

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zu Wirkungen einer  
eingeschränkten Energiesynthese auf  
Funktionen von humanen Immunzellen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Robert Tripmacher  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter:       1. Prof. Dr. med. B. Manger  
                      2. Prof. Dr. med. R. H. Straub  
                      3. Prof. Dr. med. F. Buttgereit

eingereicht am: 22.12.2004

Datum der Promotion: 13.05.2005

## Kurzdarstellung

**Hintergrund:** Die Funktion von Immunzellen hängt von einer konstanten und ausreichenden Energieversorgung ab, die über die OXPHOS in den Mitochondrien und die Glykolyse im Zytosol realisiert wird. Die wichtigsten Substrate dafür sind Sauerstoff und Glukose.

**Fragestellung:** Bei schweren Erkrankungen oder in Entzündungsgebieten ist die zelluläre Energieversorgung stark beeinträchtigt, weil in der Mikroumgebung der Zelle Sauerstoff und Nährstoffe inadäquat bereitgestellt werden. Ziel war herauszufinden, ob und wie humane Immunzellen ihre Lebensfähigkeit und funktionellen Aktivitäten unter solchen Umständen aufrechterhalten.

**Methoden:** Humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden durch MACS aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert. Die Sauerstoffverbrauchsmessung mittels Clark-Elektrode war Maß der oxidativen Energiebildung, die mit Myxothiazol und Glukoseentzug gehemmt wurde. Die CD3/CD28-stimulierte T-Zell-Proliferation wurde durchflußzytometrisch mittels CFDA SE analysiert. Basierend auf dem Paraformaldehyd-Saponin-Prozedere wurde die Zytokinsynthese ebenfalls am FACS bewertet, nachdem die T-Zellen in Anwesenheit von Brefeldin A mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden. Mit einem käuflichen Testsystem (FACS-Technik) wurde die monozytäre Phagozytose untersucht. Die HIF-1 $\alpha$ -Expression wurde nach PMA-Ionomycin-Stimulation von Myxothiazol-behandelten T-Zellen auf mRNA- und Proteinebene gemessen.

**Ergebnisse:** Bei Glukoseanwesenheit waren alle untersuchten Immunfunktionen trotz vollständig gehemmter OXPHOS unbeeinträchtigt. Erst bei gleichzeitigem Glukoseentzug, der *per sé* Proliferation und Phagozytose signifikant beeinträchtigte, waren sie signifikant vermindert. Es wird vermutet, daß T-Zellen die Energieverluste mit einem überschießenden Effekt ihres Sauerstoffverbrauchs und stark angetriebener Glykolyse kompensieren. HIF-1 $\alpha$  ist dabei nicht entscheidend für die Umschaltung auf anaerobe Energiesynthese.

**Schlußfolgerung:** Die Daten quantifizieren die Energieanforderungen der funktionellen Aktivität in hochgereinigten humanen Immunzellfraktionen. Es wurde nachgewiesen, daß sich Immunzellen unerwartet lange an eine massiv beeinträchtigte Energetik adaptieren können und ihre spezifischen Funktionen aufrechterhalten.

## **Abstract**

**Background:** The function of immune cells is dependent upon a constant and adequate supply of energy. Energy is formed via OXPHOS in the mitochondria and via cytosolic glycolysis. Oxygen and glucose are the main substrates for energy synthesis.

**Objective:** In severe diseases or in inflamed areas cellular energy supply is significantly impaired due to inadequate supply of cellular microenvironment with oxygen and nutrients. The aim of this study was to answer the question, whether and how human immune cells maintain viability and functional activity under these circumstances.

**Methods:** Human CD4<sup>+</sup> T cells and CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated by MACS from peripheral blood of healthy donors. The extent of oxidative energy formation was determined via measurement of oxygen consumption using a Clark type electrode. Energy production was restricted in glucose-free cell culture medium and by gradually inhibited OXPHOS using myxothiazol. T cell proliferation was flow-cytometrically analysed using CFDA SE after stimulation with CD3 and CD28 antibodies. Cytokine synthesis was assessed by flow-cytometrical immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure after stimulation of T cells with PMA/ionomycin in the presence of brefeldin A. Phagocytosis of monocytes was measured using a commercial test system (FACS technique). HIF-1 $\alpha$  expression was assessed by semiquantitative PCR and immunoblot after the stimulation of myxothiazol treated T cells with PMA/ionomycin.

**Results:** In glucose-containing medium all investigated immune functions were unaffected even under complete suppression of OXPHOS. Only when OXPHOS and glycolysis were simultaneously and almost completely suppressed a significant decrease was found. Glucose deprivation per se caused both a significantly reduced proliferation and phagocytosis. It is supposed, that T cells are able to compensate for an energy deficit by an excess of oxygen consumption and strongly induced glycolysis. However, HIF-1 $\alpha$  was found to be not crucial for switching to anaerobic energy synthesis.

**Conclusion:** These data quantify the energy requirement of functional activity in highly purified human immune cell fractions. An unexpectedly high adaptive potential of immune cells to maintain specific functions even under massively impaired energetic conditions could be demonstrated.

**Schlagwörter:**

CD4+ T-Zellen

CD14+ Monozyten

zellulärer Energiestoffwechsel

simulierter Sauerstoffmangel

Glukoseentzug

intrazelluläre Zytokinsynthese

T-Zell-Proliferation

Phagozytoseaktivität

HIF-1 $\alpha$

**Keywords:**

CD4+ T cells

CD14+ monocytes

cellular energy metabolism

mimicked oxygen deficiency

glucose deprivation

intracellular cytokine synthesis

T cell proliferation

phagocytotic activity

HIF-1 $\alpha$

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
1.1 Energiestoffwechsel von Immunzellen .....	11
1.2 Ableitung der Aufgabenstellungen.....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Präparation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC).....	16
2.2 Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten....	17
2.3 Zellzählung.....	18
2.4 Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs .....	18
2.4.1 Stimulanzen und Hemmstoffe des zellulären Sauerstoffverbrauchs.....	20
2.5 Zellaktivierung .....	21
2.5.1 Unspezifische Zellaktivierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin zur Induktion der Zytokinsynthese bei CD4+ T-Zellen.....	21
2.5.2 Spezifische Zellaktivierung mit <i>anti-human</i> CD3- und CD28-Antikörpern zur Induktion der Proliferation bei CD4+ T-Zellen .....	22
2.5.3 Spezifische Zellaktivierung der CD14+ Monozyten mit Bakterien.....	22
2.6 Zellkultivierung.....	23
2.7 Fluoreszenzfärbungen .....	24
2.7.1 Fixierung von Zellen in Suspension.....	24
2.7.2 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zytokinen.....	24
2.7.3 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zelloberflächenmolekülen.....	24
2.7.4 Färbung mit Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA, SE).....	25
2.7.5 Färbung mit Propidiumjodid .....	25
2.8 Durchflußzytometrie .....	25

2.9	Nachweis von HIF-1 $\alpha$ -mRNA mittels semiquantitativer PCR .....	27
2.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	27
2.9.2	Umschreibung der RNA in cDNA .....	28
2.9.3	Einstellung der cDNA-Menge.....	28
2.9.4	Amplifikation der cDNA.....	28
2.9.5	Analyse der Amplifikationsprodukte .....	29
2.10	Nachweis des HIF-1 $\alpha$ -Proteins mittels Western Blot-Analyse.....	29
2.10.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	29
2.10.2	Western-Blot .....	30
2.10.3	Zugabe der Antikörper und Detektion .....	30
2.10.4	$\beta$ -Actin-Abgleich.....	30
2.11	Verwendete Pufferlösungen .....	30
2.12	Statistische Auswertung .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Durchflußzytometrische Bewertung der Zelltrennungen.....	32
3.1.1	PBMC-Präparation .....	32
3.1.2	Magnetisch separierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	33
3.2	Sauerstoffverbrauchsmessungen mit der Clark-Elektrode.....	35
3.2.1	Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten PBMC .....	35
3.2.2	Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	40
3.2.3	Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei ruhenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	44
3.2.4	Sauerstoffverbrauch von ruhenden CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	47
3.2.5	Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei ruhenden CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	48
3.3	Zytokinproduktion von Myxothiazol-behandelten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin.....	49
3.4	Proliferation von Myxothiazol-behandelten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach spezifischer Stimulation mit <i>anti-human</i> CD3- und CD28-Antikörpern .....	54

3.5	Phagozytose von Myxothiazol-behandelten CD14+ Monozyten.....	56
3.6	Berechnung des minimalen ATP-Bedarfs für das Überleben und die vollständige Funktionalität von CD4+ T-Zellen .....	57
3.7	Beeinflussung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA- und -Proteinexpression bei CD4+ T-Zellen durch Myxothiazol und PMA-Ionomycin-Stimulation .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
4.1	Vitalität und Funktionalität von PBMC aus Leukozytenfiltern .....	61
4.2	Sauerstoffverbrauchsmessungen bei CD4+ T-Zellen .....	64
4.2.1	Sauerstoffverbrauch von ruhenden CD4+ T-Zellen.....	64
4.2.2	Sauerstoffverbrauch von Con A-stimulierten CD4+ T-Zellen.....	66
4.3	Sauerstoffverbrauchsmessungen bei CD14+ Monozyten .....	67
4.4	Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten.....	68
4.5	Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die PMA-Ionomycin- induzierte Zytokinsynthese bei CD4+ T-Zellen.....	71
4.5.1	Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten .....	71
4.5.2	Wirkungen von Cofaktor- und Vitaminentzug.....	72
4.5.3	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen.....	72
4.5.4	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen.....	76
4.6	Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die Proliferation bei CD4+ T-Zellen .....	78
4.6.1	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen.....	78
4.6.2	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen.....	79
4.7	Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die Phagozytoseaktivität von CD14+ Monozyten.....	81



4.7.1	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen.....	81
4.7.2	Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen.....	82
4.8	Hierarchie der Abhängigkeit der untersuchten Immunfunktionen von der glykolytischen und oxidativen Energiegewinnung .....	83
4.9	Einfluß des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 auf die ATP-Synthese bei Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4+ T-Zellen.....	85
4.10	Anstieg des zellulären Sauerstoffverbrauchs zur Sicherstellung des ATP-Bedarfs bei Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4+ T-Zellen.....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>116</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>117</b>

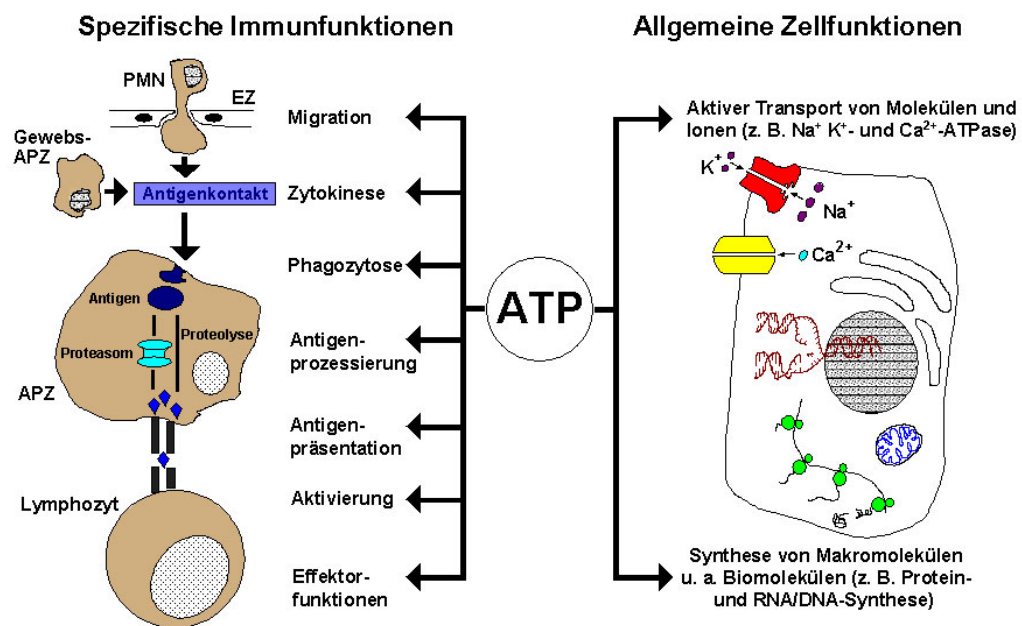
## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata	PJ	Propidiumjodid
APC	Allophycocyanin	PKC	Proteinkinase C
ATP	Adenosintriphosphat	PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
BE	Borsook-Eagle-Medium	PMN	Polymorphnuclear leukocytes
Bp	Basenpaare	P/O-Quotient	Phosphat-Sauerstoff-Quotient
BSA	Bovines Serumalbumin	Präp.	Präparation
CD	Cluster of differentiation	P/S	Penicillin/Streptomycin
cDNA	Complementary oder copy DNA	R	Korrelationsfaktor
CFDA, SE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester	rIgG	Ratten-Immunglobulin G
Con A	Concanavalin A	RA	Rheumatoide Arthritis
Cy5	Indodicarbocyanin	RNA	Ribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid	ROS	Reaktive oxygen species
DNA	Deoxyribonucleic acid	SDS	Sodiumdodecylsulfat
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphates	S.E.M.	Standard error of the mean
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	SOD	Superoxiddismutase
FCS	Fetal calve serum	TCR	T cell receptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
HeLa	Henrietta Lacks	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$	v/v	Volume per volume
I. E.	Internationale Einheiten	w/v	Weight per volume
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma		
IgG	Immunglobulin G		
Il-2	Interleukin-2		
Il-4	Interleukin-4		
mIgG	Maus-Immunglobulin G		
MACS	Magnetic activated cell sorting		
ME	$\beta$ -Mercaptoethanol		
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität		
mRNA	Messenger ribonucleic acid		
N	Anzahl		
NOS	Reactive nitrogen species		
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung		
PBA	PBS/BSA/Azid		
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells		
PBS	Phosphate buffered saline		
PCR	Polymerase chain reaction		
PE	R-Phycoerythrin		
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein		
PHA	Phythämagglutinin		

# 1 Einleitung

## 1.1 Energiestoffwechsel von Immunzellen

Immunzellen benötigen für allgemeine und spezifische Funktionen beträchtliche Mengen an Energie in Form von ATP (Buttgereit et al. 2000). Die Energie wird verbraucht für den transmembranen Ionentransport, die Makromolekülsynthese und für wichtige Prozesse, die an der Auseinandersetzung mit Antigenen beteiligt sind (Abb. 1). Ein ungestörtes Funktionieren des Immunsystems ist ohne eine adäquate Energieversorgung nicht möglich.



**Abb. 1:** Wichtige ATP-verbrauchende Funktionen von Immunzellen (verändert nach Buttgereit et al. 2000). EZ = Endothelzelle, PMN = polymorphnukleäre Zelle, APZ = Antigen-präsentierende Zelle.

Der Energiestoffwechsel von Immunzellen ist während der Zellaktivierung durch Antigene und Mitogene drastischen Veränderungen ausgesetzt und spielt bei der Regulation der zellulären Antwort in der angeborenen und erworbenen Immunität eine zentrale Rolle (Buttgereit et al. 2000, Krauss et al. 2001, Plas und Thompson 2002). Eine schnelle und anhaltende Steigerung der Energiebereitstellung ist für die Absicherung von Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen wie die Synthese von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen

erforderlich.

Die von Zellen verwendete freie Energie wird über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in der Atmungskette der Mitochondrien und die zytosolische Glykolyse produziert. Beide Systeme stehen über den Zitratzyklus miteinander in Verbindung. In aeroben Organismen ist aber die OXPHOS die Hauptenergiequelle (Saraste 1999). Die freie Energie steht den Zellen hauptsächlich in Form von endogen gebildetem ATP zur Verfügung. Extrazelluläres ATP wird von aktivierten Thrombozyten und Zellen unter Hypoxie, Stress oder bei Gewebszerstörung freigesetzt. Die immunologischen Aktivitäten von extrazellulärem ATP beinhalten eine mitogene Stimulation, die Freisetzung von Zytokinen, die Induktion von Zelltod über die Stimulation spezifischer purinerge Rezeptoren und Effekte auf die Signaltransduktion (Ferrari et al. 1997, Langston et al. 2003).

Lymphozyten gewinnen unter aeroben Bedingungen den größten Teil oder ihre gesamte Energie über die OXPHOS (Seitz 1965). Roos und Loos (1973) konnten ermitteln, daß auf diese Weise 85 % gewonnen werden. Der Rest wird über die Glykolyse bereitgestellt. Das Hauptsubstrat ihres Energiestoffwechsels ist Glukose (Kirschner et al. 1972). Trotzdem können Lymphozyten und Monozyten unter anaeroben Bedingungen ihre ATP-Konzentration problemlos durch eine gesteigerte anaerobe Glykolyse aufrechterhalten (Levene und Meyer 1912a, 1912b, Fleischmann und Kubowitz 1927, Kempner 1939, Seitz 1965, Laszlo 1967, Lewis et al. 1999, Kato und Walz 2000, Kawaguchi et al. 2001). Aber auch unter aeroben Bedingungen werden in Lymphozyten die ATP-Konzentrationen weitestgehend sichergestellt, wenn keine Glukose verfügbar ist (Seitz 1965, Laszlo 1967). Ein Grund liegt darin, daß die Glykolyse in diesen Zellen ohnehin durch die Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt wird (Baierlein und Foster 1968, Kirschner et al. 1972, Newsholme et al. 1985a, Merlo-Pich et al. 2004). Dieser an Hefen entdeckte Effekt wurde nach seinem Entdecker als Pasteur-Effekt bezeichnet (Pasteur 1876). Darüber hinaus wird bei Glukosemangel der zelluläre Sauerstoffverbrauch von Immunzellen gesteigert (Bielka 1963, Seitz 1965, Kirschner et al. 1972, Guppy et al. 1993). Dieser Effekt wird umgekehrter Pasteur-Effekt oder Crabtree-Effekt (Crabtree 1929) genannt. Anstelle von Glukose können verstärkt Aminosäuren zur Energiegewinnung oxidiert werden. Möglicherweise gewinnen alle myeloiden Zellen ihre Energie sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen über die Glykolyse (Sbarra und Karnovsky 1959, Cramer et al. 2003). Deshalb verfügen sie offenbar nicht über den Pasteur-Effekt (Cramer et al. 2003).

Ruhende Lymphozyten und Monozyten besitzen keine bedeutsamen intrazellulären Glykogenspeicher (Fiorucci et al. 2004). Sie sind deshalb auf den Import von extrazellulärer Glukose und die anschließende Glykolyse im Zytosol zur ATP-Synthese angewiesen (Levene und Meyer 1912a, Kempner 1939, Roos und Loos 1970, Sagone et al. 1974). Die Regulation der Glukoseaufnahme in Lymphozyten ist aber nur teilweise entschlüsselt. Der bisherigen Auffassung nach sind Glukoseaufnahme und Glykolyse durch das intrazelluläre Niveau von ATP und anderen Metaboliten homöostatisch reguliert. Es mehren sich jedoch Hinweise, daß bioenergetische Funktionen dieser Zellen selektives Ziel von costimulatorischen Molekülen wie CD28 sind (Frauwirth et al. 2002, Frauwirth und Thompson 2004) oder durch Moleküle des Radikalstoffwechsels wie Stickstoffmonoxid (NO) (Fiorucci et al. 2004) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Arai et al. 2004, Remans et al. 2004) geregelt werden.

## **1.2 Ableitung der Aufgabenstellungen**

### *(1) Entwicklung eines in vitro Modells, in dem die zelluläre Energiegewinnung vermindert ist*

Einleitend wurde dargestellt, daß die Funktion von Lymphozyten und Monozyten von einer konstanten und ausreichenden Versorgung mit Energie abhängig ist. Die Energie wird durch die Metabolisierung von Sauerstoff und Glukose produziert. Bei schweren Erkrankungen oder in Entzündungsgebieten wird die zelluläre Energieversorgung möglicherweise drastisch beeinträchtigt, weil eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht mehr gewährleistet ist. So ist die Mikroumgebung in entzündeten Geweben durch niedrige Sauerstoff- und Glukose- und hohe Konzentrationen von Laktat und reduktiven Metaboliten gekennzeichnet (Kittlick 1986, Schor et al. 2000, Saadi et al. 2002). Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) finden sich in betroffenen Gelenken ganz ähnliche Situationen. Hypoxie, erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, die zu einer synovialen Azidose führen, und verstärkte Laktat- und Acetatansammlung sind Ausdruck des anaeroben Stoffwechsels (Stevens et al. 1991). Areale mit geringen Sauerstoffpartialdrücken als ein gemeinsames Hauptmerkmal liegen auch in malignen Tumoren (Vaupel et al. 1989), Wunden (Kivisaari 1975) und arteriosklerotischen Plaques (Bjornheden et al. 1999) vor. Es gibt Hinweise dafür, daß während einer Sepsis die zelluläre Energetik nicht durch eine inadäquate Gewebedurchblutung gestört ist, sondern durch eine beeinträchtigte Atmung aufgrund einer erworbenen intrinsischen Störung in der mitochondrialen Atmungskette (zytopathische Hypoxie) (Crouser et al. 2002, Fink 2002, Gellerich et al. 2002, Brealey et al. 2004). Aus entwicklungsbiologischer Sicht unterliegen Immunzellen während ihrer Reifung aufgrund der Migration zwischen den unterschiedlichen

Organen (Knochenmark, Thymus, Blut, Lymphknoten) aber auch starken Schwankungen der Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen (Westermann und Bode 1999).

Zusammenfassend läßt sich also festhalten: Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (Cramer et al. 2003) und Zellen der adaptativen Immunantwort geraten in eine Situation der suboptimalen Energieversorgung, wenn sie in Gebiete mit verringerten Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen eingewandert sind. Sie müssen unter diesen erschwerten Bedingungen aber trotzdem funktionieren. Deshalb war in der vorliegenden Untersuchung ein *in vitro* Modell zu entwickeln, in dem durch graduelle und definierte Reduzierung der ATP-Bereitstellung in der OXPHOS mittels Myxothiazol, graduelle und definierte Reduzierung von Nährstoffen in der zellulären Mikroumgebung und Aktivierung verschiedener Immunzellfraktionen solche Bedingungen wirkungsvoll nachgestellt sind. Es sollte herausgefunden werden, ob Immunzellen unter diesen Bedingungen in der Lage sind, energetisch nicht nur ihre lebenserhaltenden, sondern auch ihre spezifischen Funktionen aufrechtzuerhalten.

### *(2) Untersuchung der Hierarchie der bioenergetischen Bedeutsamkeit von spezifischen Immunfunktionen mit Hilfe des zu entwickelnden in vitro Modells*

Für allgemeine Zellfunktionen wie die Makromolekülsynthese oder der Ionentransport konnte aus bioenergetischer Sicht bei B- und T-Lymphozyten eine hierarchische Ordnung nachgewiesen werden (Buttgereit et al. 1991, Buttgereit et al. 1992, Buttgereit und Brand 1995, Schmid et al. 2000). So wird in Situationen der Unterversorgung zunächst die Proteinbiosynthese drastisch reduziert, während der überlebenssichernde Ionentransport noch aufrechterhalten wird. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe des zu entwickelnden *in vitro* Modells die erstmalige Charakterisierung spezifischer Immunfunktionen hinsichtlich einer Hierarchie ihrer bioenergetischen Bedeutsamkeit angestrebt werden. Myxothiazol und/oder Entzug von Nährstoffen (Glukose) bewirken eine ATP-Reduktion und zwingen daher betroffene Zellen zur Einsparung metabolischer Energie. Das könnte sich in einer Verminderung bzw. Abschaltung von spezifischen Immunfunktionen widerspiegeln. Dabei könnte sich eine Reihenfolge des Abschaltens spezifischer Funktionen herausstellen. Diese Hierarchie würde die relative bioenergetische Bedeutsamkeit der einzelnen Immunfunktion reflektieren.

### *(3) Auswahl der zu untersuchenden Immunzellen und spezifischen Immunfunktionen*

Für die Untersuchungen wurden folgende Immunzellen und spezifische Immunfunktionen ausgewählt:

T-Lymphozyten: (i) Zellulärer Sauerstoffverbrauch von humanen peripheren CD4+ T-Zellen als Maß für den ATP-Bedarf von sowohl lebenserhaltenden als auch spezifischen zellulären Funktionen, (ii) Zytokinproduktion und (iii) Proliferation als Effektorfunktionen.

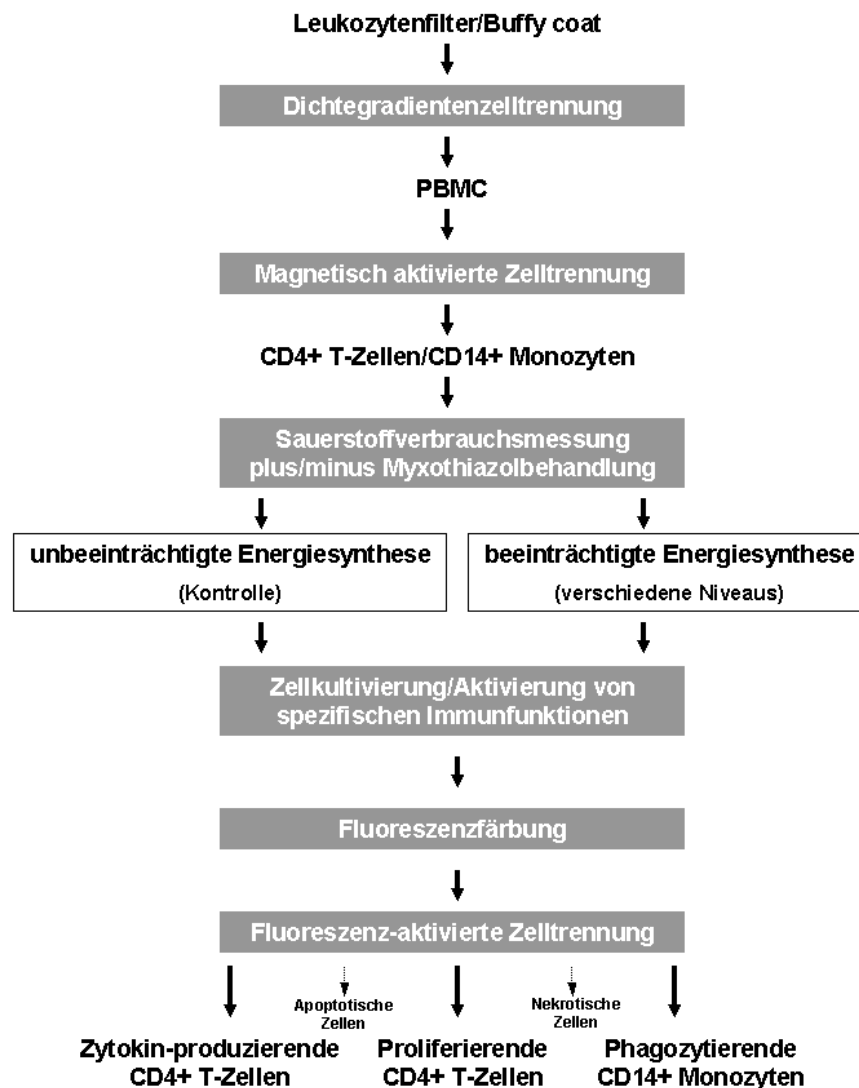
Monozyten: (iv) Zellulärer Sauerstoffverbrauch von humanen peripheren CD14+ Monozyten als Maß für den ATP-Bedarf von sowohl lebenserhaltenden als auch spezifischen zellulären Funktionen und (v) deren Phagozytoseaktivität.

Bei der Auswahl der Immunzellen und Immunfunktionen wurde auf repräsentative Relevanz geachtet. CD4+ T-Zellen und Monozyten/Makrophagen infiltrieren verstärkt das chronisch entzündete Synovium in der RA (Morita et al. 1998, Tak und Bresnihan 2000). Es wird vermutet, daß der Krankheitsprozeß durch das Zytokinprofil der Zellen beeinflusst wird (Germann et al. 1995, Maeda et al. 2002). Lymphozyten wandern aber auch in Tumore ein (Loeffler et al. 1990, Turner et al. 1999). Monozyten/Makrophagen akkumulieren in großer Anzahl in hypoxischen und ischämischen Arealen von pathologisch veränderten Geweben wie soliden Tumoren, in arteriosklerotischen Plaques, in arthritischen Gelenken (Lewis et al. 1999, Burke et al. 2003) und in Entzündungsgebieten (Kittlick 1986, Cramer et al. 2003). Während einer Sepsis-induzierten Immunparalyse kommt es zu einer merklichen Erhöhung der zirkulierenden CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (Monneret et al. 2003).

Diese Situationen sollten im Labor unter idealen Bedingungen nachgestellt werden. Damit sollten Erkenntnisse zu Funktion und Regulation in relevanten Immunzellen unter diesen Bedingungen erlangt werden.

## 2 Material und Methoden

Einleitend ist die prinzipielle experimentelle Vorgehensweise schematisch abgebildet.



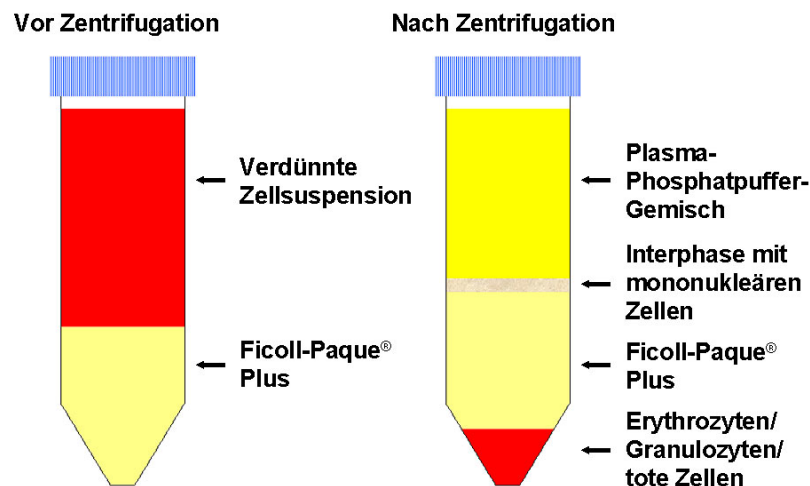
**Abb. 2:** Schema der prinzipiellen experimentellen Vorgehensweise.

### 2.1 Präparation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC)

Die PBMC wurden aus Blut erwachsener Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Ausgangsmaterial waren frische Leukozytenfilter und Buffy coats aus dem Institut für Transfusionsmedizin und dem Eigenblutspendezentrum der Charité. Das Prinzip beruht auf



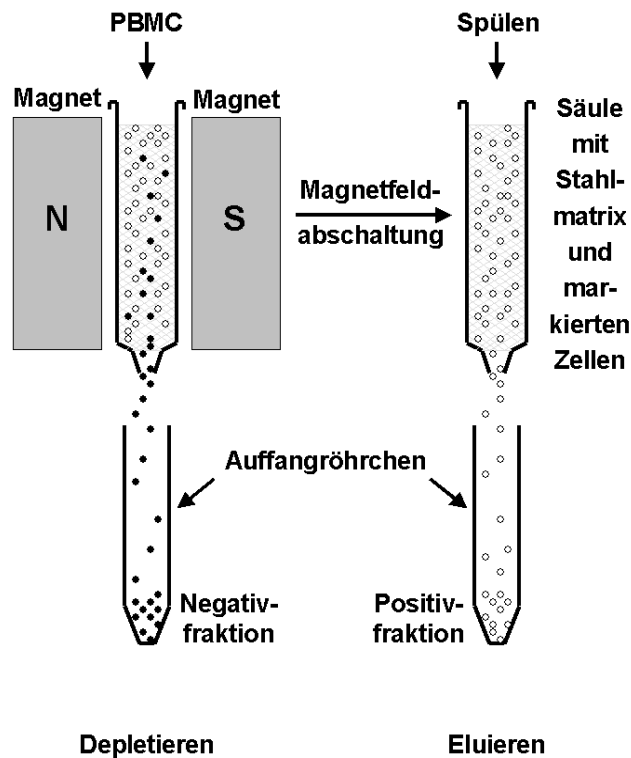
einer von Böyum (1968) entwickelten Methode. Die unterschiedliche Migration während der Zentrifugation aufgrund unterschiedlicher Dichten führt zur Bildung von Schichten verschiedener Zelltypen. (Abb. 3). Die mit PBMC angereicherte Interphase wurde isoliert und bis zur Weiterverarbeitung in PBS/BSA (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) auf Eis gelagert. Mit dem Ziel der höheren Ausbeute wurden Monozyten aus Buffy coats präpariert. CD4+ T-Zellen konnten in ausreichender Menge aus Leukozytenfiltern gewonnen werden.



**Abb. 3:** Isolierung von PBMC mittels Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus-Technik.

## 2.2 Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten

CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten wurden durch Anwendung der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) isoliert (Miltenyi et al. 1990, Radbruch et al. 1994). Es wurde nach Angaben des Herstellers der dabei verwendeten MicroBeads<sup>™</sup> (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gearbeitet. Dies sind spezielle, mit supermagnetischen Partikeln von weniger als 100 nm Durchmesser konjugierte Antikörper, die gegen die CD4- und CD14-Oberflächenantigene gerichtet waren. Nach der Markierung mit den Antikörpern wurden die Zellen vollautomatisch in einem Hochgradienten-Magnetfeld eines autoMACS<sup>™</sup> Separators (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) als Positivfraktion separiert (Abb. 4). Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Positivfraktion in Zellkulturmedium auf Eis gelagert.



**Abb. 4:** Magnetisch aktivierte Zellsortierung. N = magnetischer Nordpol, S = magnetischer Südpol.

### 2.3 Zellzählung

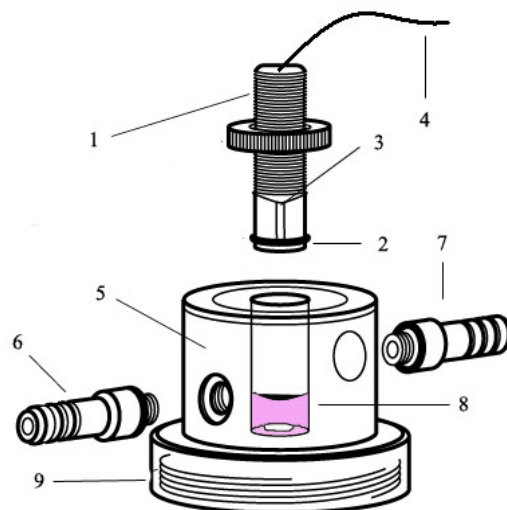
Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer oder durch automatische Zellzählung in einem Casy<sup>®</sup> Cell Counter (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) ermittelt. Die Zählkammermethode wurde außerdem für Vitalitätstests mit 0,04%iger Trypanblaulösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) genutzt. Der Anteil toter Zellen, die durch Trypanblau angefärbt wurden, betrug in der Regel weniger als 5 %.

### 2.4 Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs

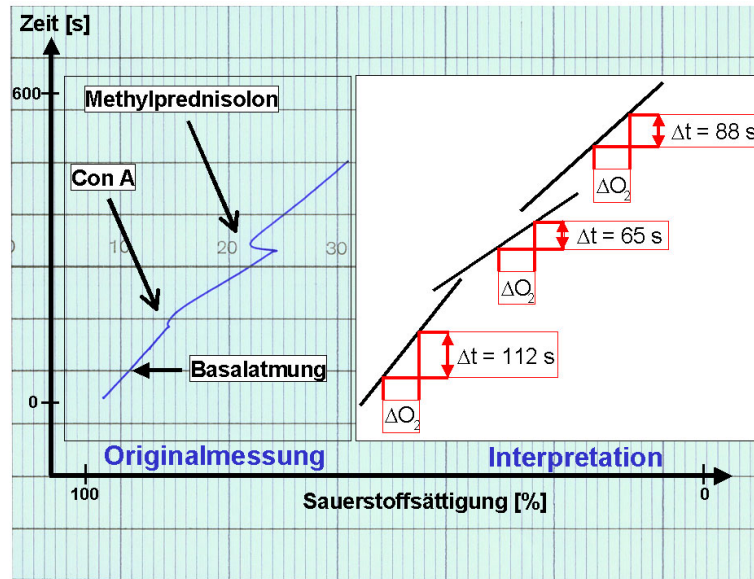
Die Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs erfolgte amperometrisch mit einer Clark-Elektrode (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Großbritannien). Grundlage dieser Methode ist eine spezielle Form der Elektrolyse (Rapoport und Raderecht 1989). An die Elektrode wird eine konstante Spannung angelegt. Dadurch entsteht ein Stromfluß, weil an der Kathode Sauerstoff zu Hydroxid-Ionen reduziert wird. Entsprechend dem Diffusionsgesetz strömt aufgrund des Konzentrationsgradienten Sauerstoff aus der Meßlösung nach. Die Sauerstoffkonzentration in der Meßlösung ist der pro Zeiteinheit an der Kathode reduzierten Sauerstoffmenge proportional.

Die Kalibrierung der Elektrode auf 100 % Sauerstoffgehalt erfolgte mittels Luftsauerstoff-gesättigtem Zellkulturmedium. Dessen Sauerstoffgehalt beträgt bei 37 °C 211 µM, weil sich bei normalem Luftdruck, 20,9 % Sauerstoffgehalt der Luft und 37 °C maximal 4,7 ml Sauerstoff in 1 l Zellkulturmedium lösen. Zur Nullpunktkalibrierung wurde eine hochkonzentrierte Zellsuspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml) in die Meßkammer gegeben und mit der Elektrode luftdicht abgeschlossen. Durch die hohe Atmungsrate war der gesamte gelöste Sauerstoff des Zellkulturmediums in kurzer Zeit verbraucht und der Nullpunkt des Meßbereichs erreicht.

Bei der Sauerstoffverbrauchsmessung wurden 700 µl Zellsuspension ( $0,5-1,5 \times 10^7$  Zellen/ml) in die Meßkammer gegeben (Abb. 5). Während der Messung war die Zellsuspension durch ein angeschlossenes Thermostat (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) auf 37 °C temperiert. Ein integriertes Rührsystem (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gewährleistete eine ausreichende Äquilibriumierung mit Luftsauerstoff, eine kontinuierliche Durchmischung und eine optimale Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode. Der sich infolge der Zellatmung kontinuierlich vermindernde Sauerstoffgehalt der Meßlösung wurde über ein angeschlossenes Sauerstoffmeßgerät mit integriertem Schreiber (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) als Anstieg einer Kurve registriert (Abb. 6).



