenden NAD-Dosis abhängiger Phosphatidylserin-Shift verbunden mit CD62L-Shedding gezeigt werden (Abb. 6 und 7). Der Phosphatidylserin-Shift ist ein früher Marker für apoptotische Zellen, das CD62L-Shedding ist ein Zeichen für Aktivierung der T-Zelle und spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration von Lymphozyten zwischen Lymphknoten und peripherem Blut. Beide Effekte sind P2X7-vermittelt [Seman et al. 2003].

Die Untersuchungen von Schenk et al. [2008] zeigen die Bedeutung des Kalzium-Einstroms nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation, der im weiteren Verlauf zur mitochondrialen ATP-Synthese führt. Es erschien daher sinnvoll, die Bedeutung der Ionenkanal-Aktivität des P2X7-Rezeptors für die von ihm vermittelten Effekte zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die P2X7-Stimulation mittels NAD in Medien mit und ohne Kalzium-Zusatz durchgeführt. Unerwarteterweise zeigte sich dabei in Abwesenheit einer direkten Stimulation von P2X7 eine niedrigere extrazelluläre ATP-Konzentration und eine höhere Expressionsdichte von CD62L im kalziumarmen Medium, während die Effekte nach direkter Stimulation von P2X7 unabhängig von der extrazellulären Kalzium-Konzentration erfolgten (Abb. 8 und 9).

5.2 ATP als Kostimulans bei der Aktivierung von CD4-Zellen

5.2.1 Verschiedene Stimuli haben unterschiedliche Effekte auf T-Zellen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur polyklonalen Stimulation von T-Zellen eingesetzt. Dabei wurde sowohl das Verhalten von aufgereinigten CD4-Zellen auf verschiedene Stimuli, als auch das Verhalten von CD4-Zellen bei Stimulation von PBMCs untersucht.

Neben direkten monoklonalen Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor (OKT3) wurde leukozytenspezifisches Phytohämagglutinin (PHA-L), Ionomycin und Phorbol-12-merystat-13-acetat (PMA) getestet. Außerdem wurden mit anti-CD2, anti-CD3 und anti-CD28 beschichtete MACSiBeads zur Stimulation verwendet.

Nachdem PHA-L als Stimulator humaner T-Zellen entdeckt wurde [Gillis et al. 1980], zeigten weitere Untersuchungen, dass es seine Wirkung über den T-Zell-Rezeptor ausübt [Weiss et al. 1984]. Neben dem Anstoß zur Proliferation bewirkt PHA-L bei T-Zellen auch die Hochregulation zahlreicher Aktivierungsmarker [Caruso et al. 1997]. Ionomycin erhöht die Permeabilität der Zellmembran für Kalzium-Ionen. PMA bewirkt als Phorbol-ester eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [Castagna et al. 1982]. Beide können in Kombination T-Zell-Rezeptor-unabhängig humane Lymphomzellen stimulieren [Imboden et al. 1985]. In der Folgezeit konnte der gesamte Signalweg nach T-Zell-Rezeptorstimulation aufgezeigt werden: Es zeigt sich, dass die Kombination von Ionomycin und PMA den Signalweg, der klassischerweise über den T-Zell-Rezeptor initiiert wird, stromabwärts starten kann (siehe Abb. 63)

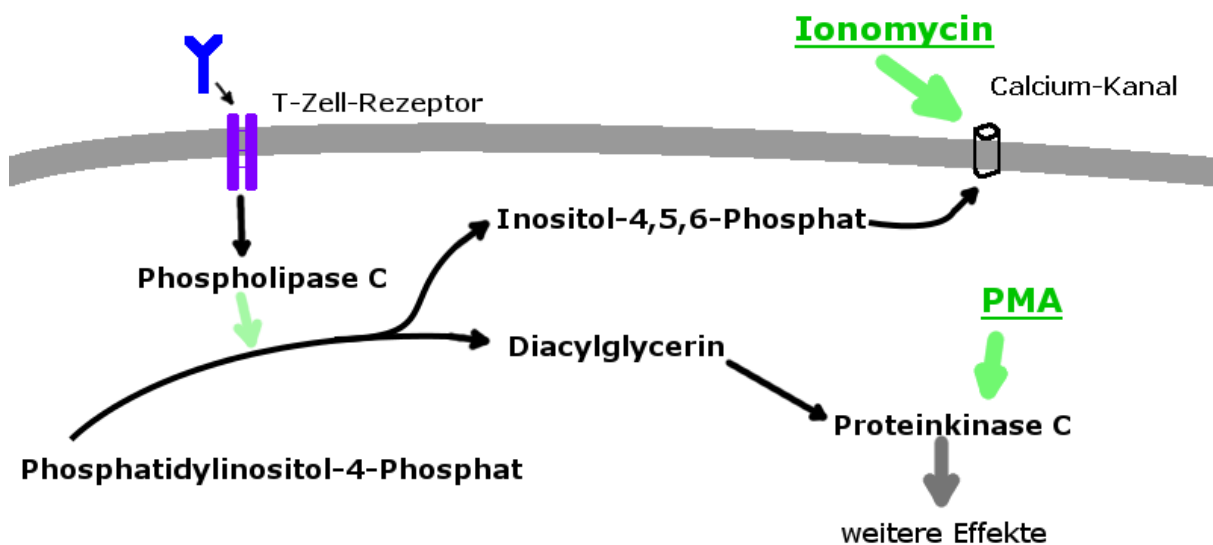


Abb. 63 Darstellung des Signalweges nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation

Nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation kommt es durch Konformationsänderung zu einer *trans*-Phosphorylierung der gegenüberliegenden intrazellulären Domänen des CD3-Komplexes. Dadurch kommt es über Zwischenstufen u.a. zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die dann ATP-abhängig Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP₂) in Inositol-4,5,6-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. DAG führt dann zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, die zu weiteren Effektorfunktionen führt, IP₃ führt zum Einbau von Ca²⁺-Kanälen sowohl in die Zellmembran als auch in das Endoplasmatische Retikulum.

Ionomycin macht die Zellmembran durchlässig für Kationen, *PMA* aktiviert die Proteinkinase C

Wie bereits Caruso et al. [1997] beschrieben haben, kann die Expression von CD69 (frühes Aktivierungsantigen) und CD25 (Interleukin-2-Rezeptor) als Korrelat für den

Grad der Stimulation gesehen werden. Die Oberflächenexpression der beiden Marker zeigte sich auch bei den verschiedenen Stimuli mit analogem Verlauf (Abb. 21 und 23): Der Stimulus, der eine hohe CD69-Expression hervorrief, führte auch zu einer hohen CD25-Expression. Die Stimulation mittels MACSiBeads (anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28) zeigte sich hier erwartungsgemäß am stärksten, PHA-L und alleinige anti-CD3-Stimulation (OKT3) zeigten schwächere Effekte. Auch Ionomycin zeigte einen leicht stimulatorischen Effekt. PMA und alleiniges anti-CD28 zeigten erwartungsgemäß keine stimulatorischen Effekte. Auch die MHC 2-Expression ist ein Marker für den Stimulationsgrad (Abb. 24): Hier zeigte sich allerdings PHA-L als potentester Stimulus, anti-CD3 und Ionomycin-Stimulation waren diesbezüglich weniger effektiv. CD38 wird ebenfalls bei Stimulation auf der Zelloberfläche hochreguliert. Es katalysiert enzymatisch die Reaktion von cyclischem ADP zu ADP-Ribose. Hier war sowohl nach PHA als auch nach MACSiBead-Stimulation deutlich mehr CD38 auf der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 18). Die genaue Bedeutung der Hochregulierung dieses Enzyms ist noch unklar. CD38 spielt bei der Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels in T-Zellen eine wichtige Rolle [Zocchi et al. 1998]. Nach Stimulation war außerdem eine verminderte CD4-Expression auf der Zelloberfläche sichtbar, hier zeigte sich PHA-L als potentester Stimulator (Abb. 19). PHA-L führt außerdem als Stimulator zu einem massiven CD62L-Shedding auf der Zelloberfläche (Abb. 22). In vivo ist das CD62L-Shedding ein bedeutsamer Schritt bei der Migration von T-Lymphozyten zwischen Lymphknoten und Blut [Galkina et al. 2003].

Betrachtet man Veränderungen der intrazellulären ATP-Konzentration und die Produktion von Interleukin-2 als Indikatoren für die T-Zell-Aktivierung, so zeigte sich, dass PHA-Stimulation als einziger Stimulator einen deutlichen Anstieg des intrazellulären ATP bewirkte (Abb. 16). Dagegen bewirkte es nur einen schwachen Anstieg des Interleukin-2 (Abb. 17). Im Vergleich dazu bewirkten gebundene anti-CD3-Antikörper einen starken Anstieg von Interleukin-2 bei mäßigem Anstieg des intrazellulären ATP. Stimulation mittels eines löslichen anti-CD3-Antikörpers zeigte hingegen nur einen schwachen Interleukin 2-Anstieg. Immobilisierte anti-CD3-Antikörper haben erwiesenermaßen eine größere Potenz zur Stimulation [Levine et al. 1996].