**Abb. 5:** Versuchsaufbau der Sauerstoffverbrauchsmessung. [1] Stopfen mit Clark-Elektrode, [2] Polypropylenmembran, befestigt mit O-Ring, [3] Kanal zur Wirkstoffzugabe, [4] Kabel zum Sauerstoffmeßgerät, [5] Inkubationsgefäß mit Wassermantel, [6] Wasserzu- und [7] -ablauf vom Thermostat, [8] Zellsuspension (rosa) mit Magnetrührstäbchen (weiß), [9] Magnetrührplatte.



**Abb. 6:** Originalabbildung eines Sauerstoffverbrauchsexperiments mit PBMC. Durch die Zugabe des Mitogens Con A wird die Atmung angeregt, so daß die gleiche Menge Sauerstoff in kürzerer Zeit verbraucht wird. Die Zugabe des Glucocorticoids bewirkt einen Rückgang der stimulierten Atmung, so daß der Anstieg der Kurve steiler wird. Ab diesem Zeitpunkt nimmt der Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit wieder ab.

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Sauerstoffverbrauch [nmol/min/10}^7 \text{ Zellen]} = \frac{D_x [\text{cm/min}] * 147,7 [\text{nmol}]}{D_{100\%} [\text{cm}] * c}$$

$c$  = Zellzahl,  $D_{100\%}$  = Meßbereich,  $D_x$  = Anstieg der Kurve

#### 2.4.1 Stimulanzen und Hemmstoffe des zellulären Sauerstoffverbrauchs

##### *Concanavalin A (Con A)*

Con A (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) kam als Stimulans des zellulären Sauerstoffverbrauchs von PBMC und CD4+ T-Zellen zum Einsatz. Das Lektin wird aus einer Bohnenart, *Canavalia ensiformis*, gewonnen. Die Stammlösung, die auch als Arbeitslösung diente, wurde mit A. dest. in einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt.

### *Carbonylcyanid 4-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)*

FCCP (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein H<sup>+</sup>-Ionophor und Entkoppler der OXPHOS in den Mitochondrien. Es hat die Fähigkeit, Plasma- und mitochondriale Membranen zu depolarisieren. Dadurch gelingt es Protonen (H<sup>+</sup>), die innere Mitochondrienmembran zu passieren, ohne die ATP-Synthese anzutreiben. Die Folge ist ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff. FCCP wurde in DMSO (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 80 mM gelöst. Als Arbeitslösung diente eine 1 mM Lösung.

### *Myxothiazol*

Myxothiazol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) stammt vom Myxobakterium *Myxococcus vulvus*. Es blockiert selektiv und irreversibel den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (Thierbach und Reichenbach 1981). In Abhängigkeit von der Konzentration kann die ATP-Synthese stufenweise bis zur Vollständigkeit unterdrückt werden. Myxothiazol wurde in DMSO in einer Konzentration von 1 mM gelöst. Die Stammlösung sowie die 10- und 100fachen Verdünnungen dienten als Arbeitslösungen.

## **2.5 Zellaktivierung**

### **2.5.1 Unspezifische Zellaktivierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin zur Induktion der Zytokinsynthese bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Nach der Sauerstoffverbrauchsmessung wurden unbehandelte und Myxothiazol-behandelte CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf eine Konzentration von  $4 \times 10^6$ /ml eingestellt. Dann erfolgte die PMA- und Ionomycin-Zugabe (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Die Zellen wurden über 6 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) (Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zur intrazellulären Anreicherung der Zytokine wurde nach 3 h Brefeldin A (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zugesetzt. Brefeldin A ist ein Macrolid-Antibiotikum aus *Penicillium brefeldianum*. Es unterbindet spezifisch die Translokation von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat.

PMA wurde in 70%igem Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und in einer Endkonzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Ionomycin wurde in DMSO in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und in einer

Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Brefeldin A wurde in 70%igem Ethanol in einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst und in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

### **2.5.2 Spezifische Zellaktivierung mit *anti-human* CD3- und CD28-Antikörpern zur Induktion der Proliferation bei CD4+ T-Zellen**

Um die Proliferation zu stimulieren, wurden unbehandelte und Myxothiazol-behandelte CD4+ T-Zellen mit immobilisierten *anti-human* CD3- (Klon UCHT1, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) und löslichen *anti-human* CD28-Antikörpern (5 µg/ml) (Klon CD28.2, Isotyp mIgG<sub>1,κ</sub>, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) stimuliert. Die Kultivierung erfolgte in 96-Loch-Zellkulturplatten (Flachboden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) über 96 h im Brutschrank. Die *anti-human* CD3-Antikörper waren immobilisiert. Sie wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) gelöst und durch fünfstündige Inkubation im Brutschrank an den Oberflächen der Zellkulturplatten befestigt. Die CFDA, SE-markierte Zellsuspension (s. Pkt. 2.7.4) wurde auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt und zu je 250 µl in die inneren Vertiefungen der Zellkulturplatte gegeben. Zum Schutz vor Verdunstung und zur Feuchtigkeitsoptimierung wurden die äußeren Vertiefungen mit zellfreiem Medium gefüllt.

### **2.5.3 Spezifische Zellaktivierung der CD14+ Monozyten mit Bakterien**

Zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität von unbehandelten und Myxothiazol-behandelten CD14+ Monozyten wurde ein Phagotest<sup>®</sup>-Kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Prinzip beruht darauf, daß Monozyten mit FITC-markierten *Escherichia coli*-Bakterien bei 37 °C inkubiert werden. FITC dient der durchflußzytometrischen Identifizierung des prozentualen Anteils der phagozytierenden Zellen. Ein Kontrollansatz bleibt auf Eis stehen. Durch die Zugabe einer Quenclösung<sup>™</sup> wird die Phagozytose abgestoppt. Außerdem erlaubt sie die Unterscheidung zwischen phagozytierten und adhärennten Bakterien. Die Erythrozyten werden mit einem Lysepuffer<sup>™</sup> entfernt. Vor der durchflußzytometrischen Analyse wird DNA-Färbelösung dazugegeben. Dadurch werden Aggregationseffekte von Bakterien oder Zellen ausgeschlossen. Datenaquisition und Quantifizierung der Phagozytoseaktivität wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubationszeit von 10 min wurde aus Gründen der Optimierung auf 1 h verlängert.

## 2.6 Zellkultivierung

Die Arbeit mit Zellkulturen und die Zellpräparationen erfolgten an einer Sterilwerkbank (Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland).

Zur amperometrischen Messung des Sauerstoffverbrauchs wurden die Zellen in Borsook-Eagle-Medium (BE) ohne oder mit 10 mM Glukose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kultiviert. Das Borsook-Medium enthält als wichtige Bestandteile 19 L-Aminosäuren (alle Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (Borsook et al. 1971). Das Eagle-Medium ist eine Natriumbicarbonat-freie Lösung aus Hanks' Salzen (alle Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (Eagle 1955). Glukose erlaubt neben der Energiegewinnung über die OXPHOS auch die Energiegewinnung über die Glykolyse.

Bei der PMA-Ionomycin-Stimulation erfolgte die Zugabe von 10 % FCS (v/v) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 100 I. E. Penicillin/ml (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 100 µg Streptomycin/ml (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 50 mM β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zu BE ohne Glukose. Dadurch wird eine optimale zelluläre Mikroumgebung geschaffen und mikrobielles Wachstum unterbunden. Im weiteren Verlauf der Experimente stellte sich heraus, daß eine stärkere PMA-Ionomycin-Stimulation möglich war, wenn BE durch RPMI 1640 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ersetzt wurde.

Die Titration der T-Zellatmung mit Myxothiazol wurde in RPMI 1640 ohne oder mit 11,1 mM Glukose durchgeführt, weil die Zellen nur in diesem Medium gleichzeitig Myxothiazol-behandelt und stimuliert wurden. Während der Proliferationsexperimente wurden die Zellen ebenfalls darin kultiviert, wobei 10 % FCS (v/v), 100 I. E. Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 50 mM β-Mercaptoethanol hinzugefügt wurden.

Zum Vergleich des Sauerstoffverbauchs und der Titration der Atmung mit Myxothiazol wurden Monozyten in RPMI 1640 ohne oder mit 11,1 mM Glukose kultiviert. Beim Phagozytostest wurde dem Medium 10 % (v/v) humanes Serum, Typ AB (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) hinzugefügt.

Alle eingesetzten Seren wurden 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert, um Antikörper, Enzymaktivitäten und die Komplementbindungskapazität zu inaktivieren. Bei der sich anschließenden Sterilfiltration wurden störende Fette entfernt.

## **2.7 Fluoreszenzfärbungen**

### **2.7.1 Fixierung von Zellen in Suspension**

Nach der PMA-Ionomycin-Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen (10 min, 300 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 2%igem Formaldehyd (1 ml/10<sup>7</sup> Zellen) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert und 20 min bei 21 °C fixiert. Durch Waschen (10 min, 300 g, 4 °C) mit PBA (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) wurde die Fixierung gestoppt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Zellpellet bei 4 °C in PBA aufbewahrt.

### **2.7.2 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zytokinen**

Die intrazelluläre Zytokinfärbung basierte auf dem Paraformaldehyd-Saponin-Prozedere, das von Sander et al. (1991) beschrieben und durch die Anwendung eines Hemmers des intrazellulären Proteintransports verbessert wurde (Jung et al. 1993). Dabei werden die Zellen nach sechsständiger *in vitro* Aktivierung mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit eines Proteintransporthemmers geerntet, fixiert und permeabilisiert. Da die Zellen Proteine nicht sezernieren können, werden bei der späteren Analyse Signale meßbar, die normalerweise durch die physiologische Sekretion nicht mehr vorhanden wären.

Zur Permeabilisierung wurden 1x10<sup>6</sup> fixierte Zellen mit PBA gewaschen (8 min, 500 g, 4 °C), dem 0,5 % (w/v) Saponin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt wurden. Das Zellpellet wurde anschließend 15 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln in 100 µl Färbelösung inkubiert. Diese enthielt 0,5 mg polyklonales IgG und die folgenden Fluorochrommarkierten Antikörper: 0,25 µg *anti-human* IL-2-FITC (Klon MQ1-17H12, Isotyp rIgG<sub>2a</sub>, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), 0,25 µg *anti-human* IFN-γ-Cy5 (Klon 4SB3, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin), 0,15 µg *anti-human* IL-4-Cy5 (Klon 4D9, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) und 0,5 µg *anti-human* TNF-α-FITC (Klon MAb11, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die Färbung wurde durch Waschen (8 min, 500 g, 4 °C) mit 21 °C-warmer PBA-Saponin-Lösung gestoppt. Dabei wurden überschüssige Antikörper aus dem Zellinneren entfernt. Das Zellpellet wurde in PBA resuspendiert und bis zur durchflußzytometrischen Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.7.3 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zelloberflächenmolekülen**

Zur durchflußzytometrischen Validierung der magnetisch aktivierten Zellsortierung wurden die CD4- und CD14-Oberflächenantigene der Zellen unmittelbar nach der magnetisch aktivierten



Zelltrennung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern (6 µg/ml *anti-human* CD4-FITC, Klon TT1, Isotyp mIgG<sub>1</sub> und 24 µg/ml *anti-human* CD14-FITC, Klon TM1, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, beide Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) oder MultiTest-Reagenz<sup>TM</sup> (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Die Färbung wurde für 10 min auf Eis in einem Gesamtvolumen von 100 µl und mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  durchgeführt. Sie wurde anschließend durch Waschen (8 min, 500 g, 4 °C) mit eiskaltem PBS/BSA abgestoppt. Bis zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen auf Eis gelagert.

#### **2.7.4 Färbung mit Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA, SE)**

Um die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchflußzytometrisch zu analysieren, wurde die Ausgangszellgeneration mit CFDA, SE (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Deutschland) markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich spontan und irreversibel an zytosolische und Oberflächenproteine von Zellen an. Durch Zellteilung nimmt die initiale Fluoreszenz ab. So können Tochterzellgenerationen von der Ausgangszellgeneration abgegrenzt werden. Der Farbstoff wurde in DMSO 5 mM gelöst. Die Konzentration in der Färbelösung betrug 1,5 µM. Die Zellen wurden in PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml eingestellt und 3,5 min bei 21 °C gefärbt. Die Reaktion wurde durch Waschen (300 g, 10 min, 4 °C) mit FCS-haltigem RPMI 1640 gestoppt.

#### **2.7.5 Färbung mit Propidiumjodid**

Um bei der durchflußzytometrischen Analyse lebender Zellen tote Zellen ausschließen zu können, wurde Propidiumjodid (PJ) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) unmittelbar vor der Analyse in einer Konzentration von 1 µg/ml der Zellsuspension zugesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und ermöglicht so die Identifizierung bzw. den Ausschluß toter oder sterbender Zellen mit rupturierten Zellmembranen. Nach Anregung zeigen diese Zellen eine rote Fluoreszenz, die ihre Erkennung möglich macht. PJ wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in A. dest. gelöst. Die Arbeitslösung war eine 10fache Verdünnung davon.

### **2.8 Durchflußzytometrie**

Unter Zuhilfenahme der Angaben von Schmitz und Rothe (1994) soll an dieser Stelle das Prinzip der Durchflußzytometrie nur kurz skizziert werden. Bei dem optischen Meßverfahren werden Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften einzelner Zellen genutzt, die bei Kontakt mit einem Laserstrahl entstehen. Zur Analyse werden die Zellen, deren Oberflächenantigene

und/oder intrazelluläre Strukturen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert werden können, durch Druckluft einer hydrodynamischen Fokussierung zugeführt und wie an einer Perlenkette an dem Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei Kontakt mit dem Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Anschließend fallen sie unter Energieabgabe auf ihr energetisches Ausgangsniveau zurück. Dabei wird Licht abgegeben, dessen Intensität sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle verhält. Die Analyse von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen ist gleichzeitig möglich, weil sie sich durch eine gemeinsame Wellenlänge anregen lassen, aber unterschiedliche und charakteristische Emissionsspektren zeigen (Tab. 1).

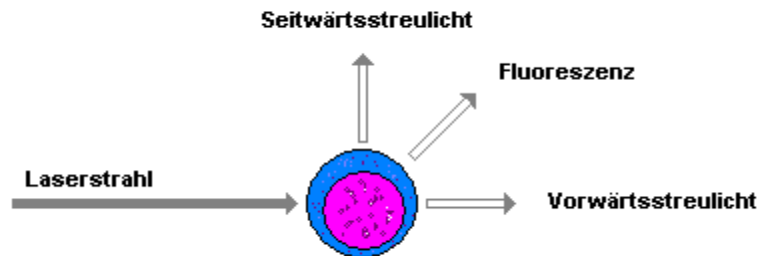
**Tab. 1:** Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorochrome	Exzitation [nm]	Fluoreszenz [nm]	Abkürzung
Allophycocyanin	650	660	APC
Annexin V	488	515	-
Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidylester	488	538	CFDA, SE
Fluorescein-Isothiocyanat	495	525	FITC
Indodicarbocyanin	651	674	Cy5
Peridin-Chlorophyll-Protein	470	680	PerCP
Propidiumjodid	350, 536	611	PJ
Phycoerythrin	488, 565	578	PE

Zusätzlich wird durch unterschiedliche physikalische Zelleigenschaften wie Querschnittsfläche und Refraktionsindex Lichtbrechung und -streuung unterschiedlicher Qualität und Quantität erzeugt. Die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Laserstrahls wird als Vorwärtsstreulicht oder Forward Light Scatter (FSC) bezeichnet, die im 90°-Bereich als Seitwärtsstreulicht oder Side Scatter (SSC). Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität und Membranfaltung (Abb. 7).

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein FACS-Calibur™ (Becton Dickinson GmbH, Bergisch Gladbach Deutschland) verwendet, das mit einem Rechner zur Datenakquisition und -analyse verbunden war. Bei jeder Probe wurden die Daten von mindestens 10.000 Zellen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen CellQuest™ (Version

3.3, BD Biosciences, San José, USA) und FCS Express™ (Version 1.0, De Novo Software, Thornhill, Kanada). Die Daten wurden als eindimensionale Histogramme oder als zweidimensionale Punkt-Bilder (Dot-plots) dargestellt und analysiert.



**Abb. 7:** Prinzip der Streulicht- und Fluoreszenzmessung am Durchflußzytometer.

## 2.9 Nachweis von HIF-1 $\alpha$ -mRNA mittels semiquantitativer PCR

DNA-Fragmente werden zur weiteren Analyse in großen Mengen benötigt. Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Abschnitten mit schon bekannter Sequenz. Sie wurde in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Mullis und Kollegen entwickelt (Mullis et al. 1986). Im wesentlichen sind in einem PCR-Ansatz vier Komponenten enthalten: (1) Eine isolierte Nukleinsäure aus Zellen oder Geweben. Sie enthält das zu amplifizierende DNA-Fragment. (2) Zwei Oligonukleotide (Primer) rahmen das Fragment ein. Hinzu kommen (3) eine hitzebeständige DNA-Polymerase und (4) die Nukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Innerhalb eines PCR-Zyklus werden drei Teilschritte mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen durchlaufen. Während des ersten Schritts bei über 90 °C wird die doppelsträngige DNA denaturiert. Es liegen nur noch DNA-Einzelstränge vor. An diese lagern sich im zweiten Schritt bei über 50 °C die Primer an. Im dritten und letzten Schritt bei über 70 °C kopiert die DNA-Polymerase den durch die Primer eingegrenzten Abschnitt auf der DNA. Am Ende von  $n$  PCR-Zyklen enthält das Reaktionsgemisch theoretisch  $2^n$  Kopien des betreffenden DNA-Abschnitts.

### 2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA mittels RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Milden, Deutschland) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu gehörten die Zellysis, die Homogenisierung der Lysate, der optionale DNase-Verdau mit einem RNase-freien DNase-Set

(Qiagen, Milden, Deutschland), die Eluierung der RNA und die spectrophotometrische Bestimmung der RNA-Menge an einem Bioanalyzer<sup>TM</sup> (G2938B, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland). Ausgangspunkt waren unbehandelte und Myxothiazol-behandelte PMA-Ionomycin-stimulierte CD4+ T-Zellen.

### 2.9.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA (complementary oder copy DNA) erfolgte nach Angaben des Herstellers des TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents-Kits (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Einzusetzen waren 400 ng isolierte RNA. Das Prinzip beruht darauf, daß die mRNA durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Die gewonnene cDNA dient als Matrize für die PCR und wird sofort weiterverarbeitet.

### 2.9.3 Einstellung der cDNA-Menge

Um einen validen semiquantitativen Vergleich der PCR-Produktmengen zu ermöglichen, war der Einsatz gleicher Ausgangsmengen an cDNA notwendig. Die Einstellung der cDNA-Ausgangsmengen erfolgte anhand der Analyse der Amplifikationsprodukte aus einer PCR, bei der als interner Standard  $\beta$ -Actin-spezifische Sequenzen amplifiziert wurden.

### 2.9.4 Amplifikation der cDNA

In Tabelle 2 sind die ausgewählten spezifischen Primer für die Amplifikation der HIF-1 $\alpha$ - und  $\beta$ -Actin-cDNA gezeigt. Deren DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Oligo<sup>®</sup> Primer Analysis (National Biosciences, Inc., Plymouth, USA) computergestützt ermittelt.

**Tab. 2:** Primer zur Amplifikation der HIF-1 $\alpha$ - und  $\beta$ -Actin-cDNA

cDNA	Primer	Primersequenz (5' nach 3')	Produktlänge	Quelle
$\beta$ -Actin	forward	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	489 bp	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland
	reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC		
HIF-1 $\alpha$	forward	AGATACTCAAAGTCGGACAGCC	453 bp	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland
	reverse	TTTCTGCTGCCTTGTATAGGAG		

Zur Amplifikation der cDNA wurden auf Eis in einem 0,2  $\mu$ l-Thermo-Strip<sup>TM</sup> (Rapidozym, Berlin, Deutschland) folgende Substanzen zusammengegeben ( $\Sigma$  = 18  $\mu$ l): 9,8  $\mu$ l A. dest., 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland), 1  $\mu$ l Primer *forward* (10

$\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Primer *reverse* (10  $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  cDNA, 0,2  $\mu\text{l}$  dNTPs (25 mM), 1  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer und 2  $\mu\text{l}$  Betain (5 M) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Ein mitgeführter Kontrollansatz enthielt A. dest. anstelle der cDNA. In einem PCR-Cycler<sup>TM</sup> (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde anschließend folgender Zyklus 20-35mal durchlaufen: 5 min 95 °C (Totaldenaturierung), 30 s 95 °C (Zyklusdenaturierung), 30 s 60 °C (Primeranlagerung), 60 s 72 °C (Elongation), 10 min 72 °C (Endelongation), hold 4 °C (Halt). Die Proben wurden auf Eis gestellt und sofort weiterverarbeitet.

### **2.9.5 Analyse der Amplifikationsprodukte**

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen (w/v) Agarosegel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente unter UV-Licht enthielt das Agarosegel Ethidiumbromid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die Laufweiten der verschiedenen DNA-Fragmente wurden anhand eines mitgeführten Molekulargewichtsmarkers (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Das Agarosegel wurde mit einer Geldokumentationsanlage (Hama GmbH & Co. KG, Monheim, Deutschland) fotografiert. Die Fotos wurden visuell ausgewertet.

### **2.10 Nachweis des HIF-1 $\alpha$ -Proteins mittels Western Blot-Analyse**

Bei der Western-Blot-Analyse werden Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine Membran transferiert und fixiert. Die Membran wird mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Ein Sekundärantikörper lagert sich in einem zweiten Inkubationsschritt an den Primärantikörper an. Mittels einer enzymkatalysierten Farb- oder Lichtreaktion wird das auf der Membran fixierte Protein sichtbar gemacht.

#### **2.10.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Ausgangspunkt waren unbehandelte und Myxothiazol-behandelte PMA-Ionomycin-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zellen wurden pelletiert (1 min, 16.000 g, 4 °C) und mit SDS-Gel-Ladepuffer (A. dest. mit 60 mM Tris, 25 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 14,4 mM ME und 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) lysiert. Um eine vollständige Denaturierung und Entfaltung aller Proteine zu sichern, wurden unmittelbar vor dem Auftragen alle Proben für 10 min in einen Wärmeblock (Techne Dri-Block<sup>®</sup> DB 2A, Novodirect GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland) bei 95 °C erhitzt.

Lauf- und Sammelgel wurden nach einer Rezeptur von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Sie

polymerisierten in einer Miniatur-Elektrophoresezelle (Mini-Protean II electrophoresis cell-Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aus. Das Laufgel war ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel. Pro Geltasche wurde das Lysat von 1 Mio. Zellen aufgetragen. Der mitgeführte Marker (Kaleidoscope Prestained Standard, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und die Positivkontrolle, CoCl<sub>2</sub>-behandeltes HeLa-Zellysat (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), wurden zu jeweils 10 µl aufgetragen.

### **2.10.2 Western-Blot**

Der Western-Blot wurde in einer Mini Tank Blotting Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurden die PVDF-Membranen (0,45 µm, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) 5 min mit einer Färbelösung aus 0,3 % Ponceau S (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) und 0,3 % TCA (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt.

### **2.10.3 Zugabe der Antikörper und Detektion**

Um die Membranen für unspezifische Bindungen des Antikörpers zu blockieren, wurden sie 2 h mit Magermilchpulverlösung (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Als Primärantikörper wurde *anti-human* HIF-1α (Klon 54, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet, als Sekundärantikörper *anti-Maus* IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Der Sekundärantikörper und die Reagenzien für die Enzymreaktion wurden dem ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System-Testkit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) entnommen. Mit dem durch Chemolumineszenz freigesetzten Licht der Enzymreaktion wurde ein Autoradiografiefilm (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Deutschland) belichtet und in einer Entwicklermaschine (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) vollautomatisch entwickelt. Die Fotos wurden visuell ausgewertet.

### **2.10.4 β-Actin-Abgleich**

Der β-Actin-Abgleich diente zum Nachweis dafür, daß sich in jeder Geltasche die gleiche Menge Zellmaterial befand. Antikörperzugabe und Detektion waren wie für den HIF-1α-Nachweis beschrieben. Als Primärantikörper wurde ein *anti-human* β-Actin-Antikörper (Klon AC-15, Isotyp mIgG<sub>1</sub>, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) eingesetzt.

## **2.11 Verwendete Pufferlösungen**

PBS: A. dest. mit 136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

(alle Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,2

PBA: PBS mit 0,5 % (w/v) BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

PBS/BSA: PBS mit 0,5 % (w/v) BSA

## **2.12 Statistische Auswertung**

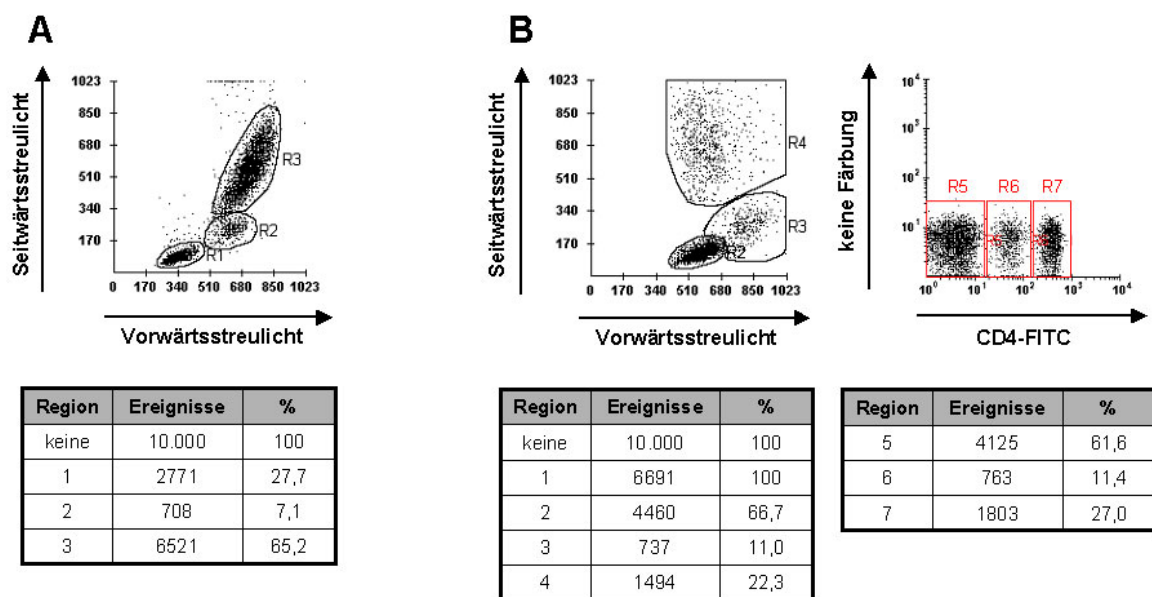
Alle gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Softwareprogramme SPSS (Version 11.0, SPSS, Inc., Chicago, USA) und Microsoft Excel (Version 2000, Microsoft Corporation, USA) erfaßt, statistisch ausgewertet und als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen Datengruppen bei unabhängigen Stichproben wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test, die bei abhängigen mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test erfaßt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Durchflußzytometrische Bewertung der Zelltrennungen

##### 3.1.1 PBMC-Präparation

Wie in durchflußzytometrischen Analysen gezeigt werden konnte, setzten sich frisch isolierte PBMC aus Leukozytenfiltern aus ca. 70 % Lymphozyten, 10 % Monozyten und 20 % Granulozyten zusammen. Damit waren im Vergleich zu Vollblut, in dem ca. 30 % Lymphozyten, 10 % Monozyten und 60 % Granulozyten gefunden wurden, die Lymphozyten deutlich angereichert. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft zweidimensionale Dot-plot-Darstellungen des Vorwärts-Seitwärts-Streulichts einer Vollblut- und einer PBMC-Untersuchung sowie eine zweidimensionale Dot-plot-Darstellung der Fluoreszenz von mit *anti-human* CD4-FITC gefärbten PBMC.

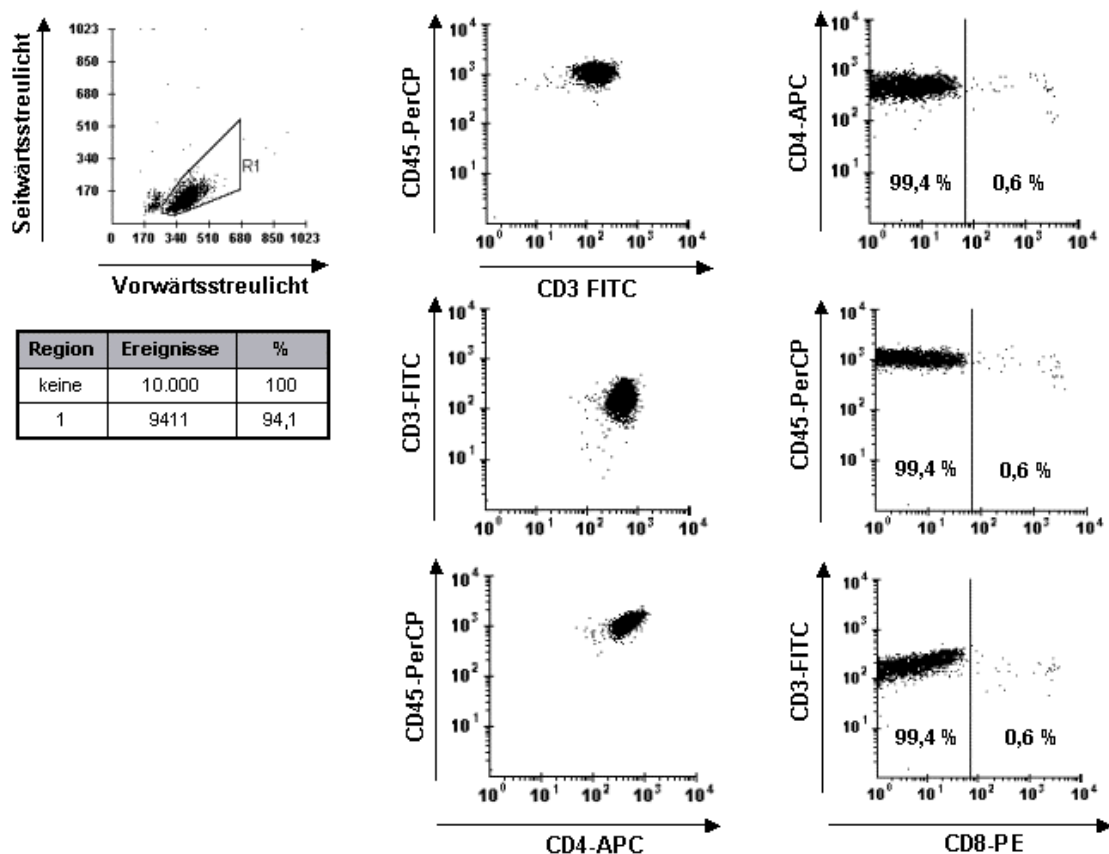


**Abb. 8:** Durchflußzytometrische Analyse von Vollblut (A) und PBMC (B). R = Region. In A sind durch R1, R2 und R3 jeweils die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten eingegrenzt, in B durch R2, R3 und R4. Ungefärbte Zellen zeigt R5. Die prozentualen Anteile der einzelnen Regionen und damit der Zellpopulationen sind tabellarisch aufgeführt. Bei 27,0 % der PBMC handelte es sich in diesem Beispiel um CD4+ T-Zellen (R7). Monozyten waren mit dem Antikörper markiert, weil sie das CD4-Oberflächenantigen schwach exprimieren (R6).

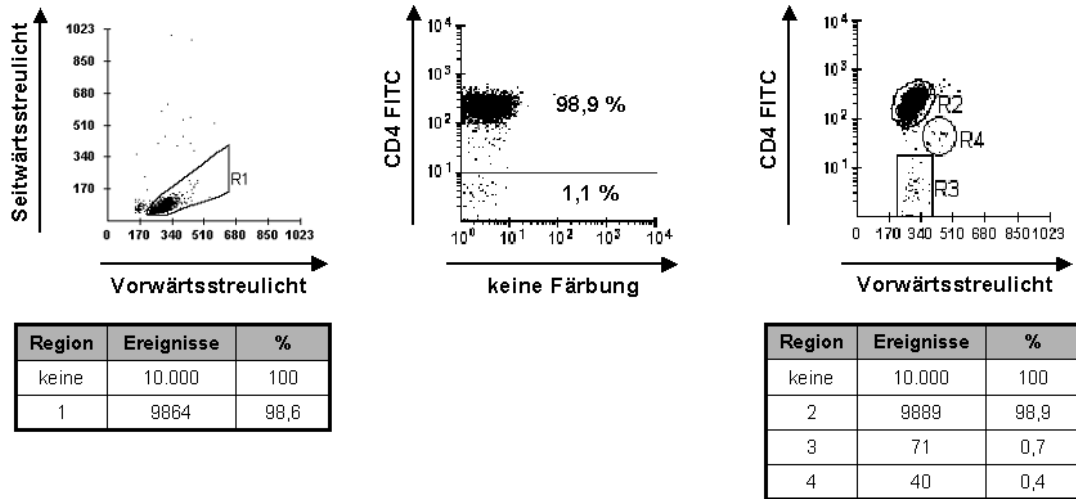


### 3.1.2 Magnetisch separierte CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten

In anderen durchflußzytometrischen Analysen konnte für alle magnetisch aktivierten Zellsortierungen eine bis zu 99%ige Reinheit nachgewiesen werden. Generell waren bis zu 99 % der Zellen lebensfähig. Die Abbildung 9 zeigt zweidimensionale Dot-plot-Darstellungen der Fluoreszenz von mit MultiTest-Reagenz<sup>TM</sup> gefärbten CD4+ T-Zellen. Später wurde nur noch mit *anti-human* CD4-FITC-Antikörpern gearbeitet (Abb. 10).

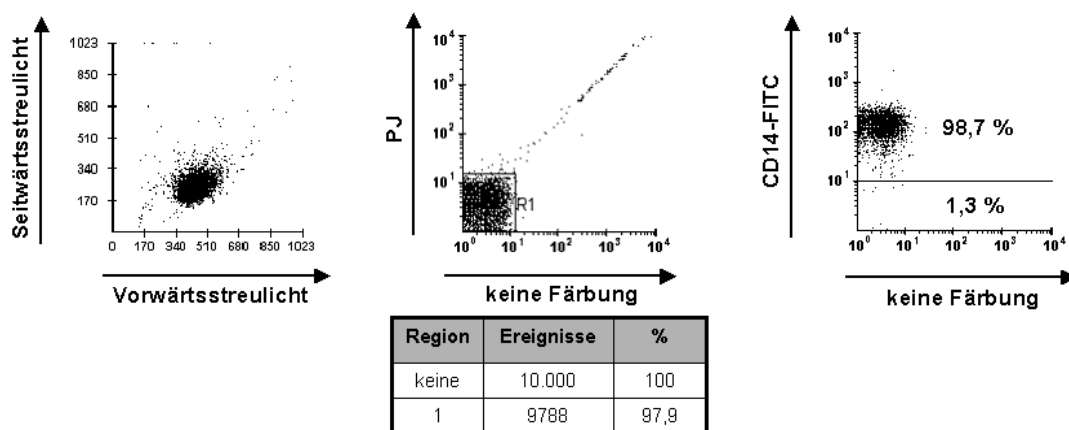


**Abb. 9:** Durchflußzytometrische Erfolgskontrolle einer magnetisch aktivierten Zellsortierung von CD4+ T-Zellen mittels MultiTest-Reagenz<sup>TM</sup>. In diesem Beispiel waren 94,1 % der Zellen lebensfähig (R1). Von den lebensfähigen Zellen waren 99,4 % CD4-positiv.



**Abb. 10:** Durchflußzytometrische Erfolgskontrolle einer magnetisch aktivierten Zellsortierung von CD4+ T-Zellen mittels *anti-human* CD4-FITC-Antikörpern. In diesem Beispiel waren 98,6 % der Zellen lebensfähig (R1). Von den lebensfähigen Zellen waren 98,9 % CD4-positiv (R2). In geringem Umfang waren CD4-negative Zellen (R3) und Monozyten (R4) vorhanden.

Die folgende Abbildung zeigt zweidimensionale Dot-plot-Darstellungen der Fluoreszenz von mit *anti-human* CD14-FITC gefärbten Monozyten.



**Abb. 11:** Durchflußzytometrische Erfolgskontrolle einer magnetisch aktivierten Zellsortierung von CD14+ Monozyten mittels *anti-human* CD14-FITC-Antikörpern. In diesem Beispiel waren 97,9 % der Zellen lebensfähig (R1). Von den lebensfähigen Zellen waren 98,7 % CD14-positiv. PJ = Propidiumjodid.

## 3.2 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit der Clark-Elektrode

### 3.2.1 Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten PBMC

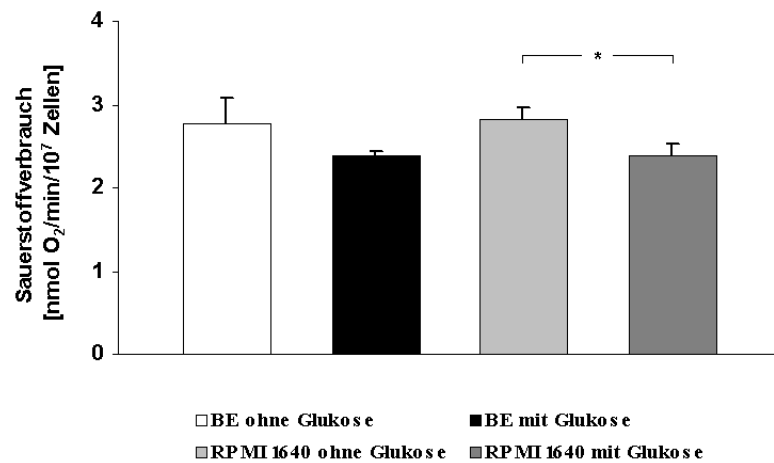
In diesem Untersuchungsabschnitt wurden zunächst standardisierte Bedingungen für die Sauerstoffverbrauchsmessungen an unterschiedlichen Zellpopulationen hergestellt. Es lagen keine Erkenntnisse und Erfahrungen über den Sauerstoffverbrauch von aus Leukozytenfiltern gewonnenen Zellen vor. Deshalb diente die Sauerstoffverbrauchsmessung gleichzeitig als Nachweis dafür, daß diese Zellen vital und funktionell aktiv sind.

Wie in der folgenden Tabelle dargestellt, konnte unabhängig von der Zusammensetzung des Zellkulturmediums eine positive, relativ enge Korrelation ( $r$ ) zwischen der eingesetzten Zellmenge und dem Sauerstoffverbrauch von frisch aus Leukozytenfiltern präparierten PBMC festgestellt werden. Die von Null verschiedene Signifikanz wurde mit dem T-Test nach Student berechnet.

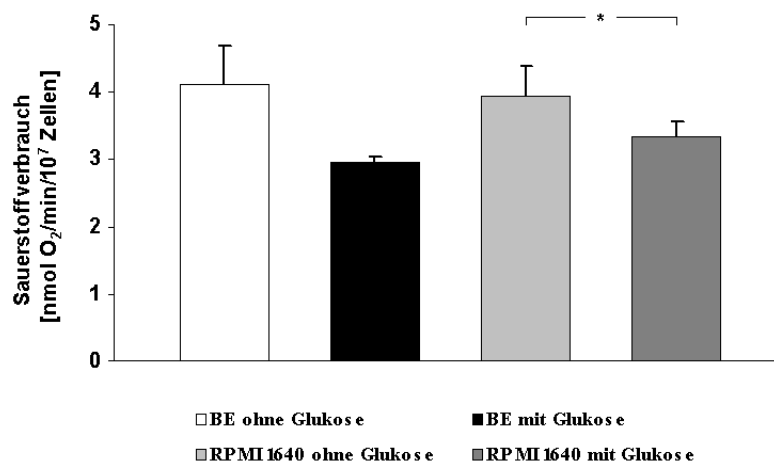
**Tab. 3:** Zusammenhang zwischen Zellzahl und Sauerstoffverbrauch von PBMC in verschiedenen Zellkulturmedien

	BE ohne Glukose	BE mit Glukose	RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
$r$	0,84	0,93	0,62	0,56
Signifikanz	+	+	+	+
$n$	28 (11 Präp.)	8 (4 Präp.)	46 (15 Präp.)	43 (16 Präp.)

In den folgenden zwei Abbildungen sind die Sauerstoffverbrauchsraten ruhender und Con A-stimulierter PBMC aus Leukozytenfiltern in den verschiedenen Zellkulturmedien dargestellt.



**Abb. 12:** Sauerstoffverbrauch ruhender PBMC in verschiedenen Zellkulturmedien. In BE ohne Glukose wurden insgesamt 28 Messungen durchgeführt (11 Pröp.), in BE mit Glukose 8 (4 Pröp.), in RPMI 1640 ohne Glukose 46 (15 Pröp.) und in RPMI 1640 mit Glukose 43 (16 Pröp.). \* p = 0,003.



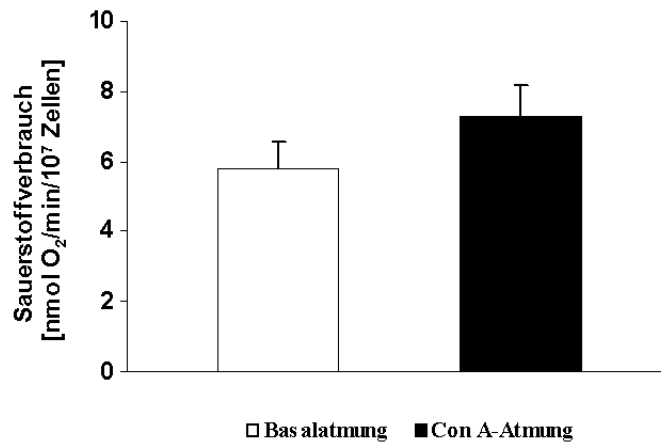
**Abb. 13:** Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter PBMC in verschiedenen Zellkulturmedien. In BE ohne Glukose wurden insgesamt 28 Messungen durchgeführt (11 Pröp.), in BE mit Glukose 8 (4 Pröp.), in RPMI 1640 ohne Glukose 20 (10 Pröp.) und in RPMI 1640 mit Glukose 28 (11 Pröp.). \* p = 0,037.

Der basale Sauerstoffverbrauch in BE mit Glukose war um  $16,8 \pm 2,5$  % niedriger als in BE ohne Glukose. Aufgrund der geringen Anzahl von unabhängigen Experimenten (Präparationen) in BE mit Glukose wurde jedoch die statistische Signifikanz verfehlt. In BE ohne Glukose bewirkte die Zugabe von Con A einen statistisch signifikanten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um  $45,4 \pm 5,2$  % ( $p = 0,001$ ). In BE mit Glukose stieg er dadurch um  $24,7 \pm 2,9$  % an. Aus genanntem Grund konnte dieser Anstieg statistisch jedoch nur als tendenziell eingestuft werden. Die in den RPMI-Medien beobachteten Basalatmungen der PBMC unterschieden sich von denen der BE-Medien statistisch nicht signifikant. Der um  $17,6 \pm 5,4$  % geringere Sauerstoffverbrauch in RPMI 1640 mit Glukose war wie auch dessen Anstieg um  $37,3 \pm 5,0$  % infolge Con A-Zugabe statistisch signifikant ( $p = 0,003$  und  $0,001$ ). Wenn die Zellen in RPMI 1640 ohne Glukose mit Con A stimuliert wurden, stieg deren Sauerstoffverbrauch statistisch signifikant um  $40,7 \pm 6,6$  % ( $p = 0,002$ ).

In Anlehnung an frühere, auch eigene Untersuchungen (Wertenauer 2000, Schmid 2000, Schmid et al. 2000, Schmid et al. 2001, Lünemann et al. 2001, Kuhnke et al. 2003, Naumann 2004) wurde Con A in einer Endkonzentration von  $33,3$  bis  $49,7 \mu\text{g}$  pro  $10^7$  Zellen eingesetzt und lag damit in einem allgemein zur Stimulation eingesetzten Bereich von  $3-5 \mu\text{g}/10^6$  Zellen.

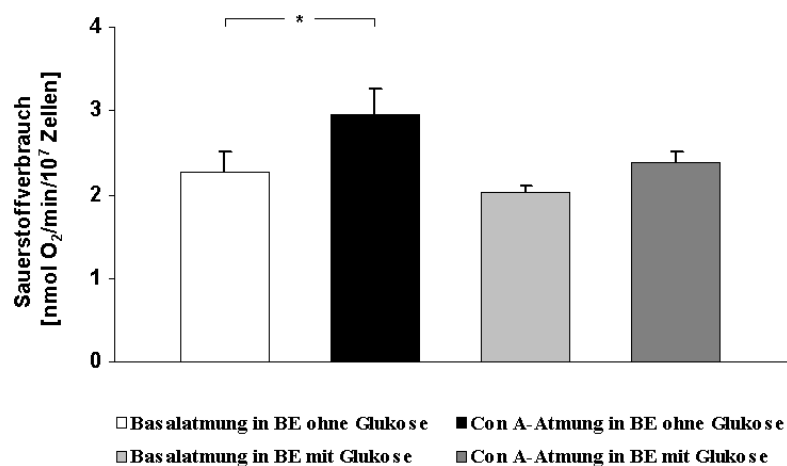
Eine Änderung der Aminosäurezusammensetzung des Zellkulturmediums und die Zugabe von Vitaminen und Cofaktoren (= Unterschied zwischen BE und RPMI 1640) hatte keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Basal- und Con A-stimulierten Atmung der PBMC aus den Leukozytenfiltern zur Folge. Dagegen bestand in RPMI 1640 ohne Glukose eine statistisch signifikant stärkere Stimulationsfähigkeit ( $p = 0,037$ ), die in BE mit Glukose jedoch aufgrund des geringen Umfangs der Präparationen verfehlt wurde.

Die gefundenen Daten für die PBMC aus Leukozytenfiltern wurden mit denen von aus humanem Vollblut gewonnenen PBMC verglichen. Dazu wurden unmittelbar nach Präparation die in Abbildung 14 dargestellten Daten gemessen. Sowohl Basal- als auch Con A-Atmung waren statistisch signifikant höher im Vergleich zu den korrespondierenden Werten der PBMC aus Leukozytenfiltern ( $p = 0,006$  bzw.  $0,01$ ). Mit einem Korrelationsfaktor von  $0,88$  konnte auch hier ein tendenziell enger Zusammenhang zwischen eingesetzter Zellzahl und Sauerstoffverbrauch gefunden werden. Dieser war jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Präparationen statistisch nicht signifikant verschieden von Null. Der Anstieg der Atmung infolge Con A-Zugabe um  $26,3 \pm 3,2$  % verfehlt aus diesem Grund nur knapp die statistische Signifikanz ( $p = 0,068$ ). Er fiel geringer aus als bei den PBMC aus Leukozytenfiltern.



**Abb. 14:** Sauerstoffverbrauch ruhender und Con A-stimulierter PBMC in BE ohne Glukose (n = 8 [4 Pröp.]). Das Blut zur PBMC-Gewinnung wurde zum Vergleich mit der Atmung von PBMC aus Leukozytenfiltern durch Punktion einer Vene gewonnen.

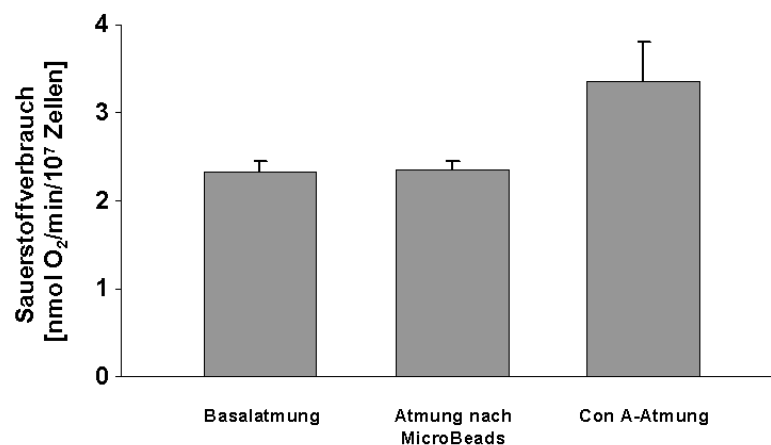
Die Präparation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung nahm darüber hinaus einen mehrstündigen Zeitraum in Anspruch. Bei den folgenden Untersuchungen wurden deshalb frisch aus Leukozytenfiltern präparierte PBMC über einen Zeitraum von 5 h bei 0 °C in verschiedenen Zellkulturmedien aufbewahrt. Anschließend wurde ihre uneingeschränkte Sauerstoffverbrauchsaktivität und Stimulationsfähigkeit mit Con A überprüft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 15:** Sauerstoffverbrauch ruhender und Con A-stimulierter PBMC 5 h nach Präparation in BE ohne (n = 14 [7 Pröp.]) und mit Glukose (n = 8 [4 Pröp.]). \* p = 0,016.

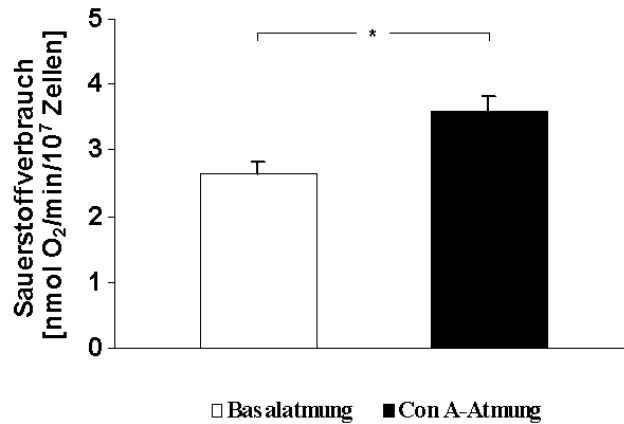
Der Sauerstoffverbrauch der PBMC in BE ohne Glukose war statistisch signifikant geringer als unmittelbar nach Präparation ( $p = 0,031$ ). Nach Zugabe von Con A nahm er um  $30,4 \pm 2,8 \%$  statistisch signifikant zu ( $p = 0,016$ ), war aber ebenfalls statistisch signifikant geringer als unmittelbar nach Präparation ( $p = 0,031$ ). Das Absinken der Basal- und Con A-Atmung nach 5 h fiel in glukosehaltigem Medium geringer aus und war statistisch nicht signifikant. Die Stimulationsfähigkeit des Sauerstoffverbrauchs lag hier bei  $16,9 \pm 3,0 \%$ . Sie war aber aufgrund der kleinen Anzahl von Experimenten statistisch nicht gesichert.

Zuletzt wurde in diesem Untersuchungsabschnitt nachgewiesen, daß die magnetisch aktivierte Zellsortierung keinerlei Einfluß auf die Sauerstoffverbrauchsaktivität und Stimulationsfähigkeit der PBMC hatte. Die folgende Abbildung zeigt, daß MicroBeads<sup>TM</sup> keine Veränderungen dieser Funktionen bewirkten. Wenn nach Hinzugabe der MicroBeads<sup>TM</sup> Con A hinzugefügt wurde, stieg der Sauerstoffverbrauch um  $48,2 \pm 9,4 \%$ .



**Abb. 16:** Sauerstoffverbrauch von PBMC nach Zugabe von *anti-human* CD4-MicroBeads<sup>TM</sup> ( $n = 5$  [5 Pröp.]) und Con A ( $n = 2$  [bei 2 der 5 Pröp.]) in BE ohne Glukose.

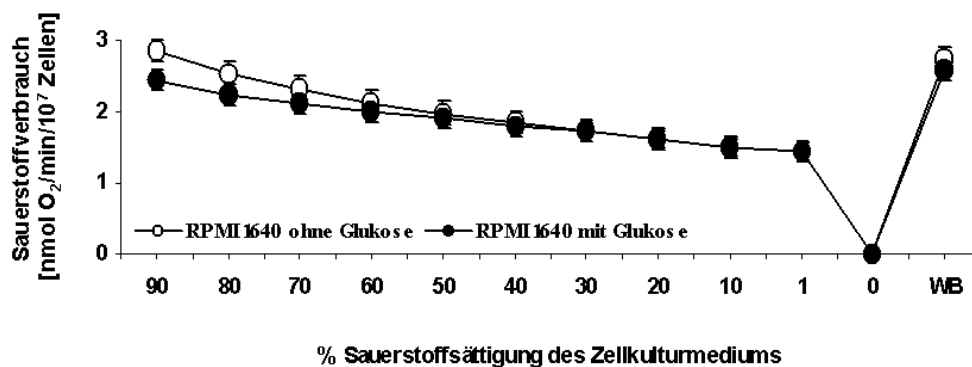
Wie die Abbildung 17 zeigt, war der Sauerstoffverbrauch von ruhenden und Con A-stimulierten PBMC aus Negativfraktionen magnetisch aktivierter Zellsortierungen ebenfalls unbeeinträchtigt. Der Con A-stimulierte Sauerstoffverbrauch war um  $37,1 \pm 4,7 \%$  statistisch signifikant höher als der unstimulierte ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 17:** Sauerstoffverbrauch ruhender und Con A-stimulierter PBMC aus Negativfraktionen magnetisch aktivierter Zellsortierungen in BE ohne Glukose (n = 30 [14 Präp.]). \* p < 0,001.

### 3.2.2 Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten CD4+ T-Zellen

Der kontinuierlich gemessene Sauerstoffverbrauch von CD4+ T-Zellen ging bis zur 10%igen Sättigung des glukosehaltigen Zellkulturmediums mit Sauerstoff um 38,1 % zurück. Das wurde in mehreren unabhängigen Experimenten gezeigt. In glukosefreiem Zellkulturmedium ging der Wert um 47,6 % zurück. In der folgenden Abbildung sind diese Beobachtungen dargestellt.



**Abb. 18:** Sauerstoffverbrauch von CD4+ T-Zellen in RPMI 1640 unter kontinuierlich fallender Sauerstoffsättigung. Beide Kurven wurden durch ununterbrochene Messungen mit Zellen aus jeweils drei unabhängigen Zellpräparationen ermittelt. WB = Wiederbelüftung.

Zwischen der eingesetzten Zellmenge und dem Sauerstoffverbrauch konnte ebenso wie bei den PBMC unabhängig von der Zusammensetzung des Zellkulturmediums eine positive und enge

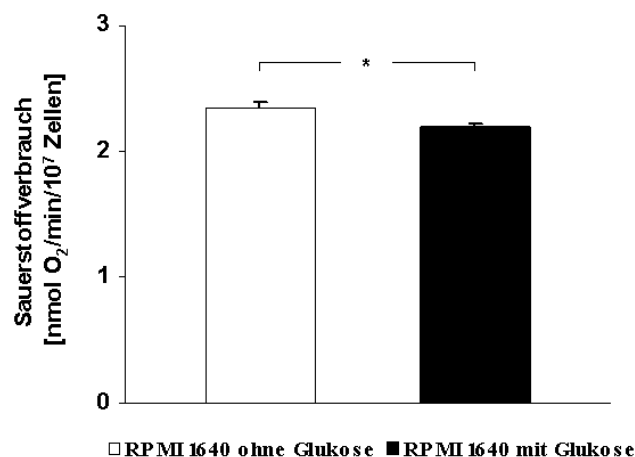


Korrelation festgestellt werden. In der folgenden Tabelle sind die Werte gezeigt. Die von Null verschiedene Signifikanz wurde mit dem T-Test nach Student berechnet.

**Tab. 4:** Zusammenhang zwischen Zellzahl und basalem Sauerstoffverbrauch von CD4+ T-Zellen in verschiedenen Zellkulturmedien

	BE ohne Glukose	RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
r	0,80	0,88	0,95
Signifikanz	+	+	+
n	55 (24 Präp.)	143 (46 Präp.)	126 (42 Präp.)

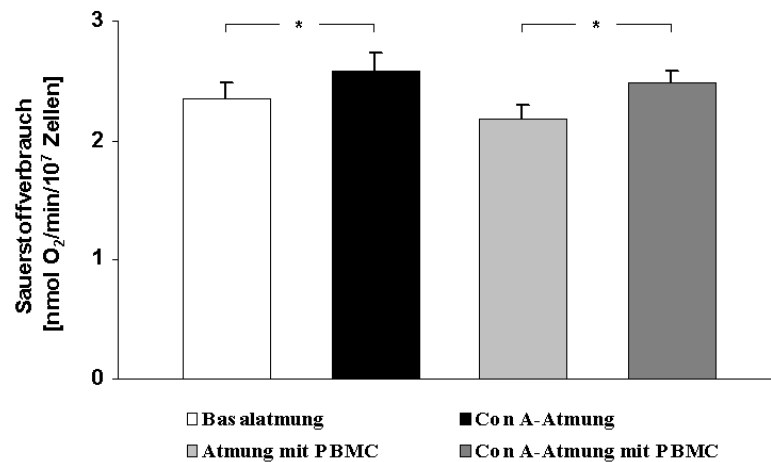
Die dazugehörige Abbildung 19 zeigt den Sauerstoffverbrauch von ruhenden CD4+ T-Zellen in RPMI 1640.



**Abb. 19:** Sauerstoffverbrauch ruhender CD4+ T-Zellen in RPMI 1640 ohne (n = 143 [46 Präp.]) und mit Glukose (n = 126 [42 Präp.]). \* p = 0,014.

Der Sauerstoffverbrauch in RPMI 1640 mit Glukose war um  $7,3 \pm 1,8$  % statistisch signifikant niedriger (p = 0,014) als in RPMI 1640 ohne Glukose. Der in BE ohne Glukose gemessene Wert (n = 55 [24 Präp.]) war identisch mit dem in RPMI 1640 ohne Glukose (p = 0,426) (Daten nicht gezeigt). Deshalb war ebenso wie bei den PBMC davon auszugehen, daß eine veränderte Aminosäurezusammensetzung und die Zugabe von Vitaminen und Cofaktoren (= Unterschied zwischen BE und RPMI 1640) keinen Einfluß auf den basalen Sauerstoffverbrauch hatten.

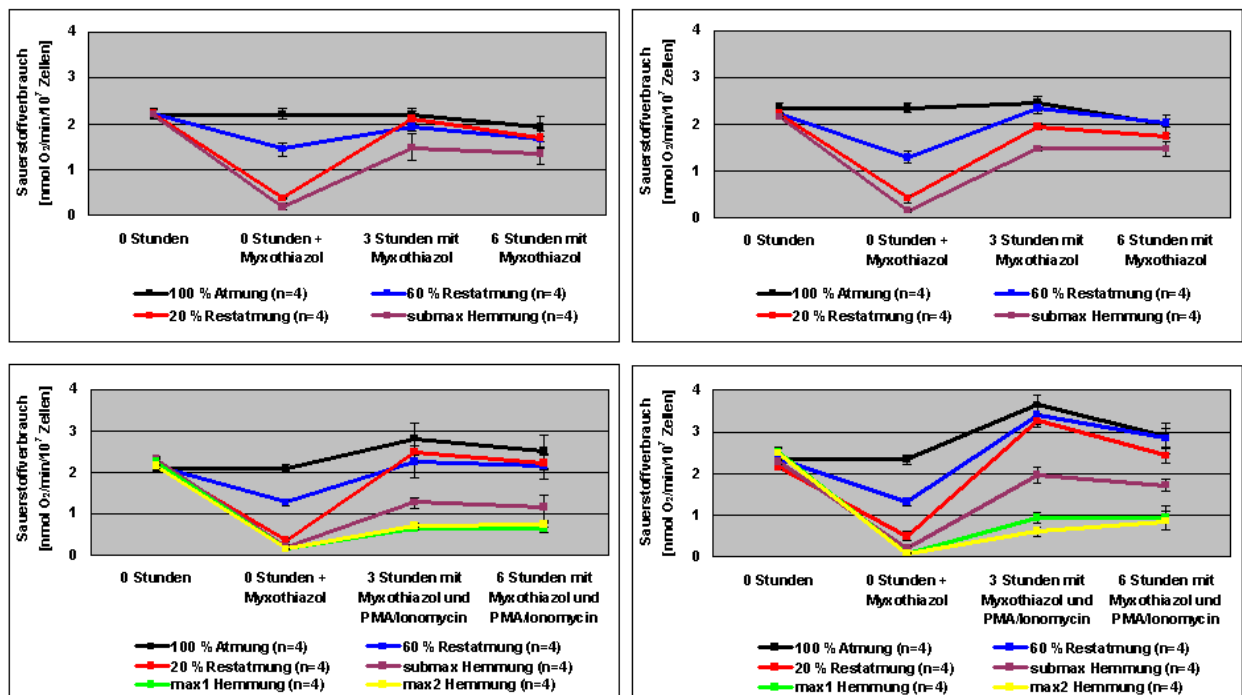
Um die Stimulationsfähigkeit des Sauerstoffverbrauchs zu prüfen, wurden zunächst Experimente mit Con A durchgeführt. Dabei konnte nur ein geringer Effekt erzielt werden, selbst wenn PBMC der Negativfraktion der magnetischen Zellsortierung als Antigen-präsentierende Zellen hinzugegeben wurden. Im Mittel war die Beobachtung dennoch statistisch gesichert. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefaßt.



**Abb. 20:** Sauerstoffverbrauch Con A-stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe von PBMC in bis zu 24 unabhängigen Experimenten in BE ohne Glukose. \*  $p = 0,027$  bzw.  $0,008$ .

Demnach konnte durch die Con A-Zugabe der Sauerstoffverbrauch um  $12,7 \pm 2,2$  % statistisch signifikant gesteigert werden ( $p = 0,027$ ). Wenn Antigen-präsentierende Zellen im Verhältnis 1:7 dazugegeben wurden, verbesserte sich dieser Effekt kaum ( $+ 14,2 \pm 2,9$  %). Er war aber ebenfalls statistisch gesichert ( $p = 0,008$ ).

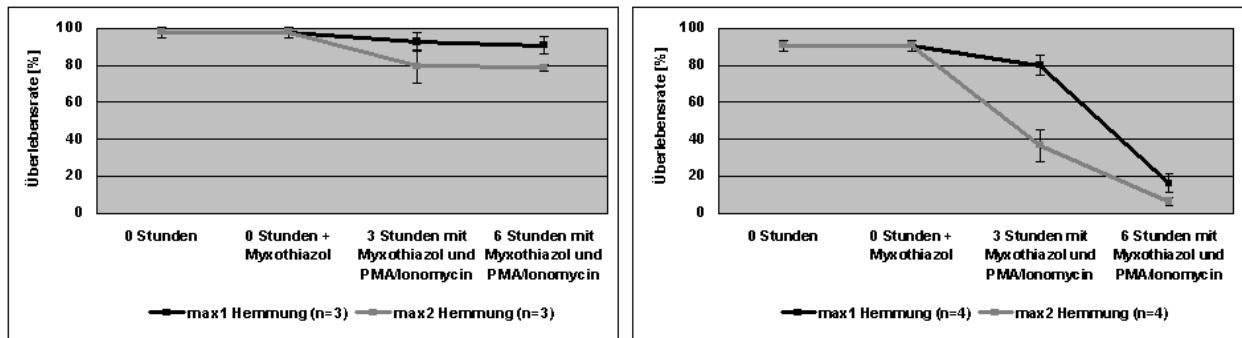
Bei gleichzeitiger Verwendung der Stimulanzien PMA und Ionomycin stellte sich heraus, daß der Sauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sehr stark angeregt wurde. Um den zeitlichen Verlauf während der Stimulation zu untersuchen, wurde er nach 3 und 6 h gemessen. Dabei wurden die Auswirkungen verschiedener Myxothiazoldosen mituntersucht. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse dargestellt. Der Sauerstoffverbrauch war demnach in beiden Zellkulturmedien bei unstimulierten und nicht Myxothiazol-behandelten Zellen über 6 h fast gleichbleibend. Im Gegensatz dazu reagierte er bei den Zellen, deren Atmung initial um 40 und 80 % sowie *submaximal* gehemmt wurde, nach 3 h stark überschießend. Das war unabhängig davon, ob PMA und Ionomycin an- oder abwesend waren. Diese Reaktion fiel im glukosefreien



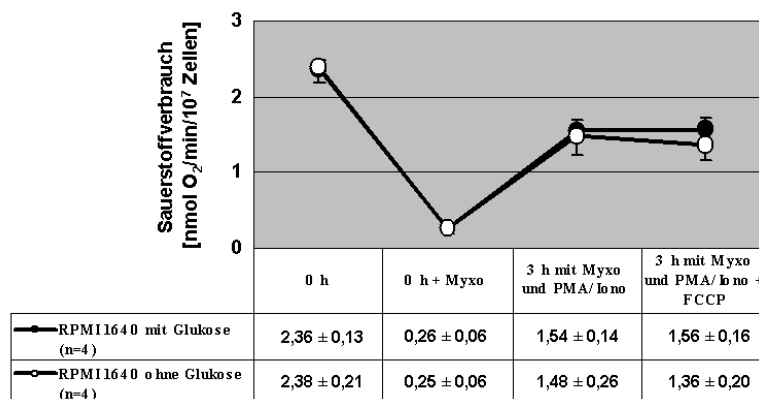
**Abb. 21:** Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffverbrauchs von CD4+ T-Zellen nach verschiedenen Myxothiazoldosen bei Glukoseverfügbarkeit (links) und unter glukosefreien Bedingungen (rechts) in Ab- (oben) und Anwesenheit (unten) von PMA und Ionomycin.

Medium stärker aus und war nach 6 h nur teilweise aufgehoben. Mit der *max1*- oder *max2*-Myxothiazoldosis war dieser Effekt wegen des überwiegenden Eintretens von Zelltod fast vollständig unterdrückt (Abb. 22). Sonst waren immer bis zu 98 % der Zellen lebensfähig. Der überschießende Effekt konnte auch bei den Zellen beobachtet werden, die nicht Myxothiazol-behandelt waren und mit PMA und Ionomycin inkubiert wurden. Hier waren die Zellen im glukosefreien Medium ebenfalls stärker betroffen.

Die Abbildung 23 verdeutlicht, daß in beiden Zellkulturmedien nach 3 h PMA-Ionomycin-Stimulation keine weitere Steigerung der Atmung mit dem Entkoppler FCCP erzeugt werden konnte. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde dazu initial mit der *submaximalen* Myxothiazoldosis unterdrückt. Dieses Ergebnis bedeutete, daß sich unter diesen Bedingungen die Atmung der Zellen bereits auf einem (nicht mehr steigerbaren) Maximum befand.



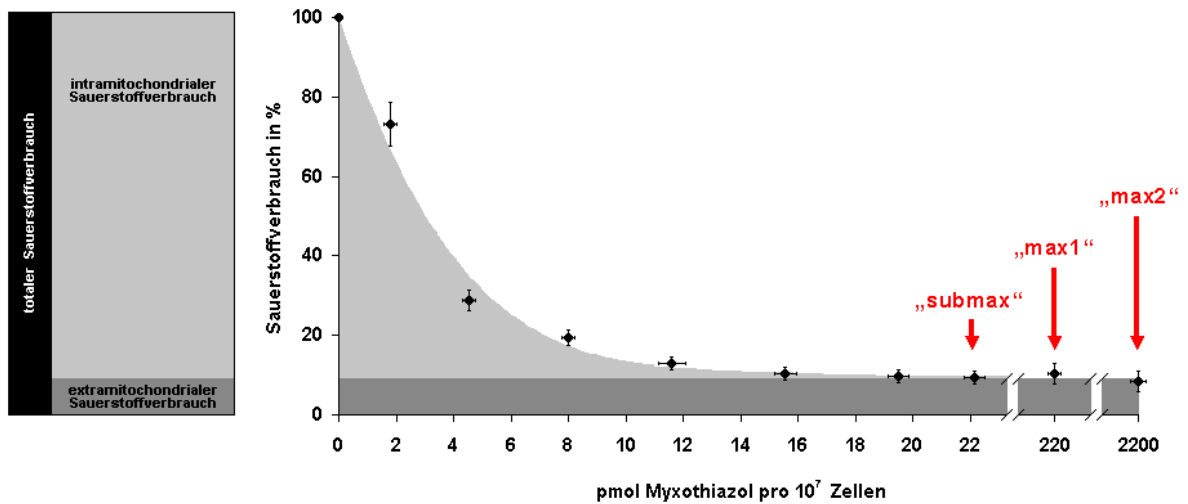
**Abb. 22:** Zeitlicher Verlauf der Überlebensraten von PMA-Ionomycin-stimulierten CD4+ T-Zellen nach *max1*- und *max2*-Myxothiazoldosis bei Glukoseverfügbarkeit (links) und unter glukosefreien Bedingungen (rechts).



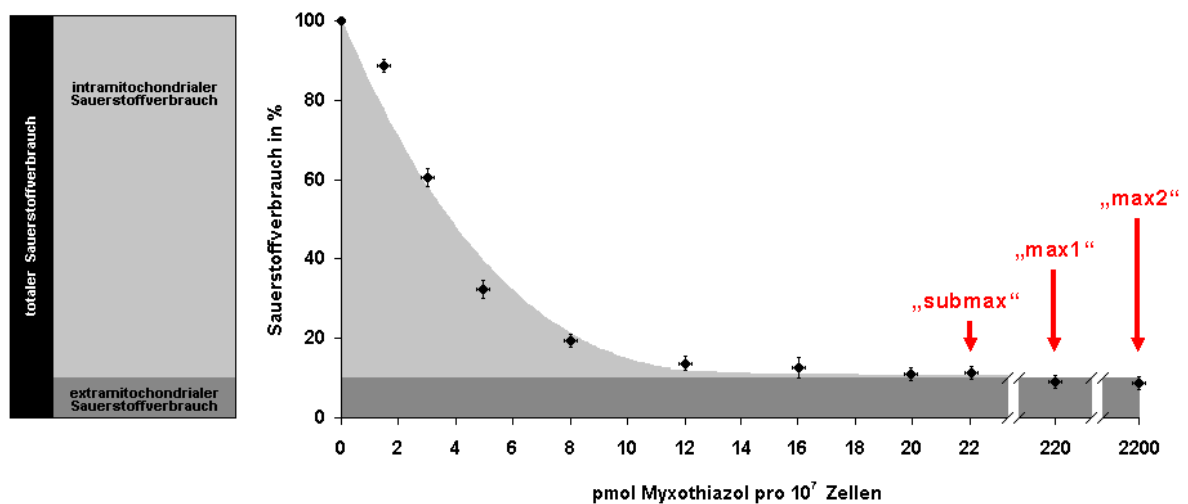
**Abb. 23:** Sauerstoffverbrauch von CD4+ T-Zellen nach *submaximaler* Myxothiazoldosis, dreistündiger PMA-Ionomycin-Stimulation und FCCP-Zugabe bei Glukoseverfügbarkeit und unter glukosefreien Bedingungen.

### 3.2.3 Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei ruhenden CD4+ T-Zellen

Bei der Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol wurde den Zellen während der Sauerstoffverbrauchsmessung schrittweise eine definierte Menge des Hemmstoffs der Atmungskette hinzugefügt. Die eingesetzte Myxothiazolmenge wurde auf die Zellzahl bezogen. Sie verursachte in jedem Fall eine schnelle und stabile Hemmung des zellulären Sauerstoffverbrauchs. In den folgenden zwei Abbildungen sind die ermittelten Titrationskurven dargestellt.



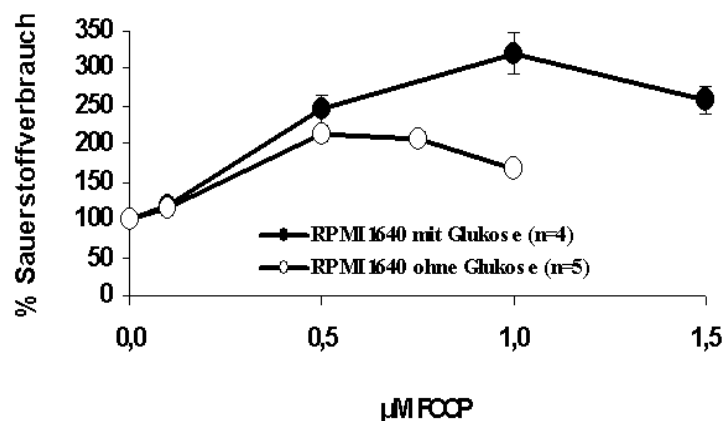
**Abb. 24:** Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD4+ T-Zellen in RPMI 1640 ohne Glukose. Jeder Meßpunkt wurde in bis zu 38 unabhängigen Experimenten ermittelt.



**Abb. 25:** Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD4+ T-Zellen in RPMI 1640 mit Glukose. Jeder Meßpunkt wurde in bis zu 32 unabhängigen Experimenten ermittelt.

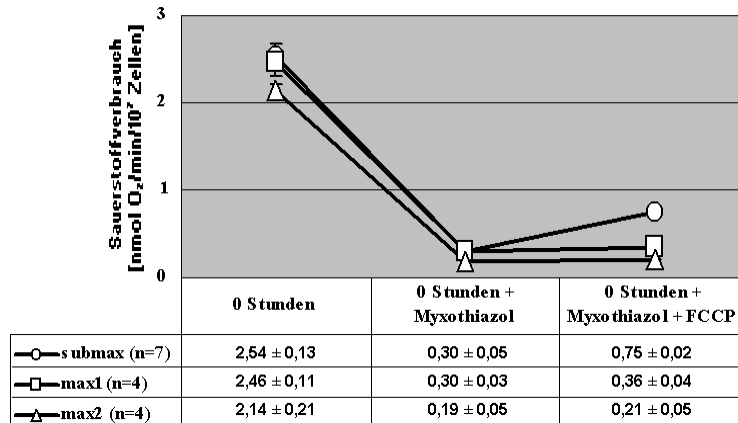
Myxothiazoldosen über 22 pmol/ $10^7$  Zellen konnten den Sauerstoffverbrauch in beiden Medien nicht stärker reduzieren. 50 % der Atmung waren unter glukosefreien Bedingungen bei einer Dosis von 3,02 pmol/ $10^7$  Zellen gehemmt. Bei Glukoseverfügbarkeit waren dafür 3,77 pmol/ $10^7$  Zellen notwendig. Die extramitochondriale Atmung ist nicht Myxothiazol-hemmbar. Sie war im glukosehaltigen tendenziell, aber statistisch nicht signifikant höher als im glukosefreien Medium.

Trotz der hochsensiblen Meßtechnik waren hinter der extramitochondrialen geringste Anteile von mitochondrialer Restatmung zu vermuten. Mit Hilfe von FCCP sollte deshalb geklärt werden, ob eine Dosis von 22 pmol Myxothiazol/ $10^7$  Zellen ausreichend für eine vollständige Hemmung der Atmung war. Dazu wurde zunächst der Sauerstoffverbrauch in Myxothiazolabwesenheit mit FCCP titriert. Den folgenden zwei Titrationskurven ist zu entnehmen, daß unter glukosefreien Bedingungen mit einer Dosis von 0,5 und bei Verfügbarkeit von Glukose mit einer Dosis von 1  $\mu$ M FCCP eine Maximalentkopplung zu erzielen war.

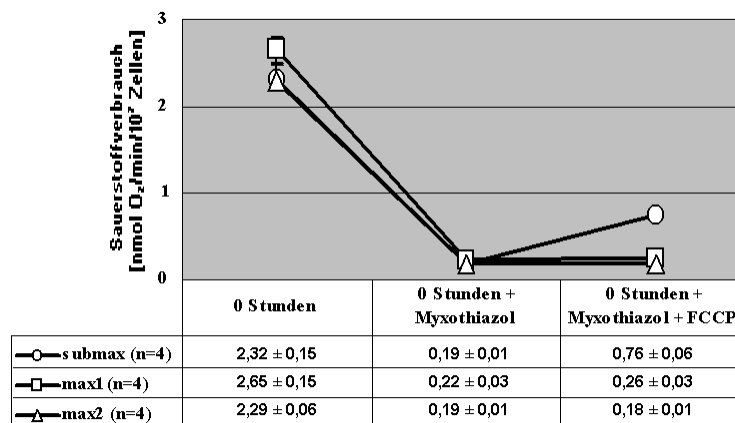


**Abb. 26:** Titration des Sauerstoffverbrauchs mit FCCP bei CD4+ T-Zellen in RPMI 1640.

Nach maximaler Hemmung des Sauerstoffverbrauchs mit 22 pmol Myxothiazol pro  $10^7$  Zellen und anschließender Zugabe von 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M FCCP konnte noch ein Sauerstoffverbrauch von rund 0,5 nmol/min/ $10^7$  Zellen in beiden Medien induziert werden (Abb. 27 und 28). Deshalb war hier davon auszugehen, daß noch einige wenige Mitochondrien und/oder Komplexe III der mitochondrialen Atmungskette aktiv waren. Aus diesem Grund wurde die Myxothiazoldosis um das 10- bzw. 100fache erhöht. Der Sauerstoffverbrauch konnte mit diesen höheren Dosen nicht stärker reduziert werden. Der FCCP-Effekt war dann jedoch nicht mehr induzierbar, wodurch eine 100%ige Hemmung der OXPHOS bewiesen wurde. Nach diesen Ergebnissen wurden die Myxothiazoldosen 22, 220 und 2200 pmol/ $10^7$  Zellen zur Vereinfachung mit *submax*, *max1* und *max2* bezeichnet.