Sowohl PHA als auch gebundenes anti-CD3 zeigten sich also als potente Stimuli der CD4-Zellen, jedoch mit unterschiedlichen Wirkungsschwerpunkten. Genauere Untersuchungen fokussierten daher auf den Vergleich dieser beiden Stimuli. Für beide Stimuli ließ sich außerdem eine Dosisabhängigkeit der Stimulationseffekte zeigen: So zeigte sich bei der PHA-Stimulation humaner PBMCs bezüglich des Verlaufs der extrazellulären ATP-Konzentration eine positive Korrelationen zur stimulierenden PHA-Konzentration (Abb. 14). Für die Antikörperstimulation an aufgereinigten humanen CD4-Zellen zeigten sich bezüglich der Interleukin 2-Produktion und der intrazellulären ATP-Konzentration ebenfalls klar erkennbare Korrelationen zur stimulierenden anti-CD3-Antikörper-Menge (Abb. 25 und 26).

5.2.2 Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Stimulation und ATP als Kostimulans

Zahlreiche Untersuchungen von T-Lymphozyten weisen darauf hin, dass die Kinetik der Stimulation über einen Zeitverlauf beobachtet werden muss [u. a. Sandoval-Montes et al. 2005, Kunzmann et al. 2000 und Trickett et al. 2003]. So wurden PHA und immobilisierte anti-CD3-Antikörper als die potentesten Stimuli über einen Zeitraum von 18 Stunden vergleichend untersucht.

Bezüglich der Aktivierungsmarker CD69 (Abb. 32) und CD25 (Abb. 34) zeigte sich hier das zu erwartende Bild: Sowohl bei PHA- als auch bei Antikörper-Stimulation zeigt sich eine mit der Zeit zunehmende Expression auf der Zelloberfläche. Die Expression von CD4 (Abb. 34) und CD62L (Abb. 33) nahm erwartungsgemäß mit zunehmender Stimulationszeit ab.

Ein interessanter Trend zeigte sich bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der intrazellulären ATP-Konzentration: Während der PHA-Stimulus zu einem kontinuierlichen Anstieg mit zunehmender Stimulationszeit führt, zeigte sich bei der Antikörperstimulation ein sprunghafter Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration nach einer Latenzzeit von 8 Stunden (Abb. 27). Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch bei der Stimulation von PBMCs mittels PHA-L, die jedoch schlecht reproduzierbar waren.

Auch bei der Interleukin 2-Sekretion zeigten sich Unterschiede quantitativer Art: Die IL 2-Sekretion war bei den Antikörper-stimulierten Zellen um das 6-fache höher, der zeitliche Verlauf zeigte sich allerdings bei beiden Stimuli analog (Abb. 28). Diese Situation stellte sich jedoch anders dar, wenn anstelle von aufgereinigten CD4+ Zellen PBMCs stimuliert wurden. In diesem Fall reichten bereits geringe PHA-Konzentrationen aus, um einen deutlichen IL-2-Anstieg im Extrazellulärraum zu bewirken (Abb. 13). Diese Beobachtung lässt sich mit der Anwesenheit von B-Lymphozyten und anderen Antigen-präsentierenden Zellen erklären: Wie bereits Gimmi et al. [1991] zeigten, ist für die Interleukin-2-Produktion sowohl ein stimulatorisches Signal über den T-Zell-Rezeptor als auch ein kostimulatorisches Signal über CD28 notwendig. Dieses kostimulatorische Signal kann z.B. von B-Lymphozyten über das Oberflächenprotein B7 gegeben werden. Da PHA-L jedoch nur das stimulierende Signal über den T-Zell-Rezeptor, jedoch nicht das kostimulierende Signal über CD28 gibt, ist eine vollständige Interleukin 2-Produktion nur in Anwesenheit von B-Zellen möglich. In der Anwesenheit von B-Zellen sind dann aber schon sehr geringe PHA-Konzentrationen zur Initiierung der maximalen Interleukin 2-Produktion ausreichend.

Interleukin 2 hat einen positiven Effekt auf Überlebensrate und Proliferation von T-Zellen [Bismuth et al. 1985] und regt die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten an [Jelinek et al. 1986]. Es handelt sich also um ein hauptsächlich aktivierendes Interleukin.

Der Verlauf der CD38-Expression zeigte ebenfalls einen bemerkenswerten Trend (Abb. 31): Die Antikörper-Stimulation führte zu einer kontinuierlichen Hochregulierung, während sich bei der PHA-Stimulation nach einer Hochregulation mit einem Maximum nach ca. 2h zunächst eine Verminderung mit einem erneuten Anstieg zwischen 8h-18h Stimulationszeit zeigte.

Die Entwicklung von CD38 wurde auch von Sandoval-Montes et al. [2005] an stimulierten T-Zellen untersucht. Auch hier war ein zyklischer Verlauf mit Hoch- und Herunterregulation auf einen PHA-Stimulus zu beobachten, während auf die anderen untersuchten Stimuli ein kontinuierlicher Anstieg der Oberflächenexpression von

CD38 mit zunehmender Stimulationszeit zu verzeichnen war. Der genaue Signalweg und Mechanismus, der zur CD38-Expression führt und die letztendlichen Auswirkungen der zunehmenden Expression sind bislang nur unzureichend geklärt. Diese könnten in seinen zwei Funktionen als Regulator des intrazellulären Kalziumspiegels und als maßgebliches Enzym, das den Abbau von extrazellulärem NAD bewirkt, liegen.

Im Mausmodell wurde der Effekt von NAD auf regulatorische T-Zellen von Cortés-Garcia et al. [2015] untersucht. Hier zeigte sich ein eindeutiger antiproliferativer Effekt von NAD, der durch Antagonisten von ADP-Ribosyl-Transferasen - zu denen CD38 zählt - und durch P2X7-Antagonisten inhibiert werden konnte. Über die Relevanz dieser Beobachtung beim Menschen müssen zukünftige Untersuchungen aufklären.

Wie Trabanelli et al. [2012] bereits zeigten spielt die extrazelluläre ATP-Konzentration eine entscheidende Rolle als auto- und parakrines Kostimulans während der CD4-Zell-Aktivierung. Im mittleren Konzentrationsbereich (0,1-1 μ M) bewirkte ATP eine Aktivierung mit Anstieg von Interleukin 2, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ sowie vermehrter Expression von CD49d und CD54, während hohe ATP-Konzentrationen (1-10mM) zu einem gegenteiligen Effekt führten.

In meinen Versuchen führte die Antikörper-Stimulation wie zu erwarten zu einem Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration, welche jedoch mit zunehmender Menge von exogen zugegebenem ATP abnahm. Dieser Effekt wurde durch Zugabe eines P2X7-Blockers aufgehoben und sogar in sein Gegenteil umgekehrt (Abb. 36). Bezüglich der Interleukin 2-Produktion zeigte sich ein abschwächender Effekt sehr hoher ATP-Konzentrationen, die Zugabe eines P2X7-Blockers hatte einen nur geringen Effekt (Abb. 37).

Diese Versuche legen nahe, dass die Kostimulation mit ATP eine P2X7-abhängige ATP-Freisetzung aus CD4-Zellen bewirkt. Die Beobachtung steht in Einklang mit der bei murinen Lymphomzellen getätigten Beobachtung, dass P2X7-Aktivierung netto zu einem ATP-Ausstrom aus der Zelle führt.

Die P2X7-abhängige ATP-Freisetzung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt nachgewiesen werden, da zur Stimulation von humanem P2X7 ATP exogen hinzugefügt werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit konnte lediglich ein P2X7-unabhängiger Anstieg des extrazellulären ATP nach alleiniger Antikörper-Stimulation unter Hinzunahme eines ATPase-Inhibitors gezeigt werden (Abb. 61).

Des Weiteren wurde die Wirkung der Kostimulation mit exogenem ATP auf die Oberflächenexpression von CD62L und den Phosphatidylserin-Switch - der Verlagerung von Phosphatidylserin-Resten von der Zellmembran-Innenseite auf die Außenseite - untersucht. Beide Phänomene wurden durch ATP-Kostimulation verstärkt, die verstärkende Wirkung wurde jedoch durch einen P2X7-Blocker nicht aufgehoben (Abb. 39 und 40).

Vergleicht man die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse mit den Beobachtungen von Trabanelli et al. [2012], so zeigt sich ein entscheidender Unterschied: Die kostimulierenden ATP-Konzentrationen, die bei Trabanelli et al. als inhibierend bei aktivierten CD4-Zellen beschrieben wurden, scheinen in den Untersuchungen dieser Arbeit eine verstärkende Wirkung auf die Stimulation zu haben: Zwar tritt bei sehr hohen ATP-Konzentrationen eine Abnahme der Interleukin 2-Konzentration auf, CD62L-Expression und Phosphatidylserin-Switch werden jedoch verstärkt. Niedrigere ATP-Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die stimulierten Zellen.

Eine mögliche Erklärung ist hier die Versuchsdurchführung: Während Trabanelli et al. zunächst eine 2-tägige Stimulation mit an eine Mikrotiterplatte gebundenen anti-CD3-Antikörpern und löslichen anti-CD28-Antikörpern durchführten und erst anschließend das ATP hinzugaben, wurde bei den Untersuchungen dieser Arbeit gleichzeitig mit gebundenen anti-CD3/anti-CD2/anti-CD28-Antikörpern und verschiedenen ATP-Konzentrationen stimuliert. Es ist durchaus denkbar, dass exogenes ATP unterschiedliche Wirkungen auf naive und bereits vorstimulierte Zellen ausübt. In den Untersuchungen von Trabanelli et al. [2012] wurde auch gezeigt, dass die ATP-Kostimulation teilweise entgegengesetzte Effekte auf unterschiedliche Zellpopulationen haben kann. Ein Einfluss des Stimulationszeitpunktes wäre somit nicht überraschend und müsste zukünftig näher untersucht werden.

Zusätzlich habe ich auch die Möglichkeit untersucht, dass die ATP-Kostimulation zu einer Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren führen kann. Durch den Abbau von extrazellulärem ATP entsteht Adenosin, welches über den A2A-Rezeptor durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg vor allem inhibitorische Wirkungen auf T-Zellen entfaltet [Huang et al. 1997, Kobie et al. 2006, Himer et al. 2010]. Dieser Mechanismus trägt z.B. zur inhibierenden Wirkung regulatorischer T-Zellen (Tregs) bei. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass Tregs auf der Zelloberfläche CD39 und CD73 exprimieren. CD39 katalysiert den Abbau von ATP zu AMP. Dieses wird von CD73 weiter verstoffwechselt zu Adenosin [Kobie et al. 2006], welches über den A2A-Rezeptor in zahlreichen Aspekten inhibitorisch auf CD4-Zellen wirkt [Romio et al. 2011; Erdmann et al. 2005].

Die Blockade des A2A-Rezeptors zeigte bei Antikörper-Stimulation mit unterschiedlich konzentrierter ATP-Kostimulation keinen Effekt auf das CD62L-Shedding (Abb. 43), wohl aber auf die Interleukin 2-Produktion (Abb. 42) und den Verlauf der intrazellulären ATP-Konzentration (Abb. 41).

Hier war ein ähnlicher Effekt wie bei Blockade des P2X7-Rezeptors zu sehen: Die durch ATP-Kostimulation bedingte Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration wurde durch einen A2A-Block teilweise ausgeglichen (Abb. 41).

Auch der von Erdmann et al. [2005] beschriebene Interleukin 2-hemmende Effekt des A2A-Rezeptors konnte in dieser Arbeit nachvollzogen werden (Abb. 42): Bei A2A-Rezeptor-Blockade waren höhere Interleukin 2-Spiegel messbar.

Darüber hinaus hatte der A2A-Block auch einen zytoprotektiven Effekt (Abb. 44).

Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, die Adenosin einen zytoprotektiven Effekt in aktivierten CD4-Zellen zuschreiben [Himer et al. 2010]. Demnach müsste ein A2A-Block vermehrten Zelltod nach Stimulation zur Folge haben.

5.2.3 Effekte von ATP, P2X7- und A2A-Rezeptor auf die Proliferation

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit dem Effekt purinerge Substanzen auf die Proliferationsrate von CD4-Zellen beschäftigt. So konnte für Adenosin ein antiproliferativer Effekt sowohl für naive [Huang et al. 1997] als auch für differenzierte CD4-Zellen [Csóka et al. 2008] gezeigt werden, während die Effekte von ATP je nach Konzentration und betrachteter Zellpopulation unterschiedlich sind [Trabanelli et al. 2012].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Effekte von ATP, P2X7-Rezeptor und A2A-Rezeptor auf die Proliferationsrate Antikörper-stimulierter CD4-Zellen untersucht. Hier zeigte sich zunächst, dass die Zugabe von 3mM ATP die Proliferation aufgereinigter CD4+ Zellen nach Stimulation mit immobilisiertem OKT3

vollständig hemmte (Abb. 46). Überraschenderweise wurde die Proliferation durch Zugabe eines P2X7-Blockers ebenfalls vollständig gehemmt, so dass nicht entschieden werden kann, ob der antiproliferative Effekt von 3mM ATP durch P2X7 vermittelt wird. Die hemmende Wirkung von P2X7-Blockade auf die Proliferation ist in Einklang mit ähnlichen Beobachtungen an Mikrogliazellen [Bianco et al. 2006].

Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten so deuten, dass niedrige ATP-Konzentrationen, so wie sie physiologischerweise im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung freigesetzt werden, für die Proliferation notwendig sind und durch P2X7 vermittelt werden. Dagegen wirken hohe ATP-Dosen, möglicherweise über eine starke P2X7-Stimulation, proliferationshemmend. Da der P2X7-Inhibitor auch die notwendigen niedrigschwelligen P2X7-Impulse blockiert, kann man keine Aussage über seine Wirkung auf die hohen ATP-Dosen machen.

Neben der antiproliferativen Wirkung eines P2X7-Inhibitors auf Mikrogliazellen [Bianco et al. 2006] wurde diese auch bei aktivierten CD4-Zellen für hohe ATP-Dosen beobachtet [Trabanelli et al. 2012]. Hier wurden detaillierte Untersuchungen mit unterschiedlichen stimulierenden ATP-Konzentrationen durchgeführt. Dabei förderten niedrige ATP-Konzentrationen um 250nM die Proliferation, während hohe ATP-Konzentrationen über 1mM einen klar antiproliferativen Effekt hatten.

Der antiproliferative Effekt einer P2X7-Blockade hat eine detailliertere Betrachtung verdient. Es ist bekannt, dass unterschiedliche ATP-Dosierungen verschiedene Wirkungen auf den P2X7-Rezeptor haben können: Während hohe ATP-Konzentrationen die Ausbildung einer Pore und die Auslösung der Apoptose bewirken, wirken niedrigere ATP-Konzentrationen über die Ionenkanal-Aktivität von P2X7 proliferationssteigernd [Baricordi et al. 1999]. Es ist zu vermuten, dass diese Beobachtung auch dem scheinbaren Widerspruch, dass sowohl eine hohe stimulierende ATP-Konzentration (und damit eine starke Aktivierung des P2X7-Rezeptors) als auch eine totale Blockade des P2X7-Rezeptors antiproliferativ wirken, zugrunde liegt.

In der Arbeit von Trabanelli et al. wurde überdies ein unterschiedlicher Einfluss von hohen ATP-Dosen auf regulatorische und Effektor-T-Zellen beschrieben: Während Effektorzellen gehemmt werden, weisen Tregs eine hohe Proliferationsrate bei hohen ATP-Konzentrationen auf [Trabanelli et al. 2012]. Eine mögliche Erklärung wäre die erhöhte Expression von ATPasen auf der Zelloberfläche, die die ATP-Konzentration nahe der Zelloberfläche auf einen intermediären Wert senken [Rissiek et al. 2015]. Die auf regulatorischen T-Zellen vermehrt exprimierte ATPase CD39 scheint hier jedoch nicht allein verantwortlich zu sein: Die Anwesenheit eines CD39-Antagonisten wirkte auf regulatorische T-Zellen proliferationssteigernd [Trabanelli et al. 2012].

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Wirkungen eines ATP-Stimulus auf die P2X7-Expressionsstärke in CD4+ Effektor- und regulatorischen T-Zellen. Ein ATP-Stimulus von 1mM bewirkte in CD4-Zellen eine Hochregulation der P2X7-mRNA, während dieser Effekt in regulatorischen T-Zellen nicht eintrat [Trabanelli et al. 2012].

Außerdem korrelierte die Proliferationsrate aktivierter CD4-Zellen auf einen ATP-Stimulus mit der Expression unterschiedlicher Spleißvarianten von CD45: Während ATP bei CD45RA-exprimierenden Zellen proliferationsfördernd wirkte, wirkte es bei CD45RO-exprimierenden Zellen proliferationshemmend [Trabanelli et al. 2012].