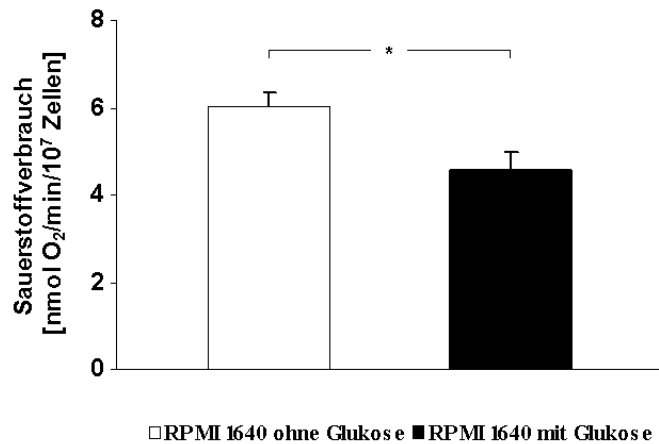
**Abb. 27:** Sauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *submax*-, *max1*- und *max2*-Myxothiazoldosis mit anschließender Zugabe von 0,5 µM FCCP in RPMI 1640 ohne Glukose.



**Abb. 28:** Sauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *submax*-, *max1*- und *max2*-Myxothiazoldosis mit anschließender Zugabe von 1 µM FCCP in RPMI 1640 mit Glukose.

### 3.2.4 Sauerstoffverbrauch von ruhenden CD14<sup>+</sup> Monozyten

In der folgenden Abbildung ist der Sauerstoffverbrauch ruhender CD14<sup>+</sup> Monozyten in RPMI 1640 dargestellt. Im Medium mit Glukose war der Sauerstoffverbrauch um  $33,0 \pm 9,2$  % statistisch signifikant niedriger ( $p = 0,017$ ) als im glukosefreien Medium.



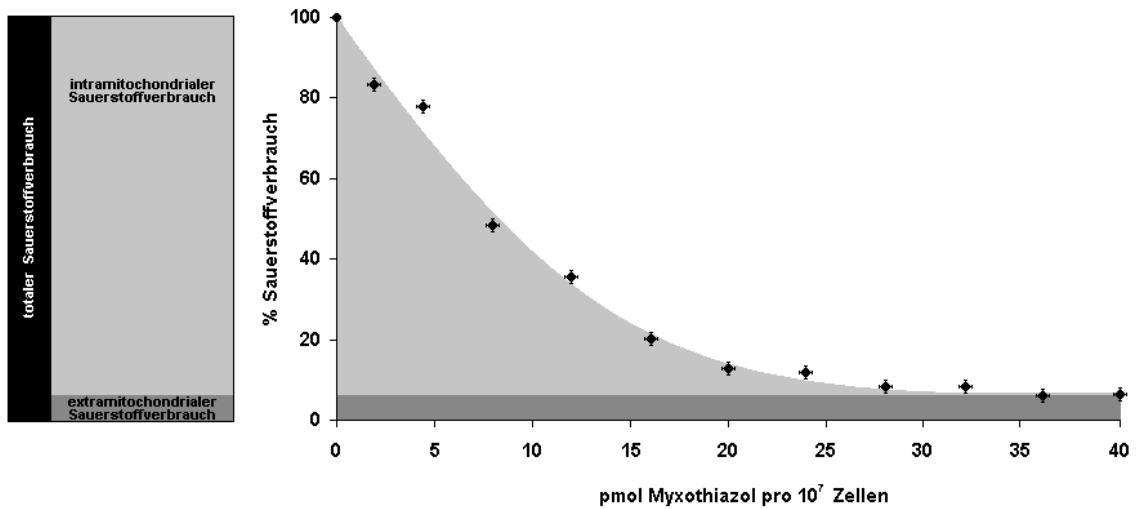
**Abb. 29:** Sauerstoffverbrauch ruhender CD14+ Monozyten in RPMI 1640 ohne (n = 22 [7 Pröp.]) und mit Glukose (n = 23 [7 Pröp.]). \* p = 0,017.

### 3.2.5 Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei ruhenden CD14+ Monozyten

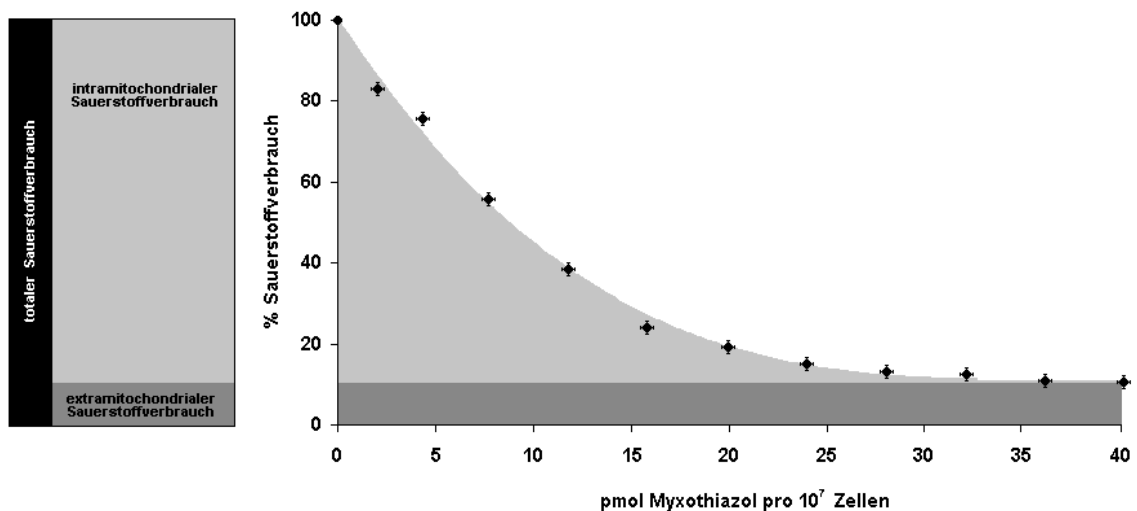
Die CD14+ Monozyten reagierten deutlich unempfindlicher auf Myxothiazol als die CD4+ T-Zellen. Bei einer Dosis von 40 pmol Myxothiazol/10<sup>7</sup> Zellen war unabhängig von der Glukosean- oder -abwesenheit die vollständige Hemmung des zellulären Sauerstoffverbrauchs erreicht. In RPMI 1640 ohne Glukose waren 50 % der Atmung bei einer Dosis von 8,17 pmol/10<sup>7</sup> Zellen gehemmt. In RPMI 1640 mit Glukose waren 8,71 pmol/10<sup>7</sup> Zellen notwendig. Ab einer Konzentration von 28 pmol/10<sup>7</sup> Zellen wirkte Myxothiazol statistisch signifikant stärker, wenn den Zellen keine Glukose zur Verfügung stand (p = 0,005 für 28, p = 0,014 für 32, p = 0,048 für 36 und p = 0,018 für 40 pmol Myxothiazol/10<sup>7</sup> Zellen). Demnach war die extramitochondriale Atmung im glukosehaltigen Medium statistisch signifikant höher als im glukosefreien Medium. Die Titrationskurven sind in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt.

In anderen Sauerstoffverbrauchsexperimenten mit der Clark-Elektrode konnte demonstriert werden, daß der Atmungskettenhemmstoff in der Lage war, den Sauerstoffverbrauch und damit die OXPHOS der CD14+ Monozyten über 1 h stabil auf dem anfangs eingestellten Niveau zu halten (Daten nicht gezeigt). Ob es sich bei der höchsten untersuchten Myxothiazoldosis von 40 pmol/10<sup>7</sup> Zellen ebenfalls um die submaximale handelte, ist nicht bekannt. Mit diesem Test wurde aber sicher nachgewiesen, daß der Effekt des Atmungskettenhemmstoffs über die Dauer der Untersuchung der Phagozytoseaktivität anhielt.





**Abb. 30:** Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD14+ Monozyten in RPMI 1640 ohne Glukose. Jeder Meßpunkt wurde in bis zu sieben unabhängigen Experimenten ermittelt.



**Abb. 31:** Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD4+ T-Zellen in RPMI 1640 mit Glukose. Jeder Meßpunkt wurde in bis zu neun unabhängigen Experimenten ermittelt.

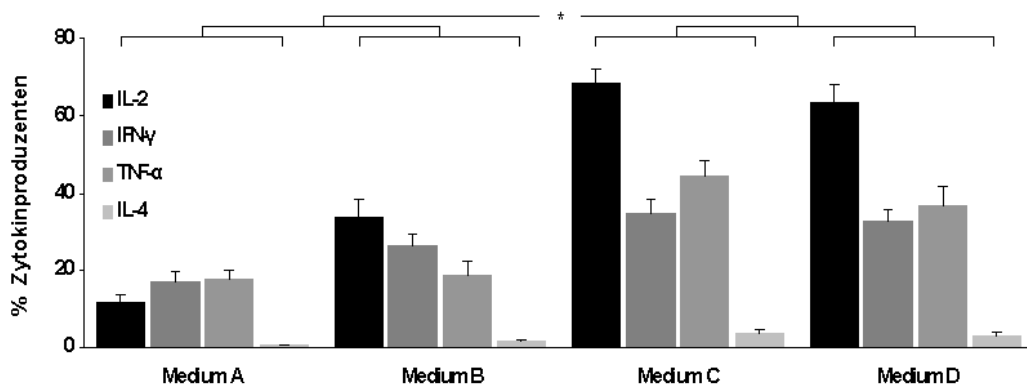
### 3.3 Zytokinproduktion von Myxothiazol-behandelten CD4+ T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin

Um den Effekt einer Myxothiazolbehandlung auf die Zytokinsynthese von CD4+ T-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst ein System etabliert, das zu einer hohen Frequenz von Zytokin-

produzierenden Zellen führte. Aus Voruntersuchungen mit BE-Medium wurde vermutet, daß sich eine unterschiedliche Zusammensetzung des Zellkulturmediums auf die Synthese von Zytokinen auswirken könnte. Daher wurden die Zellen in folgenden Zellkulturmedien mit PMA und Ionomycin stimuliert:

- *Medium A*: BE ohne Glukose
- *Medium B*: BE ohne Glukose mit 10 % (v/v) fetalem bovinem Serum, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 I. E./ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin
- *Medium C*: RPMI 1640 ohne Glukose mit 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) fetalem bovinem Serum, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 I. E./ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin
- *Medium D*: RPMI 1640 mit Glukose mit 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) fetalem bovinem Serum, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 I. E./ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin

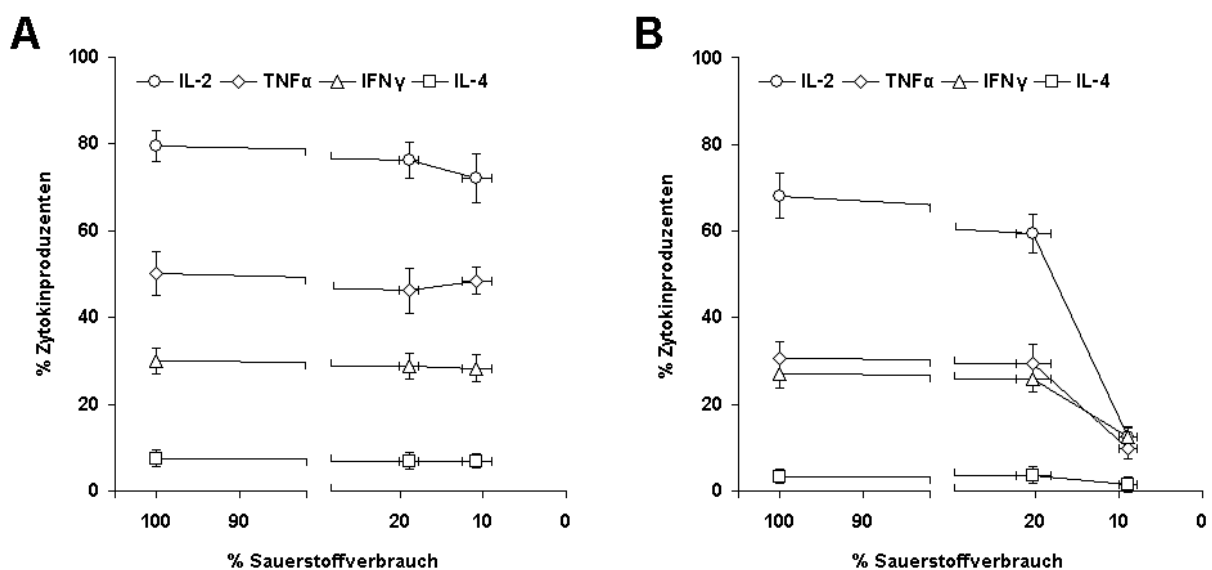
Die folgende Abbildung läßt erkennen, daß in *Medium C* und *D* statistisch signifikant mehr IL-2-, IFN-γ-, TNF-α- und IL-4-Produzenten auftraten als in *Medium A* und *B* ( $p = 0,031$ ). Dies war nicht Ursache verstärkt auftretender Nekrose in *Medium A* und *B*, wie in durchflußzytometrischen Analysen mit PJ gefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für nachfolgende Untersuchungen wurden deshalb *Medium C* und *D* weiterverwendet.



**Abb. 32:** Frequenz Zytokin-produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Zellkulturmedien aus sechs unabhängigen Zellpräparationen. \*  $p = 0,031$  vs. korrespondierenden Wert in *Medium A* und *B*.

Anschließend wurden zwei Untersuchungsserien mit je vier unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dabei sollte der Einfluß einer stufenweise mittels Myxothiazol unterdrückten

oxidativen Energiesynthese auf die Zytokinproduktion untersucht werden. Innerhalb jeder Serie wurden die Zellen jeweils in *Medium C* oder *D* aufgenommen, mit ansteigenden Myxothiazoldosen auf unterschiedliche Stufen bis zur vollständigen Hemmung der Atmung eingestellt und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Interessanterweise war erst dann ein im Vergleich zu den korrespondierenden Werten im glukosehaltigen Zellkulturmedium statistisch signifikant beeinträchtigender Effekt auf den Anteil der Zytokin-produzierenden Zellen zu beobachten, wenn die Zellen gleichzeitig einem vollständigen Glukoseentzug und einer vollständigen initialen Hemmung ihrer oxidativen Energiesynthese ausgesetzt waren ( $p = 0,029$  für alle untersuchten Zytokine). Dabei war auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen statistisch signifikant vermindert ( $p = 0,029$ ) (Daten nicht gezeigt). Die MFI der IL-2-produzierenden Zellen war tendenziell vermindert. Bemerkenswert war die Beobachtung, daß die Ausgangswerte der Anteile der Zytokin-produzierenden Zellen und deren MFI in glukosefreiem Medium tendenziell geringer waren. In der folgenden Darstellung sind die Ergebnisse der drei wichtigsten untersuchten Stufen des Sauerstoffverbrauchs als Mittelwerte gezeigt.

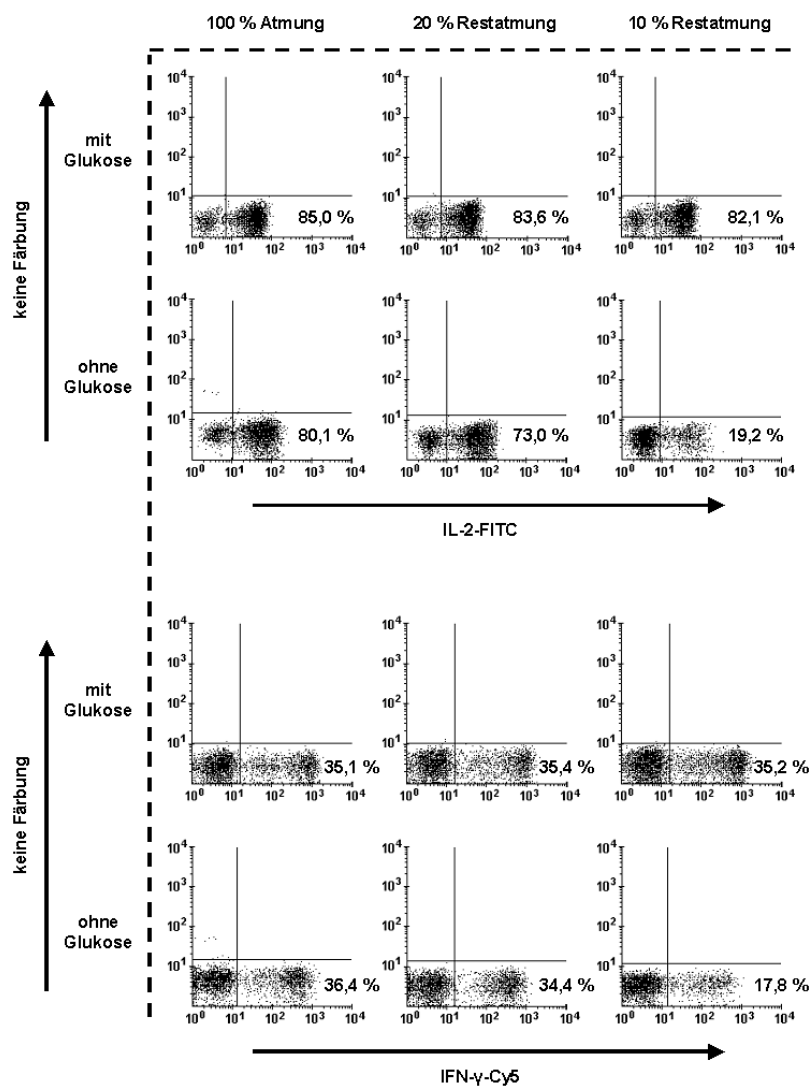


**Abb. 33:** Frequenz Zytokin-produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffverbrauch bei Glukoseverfügbarkeit (A) und unter glukosefreien Bedingungen (B) in jeweils sechs unabhängigen Experimenten.

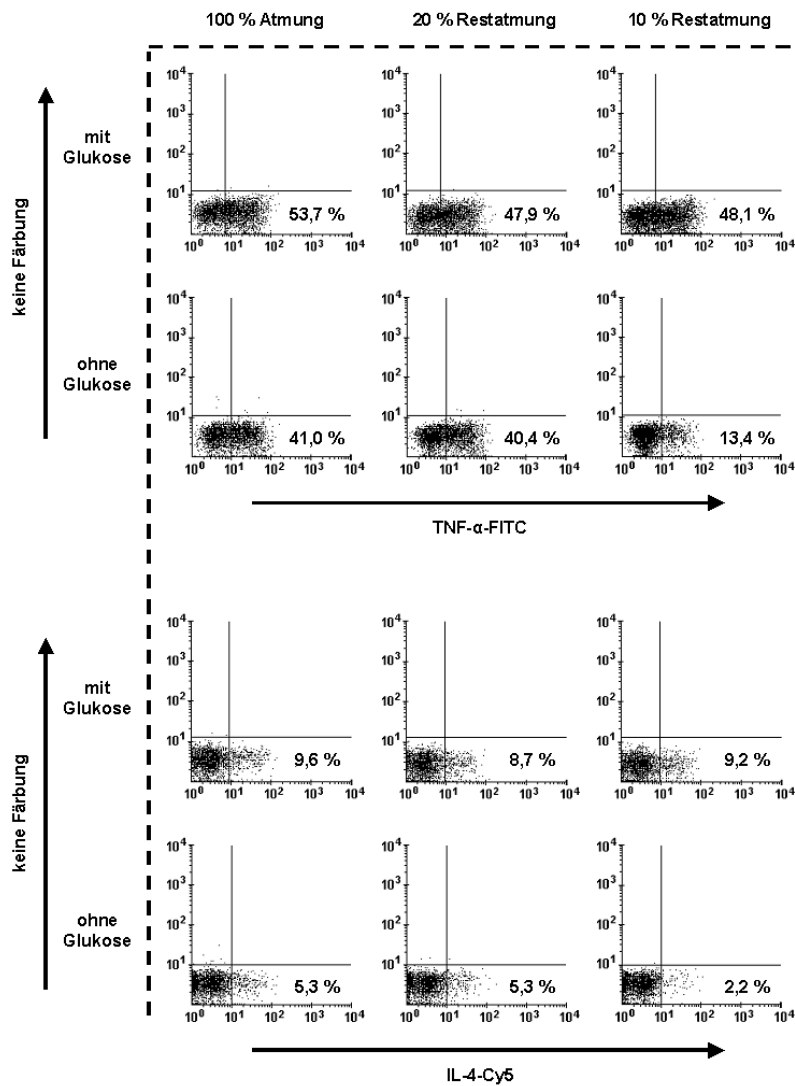
Die zweidimensionalen Dot-plot-Darstellungen der Fluoreszenz von mit *anti-human* IL-2-FITC,

IFN- $\gamma$ -Cy5, TNF- $\alpha$ -FITC und IL-4-Cy5 gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen beispielhaft die Ergebnisse eines einzelnen Versuchs aus FACS-analytischer Sicht (Abb. 34 und 35).

In FACS-Analysen mit Annexin-V-FITC und PJ konnte ausgeschlossen werden, daß die geringeren Anteile von Zytokin-produzierenden Zellen in glukosefreiem Medium bei vollständiger Hemmung der Atmung auf einer signifikanten Erhöhung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen beruhten (Daten nicht gezeigt). Bei Kontrollen mit nicht stimulierten unbehandelten und Myxothiazol-behandelten Zellen konnten in keinem Fall Zytokin-produzierende oder die Zunahme des Anteils nekrotischer Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 34:** Glukoseentzug und vollständig gehemmter zellulärer Sauerstoffverbrauch reduzieren sehr deutlich den relativen Anteil von IL-2- und IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

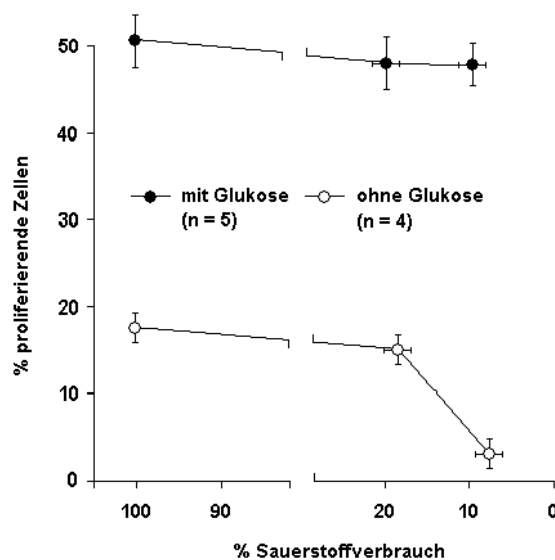


**Abb. 35:** Glukoseentzug und vollständig gehemmter zellulärer Sauerstoffverbrauch reduzieren sehr deutlich den relativen Anteil von TNF- $\alpha$ - und IL-4-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

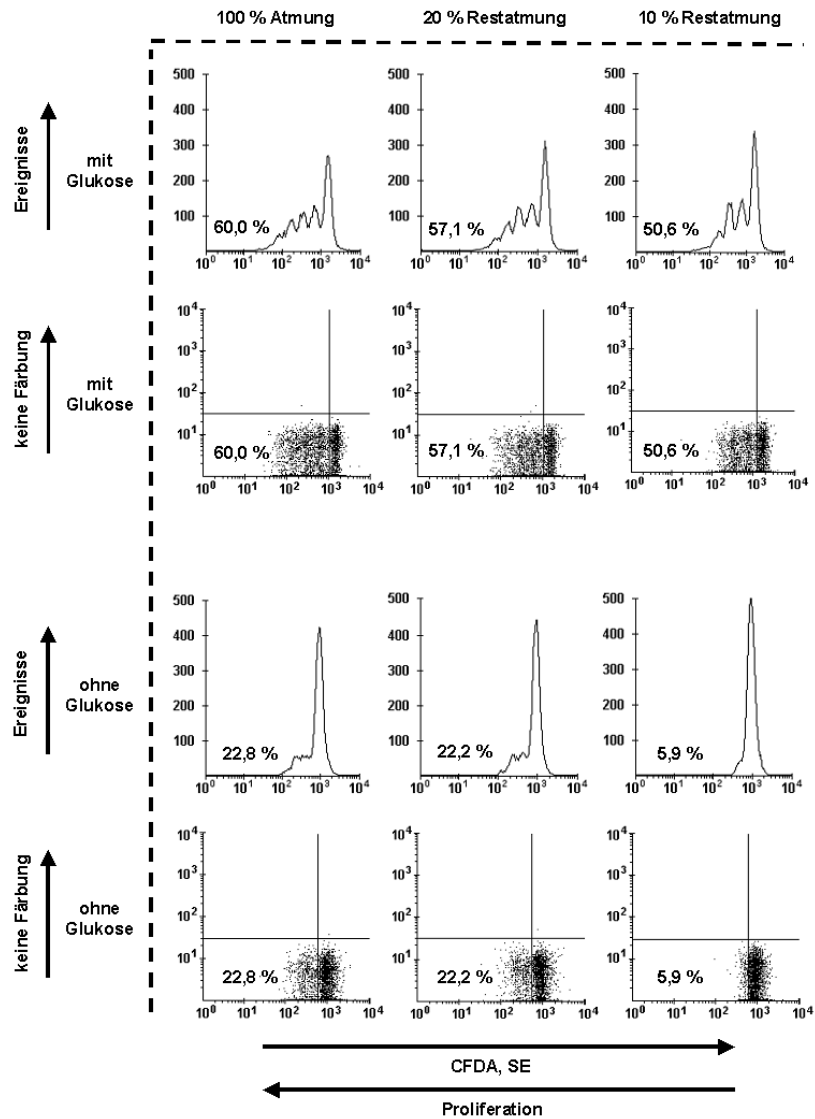
Da für die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein Reinheitsgrad von bis zu 99 % nachgewiesen wurde und Phorbolester wie PMA das CD4-Antigen herunterregulieren (Baran et al. 2001), wurde auf die Gegenfärbung des CD4-Rezeptors verzichtet. Zur Absicherung konnte in eigenen Experimenten die Herunterregulation des CD4-Antigens durch die PMA-Ionomycin-Stimulation bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.4 Proliferation von Myxothiazol-behandelten CD4+ T-Zellen nach spezifischer Stimulation mit *anti-human* CD3- und CD28-Antikörpern

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluß einer stufenweise mittels Myxothiazol gehemmten Zellatmung auf die Proliferation von CD4+ T-Zellen untersucht. Dazu wurden zwei Untersuchungsserien mit je vier bzw. fünf unabhängigen Experimenten durchgeführt. Innerhalb jeder Serie wurden die Zellen jeweils in *Medium C* oder *D* aufgenommen, mit ansteigenden Myxothiazoldosen auf unterschiedliche Stufen bis zur vollständigen Hemmung der Atmung eingestellt und anschließend mit *anti-human* CD3- und CD28-Antikörpern stimuliert. Die gewonnenen Erkenntnisse waren denen der Zytokinuntersuchungen sehr ähnlich. Glukoseentzug verursachte im Vergleich zum korrespondierenden Wert des glukosehaltigen Zellkulturmediums einen statistisch signifikant geringeren Ausgangswert proliferierender Zellen ( $p = 0,014$ ). Erst bei vollständiger Unterdrückung der Atmung und gleichzeitigem Glukoseentzug konnte eine deutliche Verminderung des Anteils proliferierender Zellen erzielt werden. Diese verfehlte aufgrund der Anzahl von vier Experimenten nur knapp die statistische Signifikanz ( $p = 0,068$ ). Die Abbildung 36 zeigt die Mittelwerte der drei wichtigsten untersuchten Stufen des Sauerstoffverbrauchs. Die zweidimensionalen Dot-plot-Darstellungen und Histogramme der Fluoreszenz von mit CFDA, SE markierten CD4+ T-Zellen zeigen beispielhaft die Ergebnisse eines einzelnen Versuchs aus FACS-analytischer Sicht (Abb. 37).



**Abb. 36:** Frequenz proliferierender CD4+ T-Zellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffverbrauch bei Glukoseverfügbarkeit und unter glukosefreien Bedingungen.



**Abb. 37:** Glukoseentzug und vollständig gehemmter zellulärer Sauerstoffverbrauch vermindern sehr deutlich den relativen Anteil von proliferierenden CD4+ T-Zellen.

In FACS-Analysen mit PJ konnte hier ebenfalls ausgeschlossen werden, daß die geringeren Anteile von proliferierenden Zellen in glukosefreiem Medium bei vollständiger Hemmung der Atmung auf einer signifikanten Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen beruhten (Daten nicht gezeigt). Bei Kontrollen mit nicht stimulierten unbehandelten und Myxothiazol-behandelten Zellen konnten in keinem Fall proliferierende oder die Zunahme des Anteils nekrotischer Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

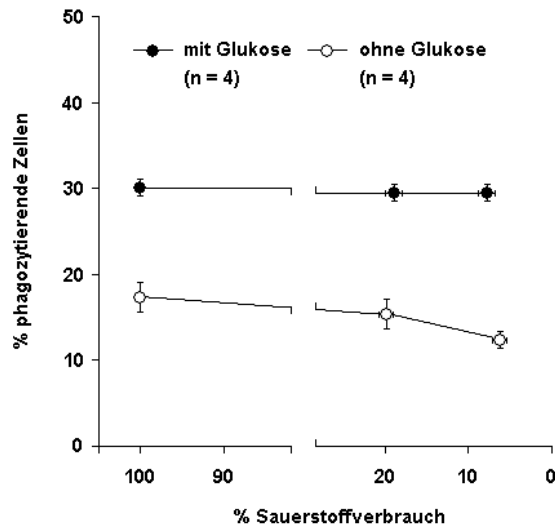
### 3.5 Phagozytose von Myxothiazol-behandelten CD14+ Monozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, daß CD4+ T-Zellen ihre Funktionalität selbst in ausgeprägten Energiemangelsituationen aufrechterhalten können, ohne dabei nekrotisch zu werden, wurde diesbezüglich zum Vergleich eine andere Immunzellart untersucht. T-Zellen sind Zellen, die die adaptative Immunität vermitteln. Ziel der folgenden Experimente war es, die Reaktion einer spezifischen Funktion von Monozyten auf Energiemangel zu prüfen. Monozyten sind Zellen der angeborenen Immunität. Im Ergebnis dieser Untersuchungen sollte das funktionelle Verhalten von Zellen der angeborenen Immunität mit dem von Zellen der adaptativen Immunität bei Energiemangel verglichen werden.

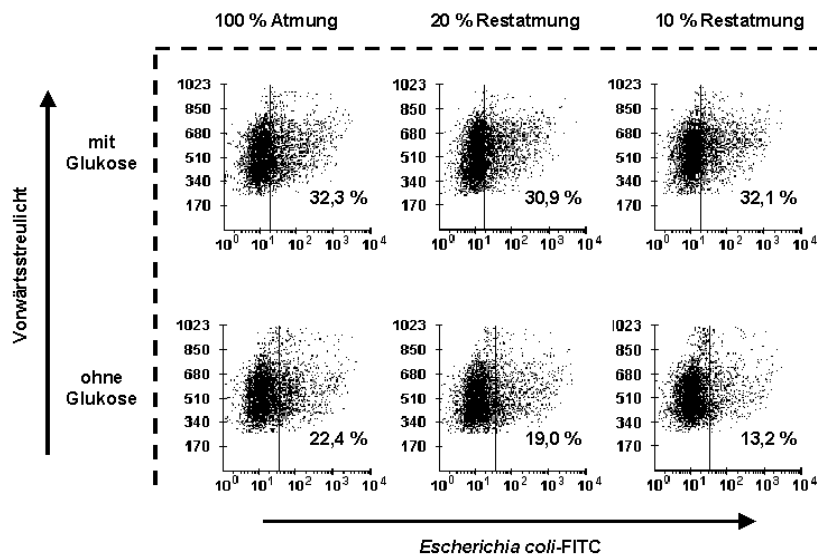
Es wurden wiederum zwei Untersuchungsserien mit je vier unabhängigen Experimenten durchgeführt. Innerhalb jeder Serie wurden CD14+ Monozyten jeweils in *Medium C* oder *D* aufgenommen, mit ansteigenden Myxothiazoldosen auf unterschiedliche Stufen bis zur vollständigen Hemmung der Atmung eingestellt und mit FITC-markierten *Escherichia coli* Bakterien des Phagotest<sup>®</sup>-Kits inkubiert. Auch hier verursachte Glukoseentzug im Vergleich zum korrespondierenden Wert im glukosehaltigen Zellkulturmedium einen statistisch signifikant geringeren Ausgangswert phagozytischer Zellen ( $p = 0,021$ ). Erst bei vollständiger Unterdrückung der Atmung und gleichzeitigem Glukoseentzug konnte eine Verminderung des Anteils phagozytischer Zellen erzielt werden. Die statistische Signifikanz wurde aufgrund von vier Experimenten aber knapp verfehlt ( $p = 0,068$ ). Die Abbildung 38 zeigt die Mittelwerte der drei wichtigsten untersuchten Stufen des Sauerstoffverbrauchs. Die zweidimensionalen Dotplot-Darstellungen der Fluoreszenz von CD14+ Monozyten, die die *Escherichia coli*-FITC-markierten Bakterien inkorporiert haben, zeigen die Ergebnisse aus FACS-analytischer Sicht (Abb. 39). Hierbei sind die Daten eines einzelnen Versuchs beispielhaft abgebildet.

In mitgeführten Kontrollansätzen, die 1 h bei 0 °C inkubiert wurden, konnte in keinem Fall Phagozytoseaktivität gefunden werden (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 38:** Frequenz phagozytierender CD14+ Monozyten in Abhängigkeit vom Sauerstoffverbrauch bei Glukoseverfügbarkeit und unter glukosefreien Bedingungen.



**Abb. 39:** Glukoseentzug und vollständig gehemmter zellulärer Sauerstoffverbrauch vermindern sehr deutlich den relativen Anteil phagozytierender CD14+ Monozyten.

### 3.6 Berechnung des minimalen ATP-Bedarfs für das Überleben und die vollständige Funktionalität von CD4+ T-Zellen

Im folgenden Abschnitt wurde der minimale ATP-Bedarf berechnet, der das Überleben und die

vollständige Funktionalität von CD4+ T-Zellen bei einer PMA-Ionomycin-Stimulation ermöglichte. Dazu wurde zunächst das Integral unter den zeitlichen Verlaufskurven des Sauerstoffverbrauchs gebildet, die in Anwesenheit von PMA, Ionomycin und *submaximaler* Myxothiazoldosis in glukosehaltigem oder -freiem Zellkulturmedium ermittelt wurden (Abb. 21). In Tabelle 5 sind die Daten dargestellt. Anschließend wurde daraus die ATP-Menge berechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die ATP-Synthese dem ATP-Verbrauch entsprach. Weiterhin wurde ein P/O-Quotient von 3 angenommen. Der extramitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde nicht berücksichtigt, weil er keinen Beitrag zur ATP-Synthese leistet. Er wurde mit 10 % veranschlagt (Tab. 13) und vom Gesamtsauerstoffverbrauch abgezogen. In Tabelle 6 sind die berechneten ATP-Werte aufgeführt.

**Tab. 5:** Minimaler Sauerstoffbedarf von  $10^7$  CD4+ T-Zellen für 6 h PMA-Ionomycin-Stimulation

RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
450 nmol	278 nmol

**Tab. 6:** Minimaler ATP-Bedarf aus der OXPHOS von  $10^7$  CD4+ T-Zellen für 6 h PMA-Ionomycin-Stimulation

RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
2,70 $\mu$ mol	1,67 $\mu$ mol

Durch die Bildung der Differenzen konnte der Energieanteil abgeschätzt werden, zu dessen Synthese die Glykolyse beitrug. Die genauen Anteile der OXPHOS und der Glykolyse an der zellulären Energiegewinnung sind jedoch nicht abschätzbar, weil die glykolytische ATP-Gewinnung durch die Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt wird (Pasteur-Effekt). Darüber hinaus kann bei Glukoseverfügbarkeit nicht ermittelt werden, wieviel ATP in der Glykolyse und der Endoxidation aus Glukose entstehen. Trotzdem geben die folgenden Werte eine gute Schätzung wieder:

$$\Delta O_2 = 172 \text{ nmol}/6 \text{ h}/10^7 \text{ Zellen}$$

$$\Delta \text{ATP} = 1,03 \text{ } \mu\text{mol}/6 \text{ h}/10^7 \text{ Zellen}$$

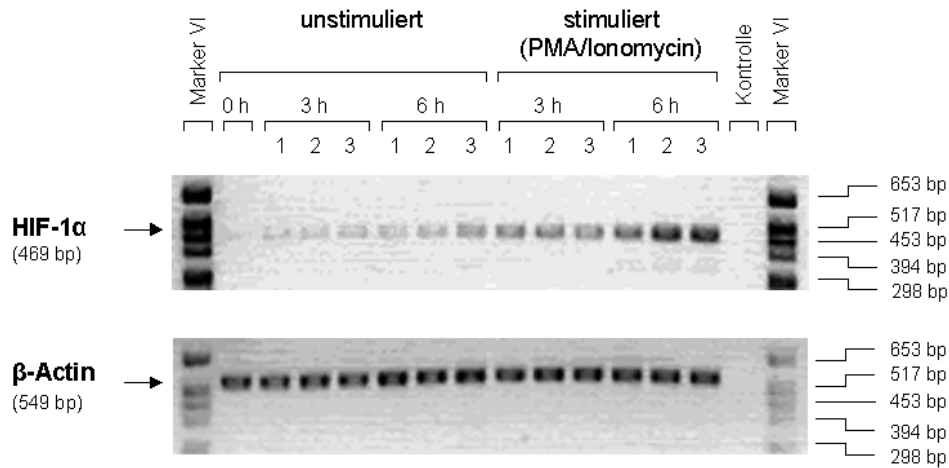
Demzufolge können offenbar funktionsfähig verbliebene, d. h. nicht durch die *submaximale* Myxothiazoldosis gehemmte Mitochondrien ihre Kapazität sehr stark erhöhen, um den Energiebedarf nach PMA-Ionomycin-Stimulation zu decken. Dadurch wird einerseits das Überleben gesichert. Andererseits wird aber nur eine gewisse Restfunktionalität, d. h. ein wenig Zytokinproduktion (Abb. 33-35) und ein wenig Proliferation (Abb. 36, 37) ermöglicht. Im Falle von Glukoseverfügbarkeit ist die Glykolyse offenbar in der Lage, die Energieverluste infolge einer eingeschränkten OXPHOS zu kompensieren. So wird beides gesichert: Überleben und vollständige Funktionalität. Der minimale Sauerstoffbedarf war hier nahezu halbiert.