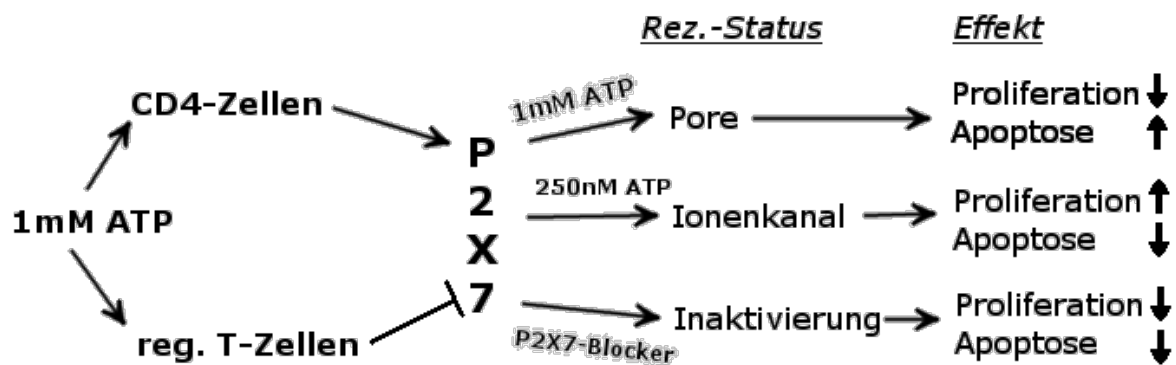


Abb. 64 Zusammenspiel von ATP und P2X7 auf Proliferation und Apoptose

1mM ATP bewirkt bei CD4-Zellen eine Hochregulation von P2X7, der Rezeptor nimmt den Porenstatus ein und wirkt antiproliferativ und proapoptotisch. Dieselbe ATP-Konzentration bewirkt bei regulatorischen T-Zellen eine verminderte P2X7-Expression und ist somit proliferationssteigernd und antiapoptotisch. Niedrigere ATP-Konzentrationen würden den Rezeptor in die Ionenkanalform überführen und somit proliferationsfördernd und antiapoptotisch wirken. Ein P2X7-Block blockiert sowohl Proliferation als auch Apoptose.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, dass die Porenform des P2X7 für den proliferativen Effekt notwendig ist [Adinolfi et al. 2005, Monif et al. 2009]. Es gibt zudem diverse Hinweise in verschiedensten Veröffentlichungen, dass der Status des P2X7-Rezeptors von zahlreichen zellulären und milieubedingten Faktoren abhängig ist. Außerdem liegt die EC₅₀ des Rezeptors bei >100µM [Jarvis und Khakh 2009], ein Effekt des P2X7 bei einer ATP-Konzentration von 250nM ist also allenfalls mittelbar über zwischengeschaltete Signalwege zu erwarten. Die hier aufgeworfenen Fragen sprengen den Rahmen dieser Arbeit und müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Im Gegensatz zu P2X7 hatte der A2A-Rezeptor in meinen Untersuchungen keinen entscheidenden Einfluss auf die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Proliferation. Für den A2A-Adenosinrezeptor sind in der Literatur antiapoptotische und proliferationshemmende Effekte in Zusammenhang mit Adenosin-Behandlung von CD4-Zellen beschrieben [Kobie et al. 2006]. Bei Zugabe eines A2A-Antagonisten wäre nach diesen Erkenntnissen allenfalls eine vermehrte Proliferation zu erwarten, diese zeigte sich nicht. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen einen leichten Trend zu vermehrter Proliferation, der jedoch nicht signifikant ist.

5.3 Kritische Überprüfung des ImmuKnow®-Kits und eigene Zellseparationsversuche

Der ATP-Stoffwechsel von CD4-Zellen hat als Marker für den zellulären Immunstatus in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen. Eine Möglichkeit zur Messung ist die Verwendung des Cylex ImmuKnow®-Kits (siehe „1.5 Die T-Zell-Funktion als Marker zur Bestimmung des Immunstatus“). Laut Herstellerangaben kann der Kit anhand der Höhe des Anstiegs des intrazellulären ATP-Gehalts von CD4+ T-Zellen nach Stimulation zwischen Infektions- oder Abstoßung-bedingten Immunreaktionen unterscheiden. Ein Teil meiner Arbeit war dem Versuch gewidmet, die Wirkungsweise dieses Kits zu überprüfen.

5.3.1 Das Prinzip der Zellseparation mittels Magnet-Beads auf Mikrotiterplatten ist problembehaftet

Zum Zwecke der Ausweitung und gegebenenfalls Anpassung des Messprinzips des ImmuKnow®-Kits über die CD4-Zell-Separation hinaus wurde zunächst versucht das Prinzip der Bead-Separation bestimmter Subpopulationen aus Vollblut oder aus PBMCs mittels anderer separat erwerbbarer Materialien durchzuführen.

Nachdem vorherige Untersuchungen dieser Arbeit beim Beschichten von Mikrotiterplatten mit anti-CD3-Antikörpern große Unterschiede verschiedener Platten bezüglich der Bindungseigenschaften zeigten (Abb. 25 und 26), wurden zunächst Mikrotiterplatten unterschiedlicher Hersteller und Modelle bezüglich unspezifischer Bindungseigenschaften untersucht.

Untersuchungen zur Interaktion von Zelloberflächen mit Polystyren-Oberflächen sind bereits in den 1970er und 1980er Jahren durchgeführt worden, hier zeigten sich vor allem positiv geladene Kunststoffoberflächen [Curtis et al. 1973] sowie freie Hydroxyl-Gruppen und Sulfyl-Gruppen [Curtis et al. 1983] als besonders „zellbindend“. Auf Grundlage dieser vielen Studien wurden zahlreiche Mikrotiter-Platten entwickelt, deren Kunststoffoberflächen besonders bindend oder abweisend für Zelloberflächen sind.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Mikrotiter-Platten zeigte sich bei Verwendung von PBMCs bei den meisten Platten keine unspezifische Zellbindung (Abb. 47), während bei Verwendung von Vollblut augenscheinlich viele Zellen unspezifisch an die Platten gebunden blieben (Abb. 48). Eine Ausnahme bildete lediglich die mit dem ImmuKnow-Kit® mitgelieferte Platte.

Für diese Beobachtung bestehen zwei mögliche Ursachen:

1. Die Zellen, die an den Platten unspezifisch gebunden sind, sind vor allen Dingen solche, die in PBMCs nicht vorkommen und sie müssen auf Stimulation mit einer vermehrten ATP-Produktion reagieren. Am ehesten kommen hier die Granulozyten oder Thrombozyten in Betracht.
2. Durch die Ausbildung vieler negativer Ladungen auf der Zelloberfläche bei PHA-Stimulation bleiben vermehrt Zellen an der Plattenoberfläche haften, deren intrazelluläres ATP dann gemessen wird. Ein Großteil dieser negativen Ladungen kommt durch den Phosphatidylserin-Shift, der auch in vielen Untersuchungen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Die Oberflächenveränderung von Granulozyten und ihrer größten Subpopulation, der Neutrophilen, ist in zahlreichen Studien untersucht worden [Mantovani et al. 2011]. Zahlreiche Rezeptoren, die nach Aktivierung der Neutrophilen vermehrt exprimiert werden, wurden beschrieben: CD18 zur Interaktion mit dendritischen Zellen [van

Gisbergen et al. 2005] und CD11a für die Interaktion mit Gefäßendothel [Janeway et al. 2009] nehmen hier eine besondere Stellung ein.

Auch für Thrombozyten ist eine Hochregulation bestimmter Oberflächen-Proteine bei Stimulation beschrieben worden, die zu einer vermehrten Zelladhäsion führen (siehe Kapitel 5.3.2 „Untersuchungen des ImmuKnow®-Kits“).

Wie an den Mikrotiter-Platten blieben auch an den magnetischen Beads viele Zellen unspezifisch haften (Abb. 50). Als Erklärung kommen dieselben Ursachen in Betracht, die bei der unspezifischen Bindung an die Kunststoffoberfläche der Platten eine Rolle spielen.

Ein „Nachahmen“ des ImmuKnow®-Kits mit anderen Materialien war so nicht befriedigend durchführbar, die Beobachtung gab Anstoß zu genaueren Untersuchungen des ImmuKnow®-Kits.

5.3.2 Untersuchungen des ImmuKnow®-Kits

Bei vielen gesunden Probanden wurde mittels des Cylex™ ImmuKnow®-Kits ein Anstieg des intrazellulären ATP in CD4-Zellen um das 10- bis 20-fache festgestellt. Die in dieser Arbeit dargestellten eigenen Untersuchungen mit aufgereinigten CD4+ Zellen ließen jedoch nur einen Anstieg des intrazellulären ATP nach PHA-Stimulation auf das 2- bis 3-fache erkennen (Abb. 16 und 27).

Um die Ursache für diese Diskrepanz zu finden wurden einzelne Schritte des ImmuKnow®-Protokolls einer kritischen Prüfung unterzogen. Als ein möglicher Grund wurde die schlechte Aufreinigung der CD4+ Zellen im ImmuKnow®-Verfahren ausgemacht. Bei Verwendung des ImmuKnow®-Kits zeigte sich eine schlechte Depletion von CD4-Zellen aus dem Überstand um lediglich 4 Prozentpunkte. Eine solch geringe Depletions-Rate ist auch mit der gemessenen ATP-Konzentration nicht vereinbar (Abb. 51). Nimmt man Zellzahlen im oberen Normbereich an und errechnet aus den gemessenen ATP-Konzentrationen die intrazellulären ATP-Konzentrationen so ergeben sich intrazelluläre ATP-Konzentrationen von über 100mM, die weit von der physiologischen Konzentration von 4-5mM entfernt sind. Diese Beobachtungen erweckten Zweifel daran, ob beim ImmuKnow®-Assay wirklich wie behauptet lediglich das intrazelluläre ATP in den CD4-Zellen gemessen wird.

Diese Zweifel wurden verstärkt durch die Messung eines vermeintlichen ATP-Anstiegs in Vollblut-Proben, aus denen vorher nachweislich fast alle CD4+ Zellen depletiert worden waren (Abb. 54). Diese Versuche zeigen eindeutig, dass an den ImmuKnow®-Beads offensichtlich unspezifisch Zellen „kleben“ bleiben, deren ATP-Gehalt zu dem gemessenen ATP-Spiegel beitragen.

Weitere ähnliche Untersuchungen mit CD8-, CD14- und CD15-depletiertem Vollblut zeigten, dass diese Zellpopulationen (CD8+ T-Zellen, Monozyten und Granulozyten) nicht in relevantem Ausmaß für die gemessene ATP-Konzentration verantwortlich sind (Abb. 57).

Auch Thrombozyten wurden als mögliche Quelle des „unspezifischen“ ATPs untersucht (Abb. 58). Diese Zellen sind bekannt für ihre ausgeprägte Bindungsfähigkeit nach Aktivierung, außerdem besitzen sie große Mengen ATP in intrazellulären Granula [Siess 1989]. Zudem wurde ein selbstverstärkender Mechanismus zwischen aktivierten T-Zellen und Thrombozyten mit direkten Zell-Zell-Interaktionen beschrieben, bei dem aktivierte T-Zellen Thrombozyten aktivieren können [Danese et al. 2004].

Die Zugabe zusätzlicher Thrombozyten zu verschiedenen Arten von Proben führte zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen. Während die Thrombozyten-Zugabe die

ATP-Konzentration nach Stimulation in einer Vollblutprobe und bei aufgereinigten CD4-Zellen eher negativ oder gar nicht beeinflusste, steigerte sie diese bei Verwendung von PBMCs erheblich.

Eine Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnte darin liegen, dass die Thrombozyten in einem allogenen Kontext verwendet wurden. Thrombozyten exprimieren auf der Zelloberfläche zahlreiche HLA-Antigene, die in einem allogenen Serum (Vollblut) eine agglutinierende Immunreaktion hervorrufen und dadurch die Bindung der Thrombozyten an die Beads verhindern können. Gleichzeitig ist es möglich, dass in den aufgereinigten CD4-Zellen andere Subpopulationen fehlen, die für eine Stimulation der Thrombozyten durch PHA notwendig sind. In den PBMCs sind dagegen alle notwendigen Zellpopulationen vorhanden, aber das allogene Serum fehlt. Zur endgültigen Bestätigung der These, dass das im ImmuKnow®-Assay gemessene ATP hauptsächlich auf Thrombozyten zurückzuführen ist, wären weitere Untersuchungen mit HLA-kompatiblen Thrombozyten notwendig.

Trotz dieser Erkenntnis sei an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich auf die durch zahlreiche Studien bestätigte klinische Relevanz des ImmuKnow®-Assays hingewiesen. So konnte für die klinische Diagnostik und zur Therapieüberwachung bei Organtransplantationen [Kowalski et al. 2003], bei Stammzellspenden [Gesundheit et al. 2010] und zur Überwachung von HIV-Patienten mit Koinfektionen [Natsuda et al. 2014] ein Nutzen des ImmuKnow®-Assays nachgewiesen werden.

5.3.3. Extrazelluläres ATP als Parameter zur Immunstatus-Beurteilung

Die Messung von immunologischen Botenstoffen als Parameter zur Überprüfung des Immunstatus eines Patienten zählt schon länger zu den etablierten klinisch-diagnostischen Verfahren. So sind die Messung der Interleukin 2 und Interferon γ -Produktion von T-Zellen nach Stimulation ein anerkanntes Verfahren für die Bestimmung der zellulären Immunität. Neben diesen Methoden konnten in jüngerer Zeit die Interleukin 6-Sekretion und jetzt auch mit der Entwicklung des ImmuKnow®-Assays die intrazelluläre ATP-Konzentration als weitere Marker etabliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich daher die Frage nach dem extrazellulären, sezernierten ATP als einem möglichen weiteren Marker für den zellulären Immunstatus.

Wie die Untersuchungen an humanen CD4-Zellen zeigten, war auch nach Stimulation mittels PHA oder anti-CD3-Antikörpern lediglich innerhalb der ersten 2 Stunden nach Stimulation extrazellulär ATP nachweisbar. Diese Beobachtung wurde vor allem ATPasen auf der Zelloberfläche zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die ATP-Sekretion von aufgereinigten humanen CD4-Zellen unter Zugabe von ATPase-Inhibitoren gemessen. Hier zeigte sich ein eindeutiger Anstieg nach Stimulation mittels anti-CD3-Antikörpern (Abb. 60). Für aussagekräftige Messwerte waren allerdings Zellzahlen von mindestens 10^6 /Well erforderlich. Da unstimulierte und stimulierte Zustände verglichen werden und für eine statistische Auswertung der schwankenden Einzelmesswerte 3-4 wells pro Ansatz erforderlich sind, wären ca. 8×10^6 CD4-Zellen für eine Messung erforderlich. Bei CD4-Zellzahlen von 500 CD4-Zellen/ μ l Blut (unterer Referenzwert) müssten dem zu untersuchenden Patienten damit ca. 16ml Blut entnommen werden. Darüber hinaus stellt die Aufreinigung von CD4-Zellen durch das Fehlen anderer Zellpopulationen die *in vivo*-Situation nur unzureichend dar. Ein solcher Test würde

also lediglich immunkompromittierte Zustände erfassen, die mit einer eingeschränkten Funktion von CD4-Zellen einhergehen.

5.4 P2X7 im Kontext der aktuellen klinischen Forschung

In letzter Zeit ist der P2X7-Rezeptor als potenzielles therapeutisches Ziel bei zahlreichen Krankheitsentitäten immer mehr in den Vordergrund gerückt. Für zahlreiche entzündliche Erkrankungen wie Antikörper-vermittelte Glomerulonephritiden [Taylor et al. 2009], chronische neuropathische oder entzündliche Schmerzen [Chessel et al. 2005], rheumatische Gelenkerkrankungen [Al-Shukaili et al. 2007], chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [Kurashima et al. 2012] und chronisch-entzündliche Lungenkrankheiten wie Sarkoidose [Mizuno et al. 2001] und Tuberkulose [Fernando et al. 2007] oder COPD (chronic obstructive pulmonary disease) [Lucatelli et al. 2011] und Lungenfibrose [Riteau et al. 2010] konnte eine wichtige Rolle des P2X7-Rezeptors nachgewiesen werden. Bei COPD und Lungenfibrose konnten zudem erhöhte extrazelluläre ATP-Spiegel gemessen werden [Riteau et al. 2010], die möglicherweise auf die in dieser Arbeit beobachtete P2X7-abhängige ATP-Freisetzung zurück zu führen sind.

Außerdem konnte in zahlreichen akut-ischämischen Zuständen in verschiedenen Organsystemen eine wichtige Rolle des P2X7-Rezeptors bei postischämischen Umbauprozessen gezeigt werden, die häufig für Residualschäden verantwortlich sind.

Alle diese Erkenntnisse fokussieren auf die Expression und die Aktivierung des P2X7-Rezeptors auf Zellen myeloischen Ursprungs (Podozyten, Mikroglia, Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten). Dagegen fehlen Studien zur Aktivität des P2X7-Rezeptors auf T-Zellen in Zusammenhang mit bestimmten entzündlichen Krankheitsbildern noch weitgehend.

Es ist nicht überraschend, dass der P2X7-Rezeptor über seine proliferative Wirkung bei der Genese diverser Neoplasien eine entscheidende Rolle spielt. Auf vielen Tumoren wird P2X7 vermehrt exprimiert und die ATP-Konzentration in festen Tumoren ist hoch [Di Virgilio et al. 2009, Pellegatti et al. 2008]. Obwohl nach derzeitigem Kenntnisstand keine signifikante Korrelation zwischen bestimmten Leukämien und bestimmten P2X7-Mutationen gefunden werden konnte, so zeigte sich doch in zahlreichen humanen leukämischen Zellreihen eine erhöhte P2X7-Expression, insbesondere in den Leukämie-Subtypen, die mit einer schlechten Prognose einhergehen [Zhang et al. 2004].

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte am Beispiel von T-Zellen gezeigt werden, dass P2X7-Aktivierung in diesen Zellen vor allem für den ATP-Ausstrom und weniger für die Neusynthese von ATP in T-Zellen verantwortlich ist. Das freigesetzte ATP dient dann anderen (Leukämie-)Zellen parakrin als Wachstums- und Proliferationsstimulans. Gerade in einer Ansammlung leukämischer T-Zellen, z.B. in einem Lymphknoten, könnte eine P2X7-Blockade so zu einer verminderten ATP-Ausschüttung und somit zu einer verminderten Wachstumsstimulation führen.

Die P2X7-Blockade als therapeutisches Konzept bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist bereits in zahlreichen klinischen Studien in Untersuchung. So zeigte der P2X7-Antagonist ADZ9056 in Phase-II-Studien bei Patienten mit

rheumatoider Arthritis eine Verminderung der Anzahl geschwollener und schmerzhafter Gelenke, jedoch ohne Effekt auf den Krankheitsverlauf (Studie: D1520C05287, Studie: NCT00520572). Eine weitere Studie zeigt außerdem für M. Crohn bei ADZ9056-Therapie einen positiven Effekt auf die Krankheitsaktivität (Studie: D8830C00002). Studien im Zusammenhang mit neoplastischen Erkrankungen stehen allerdings noch aus.