### **3.7 Beeinflussung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA- und -Proteinexpression bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Myxothiazol und PMA-Ionomycin-Stimulation**

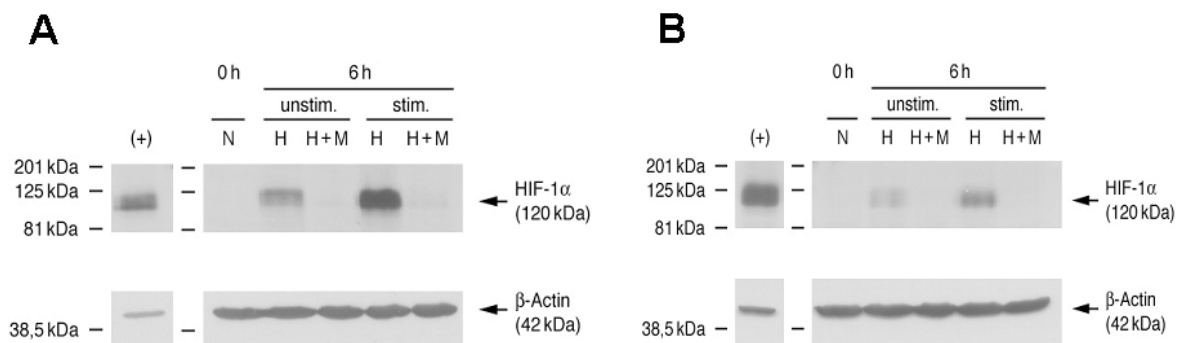
Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde vermutet, daß die sauerstoffabhängige  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 verantwortlich sein könnte für die Aufrechterhaltung der Energiesynthese und somit für das Überleben und die Funktionalität in den PMA-Ionomycin-stimulierten, aber Myxothiazol-gehemmten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Deshalb wurde das aus der Stimulation resultierende Expressionsmuster der  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors in der semiquantitativen PCR und im Western-Blot untersucht.

Wie in der Abbildung 40 zu erkennen, konnte bereits auf mRNA-Ebene in drei unabhängigen Experimenten unter Verwendung von *Medium D* eine Zunahme der Bandenintensität beobachtet werden. Diese korrelierte bei unstimulierten Zellen mit fortschreitender Zeit und höherer Myxothiazoldosis. Selbiges traf für stimulierte Zellen zu. Die Expression der HIF-1 $\alpha$ -mRNA war aber insgesamt höher. Die stärkste Bandenintensität lag bei PMA-Ionomycin-stimulierten Zellen vor, deren Atmung 50%ig oder nahezu vollständig gehemmt wurde. Kontrollen, die zum Zeitpunkt *0 Stunden* lysiert wurden und als normoxisch anzusehen waren, zeigten ebenso wie Kontrollen mit A. dest. keinerlei mRNA-Expression.

In den Western-Blot-Analysen konnte in jeweils drei unabhängigen Experimenten in *Medium C* und *D* gezeigt werden, daß das HIF-1 $\alpha$ -Protein unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut wurde (Abb. 41). Die Hypoxie wurde durch Inkubation der Zellen in geschlossenen Gefäßen erzeugt. Die Bandenintensität war bei stimulierten Zellen und in Anwesenheit von Glukose stärker ausgeprägt. Die Zugabe der *submaximalen* Myxothiazoldosis war verbunden mit einer Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins trotz hypoxischer Bedingungen und unabhängig von der Anwesenheit von Glukose, PMA und Ionomycin. Kontrollen, die zum Zeitpunkt *0 Stunden* lysiert wurden und als normoxisch anzusehen waren, zeigten keinerlei Bandenintensität.



**Abb. 40:** HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expressionsnachweis auf cDNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR. Dargestellt ist beispielhaft das Ergebnis eines einzelnen Versuchs in *Medium D* mit PMA-Ionomycin-stimulierten und unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. 1 = 100 % Atmung, 2 = 50 % Restatmung, 3 = vollständige Atmungshemmung mit der *submaximalen* Myxothiazoldosis, Kontrolle = A. dest.



**Abb. 41:** HIF-1 $\alpha$ -Protein-Expressionsnachweis mittels Western-Blot-Analyse. Es wurden PMA-Ionomycin-stimulierte und unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines Experiments unter Glukoseverfügbarkeit (**A**) und unter glukosefreien Bedingungen (**B**) verwendet. N = Normoxie, H = Hypoxie, M = *submaximale* Myxothiazoldosis, (+) = CoCl<sub>2</sub>-behandelte HeLa-Zell-Positivkontrolle.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vitalität und Funktionalität von PBMC aus Leukozytenfiltern

#### *Durchflußzytometrische Bewertung der PBMC-Präparation*

Wie in durchflußzytometrischen Analysen gezeigt, enthielten die PBMC ca. 70 % Lymphozyten sowie Monozyten und Granulozyten (Abb. 8). In den Arbeiten von Kuhnke (2000), Schmid (2000) und Schmid et al. (2000) wurden mindestens 80 % Lymphozyten gefunden. Der geringere Anteil Lymphozyten könnte Ursache einer starken Interaktion mit Strukturen des Leukozytenfilters sein, so daß die Überdruckspülung während der Zellpräparation nicht zur vollständigen Wiederfindung führte. Es ist aber davon auszugehen, daß die Zusammensetzung weitgehend der bekannten Verteilung im Blut entsprach. So wurden knapp  $\frac{1}{3}$  der PBMC als CD4+ T-Zellen identifiziert (Abb. 8).

#### *Vitalität*

Die PBMC waren auch noch vital, wenn sie über mehrere Stunden in den Leukozytenfiltern verblieben. Bei der maschinellen und Zählkammer-Zellzählung mit Trypanblau zeigte sich ebenso wie bei durchflußzytometrischen Untersuchungen mit PJ, daß bis zu 99 % der Zellen lebensfähig waren. Trotzdem stellte sich heraus, daß keine Erkenntnisse und Erfahrungen über den Sauerstoffverbrauch von aus Leukozytenfiltern gewonnenen PBMC vorlagen. Da der intakte Sauerstoffverbrauch ein zuverlässiger Parameter für die Vitalität und Funktionalität von Immunzellen ist, weil er deren Energiebedarf für sowohl lebenserhaltende als auch spezifische zelluläre Funktionen reflektiert (Buttgereit et al. 2000), wurde mit ihm die unbeeinträchtigte Funktionalität von PBMC aus Leukozytenfiltern nachgewiesen.

#### *Sauerstoffverbrauch von PBMC aus Leukozytenfiltern*

Die Untersuchungsergebnisse sind von den Versuchsbedingungen abhängig. Nach Müller et al. (1986) und Buttgereit et al. (1991, 1992) haben die Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Glukose und Aminosäuren), Substanzen zur Hemmung bakteriellen Wachstums, die Temperatur, die Zeit der Äquilibration mit Luftsauerstoff und die Zugabe von Hemmstoffen einen deutlichen Einfluß. Die Versuchsbedingungen wurden an verschiedenen Zellsystemen getestet und optimiert (Müller et al. 1986, Buttgereit et al. 1991, 1992, Schmid et al. 2000, Wertenaue 2000, Lünemann et al. 2001, Schmid et al. 2001, Kuhnke et al. 2003, Naumann 2004) und in der vorliegenden Untersuchung angewendet. Unter Berücksichtigung der sehr viel

genaueren maschinellen Zellzählung (ermittelter Korrekturfaktor: 1,5) war die Basal- (Tab. 7) und Con A-stimulierte Atmung mit Werten aus früheren Untersuchungen von PBMC aus Buffy coat-Präparationen gesunder Blutspender vergleichbar.

**Tab. 7:** Vergleich des Sauerstoffverbrauchs humaner PBMC

Methode	Temperatur (°C)	Sauerstoffverbrauch	Referenz
Amperometrie	37	2,78 <sup>2</sup>	vorgestellte Arbeit (2004)
Amperometrie	37	5,84 <sup>2</sup>	Naumann (2004)
Amperometrie	37	3,84 <sup>2</sup>	Kuhnke et al. (2003)
Amperometrie	37	6,09 <sup>2</sup>	Schmid et al. (2001)
Amperometrie	37	6,91 <sup>2</sup>	Lünemann et al. (2001)
Amperometrie	37	3,08 <sup>2</sup>	Wertenaue (2000)
Amperometrie	37	7,09 <sup>2</sup>	Schmid et al. (2000)
Lumineszenz	22	2,81 <sup>1</sup> (= 4,68 <sup>2</sup> )	Trübel und Barnikol (1998)
Amperometrie	26	2,19 <sup>1</sup> (= 3,65 <sup>2</sup> )	Bondeson und McCabe (1992)
Amperometrie	37	5 <sup>1</sup> (= 8,33 <sup>2</sup> )	Maddock et al. (1985)
Amperometrie	37	3,52 <sup>1</sup> (= 5,87 <sup>2</sup> )	Kuna et al. (1979)

<sup>1</sup>mmol O<sub>2</sub>/10<sup>11</sup> Zellen/h  
<sup>2</sup>nmol O<sub>2</sub>/10<sup>7</sup> Zellen/min

Mögliche Abweichungen können dadurch entstehen, daß Clark-Elektroden selbst Sauerstoff verbrauchen (Gleichmann und Lübbers 1960) und Zellen durch Rühreffekte während der Sauerstoffverbrauchsmessung zerstört werden (Trübel und Barnikol 1998). Bei durchflußzytometrischen Kontrollen mit PJ konnte aber keine signifikante Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen beobachtet werden. Wichtig zu erwähnen ist auch der metabolische Verdrängungseffekt, der für kultivierte Lymphozyten beschrieben wurde (Hedeskov und Esmann 1966, Talstad 1972, Sand et al. 1977, Trübel und Barnikol 1998). Er führt in Abhängigkeit von der Zellkonzentration zu ganz unterschiedlichen Werten für den Sauerstoffverbrauch, weil mit steigender Zellkonzentration die spezifische zelluläre Sauerstoffaufnahme exponentiell sinkt (Trübel und Barnikol 1998). Sand et al. (1977) konnten ausschließen, daß dafür Nährstoffdepletion, pH-Wert-Veränderungen, Ansammlung von Laktat, Schädigung der Zellen durch die Verdünnung oder Gasdiffusion ursächlich sind. Sie vermuteten die Abgabe humoraler Faktoren. Die vorliegende Arbeit sowie alle ab dem Jahr 2000 (Tab. 7) sind im selben Untersuchungslabor entstanden, so daß die Zellzahlen und alle anderen

Bedingungen weitgehend normiert waren. Außerdem war in Übereinstimmung mit den Daten von Schmid (2000) mit steigender Zellzahl ein proportionaler Anstieg des zellulären Sauerstoffverbrauchs verbunden (Tab. 3). Es wird aber der Vergleich mit den anderen Literaturstellen erschwert. Dort wurden zwar die gleichen Techniken verwendet, jedoch die eingesetzten Zellkonzentrationen nicht angegeben (Kuna et al. 1979, Bondeson und McCabe 1992) oder die Messungen bei niedrigeren Zellkonzentrationen durchgeführt (Maddock et al. 1985). Die Kontaktzeit mit Ficoll® könnte darüber hinaus beachtlichen Einfluß auf die Vitalität der Zellen gehabt haben (Trübel und Barnikol 1998). Daneben wirken sich Zentrifugation und lange Standzeiten ungünstig aus (Crowley et al. 1975). Zuletzt ist zu berücksichtigen, daß in manchen Arbeiten bei geringeren Temperaturen (Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel), in anderen Zellkulturmedien und mit anderen Methoden gemessen wurde (s. Tab. 7).

#### *Crabtree-Effekt: Unterdrückung des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart von Glukose*

Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums hatte bis auf die Glukosekonzentration keinen Einfluß auf die Basalatmung der Zellen (Abb. 12). Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Stimulierbarkeit mit Con A in Abwesenheit von Glukose (Abb. 12, 13, 15) ist auf den erstmals von Crabtree (1929) an Tumorzellen beobachteten Crabtree-Effekt zurückzuführen. Ohne zugesetztes äußeres Stoffwechselsubstrat war die Atmung der Tumorzellen höher als in Gegenwart von Glukose, weil die Energiegewinnung über die aerobe Glykolyse ausfiel. Der Effekt läßt sich bei allen Zellen nachweisen, die aerobe Glykolyse betreiben (Rapoport 1987). Er wurde auch für Immunzellen beschrieben (Bielka 1963, Seitz 1965, Kirschner et al. 1972, Guppy et al. 1993), konnte aber in seiner Funktion bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden (Thierie 2004). Demnach könnten PBMC den Energieverlust, den sie in Abwesenheit von Glukose durch den Ausfall der ATP-Synthese über die Glykolyse erleiden, durch eine verstärkte Energiegewinnung über die sauerstoffverbrauchende Oxidation anderer energieliefernder Substrate kompensieren.

#### *Sauerstoffverbrauch von PBMC aus Vollblut*

Der Sauerstoffverbrauch von frisch aus Vollblut präparierten PBMC lag deutlich über dem der PBMC aus Leukozytenfiltern (vgl. Abb. 12-14). Eine Ursache könnte die veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren durch die Leukozytenapherese sein (Apherese-Standard der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie e.V.). Der prozentuale Anstieg des Sauerstoffverbrauchs infolge Con A war aber vergleichbar mit dem der PBMC aus

Leukozytenfiltern (vgl. Abb. 13, 14). Es könnten auch verschiedene Thrombozytenzahlen aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen der Präparation entscheidend gewesen sein. Bei den Leukozytenfilterpräparationen fielen diese wahrscheinlich geringer aus, weil sich die Blutplättchen fest an die Filterstrukturen anlagerten. Obwohl kleiner und absolut sehr viel weniger Sauerstoff verbrauchend als der durchschnittliche Lymphozyt, ist der relative Sauerstoffverbrauch pro Blutvolumeneinheit aufgrund der höheren Anzahl größer (Wagner et al. 1956). Deswegen sind Thrombozyten eine erhebliche Quelle von Unklarheiten bei Messungen der Atmung von Leukozyten.

#### *Einfluß der magnetisch aktivierten Zellsortierung auf den Sauerstoffverbrauch*

Anfangs dauerte die Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung insgesamt ca. 5 h. Der Sauerstoffverbrauch von über diesen Zeitraum aufbewahrten PBMC war geringer als unmittelbar nach Präparation (vgl. Abb. 12, 15). Demzufolge konnte Con A nicht mehr so stark, aber dennoch deutlich wirken (vgl. Abb. 13, 15). Das Absinken der Basal- und Con A-Atmung fiel in glukosehaltigem Medium geringer aus (vgl. Abb. 12, 15). Die Schritte für die magnetisch aktivierte Zellisolierung wurden deshalb so optimiert, daß die Zeitdauer deutlich reduziert war.

In Übereinstimmung mit Daten von Miltenyi et al. (1990) wurde ausgeschlossen, daß die Zellen durch MicroBeads<sup>TM</sup> voraktiviert oder beeinträchtigt waren. Auch die Hindurchleitung durch den vollautomatischen Separator hatte keine Auswirkungen. Demnach verursachten MicroBeads<sup>TM</sup> keinen Effekt auf die ruhende und Con A-stimulierte Zellatmung (Abb. 16). PBMC, die durch den vollautomatischen Separator hindurchgeleitet wurden (Negativfraktion), zeigten eine normale Ruhe- und Con A-Atmung (vgl. Abb. 12, 17).

Es ist zusammenfassend davon auszugehen, daß PBMC in ihrer zellulären Vitalität und Funktionalität nicht wesentlich beeinflußt werden, wenn sie über einen gewissen Zeitraum in Leukozytenfiltern aufbewahrt und in einer magnetisch aktivierten Zellsortierung weiterverarbeitet werden.

## **4.2 Sauerstoffverbrauchsmessungen bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

### **4.2.1 Sauerstoffverbrauch von ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

#### *Einfluß der Sauerstoffsättigung des Zellkulturediums*

In den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals der Sauerstoffverbrauch von isolierten



CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Im glukosehaltigen Zellkulturmedium ging der kontinuierlich gemessene Sauerstoffverbrauch bis zur 10%igen Sättigung des Mediums mit Sauerstoff um 38,1 % zurück, im glukosefreien um 47,6 % (Abb. 18). Die dafür notwendigen Messungen dauerten 2-3 h. Bei allen anderen durchgeführten Sauerstoffverbrauchsmessungen handelte es sich jedoch um Kurzzeitmessungen (ca. 10 min). Diese sind üblicherweise dann abgeschlossen gewesen, wenn nur 20-30 % des Sauerstoffs im Medium veratmet waren, die Sauerstoffsättigung sich also auf einem Niveau von 70-80 % befand. Demzufolge konnte eine weitgehende Unabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der Sauerstoffkonzentration des Mediums festgestellt werden. Die beobachtete Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beeinträchtigte daher nicht die Meßergebnisse. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs mit sinkender Sauerstoffkonzentration nicht mit einem Verlust der Zellatmungsfunktion einherging. Nach vollständiger Extraktion des Sauerstoffs aus dem Medium und anschließender Wiederbelüftung wurde der gleiche Wert beobachtet wie zu Beginn des Experiments (Abb. 18). Die von Schmid (2000) gefundenen Daten für PBMC wiesen eine stärkere, aber auch nicht vollständige Unabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Sauerstoffkonzentration auf. Möglicherweise gibt es zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen ungleiche Empfindlichkeiten, so daß in Schmid's Arbeit (2000) mit PBMC der offenbar bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen auftretende Effekt überdeckt wurde.

#### *Einfluß der Zellkonzentration*

Eine ansteigende Zellkonzentration war ebenso wie bei den PBMC (Tab. 3) mit einem proportionalen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs verbunden (Tab. 4). Der Nachweis erfolgte durch die Verwendung von Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen in verschiedenen Zellkulturmedien. Der metabolische Verdrängungseffekt (s. Pkt 4.1) kam nicht zum Tragen, weil die Messungen zügig abgeschlossen und die Zellen nicht verdünnt wurden.

#### *Gesamtsauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen*

Wie Tabelle 8 zeigt, war der mittlere Sauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen geringer als der von PBMC und CD14<sup>+</sup> Monozyten. Vergleichend gegenübergestellt wurden nur die Werte aus RPMI 1640 ± Glukose, weil in diesen Medien auch alle spezifischen Funktionen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten gemessen wurden. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in glukosefreiem Medium ist auch auf den Crabtree-Effekt zurückzuführen. Der Sauerstoffverbrauch der Monozyten leistet offensichtlich einen bedeutenden Beitrag zur

Gesamtatmung der PBMC. Schon Weening et al. (1974) vermuteten hinter der Variabilität der Atmung von Leukozyten Differenzen in der Zellkomposition der Präparationen. Der starke monozytäre Sauerstoffverbrauch erklärt aber die höhere Basalatmung der PBMC nicht vollständig. Granulozyten sind auch immer Bestandteil von PBMC-Präparationen, die mit der Ficoll®-Methodik durchgeführt wurden (Weening et al. 1974, Sagone et al. 1976, Trübel und Barnikol 1998, Kuhnke 2000). Nach Reiss und Roos (1978) verbrauchen Granulozyten deutlich mehr Sauerstoff als Monozyten. Der Zymosan-stimulierte Sauerstoffverbrauch der Monozyten betrug dort nur  $39 \pm 6 \%$  von dem der Granulozyten. Der Mehrgehalt an Mitochondrien ist die wahrscheinlichste Ursache für die stärkere Monozytenatmung (s. Pkt. 4.4).

**Tab. 8:** Vergleich des Sauerstoffverbrauchs verschiedener ruhender Immunzellpopulationen (nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen)

	RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
PBMC	2,81	2,39
CD4+ T-Zellen	2,34	2,18
CD14+ Monozyten	6,05	4,55

#### 4.2.2 Sauerstoffverbrauch von Con A-stimulierten CD4+ T-Zellen

Um die Stimulationsfähigkeit des Sauerstoffverbrauchs von isolierten CD4+ T-Zellen grundsätzlich zu prüfen, wurden aufgrund der Erfahrungen mit PBMC zunächst Experimente mit Con A durchgeführt. Dabei war in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur (Abbas et al. 1996) in einigen Experimenten keine und im Mittel aller durchgeführten Experimente nur eine im Vergleich zu den PBMC deutlich geringere Reaktion auf die Zugabe des Lektins zu verzeichnen (vgl. Abb. 13, 20). Dies steht scheinbar im Widerspruch mit der Tatsache, daß Con A den Sauerstoffverbrauch von Lymphozyten stimuliert (Lakin-Thomas und Brand 1988, Buttgerit et al. 1992, Buttgerit et al. 1993, Guppy et al. 1993, Krauss et al. 1999). Der Grund für die deutlich geringere Reaktion der isolierten CD4+ T-Zellen auf Con A liegt darin, daß bei einer Kreuzvernetzung der TCR-Komplexe durch Lektine zusätzliche Signale von akzessorischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten für eine vollständige Aktivierung benötigt werden. Akzessorische Zellen ergänzen die TCR-vermittelten Signale zu einer vollständigen Antwort mit Hilfe ihrer costimulatorischen Moleküle, die sie bei der Bindung an die Rezeptoren von T-Zellen aufweisen (Abbas et al. 1996). In den vorliegenden Untersuchungen konnte die Con A-Stimulation jedoch nicht

verstärkt werden, wenn PBMC aus der Negativfraktion der magnetisch aktivierten Zelltrennung hinzugegeben wurden (Abb. 20). Dies lag unter Umständen an dem gewählten Verhältnis von 1:7 zwischen PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Hedfors et al. 1975, Hem 1979). Der Fokus dieser Arbeit war aber nicht auf die Ermittlung eines optimalen Verhältnisses zu richten.

In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob möglicherweise andere hochgereinigte Immunzellpopulationen wie Neutrophile oder Monozyten stärker auf Con A reagieren als CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dadurch könnte ebenfalls die stärkere Reaktion von PBMC auf Con A gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen erklärt werden. Für Neutrophile wurde berichtet, daß der Sauerstoffverbrauch im Mittel um 61 % höher war als der von Monozyten desselben Spenders, wenn die Zellen mit Zymosan stimuliert wurden (Reiss und Roos 1978). Weiterhin wurde für Neutrophile eine Con A-induzierte Aktivierung der Zellmembran-ständigen NADPH-Oxidase beschrieben (Lu und Grinstein 1989, Rossi et al. 1989). Das Enzym bildet unter starkem Sauerstoffverbrauch Superoxidradikale, die sehr schnell in Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale umgewandelt werden. Diese Stoffe weisen im Rahmen der Phagozytose eine bakterizide und fungizide Wirkung auf. Der sauerstoffabhängige Mechanismus wird als *Respiratorischer Burst* bezeichnet. Monozyten sind ebenfalls mit Con A stimulierbar (Romeo et al. 1973, Petty und Ware 1979, Matsuo et al. 1996).

### **4.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen bei CD14<sup>+</sup> Monozyten**

Der Sauerstoffverbrauch von nahezu 100%ig angereicherten CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde ebenso wie der von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Erkenntnisse über den Einfluß der Sauerstoffsättigung des Zellkulturmediums, der Zellkonzentration und der Inkubation in unterschiedlichen Zellkulturmedien, die bei den PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen gewonnen wurden, sind auf die CD14<sup>+</sup> Monozyten übertragen worden.

Der höhere Sauerstoffverbrauch in glukosefreiem Medium (Abb. 29, Tab. 8) ist ebenso wie bei den PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf den Crabtree-Effekt zurückzuführen. In der Arbeit von Reiss und Roos (1978) wurde schon der monozytäre Sauerstoffverbrauch mit einer Clark-Elektrode untersucht. Die Zellen waren aber nur zu 82 % angereichert. Der Rest bestand aus Granulozyten (3 %) und Lymphozyten (15 %). Der gefundene Wert war mit 1 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen deutlich geringer als die in der vorgestellten Arbeit gefundenen. An dieser Stelle wird aber auf den Punkt 4.1 hingewiesen. Die dort diskutierten Punkte zum Vergleich von Werten unterschiedlicher Arbeiten sind hier ebenso gültig. Weiterhin werden die Auswirkungen verschiedener Präparationstechniken kontrovers diskutiert (Glasser und Fiederlein 1990, Zhao

et al. 2003). Diese können offenbar zu Veränderungen in der Funktionalität von Immunzellen führen. So führte bei der Arbeit von Zhao et al. (2003) die Ficoll<sup>®</sup>-Präparationstechnik bei polymorphkernigen Zellen zu einem signifikant höheren *Respiratorischen Burst* als in unfraktioniertem Vollblut. Es gibt Informationen über Veränderungen im Expressionsprofil der mRNA von Monozyten, die durch die Ficoll<sup>®</sup>-Präparationstechnik gewonnen wurden (Grützkau 2003). Reiss und Roos (1978) konnten aber keine Aktivierung des Sauerstoffverbrauchs der Monozyten feststellen, die dort durch Glasadhäsions-Präparationstechnik gewonnen wurden. Der Wert von 4,83 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen, der von Chvapil et al. (1977) für Peritonealmakrophagen von Ratten gefunden wurde, kommt denen in der vorgestellten Arbeit sehr nahe. Er wurde aber in einem anderen Zellkulturmedium ermittelt.

#### **4.4 Titration des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol bei CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten**

Um in späteren Experimenten zur Quantifizierung von spezifischen Funktionen von CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten gezielt und schrittweise die Energiesynthese über die OXPHOS zu vermindern, wurde der Sauerstoffverbrauch mit Myxothiazol titriert. Monozyten zeigten eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Myxothiazol als CD4+ T-Zellen (vgl. Abb. 24, 25, 30, 31). Ihre Atmung war erst bei einer Konzentration von 40 pmol Myxothiazol/10<sup>7</sup> Zellen vollständig gehemmt. Bei den CD4+ T-Zellen waren nur 22 pmol/10<sup>7</sup> Zellen notwendig gewesen. Die Tabelle 11 zeigt die Myxothiazoldosen für eine 50%ige Hemmung der Atmung beider Zellarten im Vergleich. Sie wurden wegen der größeren Genauigkeit nicht durch Ablesung, sondern anhand der Funktionen der vier Titrationskurven ermittelt (Tab. 9, 10). Hierbei kam die geringere Empfindlichkeit der CD14+ Monozyten gegenüber dem Atmungskettenhemmstoff ebenfalls zum Ausdruck. Die wahrscheinlichste Ursache für diese Beobachtung liegt darin, daß Monozyten mehr Mitochondrien und damit mehr zu hemmende Komplexe III enthalten als CD4+ T-Zellen. Der Mitochondriengehalt limitiert den maximal möglichen Sauerstoffverbrauch durch die OXPHOS. Monozyten atmen deutlich stärker als CD4+ T-Zellen (Tab. 8). Darüber hinaus besitzen Monozyten deutlich mehr Raum für Mitochondrien. Sie sind größer und haben ein kleineres Kern-Zytoplasma-Verhältnis als Lymphozyten. Die CD14+ Monozyten zeigten in der zweidimensionalen Darstellung des Vorwärts-Seitwärts-Streulichts im Durchflußzytometer deutlich mehr Granula als CD4+ T-Zellen (vgl. Abb. 8, 11). Von Herrn Dr. med. H. Jastrow, Anatomisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, freundlicherweise zur Verfügung gestellte,

elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lymphozyten und Monozyten lassen auch auf eine höhere Anzahl von Mitochondrien in Monozyten schließen. In der Literatur liegen erstaunlicherweise kaum Untersuchungen vor (Tab. 12). In weiteren Analysen wird daher genauer zu klären sein, warum periphere CD14+ Monozyten deutlich stärker atmen als CD4+ T-Zellen und sich unempfindlicher gegenüber Myxothiazol zeigen.

**Tab. 9:** Nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelte Funktionen für die Myxothiazol-Titrationskurven der CD4+ T-Zellen

RPMI 1640 ohne Glukose	$f(x) = 0,0013x^4 - 0,0854x^3 + 2,0637x^2 - 22,057x + 100$
RPMI 1640 mit Glukose	$f(x) = -0,021x^3 + 1,0475x^2 - 16,905x + 100$

**Tab. 10:** Nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelte Funktionen für die Myxothiazol-Titrationskurven der CD14+ Monozyten

RPMI 1640 ohne Glukose	$f(x) = -0,0019x^3 + 0,2112x^2 - 7,7185x + 100$
RPMI 1640 mit Glukose	$f(x) = -0,0019x^3 + 0,2041x^2 - 7,372x + 100$

**Tab. 11:** Myxothiazoldosis für eine 50%ige Hemmung der Atmung (pmol Myxothiazol/10<sup>7</sup> Zellen)

	RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
CD4+ T-Zellen	3,02	3,77
CD14+ Monozyten	8,17	8,71

**Tab. 12:** Anzahl Mitochondrien pro Zelle

Zellart	Spezies	Mittlere Anzahl	Referenz
Lymphozyt (Blut)	Mensch	29	Kirschner et al. 1972
Lymphoblast (Lymphknoten)	Mensch	9,3	Schumacher et al. 1973
T-Lymphozyt (Blut)	Mensch	3,18	Nagy et al. 2004
Makrophage (Peritoneum)	Ratte	139,6	Mayhew und Williams 1974

Das Vorhandensein von Glukose sorgte für eine stärkere Unempfindlichkeit beider Zellarten gegenüber Myxothiazol (Tab. 11). Außerdem war die extramitochondriale Atmung, die nicht Myxothiazol-hemmbar ist, höher (Tab. 13). Eine mögliche Erklärung dafür liegt darin, daß sich durch Glykolysierung Zuckerreste unter Abspaltung von Wasser an organische Verbindungen wie Proteine und Lipide anlagern. Nach Takamiya et al. (2003) setzt die glykolysierte Form der Superoxiddismutase (SOD) mehr Substrat in Form von Superoxidradikalen um. Diese Radikale müssen aufgrund der Aufrechterhaltung des chemischen Gleichgewichts durch verstärkte Atmung wieder nachgeliefert werden. Demgegenüber sorgt das Fehlen von Glukose für eine gesteigerte SOD-mRNA-Expression in CD4+ T-Zellen (Dziurla 2004). Das Enzym wird also über die Glukosekonzentration reguliert. Die Aktivität wird durch Glykolysierung und die Konzentration bei Glukosemangel durch Transkriptionssteigerung erhöht. Die SOD ist neben der aktivierten NADPH-Oxidase ein bedeutender extramitochondrialer Sauerstoffverbraucher.

An Rattenthymozyten wurde mit maximal 2 % eine vergleichsweise geringe extramitochondriale Atmung ermittelt (Lakin-Thomas und Brand 1988). Roos und Loos (1970, 1972) fanden bei Lymphozyten mit KCN 10-15 % extramitochondriale Atmung. An PBMC konnten Schmid et al. (2000) einen Anteil von weniger als 5 % ermitteln. In den vorliegenden Untersuchungen sind folgende Werte durch Mittelwertbildung des relativen Sauerstoffverbrauchs der letzten drei Punkte auf der Titrationskurve (vgl. Abb. 24, 25, 30, 31) ermittelt worden:

**Tab. 13:** Relativer Anteil der extramitochondrialen Atmung an der zellulären Gesamtatmung

	RPMI 1640 ohne Glukose	RPMI 1640 mit Glukose
CD4+ T-Zellen	10,5 %	12,1 %
CD14+ Monozyten	6,6 %	10,9 %

Die Angaben der Tabelle 13 stimmten überein mit den Angaben von Roos und Loos (1970, 1972). Sie waren nahe der von Lakin-Thomas und Brand (1988) und Schmid et al. (2000). Die extramitochondriale Atmung aller Körperzellen beläuft sich im Mittel auf etwa 10 % (Rolfe und Brown 1997). Es fiel auf, daß die CD4+ T-Zellen unabhängig von der Glukosekonzentration eine höhere extramitochondriale Atmung hatten. Demnach wird in Monozyten weitaus mehr Sauerstoff in der OXPHOS metabolisiert als in CD4+ T-Zellen. Nach Reiss und Roos (1978) werden bei Monozyten ca. 70 % des Sauerstoffs in der OXPHOS metabolisiert. Die Zellatmung wurde dort mit Antimycin A titriert. Die Titrationskurve näherte sich ebenso wie in der

vorliegenden Arbeit (Abb. 30, 31) und der Arbeit von Buttgerit und Brand (1995) asymptotisch der maximal möglichen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs. Buttgerit und Brand (1995) fanden ebenfalls mittels Myxothiazol heraus, daß auch in Rattenthymozyten ca. 70 % des Sauerstoffs in der OXPHOS metabolisiert werden.

#### **4.5 Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die PMA-Ionomycin-induzierte Zytokinsynthese bei CD4+ T-Zellen**

##### **4.5.1 Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten**

Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten verlangt die gleichzeitige Stimulation sowohl des T-Zell-Rezeptors (TCR) als auch verschiedener Corezeptoren. Dadurch werden Proteintyrosinkinasen aktiviert, die wiederum eine Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  bewirken. Im Ergebnis wird das Plasmamembranlipid *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat* in zwei sekundäre Botenstoffe, Inositol-1,4,5-Triphosphat und 1,2-Diacylglycerol, aufgespalten (Berridge 1993). Ersterer führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch Freisetzung von Kalzium aus zellulären Speichern, letzterer aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Truneh et al. 1985). Auf diese Art wird eine Abfolge von Signaltransduktionswegen eingeleitet, die zu Zellexpansion und Immunkompetenz führen (Altman et al. 1990). Da unstimulierte periphere T-Lymphozyten spontan kaum oder keine Zytokine synthetisieren (Baran et al. 2001), war eine *in vitro* Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin erforderlich. Dadurch wurde die Aktivierung der Zellen simuliert, die beispielsweise in Entzündungsgebieten stattfindet. Die zelluläre Mikroumgebung in solchen Gebieten mit verminderten Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen wurde durch die verminderte Sauerstoffverwertung infolge Myxothiazolhinzugabe und den Entzug von Glukose nachgeahmt. Die kombinierte Gabe von PMA und Ionomycin überbrückt die Notwendigkeit der Oberflächenrezeptor-Interaktion auf T-Zellen, weil sie direkt die PKC- und Kalzium-Signalfade aktiviert (Truneh et al. 1985, Kumagai et al. 1987, Altman et al. 1992). Ionomycin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor und sorgt deshalb für einen Kalziumeinstrom in die Zellen. PMA ist strukturell verwandt mit 1,2-Diacylglycerol und aktiviert daher die PKC. Die Aktivierung der T-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit also dadurch eingeleitet, daß PMA und Ionomycin die Wirkungen der Inositol-Phospholipid-abgeleiteten sekundären Botenstoffe imitierten, deren Freisetzung normalerweise durch eine TCR-CD3-Komplex-Aktivierung erfolgt (Altman et al. 1992).

#### **4.5.2 Wirkungen von Cofaktor- und Vitaminentzug**

Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums hinsichtlich der Konzentration von Vitaminen und anderen Cofaktoren hatte erheblichen Einfluß auf die Höhe der Zytokinsynthese. Das konnte bei den Untersuchungen zur Etablierung eines Systems festgestellt werden, das zu einer hohen Frequenz von Zytokin-produzierenden Zellen führte (s. Pkt. 3.3). In den Medien *C* und *D* konnten signifikant mehr Zytokinproduzenten beobachtet werden, als in den Medien *A* und *B* (Abb. 32). Das ist vor allem auf eine verminderte ATP-Synthesekapazität in der OXPHOS infolge des Nichtvorhandenseins von dafür essentiellen Vitaminen und anderen Cofaktoren in den Medien *A* und *B* zurückzuführen. Durch eine Behandlung mit Cofaktoren konnten Marriage et al. (2004) über die Ernährung eine Verbesserung der mitochondrialen ATP-Synthese in Lymphozyten bei Patienten mit Störungen in der OXPHOS bewirken. Bei Kontrolllymphozyten gesunder Spender führte aber nur die Komponente *Coenzym Q<sub>10</sub>* bei der kombinierten Cofaktorbehandlung zu einer gesteigerten ATP-Synthese. Dennoch sind in den Medien *C* und *D* ein Großteil der Vitamine vorhanden gewesen, die auch in der Cofaktorbehandlung von Marriage et al. (2004) zu finden waren. Allein durch die Zugabe von FCS (= Unterschied zwischen Medium *A* und *B*) war eine Zunahme der Zytokinproduzenten zu beobachten. In FCS sind eine Vielzahl von essentiellen Mikronährstoffen und Wachstumsfaktoren enthalten. Es bietet der Zelle die gewohnte Umgebung. Die Zunahme der Zytokinproduzenten konnte durch die Zugabe von Vitaminen (= Unterschied zwischen Medium *B* und *C*) noch erheblich gesteigert werden. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit den Berichten von Erickson et al. (2000), Calder und Kew (2002), Keusch (2003) und Marriage et al. (2004) weitere Anhaltspunkte für den nutritiven Einfluß auf die Funktion von Zellen des Immunsystems gefunden. Nach Meinung der Autoren läßt sich der nutritive Einfluß auf das gesamte Immunsystem und die mitochondriale Energiegewinnung ausdehnen. So führte der Entzug von Wachstumsfaktoren zu einer verminderten Aktivität der OXPHOS bei T-Zellen, weil das mitochondriale Membranpotential und damit der Sauerstoffverbrauch abnahmen (Thompson et al. 1999).

#### **4.5.3 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen**

In der vorgestellten Untersuchung konnte erfolgreich ein Modell entwickelt werden, daß die Situation in einem Entzündungsgebiet vereinfacht nachstellte. Das Modell bestand aus vier Faktoren: Es wurden (1) wichtige Immunzellfraktionen untersucht, die in Entzündungsgebiete



einwandern, (2) Sauerstoffmangel mit Myxothiazol nachgeahmt, (3) Glukose als wichtigstes nutritives Substrat entzogen und (4) die Zellen aktiviert. Somit konnte die Situation in Gebieten mit geringen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen (s. Einleitung) standardisiert *in vitro* angewendet werden. Im Ergebnis wurden mit den Daten zum ersten Mal die Energieanforderungen für das Überleben und spezifische Immunfunktionen von humanen peripheren CD4+ T-Zellen quantifiziert (s. Pkt. 3.6 u. *Hypothese 1* in Pkt. 4.10).

Zur Nachahmung von Sauerstoffmangel mit Myxothiazol ist zu bemerken, daß die Methode der Deoxygenierung mit N<sub>2</sub> zur Disposition stand. In Übereinstimmung mit Rabinowitz et al. (1968) kamen aber erhebliche Zweifel an ihrer Effektivität auf. Es ist sehr kompliziert, Flüssigkeiten vollständig von Sauerstoff zu befreien und diese Situation anschließend aufrechtzuerhalten. Durch die Verwendung eines spezifischen Hemmstoffs der OXPHOS wie Myxothiazol kann intrazellulär der Sauerstoffverbrauch stufenweise bis zur Vollständigkeit unterdrückt werden (s. Abb. 24, 25, 30, 31). Das ist mit der Methode der Deoxygenierung nur sehr schwierig, wenn überhaupt zu erreichen. Die Wirkung von Myxothiazol ist außerdem mit der Situation einer schweren Sepsis zu vergleichen. Hier wird eine erworbene intrinsische Störung der Fähigkeit von Zellen diskutiert, Sauerstoff zu verbrauchen und ATP trotz normaler Sauerstoffkonzentrationen (zytopathische Hypoxie) zu synthetisieren (Crouser et al. 2002, Fink 2002, Gellerich et al. 2002, Brealey et al. 2004).

Zunächst lassen sich die gefundenen Daten so interpretieren, daß die Energieanforderungen für die Zytokinsynthese entweder durch glykolytische oder durch oxidative Energiegewinnung austauschbar gesichert werden können (Abb. 33-35). Der separate Entzug von Glukose hatte ebensowenig Auswirkungen wie die separate vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs. Erst die simultane und vollständige Hemmung sowohl der Atmung als auch der Glykolyse mündete in einer dramatischen Reduzierung der Zytokinsynthese. Diese Beobachtungen passen zu Beobachtungen von MacDonald und Koch (1977) an T-Zellen. Dort war die T-Zell-vermittelte Zytolyse erst bei vollständiger und gleichzeitiger Hemmung von Atmung und Glykolyse vermindert. In der Arbeit von Zuckerberg et al. (1994) wurde mit ansteigender Hypoxie eine dramatische Reduzierung der IL-2-mRNA von PMA-Ionomycin-stimulierten T-Zellen beobachtet. Caldwell et al. (2001) fanden, daß sich reduzierte Sauerstoffkonzentrationen beeinträchtigend auf die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen und die Zytokinsynthese auswirkten. Nach McLaughlin et al. (1996) verhinderten reduzierte Sauerstoffkonzentrationen den TCR-induzierten Zelltod und die Induktion eines wichtigen Regulatorgens in unreifen T-

Zellen des Thymus. Demzufolge werden also Überleben und Differenzierung von T-Zellen durch die umgebende Sauerstoffkonzentration beeinflusst.

Dennoch überrascht die große Adaptationsfähigkeit der Zellen an Energiemangel. Dies beweist zwar, daß CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter widrigsten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Entzündungsgebieten herrschen, überleben und ihre Funktionen ausüben können. Da aber in Kurzzeitexperimenten mit der Clark-Elektrode ca. zwei Drittel des Sauerstoffverbrauchs von Con A-stimulierten Lymphozyten (Schmid et al. 2000) und vier Fünftel des Sauerstoffverbrauchs von Con A-stimulierten Rattenthymozyten (Buttgereit und Brand 1995) spezifischen Prozessen wie der Proteinbiosynthese mit jeweils 15 und 21, der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mit jeweils 15 und 10, der Ca<sup>2+</sup>-ATPase mit jeweils 15 und 10 und der RNA/DNA-Synthese mit jeweils 8 und 15 % zugeordnet werden konnten, dürfen die vorliegenden Daten diesen zur Seite gestellt werden. Es wird vermutet, daß viel mehr Energie als bisher angenommen in sog. *futile cycles*, also sinnlosen Prozessen oder ineffizient zur Sicherung verschiedener Funktionen verbraucht wird. So werden beispielsweise in verschiedenen Säugetierzellen bis zu 40 % der Proteine, in Makrophagen sogar bis zu 55 %, sofort nach ihrer Synthese wieder degradiert (Schubert et al. 2000, Princiotta et al. 2003). Bei diesen zu degradierenden Proteinen handelt es sich um sog. *fehlerhafte ribosomale Produkte* (DRiPs, defective ribosomal products). Sie erreichen nie eine native Struktur, weil sie während der Translation oder posttranslationalen Prozessen fehlerhaft gefaltet wurden (Schubert et al. 2000). Der energetische Verbrauch für solche sinnlosen oder ineffizienten Prozesse wurde natürlich in den Arbeiten von Schmid et al. (2000) und Buttgereit und Brand (1995) mitbilanziert. Er beläuft sich allein bei der Proteindegradation auf über 10 % (Lehner 2003 nach Princiotta et al. 2003). Ursache der unerwartet großen Adaptationsfähigkeit an Energiemangel über einen längeren Versuchszeitraum könnte demzufolge die Abschaltung derartiger Prozesse sein, ohne daß dies Auswirkungen auf Zellüberleben und -funktionalität hätte. Die Zelle besitzt also Potential, die Effizienz der Energieverwertung zu erhöhen, indem sie weniger bedeutsame oder auch für das unmittelbare Zellüberleben unwichtige Prozesse abschaltet.

Darüber hinaus wird die Existenz von sog. mitochondrialen Schwellenwerten diskutiert. Es ist möglich, beträchtlich die Aktivität von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette (z. B. Komplex I um 85 % und Komplex IV um 75 %) bis hin zu einem kritischen Wert zu hemmen oder durch Mutation auszuschalten, ohne Auswirkungen auf die ATP-Synthese (Davey und Clark 1996, Farge et al. 2002, Rossignol et al. 2003). Dieses Phänomen wird *Biochemischer*

*Schwellenwert* genannt. Zellen unterschiedlicher Organe zeigen unterschiedliche biochemische Schwellenwerte (Rossignol et al. 1999). In glukosefreiem Medium könnte die Existenz eines solchen Schwellenwertes teilweise für das Fehlen eines Effektes auf die Zytokinsynthese verantwortlich sein.

Auf der anderen Seite deuten weitere Daten darauf hin, daß sich PMA-Ionomycin-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in besonderer Weise an Energiemangel durch Glukoseentzug und Komplex III-Hemmung anpassen können. Als wesentliche Ursache des unerwartet hohen adaptativen Potentials wird eine stark gesteigerte OXPHOS in den Mitochondrien vermutet. Dadurch wurde im Ergebnis deutlich mehr ATP zur Verfügung gestellt als durch die weiter unten diskutierte Glykogenolyse. Durch Spontanglykogenolyse (Doenecke 1973) und den starken Stimulus werden vermeintliche Glykogenvorräte ohnehin schnell abgebaut gewesen sein. Dies wurde aus der Beobachtung abgeleitet, daß sich nach 3 h unabhängig von der Myxothiazoldosis eine stark überschießende Reaktion des Sauerstoffverbrauchs zeigte (Abb. 21). In Punkt 4.10 wird in *Hypothese 1* diskutiert, daß einige wenige, nicht Myxothiazol-gehemmte Mitochondrien ihre Aktivität sehr stark steigerten. Dadurch wurde der Energieverlust der ausgefallenen Mitochondrien kompensiert. Zusätzlich kompensieren mußte aber auch die anaerobe Glykolyse, weil sich bei vollständigem Glukoseentzug die Zytokinsynthese stark verminderte.

Zu den bereits erwähnten Glykogenvorräten ist folgendes zu bemerken: Bei vollständiger Unterdrückung der mitochondrialen Atmung mit den *max1*- und *max2*-Myxothiazoldosen und gleichzeitigem Glukoseentzug konnten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen ihren Energiehaushalt durch die normalerweise alternativ zur Verfügung stehende glykolytische Energiegewinnung nicht mehr aufrechterhalten und starben ab (Abb. 22). Da im glukosefreien Medium immerhin bis zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs um 80 % noch kein Effekt auf die Zytokinsynthese zu beobachten war, könnten die Zellen auf ihre geringen Glykogenreserven zurückgegriffen und durch Glykogenolyse zumindest einen kleinen Teil ihres Energiebedarfs gesichert haben. Es wurde gezeigt, daß Lymphozyten Glykogenreserven enthalten (Leikin 1961, Seitz und Luganova 1968, Doenecke 1973, Gunzer et al. 1978), die durch Phythämagglutinin (PHA) mobilisiert und zur Energiegewinnung abgebaut werden (Doenecke 1973). Außerdem wurden in Lymphozyten Enzymaktivitäten des Glykogenstoffwechsels nachgewiesen (Seiler und Kelleter 1973, Gunzer et al. 1978).

Bei den IL-2-, TNF- $\alpha$ - und IL-4-Produzenten konnte ein Alles-oder-Nichts-Prinzip hinsichtlich der Zytokinsynthese in Abhängigkeit von der Energieverfügbarkeit beobachtet werden. Die MFI

der Myxothiazol-gehemmten Zellen, die als Zytokin-positiv identifiziert wurden, waren im Gegensatz zur MFI der IFN- $\gamma$ -Produzenten über alle Niveaus der Atmungshemmung hinweg nicht verringert. Die stimulierte Zelle stellte also entweder die Zytokinsynthese vollständig ein oder sie wurde konstant gehalten. Demnach könnte es hier bis zu drei Unterpopulationen geben: (1) Zellen, die von Anfang an Nichtproduzenten sind, (2) Zellen, die Produzenten sind, jedoch bei Energiemangel ihre Synthese vollständig einstellen und (3) Zellen, die sich vollkommen unbeeindruckt von einer vollständig unterdrückten OXPHOS zeigen. Es ist bekannt, daß unterschiedliche T-Zellklone in ihrer Zytokinproduktion variieren und auf diese Art in ihren funktionellen Eigenschaften. (Schauer et al. 1996). Wahrscheinlich handelte es sich bei den trotz vollständiger Atmungshemmung weiterhin Zytokin-positiven Zellen um diejenigen, deren Komplexe III bzw. Mitochondrien nicht vollständig durch Myxothiazol gehemmt wurden (s. *Hypothese 1* in Pkt. 4.10). Diese Zellen waren noch in der Lage, ihre Energiegewinnung aus der OXPHOS aufrechtzuerhalten und damit die Energieanforderungen für überlebenswichtige und spezifische Funktionen zu sichern.

#### **4.5.4 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen**

Unter glukosehaltigen Bedingungen konnten auf jedem Niveau der Atmungshemmung keine Auswirkung auf die Zytokinsynthese beobachtet werden (Abb. 33-35). Was könnten die Ursachen dafür sein? Bental und Deutsch (1993) konnten an PMA-Ionomycin-stimulierten T-Zellen innerhalb der ersten 2 h eine 6fach gesteigerte Glykolyserate beobachten. Diese steigerte sich bis auf das 15fache nach 48 oder 96 h und korrelierte mit einer erhöhten Laktatbildung. Wu und Marliiss (1993) konnten bei PMA-Ionomycin-Stimulationen an Peritonealmakrophagen von Ratten die Steigerung des Pentosephosphatzyklusses und der Glykolyse messen. Für die untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist es also während einer PMA-Ionomycin-Stimulation möglich, das Defizit aus der mit Myxothiazol unterdrückten oxidativen Energiegewinnung durch alternative ATP-Synthesewege auszugleichen. Die Stimulation treibt ohnehin direkt und/oder indirekt durch den erhöhten Bedarf die glykolytische Energiesynthese an. Dieser Mechanismus ist für die Abwanderung von T-Zellen in Gebiete mit geringen Sauerstoffpartialdrücken sinnvoll.

In diesem Zusammenhang wird auch die Energiesynthese über die Glutaminolyse diskutiert (Ardawi 1988, Calder 1995). Glutamin war Bestandteil aller verwendeten Zellkulturmedien. Trotzdem muß die Energiegewinnung über die OXPHOS signifikant den Energiebedarf für die

Zytokinsynthese gedeckt haben. Die Zytokinsynthese funktionierte unter glukosefreien Bedingungen und war bei gleichzeitig vollständig gehemmter OXPHOS stark vermindert. Hinzu kommt, daß menschliche Blutlymphozyten unter aeroben Bedingungen Glukose fast vollständig zu CO<sub>2</sub> und Wasser veratmen, während die aerobe Glykolyse praktisch keine Rolle spielt (Kelleter et al. 1973). Die vielleicht bemerkenswerteste Eigenschaft der Lymphozyten im Glukosestoffwechsel ist ihre Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen durch verstärkte Glykolyse etwa dieselben ADP-ATP-Spiegel zu halten wie unter aeroben Bedingungen. (Kelleter et al. 1973). Höchstwahrscheinlich leiten also zwei Faktoren unter glukosehaltigen Bedingungen die glykolytische Kompensation des Energieverlustes aus der unterdrückten Atmung und damit die vollkommen unbeeinträchtigte Zytokinsynthese ein: Der PMA-Ionomycin-Stimulus und der mittels Myxothiazol simulierte Sauerstoffmangel. Nach Merlo-Pich et al. (2004) wird die Glykolyse in Lymphozyten in dem Maß gesteigert wie die mitochondriale Atmung gehemmt wurde. Die aerobe Glykolyse spielt aber nur eine stark untergeordnete Rolle bei der Sicherung des Energiebedarfs für die Zytokinsynthese. Glukoseentzug verursachte keine statistisch signifikante Verminderung der Zytokinsynthese (Abb. 33-35). Die OXPHOS spielte also eine sehr viel bedeutendere Rolle. Dadurch verwundert es nicht, daß die Zytokinsynthese so lange aufrechterhalten wurde.

Buttgereit und Brand (1995) stellten an Con A-stimulierten Thymozyten von Ratten mittels amperometrischer Sauerstoffverbrauchsmessung fest, daß nach 30%iger Hemmung des Sauerstoffverbrauchs mit Myxothiazol die Cycloheximid-gehemmte Proteinbiosynthese nur noch 40 % Prozeßaktivität aufwies, obwohl Glukose zur Kompensation zur Verfügung stand. Demgegenüber hatte unter gleichen Bedingungen die vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Auswirkungen auf die Zytokinsynthese. In länger andauernden Experimenten wie der sechsstündigen PMA-Ionomycin-Stimulation können sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Umschaltprozesse sehr wahrscheinlich besser adaptieren als in Kurzzeitexperimenten wie der amperometrischen Sauerstoffverbrauchsmessung. Weiterhin wird vermutet, daß schon die glykolytische ATP-Gewinnung zur Kompensation ausreichte, weil durch die Betrachtung der Zytokinsynthese nur ein kleiner Teil der gesamten Proteinbiosynthese berücksichtigt wurde. Zudem stellen PMA und Ionomycin in Kombination ein Maximalstimulans der Proteinbiosyntheserate dar (Miyamoto et al. 2000). Diehn et al. (2002) berichten, daß bei T-Zellen durch diesen Stimulus die Expressionsmuster von mehr als 3000 Genen verändert werden. Das läßt auf enorme Veränderungen im gesamten Proteinspektrum der PMA-Ionomycin-aktivierten T-Zelle schließen. Hinzu kommt, daß unter den o. g. Bedingungen

wahrscheinlich die Synthese von anderen Proteinen zurückgeht, aber die der wichtigen Zytokine (eine der Hauptfunktionen) eben nicht.

#### **4.6 Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die Proliferation bei CD4+ T-Zellen**

##### **4.6.1 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen**

In früheren Studien zur Aktivierung von Lymphozyten wurden mitogene Pflanzenlektine wie Con A, PHA und Pokeweed Mitogen genutzt, später die physiologischere Variante der CD3/CD28-Stimulation. Damit konnten ähnlich wie bei einer antigenen Stimulation Zellwachstum (Blastenbildung) und Proliferation bei der Hauptmasse der Zellpopulation induziert werden, die meist innerhalb von 1 h zu gesteigerter Glukoseverwertung führten (Roos und Loos 1973, Sagone et al. 1974, Culvenor und Weidemann 1976, Hume et al. 1978, Frauwirth et al. 2002). Zusätzlich induzierte die Stimulation einen schnellen, aber nur moderaten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (Roos und Loos 1973, Hume et al. 1978, Krauss et al. 2001). Es wurde an Con A-stimulierten Lymphozyten eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs um 30-50 % gefunden (Buttgereit et al. 1993, Buttgereit und Brand 1995, Krauss et al. 2001, Schmid et al. 2000, 2001). Ausdruck der viel dramatischeren Steigerung der Glykolyse ist die signifikante Erhöhung der Laktatproduktion (Frauwirth und Thompson 2004) um 350 % (Roos und Loos 1973). Nach Brand et al. (1986) ist die Glukoseverwertung in proliferierenden Thymozyten von Ratten 36fach gesteigert, aber die Oxidation zu CO<sub>2</sub> nur verdoppelt. Etwa 90 % wird in Laktat umgewandelt. Das konnten auch Frauwirth et al. (2002) an humanen CD3/CD28-stimulierten T-Lymphozyten finden. Laktatproduktion bei normaler Sauerstoffverfügbarkeit wird als *aerobe Glykolyse* bezeichnet. Sie ist ursprünglich an Tumorzellen entdeckt worden (Warburg-Effekt) (Warburg et al. 1926). Ruhende Lymphozyten zeigen keine aerobe Glykolyse (Seitz und Luganova 1968). Die gesteigerte aerobe Glykolyse in Anwesenheit von Glukose ist zumindest bei einer CD3/CD28-Stimulation von Lymphozyten Rezeptor-induziert (Frauwirth et al. 2002) und nicht durch Sauerstoffmangel, so wie bei der Laktatbildung im Muskel. Die Hemmung der OXPHOS *per sé* mit TTFB (Entkoppler), Oligomycin oder KCN induziert aber auch eine verstärkte Glykolyse. Roos und Loos (1973) konnten dadurch bei Lymphozyten einen Anstieg der Laktatakkumulation um 400-600 % verursachen, der durch Anwesenheit von PHA noch verstärkt wurde.

Während der Proliferation von Lymphozyten ist also v. a. die aerobe Glykolyse stark gesteigert,

aber auch die Atmung wird erhöht (Roos und Loos 1973, Sagone et al. 1974, Culvenor und Weidemann 1976, Wang et al. 1976, Hume et al. 1978). Dies erklärt die um durchschnittlich 62,6 % geringeren Ausgangswerte der Proliferation bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in glukosefreiem Medium (Abb. 36, 37). Glukose fehlte hier außerdem als wichtiger Zellbaustein. Hinzu kommen könnte der hemmende Einfluß von ROS auf die Proliferation infolge Glukoseentzug (Aulwurm und Brand 2000). In der aeroben Glykolyse anfallendes Pyruvat akzeptiert und neutralisiert somit ROS (Brand 1997). Durch die vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs hingegen wurde die Proliferation mit 56,4 % weniger stark gehemmt. Der Entzug von Glukose hat also stärkere Auswirkungen als die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und erklärt somit die überraschend ausgeprägte Anpassungsfähigkeit der Zellen an den simulierten Sauerstoffmangel. Exogener Sauerstoffmangel wirkt sich ebenfalls beeinträchtigend auf die Proliferation von T-Zellen aus (Naldini et al. 1997, Naldini und Carraro 1999, Conforti et al. 2003).

Die Möglichkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, mehrere Energiesynthesewege nutzen zu können, macht sie elastischer in der Reaktion auf Energiemangelsituationen. Die Tatsache, daß infolge der initial vollständig gehemmten mitochondrialen Atmung die Proliferation nur um 56,4 % vermindert war, deutet auf zwei Dinge hin: (1) Die Proliferation ist kein Parameter der OXPHOS selbst. (2) Innerhalb der OXPHOS müssen Veränderungen stattgefunden haben, die im Zusammenhang mit der in Punkt 4.10 (*Hypothese 1*) diskutierten, überschießenden Reaktion des Sauerstoffverbrauchs in PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen stehen könnten.

#### **4.6.2 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen**

Nach Frauwirth und Thompson (2004) gibt es zwei wichtige Erklärungsmöglichkeiten für die Umschaltung auf aerobe Glykolyse während der Lymphozytenaktivierung (Proliferation), weil der Glukosestoffwechsel nicht einfach aufgrund der verringerten ATP-ADP-Ratio gesteigert wird: (1) Lymphozyten sind evtl. unfähig, die OXPHOS für die Sicherstellung des energetischen Bedarfs ausreichend zu steigern und hyperinduzieren deshalb die Glykolyse. (2) Alternativ könnte die Umschaltung auf die Glykolyse aus einer primären Stimulation von Glukoseaufnahme und -katabolismus resultieren, die den zellulären Bedarf für die ATP-Produktion über die OXPHOS überschreitet. Übermäßig synthetisiertes Pyruvat und NADH treiben die Laktatbildung an. Dadurch wird der NAD<sup>+</sup>-Pool regeneriert. Wahrscheinlicher ist die erste Erklärungsmöglichkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß Mitochondrien

PMA-Ionomycin-stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über ein enormes, aber begrenztes Steigerungspotential ihrer Atmungskettenaktivität verfügen (s. *Hypothese 1* in Pkt. 4.10 u. Tab. 18). Dazu ist zu ergänzen, daß die OXPHOS zwar effizienter ATP synthetisiert (38 Mol ATP/Mol Glukose vs. 2 Mol glykolytisch gewonnenes ATP/Mol Glukose). Es ist aber nicht geklärt mit welcher Intensität. Der energetische Bedarf für einige spezifische Funktionen wie die Zytokinsynthese konnte aber durch die Steigerung der OXPHOS allein gesichert werden. Dies ist in den entsprechenden Versuchen nachgewiesen worden (Abb. 33-35). Hier könnten sich sogar beide o. g. Erklärungsansätze ergänzt haben. Die PMA-Ionomycin-Stimulation war immer von einer pH-Wert-Veränderung in den sauren Bereich begleitet, erkennbar an der Verfärbung des Phenolrotindikators des Zellkulturmediums. Eine Ursache dafür könnte Laktatbildung gewesen sein, aber auch HCO<sub>3</sub>-Bildung aus übermäßig anfallendem CO<sub>2</sub> könnte stattgefunden haben.

Wie bereits diskutiert wurde, ist also die Proliferation von Lymphozyten in stärkerem Maß von der glykolytischen als von der oxidativen Energiegewinnung abhängig. Das erklärt, daß bei Verfügbarkeit von Glukose und bis zur vollständigen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs keine statistisch signifikante Beeinträchtigung der Proliferation beobachtet werden konnte (Abb. 36, 37). Die Energieverluste aus der stufenweise immer stärker unterdrückten mitochondrialen Atmung wurden durch eine gesteigerte Glykolyserate kompensiert. Diese Beobachtung stimmt mit Daten von Roos und Loos (1973) überein. Sie konnten durch Hemmung der Atmung mit TTFB (Entkoppler), Oligomycin oder KCN eine 600-800%ige Steigerung der Laktatakkumulation in PHA-stimulierten Lymphozyten induzieren.

Trotz der höchstwahrscheinlich größeren Bedeutung der glykolytischen Energiegewinnung zur Sicherung des Energiebedarfs der Proliferation ist die oxidative Energiegewinnung unbedingt erforderlich und überaus bedeutend. Dadurch befindet sich die Proliferationsaktivität in glukosehaltigem Zellkulturmedium auf einem sehr viel höheren Niveau als unter glukosefreien Bedingungen ( $50,7 \pm 3,7$  % vs.  $19,0 \pm 1,0$  %). Die synthetisierte Energie aus der Glykolyse und der OXPHOS zusammengenommen sichert die unverminderte Proliferation über den gesamten Bereich des Niveaus der Atmung (Abb. 36).



## **4.7 Effekte eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels auf die Phagozytoseaktivität von CD14+ Monozyten**

### **4.7.1 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosefreien Bedingungen**

Die in den vorliegenden Untersuchungen gefundenen Ausgangswerte (Abb. 38, 39) stimmten mit Angaben von Thies et al. (2001) weitgehend überein. Diese fanden in Untersuchungen mit Vollblut gesunder Spender, daß 20 % der Monozyten *Escherichia coli* phagozytiert hatten.

Bei vollständiger Hemmung der OXPHOS war im glukosefreien Medium die Phagozytose um 31,3 % im Vergleich zum Ausgangswert vermindert (Abb. 38, 39). Diese Daten stimmen mit ähnlichen Beobachtungen von Reiss und Roos (1978) überein. Sie konnten durch den Atmungskettenhemmstoff Antimycin A den Sauerstoffverbrauch und damit die Aufnahme von Zymosan vollständig blockieren, weil die Monozytenphagozytose sehr stark von der OXPHOS abhängig ist. Dies dürfte aber, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden, nur dann der Fall sein, wenn die Zellen nicht auf die glykolytische ATP-Gewinnung zurückgreifen können. Die Autoren konnten aber im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit schon ab einer ca. 50%igen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs einen kontinuierlichen und dosisabhängigen Rückgang der Phagozytose beobachten. Mit den drei höchsten Konzentrationen von Antimycin A konnte der Sauerstoffverbrauch nicht weiter unterdrückt, die Zymosanaufnahme aber weiter bis zur Vollständigkeit blockiert werden. Da aber bei den PMA-Ionomycin-stimulierten CD4+ T-Zellen Myxothiazoldosen über 22 pmol im glukosefreien Medium zum Zelltod führten (Abb. 22), wurde auf eine Erhöhung der Dosis über 40 pmol bei den CD14+ Monozyten verzichtet (Abb. 30, 31). In der Übersichtsarbeit von Lewis et al. (1999) sind andere Arbeiten beschrieben worden, in denen infolge exogenen Sauerstoffmangels eine verminderte Phagozytose bei Makrophagen beobachtet wurde.

Zellen des phagozytären Systems besitzen u. a. Rezeptoren für Komplement (C3b) und den konstanten Teil des Immunglobulinmoleküls (Fc), die eine Anheftung von Bakterien an die Zelle vermitteln. Der Anheftung geht ein aktiver Prozeß der Zellbewegung (Chemotaxis) und Protrusion von Zytoplasmafortsätzen (Pseudopodienbildung) voraus, der von löslichen Faktoren wie Endotoxinen und Interleukinen beeinflusst wird. Dieser Vorgang (Culic et al. 1997, Wells et al. 1999) sowie die anschließende Aufnahme über die Zellmembran, die intrazelluläre Prozessierung und die Präsentation von prozessierten Fragmenten an der Zelloberfläche (Authier et al. 1996, Groettrup et al. 1996, York und Rock 1996) sind temperatur- und

energieabhängig. Das wurde durch den Kontrollansatz bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C bestätigt. Hier konnte in beiden Zellkulturmedien keine Phagozytose festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus dem glukosefreien Medium bei vollständiger Hemmung der Atmung ist denkbar, daß die geringere ATP-Verfügbarkeit aus der OXPHOS schon zu einer Einschränkung der Bewegungsfähigkeit zu den Bakterien und so zu einer geringeren Phagozytoseaktivität führte. Zusätzlich stand natürlich auch weniger Energie für die anderen, an der Phagozytose beteiligten Prozesse zur Verfügung (Pseudopodienbildung, Anheftung), so daß auch hier die Ursachen für eine geringere Phagozytoseaktivität zu suchen sind. Wichtig an dieser Stelle zu erwähnen ist die Prozessierung. Im Phagozyt liegt das Bakterium eingeschlossen von der Plasmamembran als primäres Phagosom vor. Dieses entwickelt sich durch Fusion mit Lysosomen zum sekundären Phagosom. In diesem findet dann verstärkt der Verdauungsvorgang des Bakteriums mit Hilfe von Enzymen statt. Auch hier ist bei Energiemangel mit einer starken Beeinträchtigung zu rechnen. Hinzu kommt, daß als bakterizide Mechanismen bereits im primären Phagosom eine Ansäuerung und eine oxidative Abtötung stattfinden. Dazu sind auch erhebliche Energiemengen erforderlich (Authier et al. 1996) und demzufolge eine uneingeschränkt funktionsfähige mitochondriale Atmungskette. Weiterhin ist die eingeschränkte Energiebereitstellung für die Vielzahl der am *Respiratorischen Burst* beteiligten Enzyme zu erwähnen. So könnten zwar Bakterien noch phagozytiert, nicht aber mehr eliminiert werden. Da dieser Prozeß und der phagosomale Verdauungsvorgang der Aufnahme der Bakterien nachgelagert sind, werden sie in der energetischen Hierarchie bei Energiemangel keine Energie mehr zur Verfügung gestellt bekommen. Die Phagozytose fällt bei vollständiger Unterdrückung der OXPHOS nicht gänzlich, sondern nur teilweise aus (Abb. 38, 39). Durch die Abschaltung Phagozytose-nachgelagerter Prozesse wird Energie für die zunächst dringender benötigte Phagozytose eingespart.

#### **4.7.2 Wirkungen einer vollständigen Hemmung der OXPHOS unter glukosehaltigen Bedingungen**

Monozyten besitzen die Fähigkeit, besonders im aktivierten Zustand große Energiemengen über die Glykolyse zu gewinnen. So gibt es frühe Berichte darüber, daß Hemmstoffe der Glykolyse nicht nur die ATP-Synthese, sondern gleichzeitig die Aufnahme von Bakterien oder Erythrozyten in diese Zellen (Sbarra und Karnovsky 1959, Oren et al. 1963, Cline und Lehrer 1968, Kay et al. 1980) und die Chemotaxis und Ausbreitung (Kay et al. 1980) unterdrücken. Dementsprechend ist die nicht meßbare Beeinträchtigung der Phagozytose bei vollständiger

initialer Hemmung der OXPHOS im glukosehaltigen Zellkulturmedium zu erklären (Abb. 38, 39). Die Monozyten greifen hier auf die Energiegewinnung über die Glykolyse zurück. Nach Kawaguchi et al. (2001) können Makrophagen innerhalb von 1 min nach Beginn einer Hypoxie die Glykolyse über die Aktivierung der Phosphofruktokinase drastisch steigern. Makrophagen, die sich von Monozyten ableiten, gehören zu den Zellen, die sich an geringe Sauerstoffkonzentrationen durch Umschaltung von aerober auf die anaerobe Glykolyse für die ATP-Synthese adaptieren (Lewis et al. 1999, Kato und Walz 2000). Es ist davon auszugehen, daß periphere Monozyten ebenfalls über diesen Mechanismus verfügen und auf ihn auch im Falle einer wie in der vorgestellten Arbeit nachgeahmten Hypoxiesituation zurückgreifen. Marsin et al. (2002) konnten ebenfalls an Monozyten mit Oligomycin eine gesteigerte Glykolyse induzieren. Im glukosefreien Medium konnten die Zellen während der Phagozytose nicht auf die Energiegewinnung über die Glykolyse zurückgreifen. Demzufolge war die Phagozytoseaktivität von vornherein um 40,9 % verringert. Da durch vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in Abwesenheit von Glukose nur eine Hemmung um 31,3 % zu verzeichnen war, spielt die glykolytische Energiegewinnung bei der Phagozytose eine bedeutendere Rolle.

#### **4.8 Hierarchie der Abhängigkeit der untersuchten Immunfunktionen von der glykolytischen und oxidativen Energiegewinnung**

Beim Vergleich mit den anderen untersuchten Immunfunktionen nahm die Proliferation den höchsten Rang in der Abhängigkeit von der glykolytischen Energiegewinnung ein (Tab. 14).

**Tab. 14:** Hierarchie der Abhängigkeit der Immunfunktionen von der Glykolyse

Immunfunktion	Mittlere Beeinträchtigung bei Glukoseabwesenheit (%)
Proliferation	62,6
Phagozytose	40,9
Zytokinsynthese	0

Die Hierarchie der Abhängigkeit der untersuchten Immunfunktionen von der OXPHOS gestaltete sich wie in Tabelle 15 dargestellt.

**Tab. 15:** Hierarchie der Abhängigkeit der Immunfunktionen von der OXPHOS

Immunfunktion	Mittlere Beeinträchtigung durch nachgeahmten Sauerstoffmangel (%) <sup>1</sup>
IL-2-Synthese	81,9
TNF- $\alpha$ -Synthese	67,7
IL-4-Synthese	57,9
Proliferation	56,4
IFN- $\gamma$ -Synthese	54,2
Phagozytose	31,3

<sup>1</sup>Der nachgeahmte Sauerstoffmangel wurde durch die *submaximale* Myxothiazoldosis erzeugt.

Im Hinblick auf die evolutionäre Entwicklung des Immunsystems sind diese Hierarchien verständlich. Vor allem die Phagozytose ist ein sehr früher Prozeß in der Evolution des Immunsystems. Er war bereits bei geringen Sauerstoffkonzentrationen in der Atmosphäre existent und gehört deshalb zum angeborenen Immunsystem. Erst als die Sauerstoffkonzentrationen anstiegen, begannen sich wahrscheinlich Vorläufer der heutigen Mitochondrien als eigenständige Organismen zu entwickeln. Diese wanderten später in andere Zellen ein. Auf diese Art könnte es möglich geworden sein, mittels OXPHOS die Energie für zusätzliche Prozesse wie die Zytokinsynthese bereitzustellen.

Die Proliferation war bei Glukoseentzug am stärksten, umgekehrt jedoch nicht am wenigsten durch vollständige Hemmung der OXPHOS beeinträchtigt. Dies könnte daraus resultieren, daß durch die aerobe Glykolyse vermutlich Faktoren bereitgestellt werden, die durch Reaktionen im Zitratzyklus nicht verfügbar gemacht werden können (Frauwirth und Thompson 2004). Wurde die Glykolyse von Lymphozyten mit 2-Deoxyglukose in Gegenwart der alternativen Zitratzyklussubstrate Aspartat und Acetat gehemmt, so war die PHA-induzierte Proliferation trotz erhaltener Energiesynthesekapazität blockiert (Roos und Loos 1973). Das gleiche Ergebnis zeigten auch die vorliegenden Versuche. Hier wurde zur Hemmung der Glykolyse lediglich glukosefreies Zellkulturmedium verwendet. Alle anderen Faktoren blieben unverändert. Bei dem unbekanntem und essentiellen Faktor, der durch die Glykolyse bereitgestellt wird und die Proliferation in besonderer Weise unterstützt, könnte es sich um Pyruvat handeln. Pyruvat ist ein effektiver ROS-Akzeptor. ROS fallen vermehrt an bei gesteigerter OXPHOS-Aktivität, die durch Mitogenstimulation ausgelöst wird. Brand (1997) sieht darin einen Sinn der gesteigerten aeroben Glykolyse bei der Lymphozytenaktivierung, weil ROS Proliferation verhindern.

Weiterhin werden die Bereitstellung von Zwischenprodukten für die RNA/DNA-Synthese (Calder 1995) und eine metabolische Kontrollfunktion (Newsholme et al. 1985b) diskutiert.

Die Synthese des Zytokins IFN- $\gamma$  war unter den untersuchten Zytokinen am wenigsten von der OXPHOS abhängig. Das äußerte sich auch im bereits erwähnten Alles-oder-Nichts-Prinzip: Während die CD4+ T-Zellen nicht oder kaum in der Lage waren, die IL-2- (- 8 %), TNF- $\alpha$ - und IL-4-Synthese (jeweils  $\pm$  0 %) zu verringern und dadurch an die vollständige Hemmung der OXPHOS zu adaptieren, reduzierten sie die Intensität der IFN- $\gamma$ -Synthese bevor sie sie vollständig einstellten. Ausdruck dafür war die statistisch signifikant verringerte MFI (- 49,46 %). Die vergleichsweise geringe Unempfindlichkeit der IFN- $\gamma$ -Synthese gegenüber Sauerstoffmangel ist biologisch sinnvoll. IFN- $\gamma$  ist ein bedeutender Aktivator von Monozyten/Makrophagen, die vornehmlich in sauerstoffarmen Arealen agieren.

#### **4.9 Einfluß des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 auf die ATP-Synthese bei Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4+ T-Zellen**

HIF-1 $\alpha$  stellt die  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors *Hypoxie-induzierbarer Faktor-1* (HIF-1) dar, der zusätzlich eine zweite, die  $\beta$ -Untereinheit enthält. Die im Zytosol vorkommende und ständig nachsynthetisierte  $\alpha$ -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen sofort ubiquitiniert und in Proteasomen degradiert (Huang et al. 1998, Kallio et al. 1999). Unter hypoxischen Bedingungen ist die sauerstoffabhängige Degradation unterbunden und die  $\alpha$ -Untereinheit gelangt in den Zellkern. Dort lagert sie sich mit der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit zum vollständigen Transkriptionsfaktor HIF-1 zusammen (Gaber et al. 2004). HIF-1 steuert im Zellkern verschiedene Zielgensequenzen (Distler et al. 2004), u. a. die der anaeroben Energiegewinnung an. Dazu gehören transmembranäre Glukosetransporter und zentrale Enzyme der Glykolyse (Iyer et al. 1998). Die Entdeckung von HIF-1 als Hauptregulator der sauerstoffabhängigen Genexpression (Wang und Semenza 1993) sowie die Klonierung und molekulare Charakterisierung (Wang et al. 1995) waren wichtige Schritte für die Aufklärung des Mechanismus, welcher der Adaptation der Zelle an reduzierte Sauerstoffkonzentrationen zugrunde liegt.

HIF-1 $\alpha$  ist also ein Schlüsselregulator der Glykolyse (Ryan et al. 1998, Seagroves et al. 2001). In den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb vermutet, daß der Faktor für die unerwartet lange energetische Adaptation und damit das Überleben und die Funktionalität in den Myxothiazol-gehemmten CD4+ T-Zellen verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wurde die entscheidende, sauerstoffabhängige  $\alpha$ -Untereinheit untersucht.

Auf mRNA-Ebene war zunächst nicht zu erwarten, daß unterschiedliche Expressionsmuster gefunden werden. HIF-1 $\alpha$  wird posttranslational, also auf Proteinebene reguliert (Gaber et al. 2004). Die Untersuchungen sollten aber klären, ob bestimmte Mechanismen in Gang gesetzt werden, die erst durch die Anwesenheit von PMA, Ionomycin und Myxothiazol ermöglicht und vielleicht durch die An- oder Abwesenheit von Glukose im Zellkulturmedium noch zusätzlich beeinflußt werden. Die gefundenen Daten zeigten eine Begünstigung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression durch die PMA-Ionomycin-Stimulation und Myxothiazol (Abb. 40). Dies steht scheinbar im Gegensatz zu der Auffassung, daß HIF-1 $\alpha$  ausschließlich posttranslational, also nicht auf mRNA-Ebene reguliert wird. Tatsächlich konnten aber auch schon Lukashev et al. (2001) eine Hypoxie-unabhängige Stimulation der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Synthese durch TCR- und PMA-Ionomycin-Stimulation in Maus-T-Zellen induzieren. In weiteren Untersuchungen wird deshalb zu prüfen sein, ob PMA, Ionomycin und Myxothiazol beispielsweise Auswirkungen auf den Transkriptionsapparat haben oder über die Signaltransduktion stimulierend wirken und so zu einer Verstärkung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression führen. Hinweise dahingehend fanden sich in der Arbeit von Lukashev et al. (2001).

Wichtiger war jedoch die Untersuchung auf Proteinebene. Es fand sich in Übereinstimmung mit den Berichten von Chandel et al. (2000) und Hagen et al. (2003) in den normoxischen Kontrollen keine und in den hypoxischen Kontrollen eine starke HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression, weil das Protein sofort jeweils degradiert oder stabilisiert wurde (Abb. 41). Die PMA-Ionomycin-Stimulation hatte wie auf mRNA-Ebene ebenfalls eine begünstigende Wirkung. Das spricht nochmals für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen einer Stimulation. Es gibt bereits Hinweise, daß PMA HIF-1 $\alpha$  induziert (Hossain et al. 2000, Lukashev et al. 2001, Chun et al. 2003, Jung et al. 2003). In den vorliegenden Untersuchungen war der Faktor jedoch bei Vorhandensein von Myxothiazol nicht mehr detektierbar (Abb. 41). Die Schlußfolgerung lautete deshalb, daß HIF-1 für die Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung und damit des Überlebens und der Funktionalität in CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei vollständiger Unterdrückung der Atmung durch Myxothiazol *nicht* entscheidend sein konnte. Neuere Studien sprechen ohnehin dafür, daß HIF-1 $\alpha$  in Lymphozyten eher auf funktionelle Eigenschaften wirkt (Kojima et al. 2003).

Welche Erklärungen gibt es dafür? Die wichtigste ist die verminderte Stabilisierung des Faktors in Anwesenheit von Myxothiazol. Diese These beruht auf einem von Chandel et al. (2000) vorgeschlagenen Modell für die zelluläre Sauerstoffsensitivität: Hypoxie treibt die

Superoxidbildung (ROS-Synthese) am Komplex III der mitochondrialen Atmungskette an. Superoxid wird anschließend durch die SOD in  $H_2O_2$  umgewandelt. Zusammen mit bestimmten Botenstoffen löst  $H_2O_2$  im Zytosol die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins aus. In der vorgestellten Arbeit wird Komplex III mit Myxothiazol stufenweise bis zur Vollständigkeit blockiert. Dadurch wird die ROS-Bildung immer stärker oder ganz unterbunden. Im Ergebnis ist die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  vermindert oder wie gezeigt vollständig gehemmt (Abb. 41).

Darüber hinaus könnte ein vermehrter Abbau des Faktors hinzugekommen sein. NO, das durch die PMA-Ionomycin-Stimulation entsteht (Valdez und Boveris 2001), und andere Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette wie Myxothiazol führten in den Arbeiten von Hagen et al. (2003) und Mateo et al. (2003) zu einer Hemmung der Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins trotz niedriger Sauerstoffkonzentrationen. Als Ursache wurde die gesteigerte Prolylhydroxylase-abhängige Degradation von HIF-1 $\alpha$  angegeben (Hagen et al. 2003). Die Proteinstabilität von HIF-1 $\alpha$  wird in Abhängigkeit vom Sauerstoff (Wenger 2002, Pugh und Ratcliffe 2003, Safran und Kaelin 2003) durch eine Familie von Prolylhydroxylasen reguliert (Bruick und McKnight 2001, Epstein et al. 2001). Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ist die Aktivität der Prolylhydroxylasen gehemmt. HIF-1 $\alpha$  reichert sich im Zytosol an und heterodimerisiert im Zellkern mit der  $\beta$ -Untereinheit von HIF-1. Hagen et al. (2003) konnten aber demonstrieren, daß unter Hypoxie durch die Hemmung der Atmungskette mit Myxothiazol nicht veratmeter Sauerstoff in die Richtung von nicht Atmungssauerstoff-abhängigen Zielen wie den Prolylhydroxylasen umverteilt wird. So konnten die von ihnen untersuchten Zellen Hypoxie nicht registrieren, weil HIF-1 $\alpha$  degradiert wurde.

Zukünftige Untersuchungen müssen die Frage klären, warum PMA und Ionomycin sowie die Anwesenheit von Glukose die HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression verstärken.

#### **4.10 Anstieg des zellulären Sauerstoffverbrauchs zur Sicherstellung des ATP-Bedarfs bei Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

##### ***Hypothese 1: Nicht Myxothiazol-gehemmte Mitochondrien übernehmen die Energiesynthese***

Nach den vorliegenden Erkenntnissen konnte HIF-1 in den durchgeführten Experimenten nicht entscheidend sein für die Sicherstellung des Energiebedarfs bei den Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde die Vermutung aufgestellt, daß funktionsfähig verbliebene, nicht Myxothiazol-gehemmte Mitochondrien über ein enormes Steigerungspotential ihrer Atmungskettenaktivität verfügen. Dadurch wird der Energieverlust

aus den ausgefallenen Mitochondrien kompensiert. Rossignol et al. (2003) nehmen an, daß eine starke Erhöhung der Aktivität von Atmungskettenkomplexen das Phänomen des *Biochemischen Schwellenwertes* (s. Pkt. 4.5.3) erklärt. Dieser Effekt wird als Reserve für die Kompensation von Defiziten genutzt.

In Übereinstimmung mit der Vermutung und den nachfolgend diskutierten, in dieser Arbeit erhobenen Daten konnten Frauwirth et al. (2002) an CD28-costimulierten T-Zellen eine 4fache Steigerung des Sauerstoffverbrauchs und demzufolge der OXPHOS beobachten. Dort war ebenfalls die Glykolyse durch Glukoseentzug unterdrückt. Diese kompensatorische Regulation der Bioenergetik war reflektiert von der Fähigkeit der Zellen, zu überleben und zu proliferieren. Nach Hinzugabe der *submaximalen* Myxothiazoldosis wurden noch wenige funktionsfähige, durch den Entkoppler FCCP stimulierbare Komplexe III bzw. Mitochondrien beobachtet (Abb. 27, 28). Der Sauerstoffverbrauch konnte aber über die *submaximale* Myxothiazoldosis hinaus nicht weiter gesenkt werden (Abb. 24, 25). Dies gab Anlass zu der o. g. Vermutung. Außerdem wird sich zwischen Myxothiazol und gehemmten Komplexen III bzw. Mitochondrien immer ein chemisches Gleichgewicht einstellen. Es gibt jedoch Variationen in der Anzahl Mitochondrien pro Lymphozyt (Tab. 12). Nach Andersen et al. (1970) enthalten einzelne PHA-stimulierte Lymphozyten sogar bis zu 200 an der Zahl. Die jeweils zugegebene Myxothiazoldosis stellt aber immer eine feste Größe dar (Zugabe bezogen auf die Zellzahl). So besteht die Möglichkeit, daß bei der *submaximalen* Myxothiazoldosis Zellen übrig geblieben sind, die nur begrenzt Myxothiazol-beeinträchtigt waren.

Um die *Hypothese 1* zu überprüfen, wurden die Zellen mit Myxothiazol auf die unterschiedlichen Niveaus der Atmungshemmung eingestellt, mit PMA und Ionomycin stimuliert und der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs über 6 h gemessen. Die Abbildung 21 zeigt, daß die CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf den unterschiedlichen Niveaus der Atmungshemmung in Anwesenheit von PMA und Ionomycin außerordentlich stark ihren Sauerstoffverbrauch steigern können. Die Steigerungsfaktoren lagen im Bereich des von Frauwirth et al. (2002) gefundenen (s. o.). Dies liefert einen Hinweis auf die Richtigkeit der *Hypothese 1* ebenso wie die Tatsache, daß nicht Myxothiazol-gehemmte Zellen ebenfalls diesen Effekt in abgeschwächter Form zeigten, weil PMA und Ionomycin den Sauerstoffverbrauch stimulieren werden. Krauss und Brand (2000) fanden bei Rattenthymozyten, daß 50 % der Antwort des Sauerstoffverbrauchs auf Con A über die PKC und 30 % über Calcineurin abgewickelt wurden, also über Botenstoffe, die durch PMA und Ionomycin aktiviert werden (Isakov und Altman 2002). Der überschießende



Effekt der Atmung ist aber auch bei den nicht PMA-Ionomycin-stimulierten, nur Myxothiazol-gehemmten Zellen zu beobachten. Diese Beobachtungen liefern Anhaltspunkte für einen Synergismus: Angetrieben sowohl durch die Myxothiazolhemmung als auch die gleichzeitige PMA-Ionomycin-Stimulation steigern die Zellen enorm ihren mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Dabei nimmt die Steigerung je Komplex III bzw. Mitochondrium sogar mit steigender Myxothiazoldosis zu und endet interessanterweise immer auf einem ähnlich hohen Niveau, das bei der *submaximalen* und stärkeren Myxothiazoldosen jedoch nicht mehr erreicht wurde. Das bedeutet also, daß immer weniger Komplexe III bzw. Mitochondrien immer mehr Arbeit zu leisten im Stande sind bis ein bestimmter kritischer Wert erreicht wird (Stichwort: *Biochemischer Schwellenwert*, s. Pkt. 4.5.3). In den Tabellen 16 und 17 ist dies anhand der Versuche im glukosefreien Medium verdeutlicht. Dort fiel die Kompensationsmöglichkeit der glykolytischen ATP-Gewinnung aus. Deshalb sind die Werte mit Sicherheit auf mitochondriale Atmung zurückzuführen. Die ATP-Menge wurde unter den in Punkt 3.6 genannten Voraussetzungen berechnet.

**Tab. 16:** Sechsstündiger Sauerstoffverbrauch (nmol) von  $10^7$  CD4+ T-Zellen unter glukosefreien Bedingungen

	Unstimuliert	Stimuliert	Differenz (stimuliert - unstimuliert)
100 % Atmung	779	1045	266
50 % Atmung	664	914	250
10 % Atmung	494	774	280
0 % Atmung <sup>1</sup>	355	450	95

<sup>1</sup>Nach der *submaximalen* Myxothiazoldosis sind aber noch durch FCCP entkoppelbare Komplexe III bzw. Mitochondrien vorhanden gewesen (Abb. 27, 28).

**Tab. 17:** Sechsstündiger Energieverbrauch ( $\mu$ mol ATP) von  $10^7$  CD4+ T-Zellen unter glukosefreien Bedingungen

	Unstimuliert	Stimuliert	Differenz (stimuliert - unstimuliert)
100 % Atmung	4,68	6,27	1,59
50 % Atmung	3,99	5,48	1,49
10 % Atmung	2,96	4,64	1,68
0 % Atmung <sup>1</sup>	2,13	2,70	0,57

<sup>1</sup>Nach der *submaximalen* Myxothiazoldosis sind aber noch durch FCCP entkoppelbare Komplexe III bzw. Mitochondrien vorhanden gewesen (Abb. 27, 28).

Nach den Tabellen 16 und 17 sind mindestens 450 nmol O<sub>2</sub>/6 h/10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. 2,70 μmol ATP/6 h/10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig, um das Überleben und die restliche Funktionalität der Zellen zu sichern (minimaler ATP-Bedarf) (vgl. Abb. 33-35). Wenn diese Werte unterschritten werden, gehen die Zellen in den nekrotischen Zustand über (Abb. 22). Ein durchschnittlich einzelnes, übrig gebliebenes Mitochondrium pro Zelle ist in der Lage, seinen Sauerstoffverbrauch und damit seine Energiesynthese um das 10fache gegenüber der anfänglichen Steigerungsfähigkeit zu erhöhen (Tab. 18). Dabei wurde angenommen, daß durch Myxothiazol die Mitochondrien immer nacheinander und vollständig funktionsunfähig gemacht werden. Auf dem Atmungsniveau von 0 %, das durch die *submaximale* Myxothiazoldosis erzeugt wurde, war dann höchstwahrscheinlich noch ein funktionsfähiges Mitochondrium übrig.

**Tab. 18:** Steigerung des Sauerstoffverbrauchs (fmol) von Mitochondrien in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, induziert durch PMA und Ionomycin

Atmungsniveau	Mitochondrien/Zelle <sup>1</sup>	Steigerung O <sub>2</sub> -Verbrauch/Mitochondrium
100 %	29	0,92
50 %	14,5	1,72
10 %	2,9	9,66
0 %	1	9,5

<sup>1</sup>Es wurde der Wert von Kirschner et al. (1972) zugrunde gelegt (Tab. 12). Der Wert von Nagy et al. (2004) war zu gering und deshalb nicht überzeugend. Er blieb hier unberücksichtigt.

In glukosefreiem Medium war der überschießende Effekt der Atmung noch stärker als in glukosehaltigem. Dies läßt auf Entlastung durch Energiegewinnung über die Glykolyse in glukosehaltigem Medium schließen, die ohnehin durch den Stimulus angetrieben gewesen sein wird. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß bei T-Zellen nicht nur der ATP-Bedarf aufgrund eines gesteigerten Verbrauchs (ATP/ADP-Ratio) Antriebskraft für eine gesteigerte Glykolyserate ist, sondern die direkte Stimulation des CD28-Rezeptors (Frauwirth et al. 2002). Die Beobachtung, daß die Kurven der nicht stimulierten Zellen in beiden Medien nahezu identisch verliefen (Abb. 21), ist ein weiteres Indiz dafür. Die *Hypothese 1* wurde noch dadurch untermauert, daß der überschießende Effekt der Atmung durch stärkere Myxothiazoldosen (*max1*, *max2*) fast vollständig unterdrückt werden konnte. Hierbei ist aber zu bedenken, daß dieser Effekt besonders im glukosefreien Medium überwiegend durch Eintreten von Zelltod verursacht wurde (Abb. 22).

Die *Hypothese 1* wird eindeutig favorisiert. Daneben kommen für die überschießende Reaktion des Sauerstoffverbrauchs bei Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch die nachfolgend diskutierten Ursachen in Frage (*Hypothesen 2-4*). Die *Hypothese 2* wird wegen der höheren Wahrscheinlichkeit, einen zusätzlichen Beitrag geleistet zu haben, detailliert diskutiert. Die *Hypothesen 3* und *4* sind eher unwahrscheinlich oder leisten, wenn doch möglich, nur einen sehr geringen zusätzlichen Beitrag.

Der metabolische Verdrängungseffekt (s. Pkt. 4.1) konnte als Ursache ausgeschlossen werden. Dazu wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert, die zuvor nicht auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$ /ml verdünnt wurden. Nach 3 h konnte ebenfalls der überschießende Effekt der Atmung beobachtet werden. Außerdem trat dieser Effekt bei unstimulierten Myxothiazol-unbehandelten Zellen nicht auf (Abb. 21).

### ***Hypothese 2: Gesteigerter oxidativer Metabolismus infolge ROS-Synthese-Aktivierung oder Zunahme des Sauerstoffverbrauchs als Maß der Superoxidbildung***

Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile) und B-Lymphozyten reagieren im Falle einer Aktivierung mit dem sog. *Oxidativen* oder *Respiratorischen Burst*, einem starken Anstieg ihres oxidativen Stoffwechsels. In dessen Ergebnis werden durch das Zellmembran-ständige Enzym *NADPH-Oxidase*, auch *Respiratory Burst Oxidase* genannt, ROS synthetisiert (Babior 1999, Jackson et al. 2004). Die so gebildeten ROS dienen im wesentlichen als Teil der angeborenen Immunität der antimikrobiellen Abwehr. Mit diesem Prozeß verbunden ist ein starker Anstieg des Sauerstoffverbrauchs.

Es gibt Berichte darüber, daß in PMA-aktivierten Lymphozyten und bestimmten Jurkat-Zelllinien der oxidative Stoffwechsel ebenfalls stimulierbar ist (Sekkat et al. 1988, Benichou et al. 1989, Rabesandratana et al. 1992, Chamulitrat 1999, Tatla et al. 1999). Rabesandratana et al. (1992) berichteten, daß ROS in unseparierten Leukozyten nicht nur von Neutrophilen und Monozyten, sondern in geringerem Maß auch in Lymphozyten generiert wurden. Diese Reaktion korrelierte mit der Aktivierung der PKC. Allerdings konnte PMA die ROS-Synthese in isolierten Lymphozyten nicht auslösen, dennoch aber in bestimmten Jurkat-Zelllinien (Sekkat et al. 1988, Benichou et al. 1989). Die Jurkatzellen zeigten isoliert zunächst keine Antwort. Sie konnten aber durch die Zugabe von Neutrophilen dazu angeregt werden, in Gegenwart von PMA ROS zu synthetisieren (Rabesandratana et al. 1992). Tatla et al. (1999) fanden einen starken und schnellen Anstieg der ROS-Aktivität in T-Zellen nach Aktivierung mit PMA in

Kombination mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor. Diese war auch reguliert durch die Anwesenheit von akzessorischen Zellen. Dagegen reichte die Gabe von PMA/Ionomycin bei isolierten T-Zellen aus, um einen schnellen intrazellulären Anstieg von ROS zu induzieren (Remans et al. 2004). Ebenso konnte Chamulitrat (1999) nachweisen, daß Lymphozyten nach PMA-Stimulation in der Lage sind, ROS zu bilden. Er konnte aber nicht genau zwischen B- und T-Zellen differenzieren, weil Lymphozyten aus Peyerschen Plaques und Lymphknoten des Mesenteriums verwendet wurden. Die Tatsache, daß in Myxothiazol-unbehandelten PMA-Ionomycin-stimulierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen ebenfalls die überschießende Reaktion des Sauerstoffverbrauchs beobachtet wurde (Abb. 21), könnte für einen vom Myxothiazol unabhängigen Effekt sprechen. Demzufolge wird hier die Hypothese des gesteigerten oxidativen Metabolismus infolge ROS-Synthese-Aktivierung oder anders formuliert die Hypothese der Zunahme des Sauerstoffverbrauchs als Maß der Superoxidbildung diskutiert. Der Effekt konnte aber durch die *max1*- und *max2*-Myxothiazoldosis in glukosehaltigem Medium deutlich abgeschwächt werden (Abb. 21). Hierbei ist aber zu bedenken, daß dieser Effekt besonders im glukosefreien Medium überwiegend durch Eintreten von Zelltod verursacht wurde (Abb. 22).

Nach Devadas et al. (2002) produzieren T-Lymphozyten ROS nach Stimulation ihres Antigen-Rezeptors, obwohl es bis dahin keine Hinweise auf die Expression des vollständigen NADPH-Oxidase-Komplexes in diesen Zellen gab (Babior 1992). Unter den bekannten Untereinheiten des Enzyms exprimieren sie dennoch eine, so daß in T-Zellen entweder ein alternativer NADPH-Komplex existent ist oder sie ROS über alternative Wege generieren können (Reth 2002). ROS gelten mittlerweile auch als wichtige sekundäre Botenstoffe bei der Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten (Tatla et al. 1999, Reth 2002, Kwon et al. 2003, Jackson et al. 2004, Williams und Kwon 2004). Sie sind dafür zwar nicht absolut notwendig (Tatla et al. 1999), könnten aber aufgrund des überaus starken PMA-Ionomycin-Stimulus in großen Mengen anfallen und so in den vorgestellten Experimenten den zellulären Sauerstoffverbrauch in die Höhe getrieben haben. Es gibt Berichte, nach denen das Influenza-Virus der weltweiten Grippewelle von 1918 deshalb so tödlich gewesen sein könnte, weil es einen *Oxidativen Burst* in den befallenen Lungenzellen induzierte, der zu einer Überreaktion des Immunsystems führte (Reth 2002). Insofern könnten ROS sowohl para- als auch autokrine Wirkung auf PMA-Ionomycin-stimulierte  $\text{CD4}^+$  T-Zellen haben und deren Sauerstoffverbrauch außerordentlich ansteigen lassen. Tatla et al. (1999) sprechen davon, daß die T-Zell-Aktivierung von gesteigerter metabolischer Aktivität und oxidativer Atmung begleitet wird und es möglich erscheint, daß die Produktion von ROS eine simple Begleiterscheinung der gesteigerten

Atmungsaktivität ist.

Die geäußerte Vermutung wird durch weitere Daten der Arbeit von Chamulitrat (1999) gestützt. Er konnte in Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit zeigen (Abb. 21), daß der Sauerstoffverbrauch von Lymphozyten infolge PMA-Stimulation um das 6fache anstieg. Dieser Anstieg fiel in glukosefreiem Medium noch stärker aus und konnte unabhängig von der Glukosekonzentration sogar noch weiter erhöht werden, wenn  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  hinzugefügt wurde.  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  wird in Anwesenheit von ROS zu  $^{\cdot}\text{OOSO}_3^-$  (Sulfit-Radikal) reduziert. Damit stellte Chamulitrat (1999) einen klaren Zusammenhang her zwischen der Stimulation des zellulären Sauerstoffverbrauchs bei Lymphozyten durch PMA aufgrund der gesteigerten Aktivität der NADPH-Oxidase. Der Autor konnte auch zeigen, daß sowohl ohne PMA-Stimulation als auch bei Glukoseentzug keine Radikalbildung möglich war. Nicht wie bei Neutrophilen, bei denen ein rascher Superoxid-Burst auftritt, begann die ROS-Synthese schleichend und war lang anhaltend (Chamulitrat et al. 1999). Dies würde auch erklären, warum in der vorliegenden Untersuchung die Zugabe von PMA und Ionomycin zu Beginn der Stimulation keinen (Daten nicht gezeigt) und erst nach 3 h einen deutlichen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch hatte (Abb. 21).

Weitere Beobachtungen von Chamulitrat et al. (1999) stützten die Ansicht, nach der während einer PMA-Stimulation Lymphozyten vermehrt Glukose im Pentosephosphatzyklus verwerten. In der ersten Reaktion des Zyklusses wird durch das Enzym *Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH)* Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphoglukonolaktone umgewandelt, wobei NADPH entsteht. Das NADPH wird anschließend durch die NADPH-Oxidase oxidiert. Dabei wird molekularer Sauerstoff zum Superoxidradikal reduziert. Insofern könnte der durch PMA verstärkt angetriebene Pentosephosphatzyklus vermehrt Substrat für die im unstimulierten Zustand ruhende NADPH-Oxidase in T-Lymphozyten liefern. Wu und Marliiss (1993) konnten an Peritonealmakrophagen von Ratten ebenfalls einen gesteigerten Pentosephosphatzyklus infolge PMA-Ionomycin-Stimulation beobachten, ebenso wie Sagone et al. (1974) an Lymphozyten infolge Mitogenstimulation. Sollte sich in zukünftigen Untersuchungen herausstellen, daß die Aktivität des Enzyms *G-6-P-DH* in PMA-Ionomycin-stimulierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen erhöht ist, so wäre dies ein zusätzliches Indiz für die Richtigkeit der *Hypothese 2*. Die mRNA des Enzyms SOD wird in PMA-Ionomycin-stimulierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen vermehrt exprimiert (Dziurla 2004). Dadurch wird die Hypothese gestützt. Auch im glukosefreien Medium wurde ein starker Anstieg des

Sauerstoffverbrauchs der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach PMA-Ionomycin-Stimulation beobachtet (Abb. 21). Deshalb mußte davon ausgegangen werden, daß die Glukose aus dem FCS den beschriebenen Mechanismus noch ermöglichen konnte. Zukünftig ist die Verfügbarkeit von Glukose durch Verwendung von dialysiertem FCS vollständig zu unterdrücken und anschließend zu prüfen, ob der beobachtete Effekt noch auftritt.

Neueste Untersuchungen zeigen, daß humane T-Zellen eine funktionelle Phagozyten-typische NADPH-Oxidase exprimieren, die nach TCR-Stimulation aktiviert wird (Jackson et al. 2004). Demnach verursacht TCR-Stimulation sogar drei separate Ereignisse, die in ROS-Generierung münden: (1) Schnell auftretende, vorübergehende und unabhängig von der NADPH-Oxidase auftretende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Synthese, (2) anhaltende und von der NADPH-Oxidase abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Synthese und (3) zeitverzögerte Superoxidsynthese, die abhängig von FasL-Fas war.

Diese *Hypothese 2* würde bedeuten, daß die Energiesynthese vollständig unterdrückt werden kann, die spezifischen Immunfunktionen aber dennoch erhalten bleiben. Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch infolge der aktivierten NADPH-Oxidase dient nicht der oxidativen Energiesynthese, stellt also keinen Kompensationsmechanismus dar.

Die Hypothese widerspricht aber aus mehreren Gründen *nur scheinbar* dem Befund, daß HIF-1 $\alpha$  in Anwesenheit von Myxothiazol und PMA/Ionomycin nicht stabilisiert wurde, weil Myxothiazol die ROS-Synthese am Komplex III der mitochondrialen Atmungskette blockiert (s. Pkt. 4.9). Die überschießende Reaktion des Sauerstoffverbrauchs ist nicht Ausdruck einer ROS-Synthese, die für die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  ausreicht. Anhaltspunkte dafür sind die Stabilisierung des Faktors in unstimulierten sowie PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 41) und die vollständige Degradation in PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter normoxischen Bedingungen (Dziurla 2004). Die unter Hypoxie gesteigerte Bildung von ROS an Komplex III ist also entscheidend für die HIF-1 $\alpha$ -Anreicherung in den Zellen. Die PMA-Ionomycin-Stimulation hat unter hypoxischen Bedingungen nur einen additiven Effekt. Nach neuesten Berichten ist es darüber hinaus unwahrscheinlich, daß die hier diskutierte ROS-Synthese der Phagozyten-typischen NADPH-Oxidase überhaupt an der Regulation von HIF-1 beteiligt ist (Goyal et al. 2004). Dafür wird eher die ROS-Synthese durch sog. *low-output*-Isoformen von NADPH-Oxidasen verantwortlich gemacht, besonders die von Nox1 (Goyal et al. 2004).

Aufgrund der soeben diskutierten Arbeiten und der nicht 100%igen Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

in den PMA-Ionomycin-Experimenten der vorgestellten Arbeit (Abb. 9, 10), ist die Möglichkeit der gesteigerten ROS-Synthese als Ursache des überaus starken Anstiegs des Sauerstoffverbrauchs der Zellen zu diskutieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte in zukünftigen Experimenten dieser Art zunächst die 100%ige Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Optimierung der magnetisch aktivierten Zellsortierung sichergestellt werden. Weiterhin sollten durchflußzytometrische Analysen durchgeführt werden, um die Sauerstoffmetabolitensynthese in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach PMA-Ionomycin-Stimulation direkt zu untersuchen. Die dafür notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe sind kommerziell erhältlich. Liesse sich die ROS-Synthese in isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge einer PMA-Ionomycin-Stimulation nachweisen, so könnte dies darüber hinaus die abnormale Expression von Genen reflektieren, die normalerweise nur in Phagozyten aktiviert werden.

Abschließend soll für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein Experiment zur Stützung der *Hypothese 2* vorgestellt werden, das von Udilova (1999) an PMN zum Nachweis von Superoxidradikalen durchgeführt wurde: Da Zellen Sauerstoff auch ohne Stimulierung verbrauchen, wurde zuerst die Basalatmung gemessen. Kurz nach Zugabe von PMA nahm der Sauerstoffverbrauch stark zu. Opsoniertes Zymosan zur Stimulierung der Radikalbildung hatte einen qualitativ identischen Effekt. Da aber weder 2,4-Dinitrophenol (Entkoppler) noch Zyanid die Zunahme des zellulären Sauerstoffverbrauchs beeinflussen konnten, wurde diese als von der mitochondrialen Atmung unabhängig angesehen. Dagegen konnte durch Diphenyliodoniumchlorid, einem Inhibitor der Superoxidradikal-produzierenden NADPH-Oxidase, der Sauerstoffverbrauch vollkommen gehemmt werden. Demzufolge wurde der erhöhte Sauerstoffverbrauch bei der Aktivierung von PMN als Folge der Bildung von Superoxidradikalen interpretiert. Die Basalatmung wurde vom Sauerstoffverbrauch während des *Respiratorischen Burst* subtrahiert und die so errechnete Differenz als Maß der Superoxidbildung betrachtet.

***Hypothese 3: Gesteigerter oxidativer Metabolismus infolge RNS-Synthese-Aktivierung (RNS oder NOS = Reactive Nitrogen Species)***

In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, ob die gesteigerte Synthese von NOS zu einem gesteigerten Verbrauch von Sauerstoff führt und so den Anstieg des Sauerstoffverbrauchs während der PMA-Ionomycin-Stimulation (Abb. 21) erklärt. Für Phagozyten (Granulozyten, Monozyten) ist bekannt, daß bei der Phagozytose der Sauerstoffverbrauch durch Aktivierung der NADPH-Oxidase steil ansteigt. Es entstehen große Mengen von Superoxidradikalen, die zytotoxisch wirken. In beträchtlichem Maß wird aber zusätzlich auch das sehr reaktive,

zytotoxische NO gebildet, das durch Nitrosylierung und Peroxidbildung phagozytiertes Material angreift und degradiert. NO wird aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff durch die NO-Synthetase in nahezu allen Säugetierzellen generiert (Nisoli et al. 2004). Paradoxerweise kann NO nützliche und zellschädigende Wirkungen auslösen. Entweder agiert es als direkter Botenstoff oder ist indirekt toxisch, weil es mit Superoxid zu Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) umgewandelt wird.  $\text{ONOO}^-$  weist verschiedene zellschädigende Wirkungen auf wie z. B. die irreversible Hemmung der Atmung und die Schädigung von Enzymen und mitochondrialen Atmungskettenkomplexen. Beide Effekte können simultan auftreten. Nagy et al. (2003) konnten zeigen, daß eine *anti-human* CD3/CD28-Stimulation von T-Zellen zu einer gesteigerten Expression der endothelialen (eNOS) und neuronalen, nicht aber der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) sowie einer vermehrten Produktion von NO führt. Ebenso induzierte eine PMA-Ionomycin-Stimulation von Lymphozyten eine starke Steigerung der NO-Synthese (Valdez und Boveris 2001). Da für die Synthese von NO Sauerstoff benötigt wird, könnte daraus ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch während der Stimulation resultieren, der nicht für die Synthese von ATP verbraucht wird. In neueren Arbeiten wurde NO als ein Schlüsselsignal erkannt, daß die mitochondriale Atmung (Brown 1999) und Biogenese (Nisoli et al. 2003, Nagy et al. 2004) reguliert und so die Zellaktivierung und -proliferation absichert. NO blockiert reversibel die Cytochrom c-Oxidase, Komplex IV der Atmungskette, in Konkurrenz mit Sauerstoff. Demzufolge hat die Hemmung der NO-Synthetase die Stimulierung der Gewebe- und gesamten Körperatmung zur Folge (Brown 1999).

#### ***Hypothese 4: Mitochondriale Biogenese***

Der bedeutende bioenergetische Prozeß der ATP-Synthese findet in Organellen statt, die nicht statisch sind. Mitochondrien befinden sich innerhalb der Zelle in steter Bewegung. Dabei finden ständig verschiedene Fusions- und Teilungsprozesse statt (Nisoli et al. 2004). Dieser hohe Grad von Plastizität wird von Variationen in Größe, Anzahl und Masse der Mitochondrien begleitet, die in komplexen Prozessen durch eine Vielzahl von physiologischen Stimuli und Differenzierungsstadien ausgelöst werden. Mitochondrien sind in der Lage, zu dem Ort des größten zellulären Energiebedarfs zu wandern.

Eine Erklärung des starken Anstiegs des Sauerstoffverbrauchs nach PMA-Ionomycin-Stimulation bei  $\text{CD4}^+$  T-Zellen könnte demzufolge auch in der mitochondrialen Biogenese zu suchen sein. Auf diese Art werden neue, funktionstüchtige Atmungskettenkomplexe bereitgestellt, die selbst wiederum durch den Stimulus angetrieben werden. Nisoli et al. (2004)



berichten, daß es drei Möglichkeiten der mitochondrialen Biogenese gibt. Die wichtigste ist das Wachstum und die Teilung von präexistierenden Mitochondrien. Weiterhin kommen die *de novo* Synthese aus submikroskopischen Vorgängern im Zytoplasma und die Bildung aus anderen Membranstrukturen der Zelle vor.

Die mitochondriale Teilung kann durch eine Vielzahl von Substanzen induziert werden. Dazu gehören Hemmstoffe des Sauerstoffverbrauchs bzw. der OXPHOS, Kalziumeinstrom-Regulatoren, Phorbolster und Mitogene. Bei den Hemmstoffen des Sauerstoffverbrauchs bzw. der OXPHOS handelt es sich beispielsweise um Stickstoffmonoxid (Nisoli et al. 2003, Fiorucci et al. 2004, Nagy et al. 2004), Benzodiazepine (Vorobjev und Zorov 1983) und den Entkoppler 2,4-Dinitrophenol (Kawahara et al. 1991). Nach Andersen et al. (1970) hatte die Zellgröße, nicht aber die Sauerstoffkonzentration einen Einfluß auf die mittlere Anzahl von Mitochondrien pro PHA-stimuliertem Blutlymphozyt. Insofern wäre denkbar, daß durch die Anwesenheit von Myxothiazol die Bildung neuer Mitochondrien während der sechsständigen PMA-Ionomycin-Stimulation induziert wird, um dem Energieverlust entgegenzuwirken. Es waren ohnehin nicht alle Mitochondrien durch die *submaximale* Myxothiazoldosis gehemmt, weil mit anschließender FCCP-Entkopplung eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet wurde (Abb. 27, 28). Mitochondrien können sich in lebenden Zellen innerhalb kürzester Zeit (2-3 h) infolge der Behandlung mit Atmungskettenhemmstoffen reversibel fragmentieren (Vorobjev und Zorov 1983, Lyamzaev et al. 2004) oder schnell (innerhalb der ersten 2 h nach Belüftung) in Zellen wiedererscheinen, die aufgrund anaerober Kultivierung keine Mitochondrien mehr enthalten (Andersen et al. 1970). Darüber hinaus könnte demzufolge die PMA-Ionomycin-Stimulation selbst eine mitochondriale Biogenese einleiten, weil Phorbolster und Kalziumeinstrom-Regulatoren dazu in der Lage sind (Nisoli et al. 2004).

Van den Bogert et al. (1989) berichten, daß während der Aktivierung von Thymozyten mit Con A mitochondriale Biogenese eingeleitet wird, um ausreichend ATP für die energiepflichtige Blastogenese bereitzustellen. Die Zellen wurden bis zu 50 h mit dem Mitogen kultiviert. Nach Andersen et al. (1972) erhöht sich die mittlere Anzahl von 29 Mitochondrien pro Blutlymphozyt um mehr als das Doppelte, wenn sie in Anwesenheit des Mitogens PHA für 48 h kultiviert werden. Dabei enthalten manche Lymphozyten bis zu 200 Mitochondrien. Auch Douglas et al. (1973) beobachteten einen Mitogen-induzierten Anstieg der Mitochondrienanzahl in Lymphozyten. Ob mitochondriale Biogenese auch eine Ursache ist für die Hochregulation des Sauerstoffverbrauchs in Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten und im übrigen

auch -unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 21), müssen zukünftige Untersuchungen klären. Beispielsweise könnten ultrastrukturelle Analysen von Myxothiazol-gehemmten PMA-Ionomycin-stimulierten und -unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemacht werden. Parallel dazu bliebe nach Nisoli et al. (2004) außerdem herauszufinden, ob die NO-induzierte mitochondriale Biogenese überhaupt funktionell relevant ist für den Sauerstoffverbrauch und die Zellatmung.

In glukosefreiem Medium war der überschießende Effekt des Sauerstoffverbrauchs besonders stark ausgeprägt (Abb. 21). Hier könnte mitochondriale Biogenese infolge Glukosemangel, wie er von Weber et al. (2002) beobachtet und als Kompensation der verminderten Versorgung mit glykolytischem ATP vermutet wurde, einen zusätzlichen Beitrag geleistet haben. Denkbar ist auch, daß die Zellen, die deutlich mehr Mitochondrien enthalten als der Durchschnitt, auch deutlich weniger anfällig sind für die eingesetzten Myxothiazolkonzentrationen (*Hypothese 1*). Myxothiazol wird im Mittel möglicherweise immer eine bestimmte Anzahl der vorhandenen Mitochondrien einer Zelle nacheinander vollständig funktionsunfähig machen bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Somit wären dann immer Zellen übrig, in denen vollständig funktionsfähige Mitochondrien vorhanden sind, die für die Sicherstellung der Energieanforderungen während der Stimulation sorgen, teilungsfähig sind und das Alles-oder-Nichts-Prinzip (s. Pkt. 4.5.3) der Zytokinsynthese ermöglichen.

Gegen die *Hypothese 4* spricht jedoch folgendes, durchgeführtes Experiment (Abb. 23): Nach 3 h PMA-Ionomycin-Stimulation wurde zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Entkoppler FCCP gegeben. Wenn bis dahin mitochondriale Biogenese stattgefunden hätte, müßte eine Entkopplung und demzufolge ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs über den überschießenden Effekt hinaus zu verzeichnen gewesen sein. Dies war jedoch nicht der Fall. *Hypothese 4* ist aber dadurch nicht vollständig zu entkräften, weil PMA und Ionomycin sofort die neu gebildeten Mitochondrien zur Maximalleistung angetrieben haben könnten, so daß FCCP keine Wirkung zeigte.

Abschließend soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die NO-induzierte mitochondriale Biogenese die unbeeinträchtigte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *anti-human* CD3/CD28-Stimulation (s. auch Pkt. 3.4, 4.6 u. Abb. 36, 37) zusätzlich erklären könnte. Mit der Proliferation von Lymphozyten ist die mitochondriale Biogenese verbunden und damit die Aktivitätssteigerung von Atmungskettenkomplexen sowie deren *de novo* Synthese (van den Bogert et al. 1988, 1989). Wahrscheinlich wird infolgedessen der zelluläre Sauerstoffverbrauch ansteigen. Ein Indiz für eine NO-vermittelte mitochondriale Biogenese infolge CD3/CD28-Stimulation war die Blastenbildung und die Zunahme der Granularität der Zellen in der

durchflußzytometrischen Analyse der Proliferation (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist im Verlauf der durchgeführten Proliferationsexperimente durch die mitochondriale Biogenese das Verhältnis zwischen initial zugegebener Myxothiazolmenge und den Komplexen III so gering geworden, daß Myxothiazol den Sauerstoffverbrauch nicht mehr blockieren konnte. In zukünftigen Untersuchungen müßte demzufolge Myxothiazol im Verlauf des Experiments immer wieder appliziert werden, um den Effekt einer unterdrückten OXPHOS über die Dauer von 96 h konstant aufrechtzuerhalten. Bei der in diesem Abschnitt genannten Vermutung würde es sich in Hinsicht auf die *Hypothese 2* um einen für die oxidative Energiesynthese notwendigen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs handeln und nicht um einen wie möglicherweise bei der PMA-Ionomycin-Stimulation durch die induzierte ROS-Synthese gesteigerten. Gestützt wird dies durch die Tatsache, daß es bei T-Zellen nicht möglich war, eine ROS-Synthese durch eine PMA/CD28- oder CD3/CD28-Stimulation zu induzieren, aber dennoch eine starke T-Zell-Aktivierung (Tatla et al. 1999).

## 5 Zusammenfassung

Immunzellen haben einen steten Energiebedarf für sowohl lebenserhaltende als auch immunspezifische Funktionen. ATP, die hauptsächliche zelluläre Energieform, wird überwiegend durch die OXPHOS über die Atmungskette der Mitochondrien gewonnen, aber auch durch die zytosolische Glykolyse. Dazu werden von Lymphozyten und Monozyten in erster Linie Sauerstoff, Glukose und bei Glukosemangel Aminosäuren verstoffwechselt. In der vorgestellten Untersuchung konnte erfolgreich ein vierfaktorielles *in vitro* Modell entwickelt werden, daß die Situation in Gebieten mit verminderten Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen vereinfacht nachstellte: In (1) hochgereinigten humanen peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde (2) mittels des Atmungskettenhemmstoffs Myxothiazol die zelluläre Sauerstoffverwertung gehemmt und damit Sauerstoffmangel nachgeahmt. (3) Während der Zellaktivierung mit dem Phorbolster PMA und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin, immobilisierten CD3- und löslichen CD28-Antikörpern und opsonierten *Escherichia coli*-Bakterien wurde (4) die Konzentration von Glukose, dem wichtigsten nutritiven Substrat der Zellen, variabel gestaltet. Mit dem Modell wurde der Frage nachgegangen, wie Immunzellen gesunder Blutspender auf veränderte Bedingungen ihrer zellulären Mikroumgebung reagieren und welche spezifischen Funktionen in welchem Umfang durch Energiemangel beeinträchtigt werden.

Beide Zellarten zeigten einen ausgeprägten Crabtree-Effekt. Dieser äußerte sich in einem Ruhesauerstoffverbrauch von 2,34 bzw. 2,18 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 6,05 bzw. 4,55 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen bei den CD14<sup>+</sup> Monozyten in jeweils glukosefreiem bzw. glukosehaltigem Zellkulturmedium. Darüber hinaus verfügen die Zellen über ein unerwartet hohes adaptatives Potential, spezifische Funktionen unter massiv eingeschränkten energetischen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Überraschenderweise zeigte sich nur bei gleichzeitig vorliegendem Sauerstoff- und Glukosemangel eine signifikante Beeinträchtigung der PMA-Ionomycin-induzierten Zytokinsynthese und CD3/CD28-stimulierten Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie der monozytären Phagozytoseaktivität. War Glukose verfügbar, kompensierte die glykolytische ATP-Gewinnung die vollständig unterdrückte Energiesynthese aus der OXPHOS und die Funktionen waren nicht beeinträchtigt.

In Untersuchungen der mRNA- und Proteinexpression der  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurde festgestellt, daß der maßgeblich an der Umschaltung auf den anaeroben Energiestoffwechsel beteiligte Faktor nicht entscheidend sein konnte für die

Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung in PMA-Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei vollständig unterdrückter Energiesynthese über die OXPHOS.

Beim Vergleich mit den anderen untersuchten Immunfunktionen nahm die Proliferation den höchsten Rang in der Abhängigkeit von der glykolytischen Energiegewinnung ein. Der Entzug von Glukose bewirkte eine mittlere Beeinträchtigung um 62,6 %. Die Phagozytose war durch Glukoseentzug um 40,9 % reduziert. Für die Zytokinsynthese konnte unter diesen Bedingungen kein statistisch signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Die Hierarchie der Abhängigkeit der untersuchten Immunfunktionen von der OXPHOS gestaltete sich anders. Hier stand die Zytokinsynthese an erster Stelle mit 81,9 % für IL-2, 67,7 % für TNF- $\alpha$  und 57,9 % für IL-4. Danach folgten die Proliferation mit 56,4 % und die Phagozytose mit 31,3 %. Die IFN- $\gamma$ -Synthese lag, leicht abweichend von den anderen Zytokinen, mit 54,2 % knapp hinter der Proliferation. Bei den IL-2-, TNF- $\alpha$ - und IL-4-Produzenten konnte ein Alles-oder-Nichts-Prinzip hinsichtlich der Abhängigkeit der Zytokinsynthese von der Energieverfügbarkeit beobachtet werden: Bei zunehmendem Energiemangel stellte die stimulierte Zelle die Zytokinsynthese entweder vollständig ein oder sie wurde konstant gehalten. Dagegen waren CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage, die Intensität der IFN- $\gamma$ -Synthese vor ihrer vollständigen Einstellung zu reduzieren.

Bei der Erfassung des Sauerstoffverbrauchs auf unterschiedlichen Niveaus während der PMA-Ionomycin-Stimulation zeigte sich eine Verzehnfachung der anfänglichen Steigerungsfähigkeit eines einzelnen Mitochondriums. Durch Integralrechnung konnte der minimale Sauerstoffbedarf von 450 nmol O<sub>2</sub>/10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt werden, der Überleben und Restfunktionalität sicherte. Daraus errechnete sich ein Energiebedarf von 2,70  $\mu$ mol ATP/10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der OXPHOS. Unter glykolytischen Bedingungen wurde ein minimaler Energiebedarf von 1,67  $\mu$ mol ATP/10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Zur Differenzbildung trug die glykolytische ATP-Gewinnung bei, die an der Absicherung der vollständigen Funktionalität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt war.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1996): Immunologie (übersetzt von Stadler BM und Hess M), Bern, Verlag Hans Huber, S. 203.

Altman A, Mally MI, Isakov N (1992): Phorbol ester synergizes with Ca<sup>2+</sup> ionophore in activation of protein kinase C (PKC)alpha and PKC beta isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions, *Immunology* 76(3): 465-471.

Altman A, Mustelin T, Coggeshall KM (1990): T lymphocyte activation: a biological model of signal transduction, *Crit Rev Immunol* 10(4): 347-391.

Andersen V, Birch-Andersen A, Skovbjerg H, Hellung-Larsen P (1970): Number and structure of mitochondria in lymphocytes cultured at different oxygen tensions, *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 78(5): 537-544.

Arai T, Yamada H, Namba T, Mori H, Ishii H, Yamashita K, Sasada M, Makino K, Fukuda K (2004): Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions, *Biochem Pharmacol* 67(6): 1185-1193.

Ardawi MS (1988): Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes, *Metabolism* 37(1): 99-103.

Aulwurm UR and Brand KA (2000): Increased formation of reactive oxygen species due to glucose depletion in primary cultures of rat thymocytes inhibits proliferation, *Eur J Biochem* 267(18): 5693-5698.

Authier F, Posner BI, Bergeron JJ (1996): Endosomal proteolysis of internalized proteins, *FEBS Lett* 389(1): 55-60.

Babior BM (1999): NADPH oxidase: an update, *Blood* 93(5): 1464-1476.

Babior BM (1992): The respiratory burst oxidase, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65: 49-95.

Baierlein JL and Foster JM (1968): Studies on the energy metabolism of human leukocytes. II. Mechanism of the Pasteur effect in human leukocytes, *Blood* 32(3): 412-422.

Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M (2001): Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation, *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2): 303-313.

Benichou G, Kanellopoulos JM, Mitenne F, Galanaud P, Leca G (1989): T-cell chemiluminescence. A novel aspect of T-cell membrane activation studied with a Jurkat tumour cell line, *Scand J Immunol* 30(2): 265-269.

Bental M and Deutsch C (1993): Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes, *Magn Reson Med* 29(3): 317-326.

Berridge MJ (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling, *Nature* 361(6410): 315-325.

Bielka H (1963): Metabolism of the leukocytes of virus-induced leukemia. IV. The Crabtree effect, *Z Krebsforsch* 65: 196-200.

- Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O (1999): Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4): 870-876.
- Bondeson K and McCabe M (1992): Apparent heterogeneity between leukemic lymphocyte cell lines, *Adv Exp Med Biol* 316: 393-398.
- Borsook H, Jiggins S, Wilson RT (1971): Two inducers of rapid erythroblast multiplication in vitro, *Nature* 230(5292): 328-330.
- Böyum A (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77-89.
- Brand K (1997): Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield, *J Bioenerg Biomembr* 29(4): 355-364.
- Brand K, Leibold W, Lupp A, Schoerner C, Schulz A (1986): Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines: evaluation of glucose and glutamine metabolism, *Immunobiology* 173(1): 23-34.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M (2004): Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(3): R491-R497.
- Brown GC (1999): Nitric oxide and mitochondrial respiration, *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 351-369.
- Bruick RK and McKnight SL (2001): A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science* 294(5545): 1337-1340.
- Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE (2003): Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy, *Am J Pathol* 163(4): 1233-1243.
- Buttgereit F and Brand MD (1995): A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells, *Biochem J* 312 (Pt 1): 163-167.
- Buttgereit F, Brand MD, Müller M (1992): ConA induced changes in energy metabolism of rat thymocytes, *Biosci Rep* 12(5): 381-386.
- Buttgereit F, Brand MD, Müller M (1993): Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and ConA-stimulated thymocytes of the rat, *Biosci Rep* 13(1): 41-52.
- Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD (2000): Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects, *Immunol Today* 21(4): 192-199.
- Buttgereit F, Müller M, Rapoport SM (1991): Quantification of ATP-producing and consuming processes in quiescent pig spleen lymphocytes, *Biochem Int* 24(1): 59-67.
- Calder PC (1995): Fuel utilization by cells of the immune system, *Proc Nutr Soc* 54(1): 65-82.
- Calder PC and Kew S (2002): The immune system: a target for functional foods?, *Br J Nutr* 88 Suppl 2: 165-177.

- Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky MV (2001): Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions, *J Immunol* 167(11): 6140-6149.
- Chamulitrat W (1999): Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite, *Free Radic Biol Med* 27(3-4): 411-421.
- Chamulitrat W, Miller HI, McDonough KH (1999): Priming of Peyer's patch lymphoid cells by hemorrhagic shock and resuscitation to produce superoxide radical, *Shock* 11(2): 136-142.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing, *J Biol Chem* 275(33): 25130-25138.
- Chun YS, Lee KH, Choi E, Bae SY, Yeo EJ, Huang LE, Kim MS, Park JW (2003): Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  isoform: implications for tumor promotion, *Cancer Res* 63(24): 8700-8707.
- Chvapil M, Stankova L, Bernhard DS, Weldy PL, Carlson EC, Campbell JB (1977): Effect of zinc on peritoneal macrophages in vitro, *Infect Immun* 16(1): 367-373.
- Cline MJ and Lehrer RI (1968): Phagocytosis by human monocytes, *Blood* 32(3): 423-435.
- Conforti L, Petrovic M, Mohammad D, Lee S, Ma Q, Barone S, Filipovich AH (2003): Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation, *J Immunol* 170(2): 695-702.
- Crabtree HG (1929): Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem J* 23: 536-545.
- Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS (2003): HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation, *Cell* 112(5): 645-657.
- Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR (2002): Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity, *Crit Care Med* 30(2): 276-284.
- Crowley JP, Skrabut EM, Valeri CR (1975): The determination of leukocyte phagocytic oxidase activity by measurement of the initial rate of stimulated oxygen consumption, *J Lab Clin Med* 86(4): 586-594.
- Culic O, Gruwel ML, Schrader J (1997): Energy turnover of vascular endothelial cells, *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): C205-C213.
- Culvenor JG and Weidemann MJ (1976): Phytohaemagglutinin stimulation of rat thymus lymphocytes glycolysis, *Biochim Biophys Acta* 437(2): 354-363.
- Davey GP and Clark JB (1996): Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria, *J Neurochem* 66(4): 1617-1624.
- Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS (2002): Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression, *J Exp Med* 195(1): 59-70.



- Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO (2002): Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11796-11801.
- Distler JH, Wenger RH, Gassmann M, Kurowska M, Hirth A, Gay S, Distler O (2004): Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 50(1): 10-23.
- Doenecke C (1973): In vitro studies on glycogen metabolism of blood lymphocytes, *Verh Dtsch Ges Inn Med* 79: 534-536.
- Douglas SD, Cohnen G, König E, Brittinger G (1973): Ultrastructural features of phytohemagglutinin and concanavalin A-responsive lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia, *Acta Haematol* 50(3): 129-142.
- Dziurla R (2004): Untersuchung zur Wirkung von Hypoxie auf Energiehaushalt und bioenergetisch relevante Funktionen von Immunzellen, Dissertation, *in preparation*, Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Eagle H (1955): Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB, *Proc Soc Exp Biol Med* 89(3): 362-364.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001): *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell* 107(1): 43-54.
- Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE (2000): Micronutrients and innate immunity, *J Infect Dis* 182 Suppl 1: 5-10.
- Farge G, Touraille S, Debise R, Alziari S (2002): The respiratory chain complex thresholds in mitochondria of a *Drosophila subobscura* mutant strain, *Biochimie* 84(12): 1189-1197.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K (1997): Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65, *J Cell Biol* 139(7): 1635-1643.
- Fink MP (2002): Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration?, *Crit Care Clin* 18(1): 165-175.
- Fiorucci S, Mencarelli A, Distrutti E, Baldoni M, del Soldato P, Morelli A (2004): Nitric oxide regulates immune cell bioenergetic: a mechanism to understand immunomodulatory functions of nitric oxide-releasing anti-inflammatory drugs, *J Immunol* 173(2): 874-882.
- Fleischmann W und Kubowitz F (1927): Über den Stoffwechsel von Leucozyten, *Biochem Z* 181: 395-399.
- Frauwirth KA and Thompson CB (2004): Regulation of T lymphocyte metabolism, *J Immunol* 172(8): 4661-4665.
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB (2002): The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism, *Immunity* 16(6): 769-777.

- Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgereit F (2004): Hypoxia inducible factor (HIF) in Rheumatology: LOW O2! SEE WHAT HIF CAN DO!, *Ann Rheum Dis*, *in revision*.
- Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhof C, Redl H, Werdan K, Zierz S (2002): Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits, *Biosci Rep* 22(1): 99-113.
- Germann T, Szeliga J, Hess H, Storkel S, Podlaski FJ, Gately MK, Schmitt E, Rude E (1995): Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 4823-4827.
- Glasser L and Fiederlein RL (1990): The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal, *Am J Clin Pathol* 93(5): 662-669.
- Gleichmann U and Lübbers DW (1960): Measurement of the oxygen tension in gases and fluids with the Pt-electrode with special reference to measurement in the blood, *Pfügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 271: 431-455.
- Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrant HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W, Hänze J (2004): Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species, *Free Radic Biol Med* 36(10): 1279-1288.
- Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel PM (1996): Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency, *Immunol Today* 17(9): 429-435.
- Grützkau A (2003), Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin, *unpublished data*.
- Gunzer U, Gerner P, Nurnberger R, Horl WH (1978): Glycogen metabolism in isolated peripheral lymphocytes and thrombocytes in hair cell leukemia (HCL), chronic myelocytic leukemia (CML) and normal controls, *Verh Dtsch Ges Inn Med* 84: 190-196.
- Guppy M, Greiner E, Brand K (1993): The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes, *Eur J Biochem* 212(1): 95-99.
- Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S (2003): Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha, *Science* 302(5652): 1975-1978.
- Hedekov CJ and Esmann V (1966): Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes, *Blood* 28(2): 163-174.
- Hedfors E, Holm G, Pettersson D (1975): Activation of human peripheral blood lymphocytes by concanavalin A dependence of monocytes, *Clin Exp Immunol* 22(2): 223-229.
- Hem E (1979): Modulation by macrophages of lymphocyte responses to phytohaemagglutinin, concanavalin A and semiallogeneic cells, *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 87C(1): 17-21.
- Hossain MA, Bouton CM, Pevsner J, Laterra J (2000): Induction of vascular endothelial growth factor in human astrocytes by lead. Involvement of a protein kinase C/activator protein-1 complex-dependent and hypoxia-inducible factor 1-independent signaling pathway, *J Biol Chem* 275(36): 27874-27882.

- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7987-7992.
- Hume DA, Radik JL, Ferber E, Weidemann MJ (1978): Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation, *Biochem J* 174(3): 703-709.
- Isakov N and Altman A (2002): Protein kinase C(theta) in T cell activation, *Annu Rev Immunol* 20: 761-794.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998): Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha, *Genes Dev* 12(2): 149-162.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS (2004): T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation, *Nat Immunol* 5(8): 818-827.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry, *J Immunol Methods* 159(1-2): 197-207.
- Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L (2003): Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation, *Biochem J* 370(Pt 3): 1011-1017.
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999): Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway, *J Biol Chem* 274(10): 6519-6525.
- Kato H and Walz W (2000): The initiation of the microglial response, *Brain Pathol* 10(1): 137-143.
- Kawaguchi T, Veech RL, Uyeda K (2001): Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate, *J Biol Chem* 276(30): 28554-28561.
- Kawahara H, Houdou S, Inoue T (1991): Scanning electron microscopic observations on muscle cells of experimental mitochondrial myopathy produced by 2, 4-dinitrophenol, *J Submicrosc Cytol Pathol* 23(3): 397-403.
- Kay NE, Bumol TF, Douglas SD (1980): Effects of 2-deoxy-D-glucose on human monocyte metabolism and function, *J Reticuloendothel Soc* 28(4): 367-379.
- Kelleter R, Seiler D, Drings P (1973): Glycogen metabolism of blood lymphocytes of patients with chronic lymphatic leukemia, *Verh Dtsch Ges Inn Med* 79: 538-541.
- Kempner W (1939): The nature of leukemic blood cells as determined by their metabolism, *J Clin Invest* 18: 291-300.
- Keusch GT (2003): The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity, *J Nutr* 133(1): 336S-340S.
- Kirschner RH, Getz GS, Evans AE (1972): Leukocyte mitochondria: function and biogenesis, *Enzyme* 13(1): 56-76.

- Kittlick PD (1986): Inflammation, glycolytic metabolism, and glycosaminoglycans, *Exp Pathol* 30(1): 1-19.
- Kivisaari J (1975): Oxygen and carbon dioxide tensions in healing tissue, *Acta Chir Scand* 141(8): 693-696.
- Kojima H, Sitkovsky MV, Cascalho M (2003): HIF-1 alpha deficiency perturbs T and B cell functions, *Curr Pharm Des* 9(23): 1827-1832.
- Krauss S and Brand MD (2000): Quantitation of signal transduction, *FASEB J* 14(15): 2581-2588.
- Krauss S, Brand MD, Buttgerit F (2001): Signaling takes a breath - new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction, *Immunity* 15(4): 497-502.
- Krauss S, Buttgerit F, Brand MD (1999): Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism, *Biochim Biophys Acta* 1412(2): 129-138.
- Kuhnke A (2000): Bilanzierung des lymphozytären Energiestoffwechsels von Patienten mit entzündlich - rheumatischen Erkrankungen, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät Charité.
- Kuhnke A, Burmester GR, Krauss S, Buttgerit F (2003): Bioenergetics of immune cells to assess rheumatic disease activity and efficacy of glucocorticoid treatment, *Ann Rheum Dis* 62(2): 133-139.
- Kumagai N, Benedict SH, Mills GB, Gelfand EW (1987): Requirements for the simultaneous presence of phorbol esters and calcium ionophores in the expression of human T lymphocyte proliferation-related genes, *J Immunol* 139(5): 1393-1399.
- Kuna GB, Collipp PJ, Katkocin D, Sherwyn J, Amin S, Maddaiah VT (1979): Effect of growth hormone on lymphocyte respiration and growth rate of children, *Metabolism* 28(12): 1239-1243.
- Kwon J, Devadas S, Williams MS (2003): T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and Ick serine phosphorylation, *Free Radic Biol Med* 35(4): 406-417.
- Lakin-Thomas PL and Brand MD (1988): Stimulation of respiration by mitogens in rat thymocytes is independent of mitochondrial calcium, *Biochem J* 256(1): 167-173.
- Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA (2003): Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP, *J Immunol* 170(6): 2962-2970.
- Laszlo J (1967): Energy metabolism of human leukemic lymphocytes and granulocytes, *Blood* 30(2): 151-167.
- Lehner PJ (2003): The calculus of immunity: quantitating antigen processing, *Immunity* 18(3): 315-317.
- Leikin SL (1961): Glycogen content of normal lymphocytes, *Proc Soc Exp Biol Med* 106: 286-288.
- Levene PA and Meyer GM (1912a): The action of leucocytes on glucose, *J Biol Chem* 11(4): 361-370.

- Levene PA and Meyer GM (1912b): On the action of leucocytes on glucose, second communication, *J Biol Chem* 12(2): 265-273.
- Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE (1999): Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms, *J Leukoc Biol* 66(6): 889-900.
- Loeffler DA, Keng PC, Baggs RB, Lord EM (1990): Lymphocytic infiltration and cytotoxicity under hypoxic conditions in the EMT6 mouse mammary tumor, *Int J Cancer* 45(3): 462-467.
- Lu DJ and Grinstein S (1989): Concanavalin A stimulation of O<sub>2</sub> consumption in electropermeabilized neutrophils via a pertussis toxin-insensitive G protein, *FEBS Lett* 253(1-2): 151-156.
- Lukashev D, Caldwell C, Ohta A, Chen P, Sitkovsky M (2001): Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes, *J Biol Chem* 276(52): 48754-48763.
- Lünemann JD, Buttgerit F, Tripmacher R, Baerwald CG, Burmester GR, Krause A (2001): Norepinephrine inhibits energy metabolism of human peripheral blood mononuclear cells via adrenergic receptors, *Biosci Rep* 21(5): 627-635.
- Lyamzaev KG, Izyumov DS, Avetisyan AV, Yang F, Pletjushkina OY, Chernyak BV (2004): Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis, *Acta Biochim Pol* 51(2): 553-562.
- MacDonald HR and Koch CJ (1977): Energy metabolism and T-cell-mediated cytolysis. I. Synergism between inhibitors of respiration and glycolysis, *J Exp Med* 146(3): 698-709.
- Maddock EO, Maddock SW, Kelley VE, Strom TB (1985): Rapid stereospecific stimulation of lymphocytic metabolism by interleukin 2, *J Immunol* 135(6): 4004-4008.
- Maeda T, Yamada H, Nagamine R, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Iwamoto Y (2002): Involvement of CD4<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 46(2): 379-384.
- Marriage BJ, Clandinin MT, Macdonald IM, Glerum DM (2004): Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders, *Mol Genet Metab* 81(4): 263-272.
- Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L (2002): The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase, *J Biol Chem* 277(34): 30778-30783.
- Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernandez C, Moncada S (2003): Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways, *Biochem J* 376(Pt 2): 537-544.
- Matsuo T, Hazeki K, Hazeki O, Katada T, Ui M (1996): Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by concanavalin A through dual signaling pathways, G-protein-coupled and phosphotyrosine-related, and an essential role of the G-protein-coupled signals for the lectin-induced respiratory burst in human monocytic THP-1 cells, *Biochem J* 315(Pt 2): 505-512.
- Mayhew TM and Williams MA (1974): A quantitative morphological analysis of macrophage stimulation, *Z Zellforsch* 147: 567-588.

- McLaughlin KA, Osborne BA, Goldsby RA (1996): The role of oxygen in thymocyte apoptosis, *Eur J Immunol* 26(5): 1170-1174.
- Merlo-Pich M, Deleonardi G, Biondi A, Lenaz G (2004): Methods to detect mitochondrial function, *Exp Gerontol* 39(3): 277-281.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W and Radbruch A (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* 11(2): 231-238.
- Miyamoto S, Kimball SR, Safer B (2000): Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation, *Biochim Biophys Acta* 1494(1-2): 28-42.
- Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A (2003): Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis, *Crit Care Med* 31(7): 2068-2071.
- Morita Y, Yamamura M, Kawashima M, Harada S, Tsuji K, Shibuya K, Maruyama K, Makino H (1998): Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 41(9): 1669-1676.
- Müller M, Siems W, Buttgerit F, Dumdey R, Rapoport SM (1986): Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells, *Eur J Biochem* 161(3): 701-705.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A (2004): Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca<sup>2+</sup> signaling profile of lupus T cells, *J Immunol* 173(6): 3676-3683.
- Nagy G, Koncz A, Perl A (2003): T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca<sup>2+</sup>- and redox-dependent production of nitric oxide, *J Immunol* 171(10): 5188-5897.
- Naldini A and Carraro F (1999): Hypoxia modulates cyclin and cytokine expression and inhibits peripheral mononuclear cell proliferation, *J Cell Physiol* 181(3): 448-454.
- Naldini A, Carraro F, Silvestri S, Bocci V (1997): Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells, *J Cell Physiol* 173(3): 335-342.
- Naumann L (2004): Untersuchungen zum differenzierten Wirkungsprofil von Glucocorticoiden auf humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Dissertation, Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS (1985a): Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance, *Q J Exp Physiol* 70(4): 473-489.
- Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS (1985b): The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells, *Biosci Rep* 5(5): 393-400.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO (2004): Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework, *Biochem Pharmacol* 67(1): 1-15.

- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO (2003): Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide, *Science* 299(5608): 896-899.
- Oren R, Farham AE, Saito K, Milofsky E, Karnovsky ML (1963): Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells, *J Cell Biol* 17: 487-501.
- Pasteur L (1876): *Études sur la Bière*, Gauthier-Villars Paris.
- Petty HR and Ware BR (1979): Macrophage response to concanavalin A: effect of surface crosslinking on the electrophoretic mobility distribution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(5): 2278-2282.
- Plas DR and Thompson CB (2002): Cell metabolism in the regulation of programmed cell death, *Trends Endocrinol Metab* 13(2): 75-78.
- Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, Bennink JR, Yewdell JW (2003): Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing, *Immunity* 18(3): 343-354.
- Pugh CW and Ratcliffe PJ (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nat Med* 9(6): 677-684.
- Rabesandratana H, Fournier AM, Chateau MT, Serre A, Dornand J (1992): Increased oxidative metabolism in PMA-activated lymphocytes: a flow cytometric study, *Int J Immunopharmacol* 14(5): 895-902.
- Rabinowitz Y, Schimo I, Wilhite BA (1968): Metabolic responses to separated leucocytes to phytohaemagglutinin: effects of anaerobiasis, actinomycin D and puromycin, *Br J Haematol* 15(5): 455-464.
- Radbruch A, Mechtold B, Thiel A, Miltenyi S, Pfluger E (1994): High-gradient magnetic cell sorting, *Methods Cell Biol* 42 Pt B: 387-403.
- Rapoport SM (1987): *Medizinische Biochemie*, 9. Aufl., Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit, S. 348.
- Rapoport SM und Raderecht HJ (1989): *Physiologisch-Chemisches Praktikum*, 8. Aufl., Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit, S. 156 ff.
- Reiss M and Roos D (1978): Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils, *J Clin Invest* 61(2): 480-488.
- Remans PH, Gringhuis SI, van Laar JM, Sanders ME, Papendrecht-van der Voort EA, Zwartkruis FJ, Levarht EW, Rosas M, Coffey PJ, Breedveld FC, Bos JL, Tak PP, Verweij CL, Reedquist KA (2004): Rap1 signaling is required for suppression of Ras-generated reactive oxygen species and protection against oxidative stress in T lymphocytes, *J Immunol* 173(2): 920-931.
- Reth M (2002): Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation, *Nat Immunol* 3(12): 1129-1134.
- Rolfé DF and Brown GC (1997): Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals, *Physiol Rev* 77(3): 731-758.

- Romeo D, Zabucchi G, Rossi F (1973): Reversible metabolic stimulation of polymorphonuclear leukocytes and macrophages by concanavalin A, *Nat New Biol* 243(125): 111-112.
- Roos D and Loos JA (1970): Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. I. Stimulation by phytohaemagglutinin, *Biochim Biophys Acta* 222(3): 565-582.
- Roos D and Loos JA (1973): Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation, *Exp Cell Res* 77(1): 127-135.
- Roos D and Loos JA (1972): *Proc Vith ann leuc cult conf* (ed Schwarz MR), New York, Academic Press, p. 215.
- Rossi F, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Bazzoni F (1989): Studies on molecular regulation of phagocytosis in neutrophils. Con A-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phosphoinositide turnover, rise in  $[Ca^{2+}]_i$ , and arachidonic acid release, *J Immunol* 142(5): 1652-1660.
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T (2003): Mitochondrial threshold effects, *Biochem J* 370(Pt 3): 751-762.
- Rossignol R, Malgat M, Mazat JP, Letellier T (1999): Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies, *J Biol Chem* 274(47): 33426-33432.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization, *EMBO J* 17(11): 3005-3015.
- Saadi S, Wrenshall LE, Platt JL (2002): Regional manifestations and control of the immune system, *FASEB J* 16(8): 849-856.
- Safran M and Kaelin WG Jr (2003): HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway, *J Clin Invest* 111(6): 779-783.
- Sagone AL Jr, King GW, Metz EN (1976): A comparison of the metabolic response to phagocytosis in human granulocytes and monocytes, *J Clin Invest* 57(5): 1352-1358.
- Sagone AL Jr, LoBuglio AF, Balcerzak SP (1974): Alterations in hexose monophosphate shunt during lymphoblastic transformation, *Cell Immunol* 14(3): 443-452.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3. Aufl., Bd. 2, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 18.52.
- Sand T, Condie R, Rosenberg A (1977): Metabolic crowding effect in suspension of cultured lymphocytes, *Blood* 50(2): 337-346.
- Sander B, Andersson J, Andersson U (1991): Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure, *Immunol Rev* 119: 65-93.
- Saraste M (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siècle, *Science* 283(5407): 1488-1493.
- Sbarra AJ and Karnovsky ML (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes, *J Biol Chem* 234(6): 1355-1362.



- Schauer U, Jung T, Krug N, Frew A (1996): Measurement of intracellular cytokines, *Immunol Today* 17(7): 305-306.
- Schmid D (2000): Bilanzierung des zellulären Energiestoffwechsels humaner Lymphozyten und die therapeutische Beeinflussung durch Glucocorticoide, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät Charité.
- Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Fici G, von Voigtlander P, Buttgerit F (2001): Short-term effects of the 21-aminosteroid lazaroid tirilazad mesylate (PNU-74006F) and the pyrrolopyrimidine lazaroid PNU-101033E on energy metabolism of human peripheral blood mononuclear cells, *Biosci Rep* 21(1): 101-110.
- Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgerit F (2000): Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states, *Biosci Rep* 20(4): 289-302.
- Schmitz G und Rothe G (1994): Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Stuttgart · New York, F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, S. 3 ff.
- Schor H, Vaday GG, Lider O (2000): Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix, *Dev Immunol* 7(2-4): 227-238.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404(6779): 770-774.
- Schumacher HR, Szekely IE, Park SA, Fisher DR (1973): Ultrastructural studies on the acute leukemic lymphoblast, *Blut* 27(6): 369-406.
- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS (2001): Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 21(10): 3436-3444.
- Seiler D and Kelleter R (1973): Biochemical studies of glycogen metabolism of human blood lymphocytes, *Verh Dtsch Ges Inn Med* 79: 536-538.
- Seitz IF (1965): Biochemistry of normal and leukemic leucocytes, thrombocytes, and bone marrow cells, *Adv Cancer Res* 9: 303-410.
- Seitz JF and Luganova IS (1968): The biochemical identification of blood and bone marrow cells of patients with acute leukemia, *Cancer Res* 28(12): 2548-2555.
- Sekkat C, Dornand J, Gerber M (1988): Oxidative phenomena are implicated in human T-cell stimulation, *Immunology* 63(3): 431-437.
- Stevens CR, Williams RB, Farrell AJ, Blake DR (1991): Hypoxia and inflammatory synovitis: observations and speculation, *Ann Rheum Dis* 50(2): 124-132.
- Tak PP and Bresnihan B (2000): The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis, *Arthritis Rheum* 43(12): 2619-2633.
- Takamiya R, Takahashi M, Myint T, Park YS, Miyazawa N, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N (2003): Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis, *FASEB J* 17(8): 938-940.

- Talstad I (1972): The influence of the crowding phenomenon on the oxygen consumption of blood cells as determined by the Cartesian diver technique, *Acta Physiol Scand* 84(3): 332-337.
- Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM (1999): The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells, *Free Radic Biol Med* 26(1-2): 14-24.
- Thierbach G and Reichenbach H (1981): Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain, *Biochim Biophys Acta* 638(2): 282-289.
- Thierie J (2004): Modeling threshold phenomena, metabolic pathways switches and signals in chemostat-cultivated cells: the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Theor Biol* 226(4): 483-501.
- Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, Calder PC (2001): Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults, *Lipids* 36(11): 1183-1193.
- Thompson CB, Rathmell JC, Frauwirth KA, Lindsten T, Rudin CM, Opferman JT, Ashton-Rickardt PG, Harris MH, Chandel NS, Schumacker PT, Vander Heiden MG (1999): What keeps a resting T cell alive?, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64: 383-387.
- Trübel H and Barnikol WK (1998): A new microprocedure for continuous and non-consuming determination of cellular oxygen uptake based on fluorescence quenching, *Biomed Tech (Berl)* 43(11): 302-309.
- Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM (1985): Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester, *Nature* 313(6000): 318-320.
- Turner L, Scotton C, Negus R, Balkwill F (1999): Hypoxia inhibits macrophage migration, *Eur J Immunol* 29(7): 2280-2287.
- Udilova N (1999): Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Valdez LB and Boveris A (2001): Nitric oxide and superoxide radical production by human mononuclear leukocytes, *Antioxid Redox Signal* 3(3): 505-513.
- Van den Bogert C, Melis TE, Kroon AM (1989): Mitochondrial biogenesis during the activation of lymphocytes by mitogens: the immunosuppressive action of tetracyclines, *J Leukoc Biol* 46(2): 128-133.
- Van den Bogert C, Muus P, Haanen C, Pennings A, Melis TE, Kroon AM (1988): Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells, *Exp Cell Res* 178(1): 143-153.
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989): Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res* 49(23): 6449-6465.
- Vorobjev IA and Zorov DB (1983): Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett* 163(2): 311-314.

- Wagner R, Meyerriecks N, Sparaco R (1956): Enzyme studies on white blood cells and blood platelets. V. Dehydrogenase activity, *Arch Biochem Biophys* 61(2): 278-290.
- Wang GL and Semenza GL (1993): Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, *J Biol Chem* 268(29): 21513-21518.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5510-5514.
- Wang T, Marquardt C, Foker J (1976): Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation, *Nature* 261(5562): 702-705.
- Warburg O, Wind F, Negelein E (1926): Über den Stoffwechsel von Tumoren, *Klin Wochenschr* 5(19): 829-832.
- Weber K, Ridderskamp D, Alfert M, Hoyer S, Wiesner RJ (2002): Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells, *Biol Chem* 383(2): 283-290.
- Weening RS, Roos D, Loos JA (1974): Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparations: a comparative study, *J Lab Clin Med* 83(4): 570-577.
- Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL (1999): Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards, *Nature* 401(6752): 505-508.
- Wenger RH (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression, *FASEB J* 16(10): 1151-1162.
- Wertenaue HJ (2000): Untersuchungen zur Wirkung von Methylprednisolon und Anti-CD4-Antikörpern auf die Signaltransduktion in peripheren mononukleären Zellen (PMNC), Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät Charité.
- Westermann J and Bode U (1999): Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death, *Immunol Today* 20(7): 302-306.
- Williams MS and Kwon J (2004): T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling, *Free Radic Biol Med* 37(8): 1144-1151.
- Wu G and Marliss EB (1993): Enhanced glucose metabolism and respiratory burst in peritoneal macrophages from spontaneously diabetic BB rats, *Diabetes* 42(4): 520-529.
- York IA and Rock KL (1996): Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex, *Annu Rev Immunol* 14: 369-396.
- Zhao J, Juettner B, Scheinichen D, Jaeger K, Heine J, Piepenbrock S (2003): Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique, *Acta Anaesthesiol Scand* 47(6): 702-706.
- Zuckerberg AL, Goldberg LI, Lederman HM (1994): Effects of hypoxia on interleukin-2 mRNA expression by T lymphocytes, *Crit Care Med* 22(2): 197-203.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. F. Buttgereit. Die experimentellen Untersuchungen wurden im Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin durchgeführt.

Allen, die mein naturwissenschaftliches Interesse gefördert und mir während meiner Promotionstätigkeit zur Seite gestanden haben, gilt mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. med. F. Buttgereit möchte ich für das Vertrauen, das er mir bei der Vergabe des Dissertationsthemas entgegenbrachte, danken. Die vielseitigen Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts waren unerlässlich für das Gelingen dieser Arbeit.

Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Radbruch hat mir die Arbeit in den Laboren und die Nutzung der technischen Ausstattung des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums ermöglicht. Die Herren Dr. rer. nat. A. Scheffold und Dr. rer. nat. A. Grützkau haben mir wichtige experimentelle Hinweise gegeben.

Mit Herrn Dr. med. A. Chan verbrachte ich unvergeßliche und sehr schöne Stunden im Labor. Mit ihm durfte ich zahlreiche sachkundige und förderliche Diskussionen führen.

Herrn Dr. rer. nat. S. Schuchmann möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts des Antrags auf Zulassung zur Promotion danken.

Bei den molekularbiologischen Experimenten unterstützte mich Herr Dipl.-Biol. T. Gaber aus der Arbeitsgruppe. Er hat außerdem das Manuskript der Arbeit durchgesehen und war stets sehr hilfsbereit. Auch den verbleibenden Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei gedankt, insbesondere Frau C. M. Spies für die interessante Zusammenarbeit.

Mein ganz besonders tief empfundener persönlicher und sehr herzlicher Dank gilt Frau G. S. Öhm. Sie hat diese Arbeit über alle Maßen intensiv und liebenswürdig unterstützt.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 19.12.2004

Robert Tripmacher