Das ATP, das physiologischerweise zur auto- und parakrinen Stimulation freigesetzt wird, kann auch als Parameter zur Beurteilung des zellulären Immunstatus genutzt werden. Im Gegensatz zu dem im ImmuKnow®-Assay gemessenen intrazellulären ATP zeigt sich jedoch ein entscheidender Unterschied: Im Gegensatz zum ImmuKnow®-Assay werden die CD4-Zellen nicht im Vollblut stimuliert, separiert und dann der Parameter gemessen. Die Aufreinigung der T-Zellen aus Vollblut muss vor Stimulation erfolgen, da die ATP-Produktion anderer Zellpopulationen im Vollblut ebenfalls erheblich ist und außerdem zahlreiche ATPasen für einen sofortigen Abbau des ausgeschleusten ATP sorgen. Bei der Stimulation von T-Zellen spielen aber neben dem eigentlichen Stimulans auch zahlreiche Zell-Zell-Interaktionen eine bedeutende Rolle, eine Aufreinigung der CD4-Zellen mit anschließender Stimulation lässt also wesentliche physiologische *in vivo*-Faktoren außer Acht. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre das von Ledderose et al. [2015] untersuchte Verfahren des Real-time Monitoring, bei dem die ATP-Konzentration in direkter Umgebung der Zelle gemessen werden kann. Ein solches Verfahren ist allerdings schlecht standardisierbar und sehr kosten- und zeitaufwendig, weswegen eine Anwendung in der Breite sehr unwahrscheinlich ist.

Eine weitere Möglichkeit ist es, die T-Zellen im Vollblut zu stimulieren und erst nach einer bestimmten Inkubationszeit aufzureinigen. Dann kann nach einer weiteren Inkubationszeit das extrazelluläre ATP gemessen werden. Hierzu ist allerdings ein genaueres Verständnis des Zeitablaufes der T-Zell-Stimulation - insbesondere auch des ATP-Stoffwechsels - notwendig. Nur so kann die optimale Länge für Stimulations- und Inkubationszeit nach Aufreinigung gefunden werden. Voraussetzung für eine solche Anordnung wäre außerdem, dass die ATP-Ausschleusung aus den Zellen zumindest mit leichter Verzögerung nach Stimulation stattfindet.

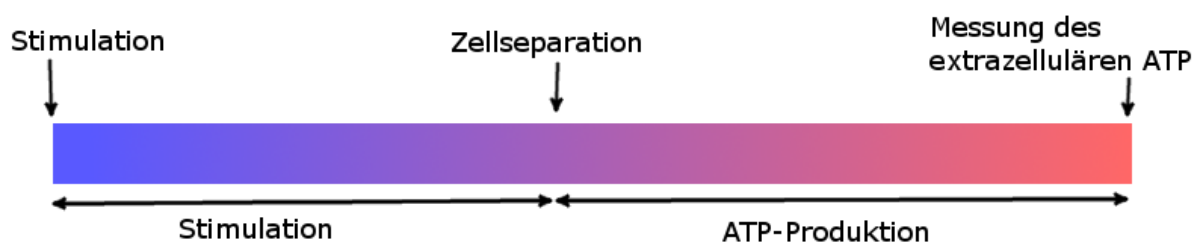


Abb. 65 zeitlicher Ablauf eines möglichen verbesserten Systems zur Messung der ATP-Freisetzung von CD4-Zellen nach Stimulation in Vollblut

Nach Stimulation von Vollblut werden die CD4-Zellen nach einer gewissen Zeit separiert. Dann wird nach weiterer Inkubationszeit die extrazelluläre ATP-Konzentration gemessen.

In Zusammenschau der Erkenntnisse dieser Arbeit lässt sich festhalten: Intrazelluläre ATP-Produktion und ATP-Ausschleusung aus der Zelle verlaufen nicht analog und sind unabhängig voneinander. Das heißt, die Messung des ausgeschleusten ATP ist ein Parameter für eine Zellfunktion, die durch die Messung anderer Parameter (z.B. die Messung des intrazellulären ATP) nicht mitgemessen werden kann. Immunkompromittierende Zustände, die sich durch andere Parameter nicht erfassen lassen, könnten über die Messung des extrazellulären ATP also möglicherweise erfasst werden. Insofern kann die Messung der ATP-Freisetzung also zu einer vollständigen Erfassung der zellulären Immunität beitragen.

Zusammenfassung

Die Bedeutung von ATP als Botenstoff und seine Wirkung auf verschiedene Rezeptoren wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Der durch ATP aktivierte Rezeptor P2X7 nimmt hier aufgrund seiner weiten Verbreitung auf Zellen des Immunsystems eine Sonderstellung ein.

Der ATP-Stoffwechsel von CD4-Zellen als Maß für die immunologische „Fitness“ von T-Zellen findet beim kommerziellen ImmuKnow®-Kit klinische Anwendung, der durch Messung des intrazellulären ATP-Spiegels (iATP) in CD4-Zellen Rückschlüsse auf den Immunstatus immunsupprimierter Patienten zulässt. In dieser Arbeit wurde zum einen die Eignung von ATP-Messungen (sowohl des intrazellulären ATP-Spiegels als auch der Menge des in die Umgebung freigesetzten ATPs) als Surrogat-Marker für die T-Zell-Aktivierung untersucht. Zum anderen wurde der Einfluss von exogen zugegebenem ATP auf die Reaktion von CD4+ T-Zellen nach Stimulation untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Reaktionen von T-Zellen von Maus und Mensch auf unterschiedliche stimulierende Substanzen untersucht.

Bei murinen Lymphomzellen führte Stimulation des P2X7-Rezeptors und des T-Zell-Rezeptors zur Änderung diverser Oberflächenmarker und zur Ausschleusung von ATP. Während die Stimulation von P2X7 mit einer Verminderung des intrazellulären ATP-Gehalts verbunden war, stieg dieser bei T-Zell-Rezeptor-Stimulation.

Bei humanen CD4+ T-Zellen führte die Stimulation durch Phytohämagglutinin (PHA) zur Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum verbunden mit einem Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration. Wurden die CD4-Zellen vor der Stimulation aufgereinigt fiel dieser Anstieg jedoch deutlich geringer aus. Während PHA vor allem einen Anstieg des intrazellulären ATPs bewirkte, führte Stimulation durch X-OKT3 vor allem zur Sekretion von IL-2. Die Zugabe von exogenem ATP führte in hohen Dosierungen (3mM) zu einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration sowie zur Unterdrückung der IL-2-Sekretion. Der Effekt auf das iATP konnte ganz, der auf das IL-2 teilweise durch Blockade des P2X7-Rezeptors aufgehoben werden. Exogenes ATP unterdrückte auch die Proliferation von T-Zellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise des ImmuKnow®-Kits kritisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse in hohem Maße von den verwendeten Mikrotiterplatten abhängig war und die Aufreinigung der CD4+ T-Zellen höchst unspezifisch ist. Der überwiegende Anteil des gemessenen ATPs stammte von einer Zellpopulation, die unabhängig von der CD4-Expression an der Platte oder den Beads kleben blieb. Vorläufige Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich um Thrombozyten handeln könnte.

Abschließend wurde daher untersucht, ob die ATP-Ausschleusung aus CD4-Zellen nach Stimulation möglicherweise einen brauchbaren Parameter zur Messung der Immunreaktion darstellt. Dabei konnte zwar nach Zugabe von ATPase-Inhibitoren ein klarer Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration nach PHA-Stimulation beobachtet werden, der allerdings eine große Zellzahl voraussetzte und daher nicht als Routinetest geeignet ist.

Zusammenfassend zeigt meine Arbeit, dass der kommerziell vertriebene ImmuKnow®-Test etwas anderes misst als was er zu messen vorgibt, und daher nicht als Test zur routinemäßigen globalen Beurteilung der Immunfunktion geeignet ist. Darüberhinaus zeigt die Arbeit, dass die iATP-Konzentration und ATP-Sekretion, IL-2-Produktion und die Entwicklung verschiedener Oberflächenmarker jeweils unterschiedliche Aspekte der T-Zell-Aktivierung abbilden. Keiner dieser Einzelparameter ist geeignet, ein vollständiges Bild des Immunstatus abzugeben.

Abstract

The role of ATP as an extracellular messenger molecule and its effects on different receptors have been widely studied in the last years. The ATP-activated P2X7 receptor plays a special role due to its ubiquitous expression on different types of immune cells.

The commercially available ImmuKnow®-Assay uses the intracellular ATP (iATP) content of CD4+ cells as a marker for the immunological „fitness“ of t cells that allows to draw conclusions about the immune state of immunosuppressed patients. In this thesis I examined whether ATP levels (both intra- and extracellular) qualify as surrogate markers for t cell activation. The influence of exogenously added ATP as a costimulatory substance during CD4+ cell stimulation was also examined.

In the first part of this thesis the reactions of murine and human t cells to different stimulating substances were examined. Murine lymphocytes showed a release of ATP and a change in different surface markers following to P2X7 and t cell receptor stimulation. While P2X7 stimulation led to a decrease in intracellular ATP levels, t cell receptor stimulation increased intracellular ATP concentrations.

In human CD4+ cells stimulation with phytohemagglutinin (PHA) led to ATP release into the extracellular space and an increase in intracellular ATP levels. When isolated CD4+ cells were stimulated, this increase was much lower. PHA stimulation predominantly raised the levels of intracellular iATP, while X-OKT3 stimulation mainly led to IL-2 secretion with little effect on iATP. Adding high doses of ATP (3mM) decreased iATP levels and IL-2 secretion. The drop in IL-2 secretion was partly antagonized by P2X7 inhibitors, the drop in iATP levels was fully antagonized. High levels of extracellular ATP also inhibited t cell proliferation.

In the second part of this thesis the operational mode of the ImmuKnow®-Assay was examined. The reproducibility of measurements was highly dependent on the microtiter plates that were used, and the positive selection of CD4+ cells on microtiter plates was highly unspecific. The main part of the detected ATP levels came from a cellular population that bound unspecifically to the plate or the beads independently of CD4 expression. Initial examinations suggest that this population might be thrombocytes.

Finally I examined whether ATP release from stimulated CD4+ might be a useful parameter for monitoring immune reactions. Increases in extracellular ATP levels were detectable after PHA stimulation only when ATPase inhibitors were added, but large numbers of cells were needed. Therefore this method is not suitable as a routine test.

In summary, the results of this thesis show that the ImmuKnow®-Assay measures something different from what it claims to measure (the iATP content of CD4+ cells). Therefore we do not consider it appropriate as a global measure of immune function. In addition, this thesis shows that iATP levels and ATP-secretion, IL-2 production and expression of surface markers represent different aspects of t cell activation. None of these parameters by themselves are appropriate to give a complete representation of the immune status.

Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosindiphosphat
AF700:	Alexa Fluor 700 (Farbstoff für die Durchflusszytometrie)
AMP:	Adenosinmonophosphat
APC:	Allophycocyanin (Farbstoff für die Durchflusszytometrie)
ART:	Adenosindiphosphat-Ribosyl-Transferase
ATP:	Adenosintriphosphat
BSA:	Bovines Serumalbumin
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD:	Cluster of Differentiation
COPD:	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronisch obstructive Lungenerkrankung)
DAG:	Diacylglycerin
DAPI:	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO:	Dimethylsulfoxid
eATP:	extrazelluläres ATP
EC ₅₀ :	mittlere effektive Konzentration
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymatisches Immunadsorptionsverfahren)
FACS:	Fluorescent activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS:	Fetal Calf Serum (fetales Kälber-Serum)
FITC:	Fluorescent Isothiocyanate (Farbstoff für die Durchflusszytometrie)
FSC:	Forward Scatter bei der Durchflusszytometrie
iATP:	intrazelluläres Adenosintriphosphat
IC ₅₀ :	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
IP ₃ :	Inositol-4,5,6-Phosphat
MFI:	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC:	Major Histocompatibility Complex
NAD:	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PE:	Phycoerythrin
PHA:	Phytohämagglutinin bestehend aus den zwei Proteinen PHA-L (Leukoagglutinin) und PHA-E
PI:	Propidiumiodid
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PKC:	Proteinkinase C
PLC:	Phospholipase C
POM-1:	Sodium Polyoxotungstate
PMA:	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
rpm:	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute beim Zentrifugieren)
RPMI:	Roswell Park Memorial Institut (Ort, wo das RPMI-1640 Medium erstmals entwickelt wurde)
RT:	Raumtemperatur
SSC:	Sideward-Scatter bei der Durchflusszytometrie
TNF:	Tumornekrosefaktor

Literatur

- Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Blognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005) Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16 (10) : 3260-72
- Al-Shukaili A, Al-Kaabi J, Hassan B (2008) A comparative study of interleukin-1beta production and P2X7 expression after ATP stimulation by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis patients and normal healthy controls. *Inflammation* 31 (2) : 84-90
- Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F (1996) An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* 87 (2) : 682-90
- Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F (1999) Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem* 274 (47) : 33206-8
- Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, Matteoli M, Di Virgilio F, Abbracchio MP, Verderio C (2006) A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem* 99 (3) : 745-58
- Bismuth G, Moreau JL, Sommé G, Duphot M, Dautry-Varsat A, Robb RJ, Théze J (1985) Regulation of interleukin 2 (IL-2) receptor expression: IL2 as an inducing signal for the expression of its own receptor on a murine T helper cell line. *Eur J Immunol* 15 (7) : 723-7
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cell: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110 (4) : 1225-32
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Koch-Nolte F, Haag F, Bulfone-Paus S (2009) ATP induces P2X7 receptor-independent cytokine and chemokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells. *J Leukoc Biol* 85 (4) : 692-702
- Burnstock G (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58 (1) : 58-86
- Burnstock G, Fredholm BB, North RA & Verkhratsky A (2010) The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol* 199 (2) : 93-147
- Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometrie* 27 (1) : 71-6

- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Bio Chem* 257 (13) : 7847-51
- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z (2011) Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol* 187 (2) : 676-83
- Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GW, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467 (7317) : 863-7
- Chessel IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CBA, Casula MA, Yiangos Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114 : 386-96
- Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhail A, Inoue Y, Woehrle T, Zhang Q, Hauser C, Junger WG (2010) Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal* 3 (125) : ra45
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36(9) : 1277-83
- Cortés-García JD, López-López C, Cortez-Espinosa N, García-Hernández MH, Guzmán-Flores JM, Layseca-Espinosa E, Portales-Cervantes L, Portales-Pérez DP (2015) Evaluation of the expression and function of the P2X7 receptor and ART1 in human regulatory T-cell subsets. *Immunobiology* 221 (1) : 84-93
- Csóka B, Himer L, Selmečzy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, Deitch EA, Splarics Z, Németh ZH, Haskó G (2008) Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J* 22 (10) : 3491-9
- Curtis ASG (1973) Cell adhesion. *Prog Biophys Mol Biol* 27 : 315-84
- Curtis ASG, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F (1983) Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J Cell Biol* 97 (5) : 1500-6
- Deli T, Varga N, Ádám A, Kenessey I, Rásó E, Puskás LG, Tóvári J, Fodor J, Fehér M, Szigeti GP, Csernoch L, Tímár J (2007) Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer* 121 (1) : 55-65
- Danese S, de la Motte C, Rivera-Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C (2004) Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol* 172 (4) : 2011-5

- Diamint B, Krüger PG (1967) Histamine Release from Isolated Rat Peritoneal Mast Cells Induced by Adenosine-5'-Triphosphate. *Acta Physiol Scand* 71 (4) : 291–302
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baridordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97 (3) : 587-600
- Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009) P2X7: a growth-promoting receptor - implications for cancer. *Purinergic Signal* 5 (2) : 251-6
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Kendall Harden T, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461 (7261) : 282-6
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Küper N, Karcher C, Weissmüller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99 (10) : 1100-8
- Erdmann AA, Gao ZG, Jung U, Foley J, Borenstein T, Jacobson KA, Fowler DH (2005) Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood* 105 (12) : 4707-14
- Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, Wiley JS, Britton WJ (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175 (4) : 360-6
- Filippini A, Taffs RE & Sitkovsky MV (1990) Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (21) : 8267-71
- Fujii S, Kato H, Kuroda Y (1999) Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Lett* 276 (1) : 21–4
- Galkina E, Tanousis K, Preece G, Tolaini M, Kioussis D, Florey O, Haskard DO, Tedder TF, Ager A (2003) L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med* 198 (9) : 1323–35
- Gesundheit B, Budowski E, Israeli M, Shapira MY, Resnick IB, Bringer R, Azar Y, Samuel S, Dray L, Amar A, Kristt D, Or R (2010) Assessment of CD4 T-lymphocyte reactivity by the Cylex ImmuKnow assay in patients following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 45 (3) : 527-33

- Gillis S, Smith KA, Watson J (1980) Biochemical characterization of lymphocyte regulatory molecules. II. Purification of a class of rat and human lymphokines. *J Immunol* 124 (4) : 1954-62
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, Nadler LM (1991) B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (15) : 6575-9
- van Gisbergen KPJM, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201 (8) : 1281-92
- Gutiérrez-Martín Y, Bustillo D, Gómez-Villafuertes R, Sánchez-Nogueiro J, Torregrosa-Hetland C, Binz T, Gutiérrez M, Miras-Protugal MT, Artalejo AR (2011) P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 286 (13) : 11370-81
- Himer L, Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Pacher TP, Németh ZH, Deitch EA, Vizi ES, Cronstein BN, Haskó G (2010) Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J* 24 (8) : 2631-40
- Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M (1997) Role of A2a adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T cell activation and expansion. *Blood* 90 (4) : 1600-10
- Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (3) : C752-60
- Imboden JB, Weiss A, Stobo JD (1985) The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J Immunol* 134 (2) : 663-5
- Inoue K (1998) ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Jpn J Pharmacol* 78 (4) : 405-10
- Ishii K, Kaneda M, Li H, Rockland KS, Hashikawa T (2003) Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina. *J Comp Neurol* 459 (3) : 267-77
- Israeli M, Yussim A, Mor E, Sredni B, Klein T (2007) Preceding the rejection: In search for a comprehensive post-transplant immune monitoring platform. *Transpl Immunol* 18 (1) : 7-12
- Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Immunologie*, 7. Aufl., Springer, Berlin

- Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56 (1) : 208-15
- Jelinek DF, Splawski JB, Lipsky PE (1986) The roles of interleukin 2 and interferon-gamma in human B cell activation, growth and differentiation. *Eur J Immunol* 16 (8) : 925 - 32
- June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB (1987) T-Cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7 (12) : 4472-81
- Jusko WJ, Thosom AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, Christians U, Winkler M, Fitzsimmons WE, Lieberman R, McBride J, Kobayashi M, Warty V, Soldin SJ (1995) Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* 17 (6) : 606-14
- Kahlenberg JM, Dubyak GR (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7-receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (5) : C1100-8
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR (2006) T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177(10): 6780 - 6
- Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, Lobashevsky A, Redfield R, Schweitzer E, Heredia A, Reardon E, Davis C, Bentlejewski C, Fung J, Shapiro R, Zeevi A (2003) Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant* 17 (2) : 77-88
- Kunz D, Pross M, König W, Lippert H, Manger T (1998) Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6 and cellular immune status in the early phase after liver transplantation. *Transplant Proc* 30 (5) : 2398-9
- Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weißinger F, Tony HP, Wilhelm M (2000) Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96 (2) : 384-92
- Kurashima Y, Amiy T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H (2012) Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3 : 1-12
- Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005) A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 174 (2) : 1073-80
- Ledderose C, Bao Y, Lidicky M, Zipperle J, Li L, Strasser K, Shapiro NI, Junger WG (2014) Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling. *J Biol Chem* 289 (37) : 25936-45
- Ledderose C, Bao Y, Zhang J, Junger WG (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signaling during immune cell activation. *Acta Physiol (Oxf)* 213 (2) : 334-45

- Levine BL, Mosca JD, Riley JL, Carroll RG, Vahey MT, Jagodzinski LL, Wagner KF, Mayers DL, Burke DS, Weislow OS, St. Louis DC, June CH (1996) Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science* 272 (5270) : 1939-43
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage. Springer Verlag Heidelberg, Heidelberg
- Lucatelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, Zissel G, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC, Lungarella G, Idzko M (2011) P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44 (3) : 423-9
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11 (8) : 519-31
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, Beck PL, Muruve DA, Kubes P (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330 (6002) : 362-6
- McCloskey MA, Fan Y & Luther S (1999) Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol* 163 (2) : 970-7
- Mizuno K, Okamoto H & Horio T (2001) Heightened ability of monocytes from sarcoidosis patients to form multi-nucleated giant cells in vitro by supernatants of concanavalin A-stimulated mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 126 : 151-6
- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA (2009) The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore". *J Neurosci* 29 (12) : 3781-91
- Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Grimm M, Jakob T, Martin SF, Di Virgilio F, Boeynaems J-M, Virchow JC, Idzko M (2010) The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 65 (12) : 1545-53
- Natsuda K, Soyama A, Takatsuki M, Hidaka M, Kitasato A, Adachi T, Kuroki T, Eguchi S (2014) The efficacy of the ImmuKnow assay for evaluating the immune status in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-coinfected patients. *Transplant Proc* 46 (3) : 733-5
- Needleman P, Minkes MS, Douglas JR (1974) Stimulation of prostaglandin biosynthesis by adenine nucleotides. Profile of prostaglandin release by perfused organs. *Circ Res* 34 (4) : 455-60
- Niemi K, Teirilä L, Lappalainen J, Rajamäki K, Baumann MH, Öörni K, Wolff H, Kovanen PT, Matikainen S, Eklund KK (2011) Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol* 186 (11) : 6119-28

- Oxford Immunotec Ltd (2018) How the test Works. Marlborough, USA. [online im Internet] URL: <http://www.oxfordimmunotec.com/international/products-services/t-spot-tb-test/how-it-works/> [Stand: 07.02.2018, 20:00]
- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccari F, Pistoia V, Di Virgilio F (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 3 (7) : e2599
- Piccini A, Cara S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A (2007) ATP ist released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (23) : 8067-72
- Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE, Dubyak GR, Hackos D, Dixit VM (2013) Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 186 (11) : 6553-61
- Quiagen GmbH (2018) QuantiFERON-TB Gold Plus - Product Details - Principle .Hilden, Deutschland. [online im Internet] URL: <https://www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/human-pathogens/quantiferon-tb-gold-plus/#productdetails> [Stand: 07.02.2018, 21:00]
- Quian BZ, Pollard WP (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141 (1) : 39-51
- Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V (2006) The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* 66 (2) : 907-14
- Rissiek A, Baumann I, Cuapio A, Mautner A, Kolster M, Arck PC, Dodge-Khatami A, Mittrücker H-W, Koch-Nolte F, Haag F, Tolosa E (2015) The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J Autoimmun* 58 : 12-20
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VFJ, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Coullin I (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation an fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182 (6) : 774-83
- Roger S, Pelegrin P (2011) P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opin Investig Drugs* 20 (7) : 875-80
- Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J (2011) Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg an Teff cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 301 (2) : C530-9
- Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L (2005) CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol* 77 (4) : 513-21

- Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1 (39) : ra6
- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19 (4) : 571-82
- Sester M, Sotiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D (2011) Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 37 (1) : 100-11
- Siess W (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69 (1) : 58 - 169
- Slater NM, Barden JA, Murphy CR (2000) Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy. *Histochem J* 32 (6) : 365-72
- Sottong PR, Rosebrock JA, Britz JA, Kramer TR (2000) Measurement of T-lymphocyte responses in whole-blood cultures using newly synthesized DNA and ATP. *Clin Diag Lab Immunol* 7 (2) : 307-11
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272 (5262) : 735-8
- Taylor SRJ, Turner CM, Elliott JI, McDaid J, Hewitt R, Smith J, Pickering MC, Whitehouse DL, Cook HT, Burnstock G, Pusey CD, Unwin RJ, Tam FWK (2009) P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 20 (6) : 1275-81
- Trabanelli S, Ocadlikova, Gulinelli S, Curti A, Salvestrini V, Paula Vieira R, Idzko M, Di Virgilio F, Ferrari D, Lemoli RM (2012) Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation. *J Immunol* 189 (3) : 1303-10
- Trickett A, Kwan YL (2003) T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* 275 (1-2) : 251-5
- Weiss A, Stob JD (1984) Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med* 160 (5) : 1284-99
- Woehrle T, Yip L, Elkhail A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, Junger WG (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T cell activation at the immune synapse. *Blood* 116 (18) : 3475-84

- Yatscoff RW, Copeland KR, Faraci CJ (1990) Abbott TDx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporine in whole blood. *Clin Chem* 36 (11) : 1969-73
- Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J.* 23 (6) : 1685-93
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Di Virgilio D (1990) Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J Immunol* 145 (5) : 1545-50
- Zhang Y, Palmblad J, Fredholm BB (1996) Biphasic effect of ATP on neutrophil functions mediated by P2U and adenosine A2A receptors. *Biochem Pharmacol* 51 (7) : 957-65
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362 (4-5) : 299–309
- Zocchi E, Daga A, Usai C, Franco L, Guida L, Bruzzone S, Costa A, Marchetti C, De Flora A (1998) Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J Biol Chem* 273 (14) : 8017-24

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Friedrich Haag, der mir die Möglichkeit gegeben hat, auf diesem aufregenden wissenschaftlichen Gebiet zu promovieren. Er stand mir stets mit wertvollem Rat zur Seite, gab wertvolle Impulse, wenn die Ergebnisse in Sackgassen zu führen schienen, und ließ dennoch größtmögliche Freiheit für eigene Ideen und Interessenschwerpunkte. Er war bei Fragen und Problemen immer erreichbar.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Gudrun Dubberke - der „guten Seele“ des Labors - , die mir bei meinen ersten Schritten im Labor und auch später mit Engelsgeduld zur Seite stand. Sie wusste bei Schwierigkeiten bei der Durchführung, bei Organisatorischem und bei der Beschaffung von Material, bei persönlichen Schwierigkeiten und bei allem sonst stets Rat.

Prof. Eva Tholosa möchte ich für die Erstellung des Zweit-Gutachtens danken.

An das gesamte Institut für Immunologie des UKE, insbesondere Prof. Eva Tholosa, Prof. Hans-Willi Mittrücker und Prof. Friedrich Koch-Nolte geht der Dank für die vielen Anregungen, die ich durch Journal Clubs und Diskussionen erhalten habe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den anderen medizinischen Doktoranden der AG Haag wie Soroush Nader, auf dessen Beobachtungen ich meine Untersuchungen aufbaute und der mich in einige Untersuchungstechniken einwies, und Janne Becher, die parallel zu mir promovierte, außerdem Philine Pfeiffer - die Atmosphäre war großartig und kollegial.

Ebenso möchte den anderen Arbeitsgruppen des Instituts danken, namentlich seien hier Dr. Timo Lischke von der AG Mittrücker, der mir bei den FACS-Messungen stets mit Rat und Tat zur Seite stand, und Welbeck Danqua von der AG Nolte, der mir die von ihm entwickelten Antikörper zur P2X7-Blockade zur Verfügung gestellt hat, erwähnt.

Zu guter Letzt möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren und die ich hier vergessen habe zu erwähnen.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meiner Familie danken, die mir während des Studiums und der Promotionszeit stets zur Seite stand.

Lebenslauf

Wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: