

**Vergleichende Analyse des Immunphänotyps von
CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten und deren
Funktionalität unter dem Einfluss von Hypoxie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet. am Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig Universität Gießen

Joke Malcher

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und – Biochemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger

und

Aus dem Labor für Interventionelle Immunologie Köln
der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael v. Bergwelt-Baildon

**Vergleichende Analyse des Immunphänotyps von
CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten und deren
Funktionalität unter dem Einfluss von Hypoxie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet. am Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig Universität Gießen

Eingereicht von
Joke Malcher
Tierärztin aus Köln

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. Rüdiger Gerstberger
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael v. Bergwelt-Baildon

Tag der Disputation: 15.12.2015

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Entwicklung und Reifung von B-Lymphozyten | 1 |
| 1.2 | Aktivierung von B-Lymphozyten | 4 |
| 1.3 | Zusätzliche funktionelle Bedeutung von B-Lymphozyten | 8 |
| 1.4 | Hypoxie im Organismus – Physiologie und Pathologie | 9 |
| 1.6 | Ziele der Arbeit | 15 |
| 2. | Material und Methoden | 16 |
| 2.1 | Material | 16 |
| 2.2 | Vorbereitung zur Kultivierung von CD40L-aktivierten B-Zellen | 20 |
| 2.3 | Kultivierung und CD40L-vermittelte Aktivierung von B-Lymphozyten | 25 |
| 2.4 | Durchflusszytometrie | 26 |
| 2.5 | Analyse der Apoptose und des Zellzyklus CD40L-aktivierter B-Zellen | 31 |
| 2.6 | Funktionelle Analyse CD40L-aktivierter B-Lymphozyten | 34 |
| 2.7 | Eisenchelation als Hypoxienachahmung | 39 |
| 2.8 | Statistik | 40 |
| 3. | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Veränderung der Morphologie und Proliferation CD40L-aktivierter B-Zellen unter Hypoxie | 41 |
| 3.2 | Einfluss von Hypoxie auf die Apoptose von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten | 45 |
| 3.3 | Einfluss von Hypoxie auf den Zellzyklus von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten | 48 |
| 3.4 | Der Einfluss von Hypoxie auf den Immunphänotyp von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten | 50 |
| 3.5 | Der Einfluss von Hypoxie auf die Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten | 60 |
| 3.6 | Aktivierung des Hypoxiesignalwegs durch Eisenchelation (Hypoxienachahmung) | 72 |
| 3.6.1 | <i>In vitro</i> Modell | 72 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.6.2 | Einfluss der Eisenchelation auf zirkulierende B-Zellen bei Patienten..... | 99 |
| 4. | Diskussion | 109 |
| 4.1 | Auswirkung von Hypoxie auf CD40L-aktivierte | 109 |
| | B-Lymphozyten..... | 109 |
| 4.2 | APC-Funktion von CD40L-aktivierten | 111 |
| | B-Lymphozyten..... | 111 |
| 4.3 | Die Eisenchelation als Hypoxienachahmung..... | 112 |
| 4.4 | Einsatz und möglicher Nutzen in der Klinik..... | 116 |
| 5. | Zusammenfassung | 119 |
| 6. | Summary | 121 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 124 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 127 |
| 9. | Anhang | 137 |
| 9.1 | Danksagung..... | 137 |
| 9.2 | Erklärung | 138 |

1. EINLEITUNG

1.1 ENTWICKLUNG UND REIFUNG VON B-LYMPHOZYTEN

Die Entwicklung von B-Lymphozyten unterteilt sich in eine frühe, antigenunabhängige Differenzierung innerhalb des Knochenmarks (KNM) zur reifen B-Zelle und eine späte, antigenabhängige, terminale Differenzierung in den sekundär lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) zu Gedächtniszellen bzw. antikörperproduzierenden Plasmazellen [1]. Unreife B-Zellen werden im Knochenmark mit zahlreichen Autoantigenen im Rahmen der Negativselektion konfrontiert und erhalten entweder B-Zell Rezeptor (BCR)-vermittelte Apoptose-Signale („klonale Deletion“) oder werden reaktionsunfähig („Anergie“) [2,3]. B-Lymphozyten (B-Zellen) gehen aus hämatopoetischen Stammzellen des roten KNM hervor. Im KNM durchlaufen die B-Zellen die Stadien der Pro-B-, Prä-B- und unreifen B-Zellen und werden dann als reife aber „naive“ B-Zellen in die Peripherie entlassen [4]. Von „naiven“ B-Lymphozyten spricht man vor dem ersten Antigenkontakt. Diese Abläufe im KNM sind daher zunächst unabhängig von der Anwesenheit spezifischer Antigene (Ag). Die im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten stellen überwiegend naive B-Zellen dar, die jedoch lediglich 1-2 % aller B-Lymphozyten im gesunden menschlichen Organismus repräsentieren. B-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, zwischen Blut und Lymphsystem zu wandern. Im ersten Schritt ermöglicht u.a. das Zelladhäsionsmolekül L-Selectin und verschiedene Chemorezeptoren (z.B. CXCR4) [5] eine reversible Bindung der zirkulierenden Lymphozyten an das Endothel (Rollen) der „*high endothelial venules*“ (HEV) in sekundär lymphatischen Organen. Danach kommt es zur Chemokin-induzierten Aktivierung von Integrinen, was eine feste Bindung der Lymphozyten an die Gefäßwand ermöglicht. Diese Bindung ist Voraussetzung für die transendotheliale Migration in anderes Gewebe (*Diapedese*) [6]. Auf diesem Wege können Lymphozyten nicht nur aus dem Blut in das extravaskuläre Gewebe auswandern, sondern eben auch in das sekundär lymphatische System. Die zielgerichtete und chemotaktisch gesteuerte Migration immunkompetenter B-Zellen in sekundär lymphatische Organe nennt man „*homing*“ [7].

In den sekundär lymphatischen Organen existieren Regionen, die überwiegend von B-Lymphozyten oder von T-Lymphozyten besiedelt und durchwandert werden, sogenannte B-Zell Zonen und T-Zell Zonen. Die Zellzusammensetzung dieser Zonen spiegelt ihre Aufgabe bei der antigenspezifischen Differenzierung der entsprechenden Lymphozyten wieder.

Reife, „naive“ B-Lymphozyten bilden beim „*homing*“ Follikel, welche in allen sekundär lymphatischen Organen auftreten. Wenn Follikel nicht aktiv an der Immunantwort beteiligt sind, so nennt man sie Primärfollikel [8]. Die B-Zell-Immunantwort zeichnet sich dadurch aus, dass bei Antigenkontakt die „naiven“ antigenreaktiven B-Zellen in den T-Zonen expandieren und zu kurzlebigen (3-5 Tage) Plasmazellen differenzieren, die niedrig affine Antikörper meist vom IgM-Typ sezernieren, und/oder in antigeninduzierte B-Zellen, deren Funktion es ist, Keimzentren zu bilden [9]. Innerhalb des Keimzentrums kommt es zur Affinitätsreifung des Antigenrezeptors, was einen Isotypenwechsel der Immunglobuline von IgM zu IgA, IgE oder IgG zur Folge hat [10,11]. Über den Nachweis der selektiven Expression der Immunglobuline IgM und/oder IgD an der Zelloberfläche können humane unreife B-Zellen (IgM+ IgD-) und reife B-Zellen (IgM+ IgD+) identifiziert werden [12]. B-Zellen durchlaufen dabei, wie eben schon erwähnt, einen Immunglobulin-Isotypenwechsel, einen Umlagerungsprozess der Immunglobuline z.B. von IgM zu IgG und expandieren klonal [13]. Diese Umschaltung wird von T-Zell-Zytokinen bzw. -Signalen gesteuert [14]. Durch spezifische Kontakte zwischen T-Helferzellen Typ 2 (TH2-Zellen) und B-Zellen während der Antigenerkennung („klonale Selektion“) [15] differenzieren B-Zellen entweder zu B-Gedächtniszellen (IgD-CD27+) [16] oder zu langlebigen, antikörpersekretierenden Plasmazellen (CD20-CD138+CD38+) [17]. Differenzierungsantigene (CD = *cluster of differentiation*) stellen eine Untergruppe funktionell bedeutsamer Zelloberflächenproteine dar (Tab.1.1), deren Expression ein bestimmtes Funktionsstadium der antigentragenden Zelle anzeigt [18,19].

| CD Antigen | Zelluläre Expression | Funktion |
|---------------|--|---|
| CD3 | T-Lymphozyten | Assoziiert mit dem T-Zell Antigenrezeptor; Signaltransduktion |
| CD4 | T-Lymphozyten, T-Helferzellen | Co-Rezeptor für MHC Klasse II Moleküle; Signaltransduktion |
| CD8 | Zytotoxische T-Zellen | Co-Rezeptor für MHC Klasse I Moleküle. |
| CD14 | Monozyten, Makrophagen | Rezeptor für Lipopolysaccharid-Komplex |
| CD19 | B-Lymphozyten | B-Zell Co-Rezeptor |
| CD20 | B-Lymphozyten | Mögliche Funktion in der Regulation der B-Zellaktivierung |
| CD25 | Aktivierte T-Zellen | IL-2 Rezeptor, α -Kette |
| CD27 | T-Zellen, NK Zellen, einige B-Zellen | TNF Rezeptor |
| CD28 | Alle T-Zell Subpopulationen | Aktivierung naiver T-Zellen, Rezeptor für co-stimulierendes Signal, bindet CD80 |
| CD38 | Keimzentrum B-Zellen, Plasmazellen | erhöht B-Zellproliferation |
| CD40 | B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen | Bindet CD154 (CD40L); Rezeptor für co-stimulatorisches Signal für B-Zellen, Anregung von Wachstum und Differenzierung |
| CD45 | Alle hämatopoietischen Zellen | erhöhte Signalisierung durch Antigen Rezeptoren von B- und T-Zellen |
| CD62L | B-Zellen, T-Zellen | Leukozyten Adhäsionsmolekül, L-Selektin |
| CD69 | Aktivierte T- und B-Zellen | frühes Aktivierungs- Antigen |
| CD80 | B-Zell Subpopulationen | Co-Stimulator, Ligand für CD28 |
| CD86 | Aktivierte B-Zellen | Co-Stimulator, Ligand für CD28 |
| CD107a | Aktivierte T-Zellen | Degranulierung von Lymphozyten |
| CD154 (CD40L) | Aktivierte CD4 T-Zellen | Ligand für CD40, Verursacher von B-Zell Proliferation und Aktivierung |

Abb.1.1: Differenzierungsantigene, CD = *cluster of differentiation*, sind Oberflächenmoleküle von Immunzellen. Bestimmte CD-Moleküle sind für bestimmte Zelltypen und Aktivierungszustände der Zellen typisch.

Gedächtniszellen siedeln sich in der unmittelbaren Umgebung der Keimzentren an. Sie exprimieren Immunglobuline und stehen so für eine schnelle Reaktion im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Antigen bereit. Die Plasmazellen verlassen das Keimzentrum in Richtung Knochenmark und Epithelien, um durch die Sekretion großer Mengen löslicher Antikörper zur Eliminierung des für sie spezifischen Antigens beizutragen. Kommt es zu keiner Antigenerkennung, so wird es den B-Zellen durch Überlebenssignale, die sie dort von folliculär-dendritischen Zellen (FDZ) bekommen, ermöglicht, weiter zu zirkulieren [20]. Ein nicht aktivierter B-Lymphozyt stirbt nach ca. drei Tagen. Somit überlebt nur eine gewisse Anzahl an B-Zellen, wodurch deren Menge reguliert wird [21].

Für die Funktionalität des spezifischen Immunsystems ist es wichtig, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. Die Entstehung der Antikörpervielfalt wird durch eine Reihe molekularer Mechanismen bewerkstelligt. Ein Antikörper besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die untereinander durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Die variablen Domänen der leichten und schweren Ketten lassen sich in V, D, J- Segmente unterteilen. So wird die variable Domäne einer schweren Kette von den V, D, J-, diejenige einer leichten Kette von V, J- Gensegmenten kodiert. Die große Anzahl von Antikörper-spezifitäten wird in erster Linie durch die freie Kombination dieser Gensegmente erzeugt [22].

Durch diese somatische Rekombination entstehen B-Zellen mit unterschiedlichen, zufälligen Antigen-spezifitäten. Viele dieser Zellen sterben nach kurzer Zeit wieder ab. Erst durch die Bindung an ihr spezifisches Antigen werden sie zur Vermehrung angeregt. Diese zufällige Rekombination birgt jedoch auch die Gefahr der Entstehung autoreaktiver Zellen, d.h. Zellen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten [23]. Autoreaktive B-Zellen können maßgeblich zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen.

1.2 AKTIVIERUNG VON B-LYMPHOZYTEN

Man kann zwischen T-Zell abhängiger und T-Zell unabhängiger B-Zell Aktivierung unterscheiden. Antigene wie zum Beispiel die in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthaltenen Lipopolysaccharide (LPS) aktivieren B-Zellen polyklonal über Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder den B-Zell Rezeptor (BCR), unabhängig von deren Antigen (Ag)-Spezifität [24]. Bei dieser T-Zell unabhängigen Aktivierung kommt es zu keinem Isotypenwechsel (hauptsächlich wird IgM produziert), keiner Affinitätsreifung des B-Zell Rezeptors und keiner Ausbildung von Gedächtniszellen. Bei der T-Zell abhängigen Aktivierung trifft eine zirkulierende, naive B-Zelle auf „ihr“ Antigen, wandert, geleitet von Chemokinen, in die sekundär lymphatischen Organe, wo es zur Interaktion mit den T-Zellen und zur Antigenpräsentation kommt. B-Zellen bilden in den sekundär lymphatischen Gewebe Primärfollikel aus. Erkennen akti-

vierte T-Helferzellen vom Subtyp TH2 im Bereich des Keimzentrums oder der parakortikalen Zone sekundärer Follikel in lymphatischen Organen ebenfalls diese B-Zell spezifisch präsentierten Antigene, so induzieren jene über Botenstoffe (Zytokine, z. B. Interleukin 4) die Aktivierung der B-Lymphozyten. Für die T-Zell abhängige B-Zellaktivierung ist der CD40-Ligand (= CD40L) notwendig, welcher auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird [24]. Bei der T-Zell abhängigen Aktivierung brauchen B-Lymphozyten zwei Signale, um aktiviert zu werden:

- Bindung des für sie spezifischen Antigens an ihren membranständigen, quervernetzten B-Zell Rezeptor.
- Erkennung des Antigens durch eine antigenspezifische T-Helferzelle vom Subtyp 2 (TH2-Zelle) und Nutzung der CD40L - CD40 Interaktion als co-stimulatorisches Signal [25,26] (Abb.1.1).

Die TH2 Zelle sezerniert aufgrund der CD40L - CD40 Interaktion u.a. Interleukin 4 (IL-4) [27], als wichtigsten Proliferationsfaktor für B-Zellen. Nachdem die B-Zelle durch beide Signale stimuliert worden ist, beginnt sie sich zu teilen und sich zu vergrößern. Die Zunahme der Zellgröße ist ein erstes Anzeichen von Aktivierung [28]. Dabei ist eine erhöhte Expression von co-stimulatorischen Molekülen und Interleukinen zu beobachten.

Vor allem die Expression der co-stimulatorischen Proteine CD80 und CD86, sowie des *major histocompatibility complex II* (MHCII) wird auf der Zelloberfläche induziert [29]. Dadurch werden die B-Lymphozyten zu potenten Antigen präsentierenden Zellen, die im Zuge der adaptiven Immunantwort „naive“ T-Zellen aktivieren können, welche ihrerseits wiederum zu einer Aktivierung der B-Zellen führen [30] (Abb. 1.1). Bei der Aktivierung von B-Lymphozyten ist das CD40L - CD40 System einer der potentesten Stimulatoren [31]. CD40 repräsentiert ein Integralmembranprotein, dessen Gen auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 20 nachgewiesen wurde [32]. Es handelt sich um einen Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Familie (TNF), der durch den CD40 - Liganden aktiviert wird und die Proliferation der B-Lymphozyten induziert. Humane B-Zellen und Endothelzellen [33] exprimieren CD40 konstitutiv. Beim CD40 - Ligand handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches ebenfalls zur TNF-Familie gehört [34]. CD40L wird u.a. auf aktivierten T-Zellen expri-

miert, konnte aber auch für natürliche Killerzellen (NK) [35], Makrophagen und Endothelzellen [36] nachgewiesen werden. Dieses CD40L - CD40 System macht man sich zur Aktivierung von B-Lymphozyten *in vitro* zunutze, indem z.B. der humane CD40 - Ligand von stabil transfizierten murinen NIH-3T3 Fibroblasten exprimiert wird, die nachfolgend mit humanen B-Zellen co-kultiviert werden. Dabei handelt es sich um ein etabliertes *in vitro* Modell für die T-Zell abhängige B-Zell Aktivierung [37] und wird seit langem in der Arbeitsgruppe von Prof. Bergwelt-Baildon genutzt und weiterentwickelt [38,39].

Damit jedoch keine unerwünschten Autoreaktionen in Gang gesetzt werden, ist es zwingend notwendig, dass die B-Zelle beide Signale erhält, es also auch zu einer Aktivierung durch den BCR kommt [40]. Über diesen können B-Lymphozyten Antigene binden, während sie zwischen Blut und Lymphe patrouillieren. Findet lediglich eine CD40 Stimulation ohne vorherigen Antigenkontakt statt, so wird verstärkt Fas, ein Apoptose-induzierender Rezeptor, auf der Zelloberfläche exprimiert und die B-Zelle geht in Apoptose [41]. Damit wird eine Weiterentwicklung autoreaktiver B-Zellen effektiv unterbunden [42]. Auch die alleinige Stimulation über den BCR ohne T-Zell Hilfe führt zum Untergang der Zelle. Wenn die B-Zelle die quervernetzenden BCR Moleküle mitsamt dem Antigen zusammen in die Zelle aufnimmt, spricht man von rezeptorvermittelter Endozytose [43]. Die aufgenommenen Antigene gelangen durch diese Endozytose in die sauren lysosomalen Zellkompartimente, wo sie zu Peptiden gespalten und auf MHCII Molekülen exprimiert werden. Die mit Peptid beladenen MHCII Komplexe werden anschließend auf die Zelloberfläche transportiert. Dadurch kann nun die B-Zelle T-Zell vermittelt aktiviert werden, wenn eine für dasselbe Antigen spezifische TH2 Zelle auf sie trifft [44].

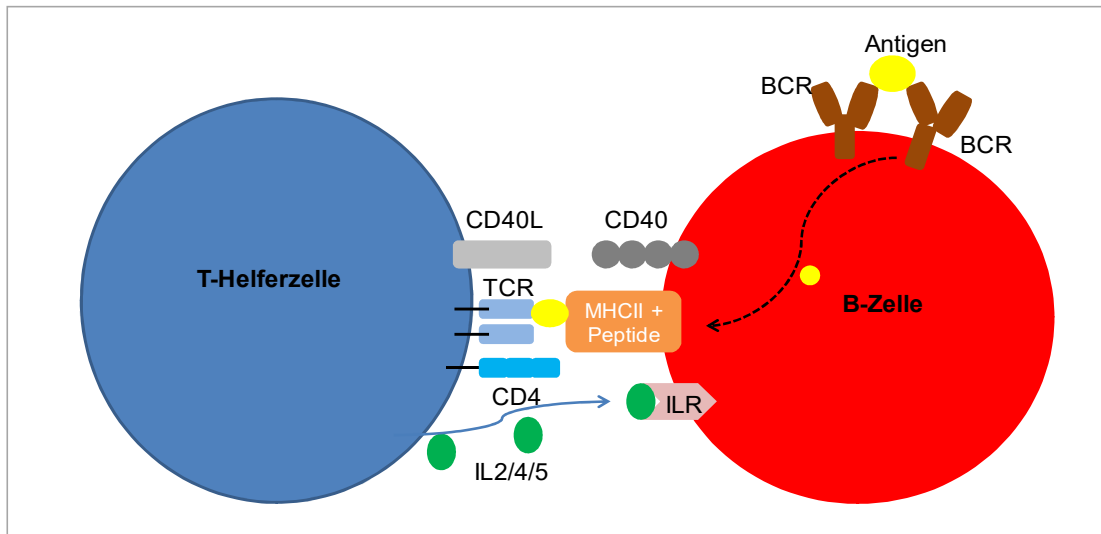


Abb.1.2: Darstellung der Wechselwirkung zwischen B-Lymphozyt und T-Lymphozyt. Aktivierung der B-Zelle sowohl über das CD40L-CD40 System und B-Zell Rezeptoren (BCRs) durch ein quervernetzendes Antigen als auch über den Kontakt des T-Zell Rezeptors (TCR) mit dem mit Fragmentantigen (Peptid) beladenen *major histocompatibility complex II* (MHCII). Freisetzung der Interleukine 4 und 5 (IL-4, IL-5) durch die T-Zelle, als Proliferationsfaktoren für die B-Zelle. T-Helferzellen sind durch die Expression von *cluster of differentiation* (CD4) gekennzeichnet.

Die meisten aktivierten B-Zellen wandern für eine schnelle Immunantwort in die Milz und in die Lymphknoten, wo sie zu kurzlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren und zunächst niederaffine Antikörper sezernieren. Durch die T-Zell Aktivierung wird der primäre B-Zell Follikel zum sekundären Follikel unter Bildung eines Keimzentrums. Durch die Keimzentrumsreaktion werden B-Lymphozyten hervorgebracht, die hochaffine Antikörper mit speziellen Effektorfunktionen produzieren können. Die verschiedenen Effektorfunktionen sind das Resultat des so genannten Klassenwechsels (= Isotypenwechsel). Das Keimzentrum unterteilt sich in eine charakteristische dunkle und eine helle Zone, die beide von einer gemeinsamen „Mantelzone“ umgeben sind [8] (Abb.1.2). Die aktivierten B-Lymphozyten beginnen zunächst in der dunklen Zone des Keimzentrums stark zu proliferieren. Hier findet auch die somatische Hypermutation des jeweiligen Immunglobulins statt, welche die Anzahl der möglichen B-Zell Rezeptoren noch einmal signifikant erhöht und letztlich dafür sorgt, dass für praktisch jedes potentielle Antigen ein spezifischer Rezeptor im menschlichen Immunsystem entsteht [11]. Spontanmutationen in den Immunglobulin-Genen können zu B-Zellen führen, die effizientere Antikörper produzieren. Danach wandern die B-Lymphozyten in die helle Zone des Keimzentrums, wo sie auf folliculäre

dendritische Zellen mit gebundenem spezifischen Antigen und TH-Zellen treffen (Abb.1.2). B-Zellen, die durch somatische Hypermutation keine erhöhte Affinität zum Antigen erworben haben, gehen in die Apoptose.

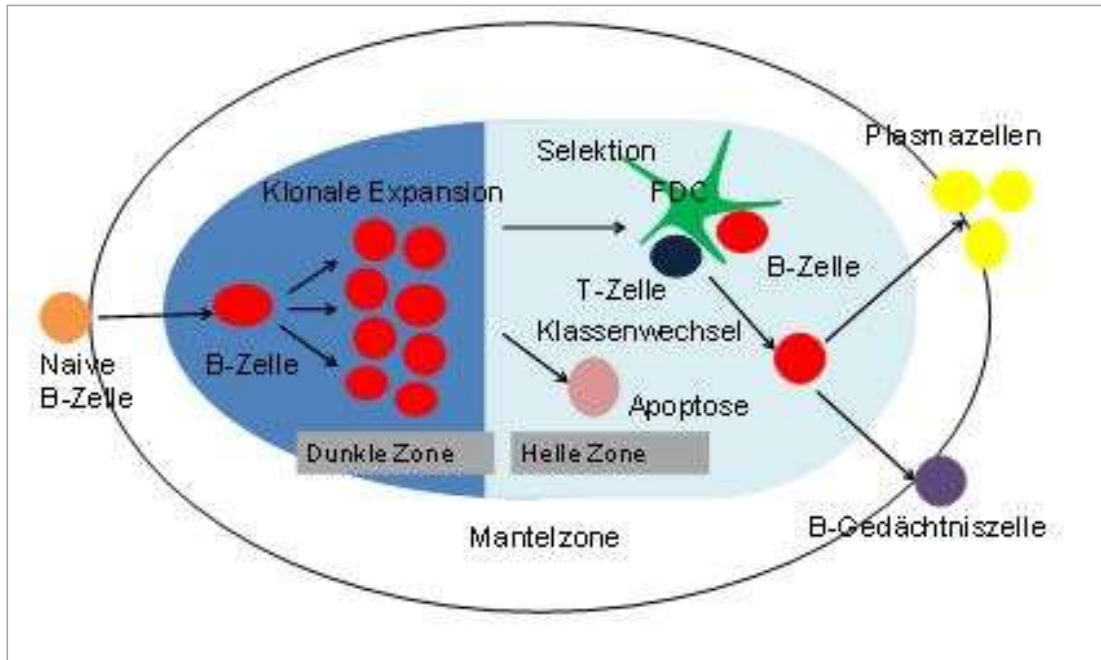


Abb.1.3: Schematische Darstellung des Weges einer aktivierten B-Zelle durch das Keimzentrum eines sekundär lymphatischen Organs.

In der dunklen Zone des Keimzentrums proliferieren die aktivierten B-Zellen zunächst (klonale Expansion). Nach Abschluss dieses Prozesses wandern die B-Zellen in die helle Zone. Dort treffen sie auf ihr Antigen, das von „*follicular dendritic cells*“ (FDCs) präsentiert wird. Sollte die Affinitätsreifung eine höhere Affinität zum Antigen bewirkt haben, so erhält die B-Zelle ein Überlebenssignal und verlässt das Keimzentrum, um zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle oder einer B-Gedächtniszelle auszudifferenzieren. Ohne Überlebenssignal gehen die B-Zellen in die Apoptose.

1.3 ZUSÄTZLICHE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON B-LYMPHOZYTEN

B-Zellen scheinen neben ihrer Funktion als Antikörper produzierende Zellen Immunreaktionen zusätzlich auf vielfältige Weise zu beeinflussen. So sind sie in der Lage, neben ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation, durch Sekretion von Zytokinen wie IL-4, IL-12 oder Interferon- γ die Differenzierung der T-Lymphozyten zu CD4-positiven TH1- oder TH2-Lymphozyten einzuleiten [45].

Dass B-Zellen auch immunmodulatorisch agieren können, wurde erst kürzlich entdeckt; eine Funktion, die in Analogie zu der Funktion der regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) diskutiert wird. Aktuelle Daten beschreiben eine potentielle regulatorische B-Lymphozytensubpopulation, die durch den Immunphänotyp CD24^{high}/CD38^{high} charakterisiert zu sein scheint [46]. Diese B-Zellen unterdrücken die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), INF- γ) von TH2-Lymphozyten, indem sie vermehrt IL-10 sezernieren. B-Lymphozyten dieses Phänotyps wurden beispielsweise bei Patienten mit systemischem *Lupus erythematosus* (SLE) gefunden und weisen dort eine auffällig verminderte immun-suppressive Aktivität auf [47]. Die regulatorische Aktivität dieser CD24^{high}/CD38^{high} B-Zellen scheint folglich für die immunologische Homöostase, also das Gleichgewicht zwischen ausreichender Fremderkennung und Selbsttoleranz, von Bedeutung zu sein. Hinzu kommt, dass diese regulatorischen B-Lymphozyten auch für die zu meist erniedrigte Immunogenität von Tumoren verantwortlich sein könnten [48]. Seit einigen Jahren wird darüber hinaus zunehmend die Bedeutung der Funktion von B-Lymphozyten im Rahmen von autoinflammatorischen Prozessen aber auch Tumorerkrankungen erkannt [49].

1.4 HYPOXIE IM ORGANISMUS – PHYSIOLOGIE UND PATHOLOGIE

Die Sauerstoffverteilung auf alle Gewebe eines Organismus wird unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe der Blutzirkulation realisiert. Eingeatmete Luft weist einen Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von ungefähr 160 mmHg auf (Meeresspiegel-Niveau) und entspricht dem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21 % O_2 . Die Passage des Sauerstoffs durch die Lunge und die anschließende Diffusion in die Alveolarkapillaren resultiert bei Ruhestellung des Menschen in einem verringertem pO_2 in den arteriellen Blutgefäßen von etwa 95 mmHg [50]. Für die Versorgung aller Organe mit ausreichend Sauerstoff genügt diese Konzentration. Der Sauerstoffpartialdruck in den einzelnen Organgeweben ist unterschiedlich und liegt zwischen 4 und 40 mmHg entsprechend einem Sauerstoffgehalt von 0,5 – 5% O_2 (Abb. 1.3). Sauerstoff gelangt somit ständig durch Diffusion aus den Kapillaren in die Zellen

weil dort eine geringere Konzentration herrscht; durch den ständigen O₂ – Verbrauch der Zellen bleibt diese Partialdruckdifferenz erhalten. Das geschieht so lange, bis die Diffusionsstrecke für O₂ mehr als 200 µm beträgt. Wird die Diffusionsgrenze für Sauerstoff von ca. 200 µm überschritten, so entstehen Gewebebereiche, die mit Sauerstoff unterversorgt werden. Die verminderte Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder bestimmter Gewebsregionen wird als Hypoxie bezeichnet [51]. Physiologisch tritt Hypoxie während der normalen Embryonalentwicklung auf [52], aber auch in Keimzentren des lymphatischen Gewebes im adulten Tier bzw. Mensch, wobei der Sauerstoffpartialdruck zwischen den einzelnen Organen unterschiedlich ist [53]. In der Milz, ähnlich wie in den Lymphknoten, liegt der Sauerstoffpartialdruck zwischen 10 und 25 mmHg, während er im Thymus < 5 mmHg beträgt [54,55]. Neben den genannten Geweben, in denen eine physiologische Hypoxie nachzuweisen ist, setzt ein pathologischer Sauerstoffmangel im Rahmen einer Gewebsschädigung große Anpassungsvorgänge der betroffenen organständigen Zellen voraus, aber auch der Immunzellen, die in das geschädigte Gewebe einwandern.

Die Ausbildung hypoxischer Gewebsbereiche kann Kennzeichen verschiedener pathophysiologischer Zustände sein und ist meist auf ein defektes Gefäßsystem in der betreffenden Region zurückzuführen. Dazu zählen zerebrale und kardiovaskuläre Erkrankungen wie etwa Artherosklerose, Apoplexie, Myokardinfarkt, *Diabetes mellitus*, Entzündungsprozesse, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen sowie Tumorerkrankungen. Solide Tumoren, wie zum Beispiel Hirn-, Colon-, Brust- und Prostatumoren, weisen, im Vergleich zu ihren Ursprungsgeweben, umfangreiche hypoxische Regionen auf [52]. Die Versorgung eines soliden Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgt bis zu einem Durchmesser von 0,1 – 0,2 mm mittels Diffusion. Eine notwendige Voraussetzung für das weitere Wachstum eines Tumors ist daher seine Vaskularisierung (Angiogenese) [56]. Die in den Tumor einwachsenden Gefäße sind jedoch ungeordnet und weisen strukturelle Veränderungen auf. Die Entstehung hypoxischer Regionen in soliden Tumoren basiert demnach auf dem Ungleichgewicht zwischen schnell proliferierenden Tumorzellen und einer inadäquaten Sauerstoffversorgung aufgrund des unregelmäßig einwachsenden Gefäßsystems in den Tumor [57].

Der Sauerstoffgehalt von soliden Tumoren erweist sich im Vergleich zu den entsprechenden Ursprungsgeweben und in Abhängigkeit von der Tumolvaskularisierung als deutlich reduziert. Gut oxygenierte Tumorbereiche gehen je nach Lage zum Gefäßsystem in hypoxische und schließlich in anoxische Regionen über. Bei soliden Tumoren variiert regional unterschiedlich innerhalb des jeweiligen Tumors, sowie im direkten Vergleich selbst verschiedener Tumorarten, der Grad der Hypoxie. Bei den meisten Tumoren gehen in Abhängigkeit von der Lage der Tumorzellen zum Blutgefäßsystem gut oxygenierte Regionen in hypoxische Bereiche über, welche wiederum mit anoxischen Gebieten assoziiert sind. Der Sauerstoffpartialdruck in soliden Tumoren liegt zwischen 1 und 10 mmHg und entspricht einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 0,15 – 1,5 % O₂ [56].

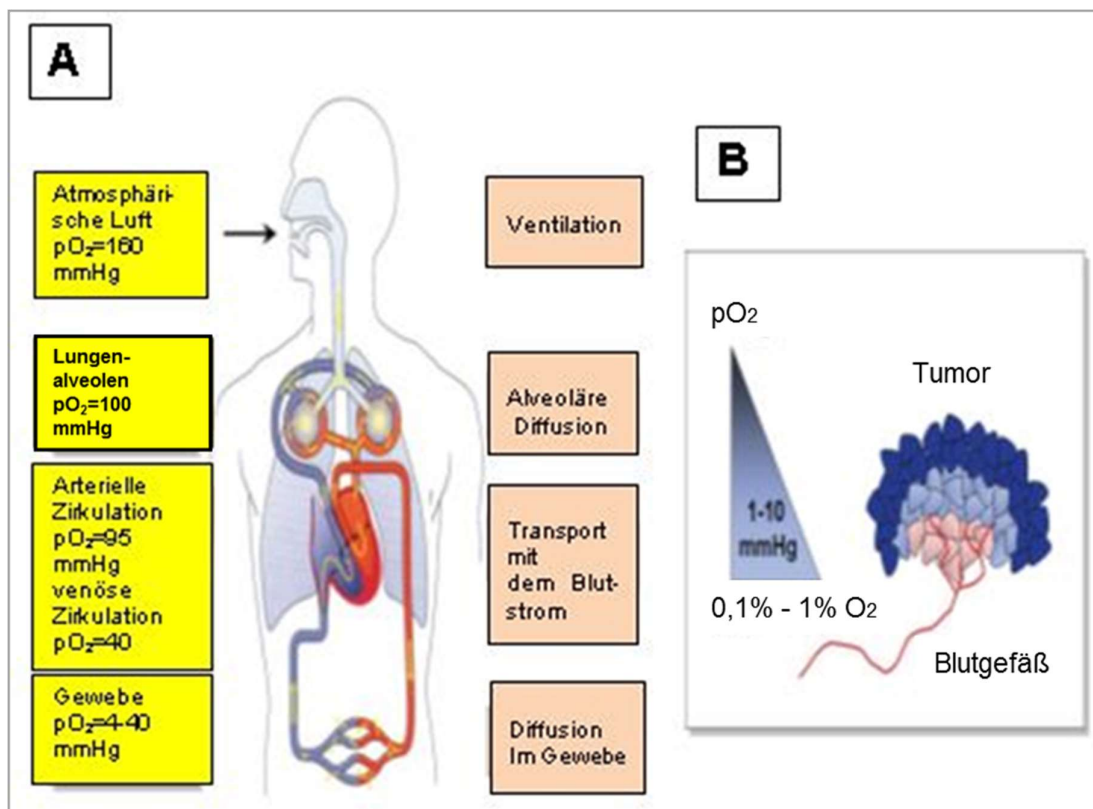


Abb.1.4: Unterschiedliche Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke (pO₂, pCO₂) unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus. In der Einatemungsluft existiert ein Sauerstoffpartialdruck von ca. 160 mmHg. In den Lungenalveolen beträgt der pO₂ 100 mmHg. Nach der Passage des Sauerstoffs über die Luft – Blut Schranke kommt es zu einem verringertem pO₂ in den arteriellen Gefäßen von 95 mmHg. Je nach perfundierten Organ beträgt der pO₂ in den O₂ – verbrauchenden Geweben 4 - 40 mmHg. B: Sauerstoffpartialdruckgradienten in einem Tumor. Im Bereich der infiltrierten Blutgefäße beträgt der pO₂ ca. 10 mmHg. Im Tumorzentrum kann es zu einem verringertem pO₂ auf bis zu 1 mmHg kommen (Science division Henry Ford College).

Für die Aufrechterhaltung wichtiger Zellfunktionen wird in einer sauerstoffarmen Umgebung der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1) benötigt, um die Sauerstoffhomöostase zu regulieren [58]. So spielt HIF-1, der als zellulärer O₂-Sensor dient, eine zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor bei der Anpassung an eine hypoxische Umgebung und reguliert ein großes Netzwerk von Zielgenen, wie z.B. diejenigen für den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder Erythropoetin (EPO) [59]. HIF-1 stellt ein Heterodimer dar und besteht aus einer Sauerstoff-abhängig vorhandenen α - und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Unter normoxischen Bedingungen im Gewebe wird die Stabilität der HIF-1 α Proteinuntereinheit posttranslational durch Sauerstoff- und Eisen-abhängige Prolylhydroxlasen (PHD) reguliert. Maxwell et al [60] stellten fest, dass HIF-1 α bei erhöhtem pO₂ in Gegenwart des Proteins des Tumorsuppressor-Gens Von-Hippel-Lindau (pVHL) über einen Ubiquitin/Proteasom-Proteinkomplex abgebaut wird (Abb. 1.4). Nur Proteine, die zuvor mit Ubiquitin - Molekülen markiert wurden, werden vom Proteasom abgebaut. Dabei werden die Proteine mit einer Ubiquitinkette verknüpft (Polyubiquitinierung) und somit als zu degradierende Proteine erkennbar gemacht [61]. VHL bildet zusammen mit den Proteinen Elongin B und C, sowie Cul2 und Rbx1 einen Komplex, welcher HIF-1 α für die Proteolyse markiert [60] (Abb. 1.4). Die Halbwertszeit von HIF-1 α liegt bei atmosphärischem pO₂ im Bereich von ca. zehn Minuten [62]. Unter hypoxischen Bedingungen jedoch führt der Mangel an Sauerstoff im Gewebe zu einer Hemmung der PHDs, es kommt zur Stabilisierung von HIF-1 α und nicht zur „Markierung“ mit Polyubiquitin [63,64]. Auf diese Weise akkumuliert HIF-1 α im Zytosol und transloziert in den Zellkern, wo es an die dort vorhandene β -Untereinheit bindet und als Heterodimer zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression spezieller Gene aktiviert (Abb.1.4). Dadurch kommt es ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen zur Aktivierung des Heterodimers HIF-1 [65]. Einen weiteren Aktivator des HIF-1 α Signalweges stellt die Eisenchelation dar [66]. HIF-1 α ist der zentrale Sauerstoffsensor für Säugerzellen [67]. Es ist in der Lage, durch Steuerung der Transkription entsprechender Gene u.a. auf Zellproliferation, verschiedene Transportvorgänge, Angiogenese und Glykolyse Einfluss zu nehmen [59]. Die bedeutendste Konsequenz einer lokalen Hypoxie stellt die Notwendigkeit der Umstellung des zellulären Energiestoffwechsels dar, weil der sauerstoffabhängige Prozess der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien nicht stattfinden kann. Der Verlust dieses effektiven Weges der Energie (ATP)-Gewinnung wird partiell

ausgeglichen durch eine entsprechende Steigerung der glykolytischen Aktivität. HIF-1 α trägt zu dieser Umstellung des Zellmetabolismus bei, indem der Transkriptionsfaktor Gene reguliert, die für glykolytische Enzyme kodieren, wie z.B. die Laktat-Dehydrogenase A (LDH A) [68]. Zahlreiche Studien belegen den Zusammenhang zwischen HIF-1 α Überexpression in soliden Tumoren und der Verkürzung der Überlebens- bzw. der rezidivfreien Zeit [69]. Dabei nimmt das HIF-1 Zielgen VEGF eine zentrale Stellung ein, da dieser Faktor durch Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration entscheidend zur tumorassoziierten Angiogenese beiträgt [70].

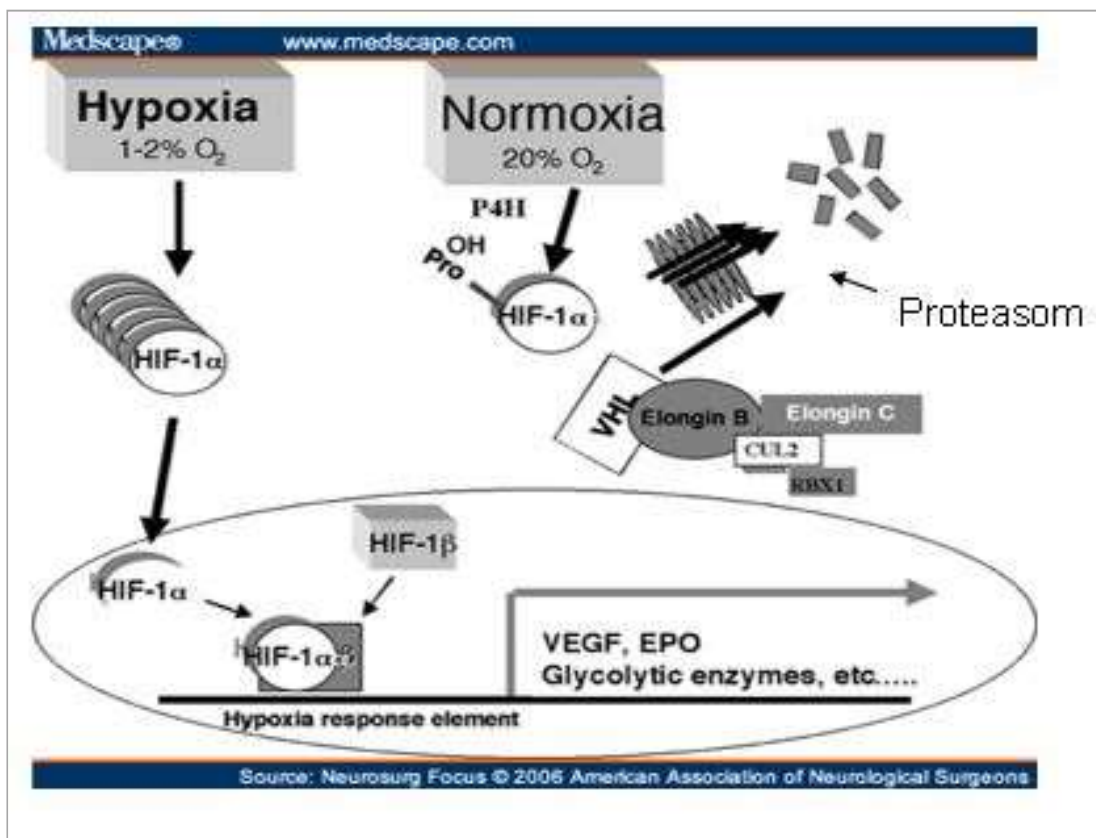


Abb.1.5: Modell der Aktivierung und Hydroxylierung des Heterodimers HIF-1 anhand des Hypoxiesignalwegs. Unter Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert in den Zellkern, wo es nach Bindung an HIF-1 β seine Zielgene für die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder Erythropoetin (EPO) reguliert. Unter Normoxie wird HIF-1 α durch das Protein Von-Hippel-Lindau (VHL), welches zusammen mit den Proteinen Elongin B und C, sowie Cul2 und Rbx1 einen Komplex bildet, markiert und von Prolyl 4-Hydroxylasen (P4H) an Proteinresten hydroxyliert und dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. (Medscape, 2006)

Das Mikromilieu spielt für die Funktion von Immunzellen eine wichtige Rolle. Dieses ist im entzündeten Gewebe bzw. in Strukturen sekundär lymphatischer Organe von einer geringen Glukosekonzentration, einem niedrigen pH-Wert und vor allem einer geringen Sauerstoffkonzentration (Hypoxie; $pO_2 = 4$ bis 40 mmHg; $\cong 0,5 - 5\% O_2$) geprägt [71]. Dem Umstand dieses hypoxischen Mikromilieus wird jedoch bei vielen *in vitro* Experimenten, welche die Funktion von Immunzellen untersuchen, häufig wenig Rechnung getragen. Insbesondere ist der biologische Effekt der Hypoxie auf die Funktion von B-Lymphozyten weitgehend unverstanden.

Über die CD40L - CD40 Interaktion, die im lymphatischen Gewebe - genauer im Keimzentrum z.B. eines Lymphknotens - stattfindet, können B-Zellen aktiviert werden (Abb.1.2). Die Aktivierung über den CD40-Signalweg induziert antigenpräsentierende, stimulierte B-Lymphozyten [38,39], welche wiederum antigenspezifische T-Zellen aktivieren können [49]. CD40L-aktivierte B-Lymphozyten können über längere Zeit (mehrere Wochen) in Kultur genommen und propagiert werden [72]. In der vorliegenden Promotionsarbeit wird mithilfe dieses Modells und hypoxischer Zellkulturbedingungen der Einfluss von Hypoxie auf die Antigen präsentierende Zelle (APC)-Funktion aktivierter B-Lymphozyten untersucht.

In vivo spielen sich die oben beschriebenen Vorgänge der Antigenpräsentation und Immunmodulation u.a. im entzündlichen Gewebe bzw. in sekundär lymphatischen Organen und damit in hypoxischem Milieu ab. Kennzeichnend für eine Entzündung ist die Infiltration des extravasalen Raumes durch Immunzellen, was mit einem erhöhten Nährstoff - und Sauerstoffbedarf einhergeht. Das führt zur Entstehung lokal hypoxischer Regionen, in denen der Sauerstoffbedarf das Angebot übersteigt. Physiologisch beträgt der Sauerstoffpartialdruck pO_2 im endkapillären Stromgebiet ca. 40 mmHg, im entzündlichen Gewebe und in Tumoren reduziert sich der O_2 -Anteil auf $0,15 - 1,5\%$ ($pO_2 = 1 - 10$ mmHg) (Abb. 1.3) und weniger [73,74]. Die der Hypoxie ausgesetzten Zellen reagieren mit Aktivierung von HIF-1 α , um durch Neubildung von roten Blutkörperchen mittels Erythropoetin oder durch Angiogenese mittels VEGF dem Sauerstoffmangel entgegenzuwirken. Für gewöhnlich werden *in vitro* Experimente mit immunkompetenten Zellen jedoch oft bei normaler Raumluft (21 Vol. %) durchgeführt, was letztlich Hyperoxie im physiologischen Sinne darstellt. Immunologische Effekte, die durch das inflammatorische, hypoxische Mikromilieu bestimmt werden, können folglich unter diesen hyperoxischen *in vitro* Bedingungen nicht beobachtet werden.

Im Vergleich zu einer ganzen Reihe von Untersuchungen, welche die Rolle von Hypoxie auf Makrophagen und T-Lymphozyten beschrieben haben, ist noch sehr wenig über den Einfluss von Hypoxie auf die Funktion von aktivierten B-Zellen als APCs bekannt.

1.6 ZIELE DER ARBEIT

Vor einigen Jahren erneut in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt ist die Antigenpräsentation als Funktion von B-Lymphozyten. Diese Erkenntnisse über die Fähigkeit der APC Funktion von B-Lymphozyten sollte in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um die Frage zu klären, welches Potenzial die *in vitro* Generierung CD40L-aktivierter B-Zellen bietet.

Die hierbei zugrunde liegenden zellbiologischen Mechanismen und insbesondere die Bedeutung von Hypoxie für die humanen B-Zellen sind jedoch noch weitgehend unverstanden. Hierzu wurden im vorliegenden Forschungsprojekt CD40L-aktivierte B-Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den konventionellen Zellkulturbedingungen immunphänotypisch und funktionell charakterisiert. Ergänzend sollten die erzielten Ergebnisse durch die Nachahmung eines hypoxischen Milieus mit Applikation eines Eisenchelators bestätigt werden.

Hierzu wurden folgende Teilziele verfolgt:

1. Der Einfluss von Hypoxie auf die APC Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten
 - a. Zellzyklus und Apoptoseverhalten
 - b. Immunphänotypisch und funktionell
2. Einfluss der Eisenchelation auf die APC Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten
 - a. Immunphänotypisch
 - b. Funktionell

Angestrebt ist ein besseres Verständnis der Wirksamkeit CD40L-aktivierter B-Lymphozyten als Zelltherapeutikum.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 TABELLE MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLE

| Methoden | Material | Bezugsquelle |
|--------------|---|--|
| Zellkultur | DMEM/Ham's F12 Medium | PAA GmbH, Pasching, Österreich |
| | RPMI 1640 Medium | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA |
| | Natronlauge (NaOH) 10% | Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| | Natriumchlorid (NaCl) >99,8% | Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| | Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂) >99% | Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| | IMDM Medium | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | Fetal calf serum (FCS) | Lonza, Basel, Schweiz |
| | Hepes Puffer (1 M) | PAA GmbH, Pasching, Österreich |
| | PenStrep 100 ml | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | Humanserum (HS) | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | Pancoll | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland |
| | Reinraumwerkbank Bioair 1.2 | Labmarket, Mannheim, Deutschland |
| | Zellkulturflaschen 200 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| | Trypsin-EDTA 5 %, 10x, | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | DMSO 10 % | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | Trypanblau (TrypanBlueStain 0,4 %) | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim, Deutschland |
| | 6-Well Platten (Nunc) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | PBS 10x, 500 ml | PAA GmbH, Pasching, Österreich |
| | NIH-3T3 Mausfibroblasten | Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland |
| | Zentrifuge Z 513 | Hermle, Wehingen, Deutschland |
| | Wasserbad WNB7-45 | Memmert, Schwabach, Deutschland |
| Falcon 50 ml | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland | |

| <u>Methode</u> | <u>Material</u> | <u>Bezugsquelle</u> |
|------------------------|---|---|
| | Spritzen 50 ml | Braun Melsung AG, Melsungen, Deutschland |
| | Autoklav Typ 23 | Melag, Berlin, Deutschland |
| Hypoxie | CO ₂ /N ₂ -Inkubator CB 053 | Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland |
| Proliferation | Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) 25 mg | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| | Beads | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| Apoptose | Binding buffer 50 ml | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | Staurosporin 0,5 mg | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | AnnexinV | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| Intracellular Staining | Golgistop (Monensin) | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| Durchfluss-zytometer | Facs Röhrchen 5 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| | Zellwash | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| | Durchflusszytometer Gallios | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| | Durchflusszytometer Canto | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | Immunglobulin Octagam10% | Kryotec, Hamburg, Deutschland |
| | Humanalbumin 200 g/l, 50 ml | Baxter, Deerfield, USA |
| | Zell-Fix (10x) | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | Reinstwasser | Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland |
| | Formalin 0,5 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| | Sterile Filter 0,80 µm | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| B-Zell Aufreinigung | MACS Buffer, 1l PBS+ 0,5 % BSA + 2 mM EDTA | PBS: Santa Cruz Biotechnologie, Texas, USA BSA: Applichem, Darmstadt, Deutschland EDTA: Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | Sterile Filter | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | EDTA 100 g | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | Albumin-FraktionV (BSA) 500 g | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| | MACS Separation Miltenyi | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| | MACS Columns 25 LS | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| | MACS Filters | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| | MACS Multi Stand | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| | MicroBeads, CD19, human | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| MicroBeads, CD3, human | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland | |

| <u>Methode</u> | <u>Material</u> | <u>Bezugsquelle</u> |
|--------------------------------|---|---|
| Mixed-lymphocyt-reaction (MLR) | 96er Well Platten (Sigma, runder Boden) | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| | GolgiStop | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| Zellzyklus | Ethanol 70%, vergällt | Otto-Fischar GmbH+Co KG, Saarbrücken, Deutschland |
| | 7-Aminoactinomycin (7AAD) 2 ml | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| Eisenchelator | Desferal 2 mg (Deferoxamine) | Novartis, Nürnberg, Deutschland |
| Antikörper | CD80 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD107a Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD3 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD86 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | PDL2 Ratte anti-maus IgG monoklonal | eBioscience, Frankfurt, Deutschland |
| | CD62L Maus anti-human IgG monoklonal | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| | CD8 Maus anti-human IgG monoklonal | Biologend, Fell, Deutschland |
| | CD38 Maus anti-human IgG monoklonal | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| | CD27 Maus anti-human IgG monoklonal | Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland |
| | CD79a Maus anti-human IgG monoklonal | Biologend, Fell, Deutschland |
| | PDL1 Ratte anti-maus IgG monoklonal | eBioscience, Frankfurt, Deutschland |
| | CD14 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD19 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD69 Maus anti-human IgG monoklonal | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| | CD4 Maus anti-human IgG monoklonal | Biologend, Fell, Deutschland |
| | CD20 Maus anti-human IgG monoklonal | Biologend, Fell, Deutschland |
| | CD45 Maus anti-human IgG monoklonal | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |

2.1.2 KULTURMEDIEN UND LÖSUNGEN

Als Standardmedium für Adhäsionszellkulturen diente, sofern nicht anders erwähnt, RPMI 1640 unter Zusatz von Penicillin-Streptomycin (PenStrep), fetalem Kälberserum (FCS) und HEPES Puffer in den folgenden effektiven Konzentrationen in 500 ml Medium:

- HEPES 10 mM/l
- Penicillin-Streptomycin 0,1 µg/l
- FCS 10%

Diese Zusammensetzung wird im Folgenden als RPMI-Medium (pH 7,4) bezeichnet.

Die Kultur von CD40L-Mausfibroblasten wurde in DMEM-Ham's F-12 Medium unter Zusatz von FCS, HEPES und PenStrep (in den oben angegebenen Konzentrationen) sowie Gentamicin/G418 angesetzt, dessen effektive Konzentration in 500 ml Medium 180 µg/l betrug. Diese Zusammensetzung wird im Folgenden als NIH (*National Institutes of Health*) Medium bezeichnet.

Das Ausplattieren von CD40L-Mausfibroblasten auf 6-Well Platten erfolgte in DMEM Medium unter Zusatz von FCS, HEPES und PenStrep in den oben angegebenen Konzentrationen. Im Folgenden wird das Medium als NIH-Wildtyp Medium bezeichnet.

Bei der Färbung mit Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7AAD) zur Erkennung des Apoptoseverhaltens CD40L-aktivierter B-Zellen wurde Binding buffer verwendet: Stammlösung: 0,1 M HEPES / NaOH, pH 7,4, 1,4 M NaCl und 25 mM CaCl₂ Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 verdünnt mit Reinstwasser (Ampuwa). Das Einfriermedium setzte sich aus 90 Vol. % fetalem Kälberserum (FCS) und 10 Vol. % Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammen.

Für diverse Zellkulturarbeiten, wie z.B. das Waschen von NIH-3T3 Fibroblasten wurde PBS verwendet. 500 ml PBS 10x wurden zu 1 l Reinstwasser (Ampuwa) hinzugefügt und der pH 7,2 mit NaOH eingestellt. Die PBS Lösung war 3,33-fach konzentriert. Das in einer Flasche abgefüllte PBS wurde autoklaviert.

2.2 VORBEREITUNG ZUR KULTIVIERUNG VON CD40L-AKTIVIERTEN B-ZELLEN

2.2.1 CHARAKTERISIERUNG DER CD40L MAUSFIBROBLASTENKULTUR

Zur Aktivierung von B-Lymphozyten wurden adhärente NIH-3T3 Mausfibroblasten eingesetzt, welche den humanen CD40-Ligand (CD40L) stabil transfiziert exprimierten [75,74]. Durchflusszytometrische Kontrollen in regelmäßigen Abständen bestätigten eine gleichbleibend hohe Expression des membranständigen CD40L (CD154) Moleküls auf den Fibroblasten. Die Expressionsdichte des CD40-Liganden wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als ein Maß der auf einzelnen Zellen exprimierten Moleküle gemessen. Liegt die MFI dabei <10 , bedeutet das, dass die Expressionsdichte des membranständigen CD40L Moleküls nicht hoch genug ist, um diese für Zellkulturarbeiten einzusetzen. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2 HYPOXISCHE KULTURBEDINGUNGEN FÜR CD40L-AKTIVIERTE B-ZELLEN

Die hypoxischen Kulturbedingungen für die CD40L-aktivierten B-Zellen wurden durch den CO₂/N₂ Zellinkubator hergestellt, welcher die hypoxische Atmosphäre (0,8 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂) erzeugte. Für die Hypoxiekulturen wurde das RPMI-Medium über 24 Std. im definierten Sauerstoffmilieu (0,8 % O₂ erreicht durch Verdrängung des O₂ durch Stickstoff N₂) bei regulären Standardzellkulturbedingungen (5 % CO₂) präinkubiert.

2.2.3 CD40L MAUSFIBROBLASTENKULTUR

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 bei sterilen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen. Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90 % Ethanol

desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert. Die CD40L exprimierenden Mausfibroblasten wurden in einem CO₂-Brutschrank im offenen System bei 37°C, bei einem normoxischen pO₂ (21%), sowie 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit je 10 ml NIH-Medium kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die konfluenten Zellen nach Entfernen des alten Mediums zunächst mit PBS zur vollständigen Eliminierung des FCS gewaschen, da dieses die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt hätte, bevor sie mit drei ml Trypsin-Lösung (Trypsin-EDTA 10-fach, 5 %, 1:10 in PBS verdünnt; final 0,5%) für fünf Min. enzymatisch behandelt und anschließend zur Neutralisierung mit 10 ml NIH-Medium abgespült wurden. Trypsin ist eine Protease, die u.a. Adhäsionsproteine der Mausfibroblasten angreift und somit die Lösung der Zellen vom Flaschenboden bewirkt [76]. Die Wirkung des Trypsins wird danach gestoppt, damit die Zellen nicht beschädigt werden, da Trypsin potentiell zytotoxisch wirkt. Nach dem Abzentrifugieren (1200 rpm, für fünf Min. bei Raumtemperatur (RT)) wurde das Zellpellet resuspendiert; je 1,5×10⁶ Zellen wurden in 10 ml Medium + 180 µg/l Gentamicin G418 und neuen 200 ml Gewebekulturflaschen weiterkultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂. Die Zellen wurden bis zu einer maximalen lückenlosen Bedeckung der Oberfläche eines Kulturgefäßes von 80% kultiviert, weshalb die Zellen alle drei bis vier Tage in neue Flaschen umgesetzt wurden.

2.2.4 ZELLSEPARATION MONONUKLEÄRER ZELLEN

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) aus peripherem humanen Blut dienen Blutprodukte, welche bei der Verarbeitung von citrathaltigen Vollblutspenden zu Plasmakonzentraten anfallen (*buffy coats*). Im Rahmen des Ethikvotums Nummer 04-161 wurden die *buffy coats* aus dem Institut für Transfusionsmedizin und dem Eigenblutspendezentrum der Uniklinik Köln bezogen.

Mit Hilfe der von Boyum entwickelten Pancoll-Dichtgradienten-Zentrifugation können PBMCs von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten getrennt werden [77]. Pancoll repräsentiert ein ungeladenes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, dessen Dichte (1,077 g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen mittlerer Dichte die Pancollschicht während einer Zentrifugation passieren

können. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen) sammeln sich in der Interphase an, während Granulozyten, Erythrozyten und nicht-vitale Zellen sich in der Pancollphase wiederfinden [78].

Zur praktischen Durchführung des Pancoll-Protokolls wurden 10 ml Blut 1:4 mit PBS verdünnt und auf 15 ml Pancoll in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) aufgeschichtet. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 2400 rpm und RT ohne Bremse waren Erythrozyten und Granulozyten durch die Pancollschicht sedimentiert und die peripheren mononukleären Blutzellen befanden sich in der Interphase zwischen Pancoll und Plasma [79]. Die separierten PBMCs wurde abpipettiert, zweimal mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (für fünf Min. bei RT, 1200 rpm). Das dabei entstandene Zellpellet wurde weiter verwendet, der Überstand verworfen [80].

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in RPMI-Medium gewaschen und bei 1200 rpm für fünf Min. bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl einer 0,84% Trypanblaulösung in isotoner NaCl-Lösung versetzt, was eine 0,04 % Trypanblaulösung ergab. Trypanblau dringt in tote Zellen, aufgrund der intakten Membranintegrität aber nicht in lebende Zellen ein, wodurch tote Zellen unter dem Mikroskop dunkelblau erscheinen und nicht mitgezählt werden. Es wurden die Zellen von jeweils 16 Kleinquadraten einer Neubauer-Zählkammer gezählt und summiert, um die Zellzahl in einem Großquadrat zu erhalten [81]. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} * 10 * 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

2.2.5 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Durch Gefrierkonservierung in flüssigem Stickstoff können Zellen für lange Zeit gelagert werden [82]. Das Einfrieren eukaryotischer Zellen ist problematisch, da diese durch intrazelluläre Eiskristallbildung während des Gefriervorganges geschädigt werden können. Die B-Zellen werden deshalb in ein sogenanntes Einfriermedium (FCS 90% mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) gegeben, um Zellschäden so gering wie möglich zu halten. Als kryoprotektive Substanz verhindert DMSO die Ausbildung von intrazellulären Eiskristallen. Bei steigenden Temperaturen und in hohen Konzentrationen wirkt DMSO zytotoxisch, weshalb es wichtig ist, die Zellen im Einfrierprozess möglichst schnell auf den Bereich zwischen 0 und 4 °C abzukühlen [83]. DMSO wurde anstatt Glycerin gewählt, weil es schneller in die Zellen diffundiert und die Kristallbildung innerhalb der Zelle minimiert. Um den Austritt von intrazellulärem Wasser zu ermöglichen, muss ein stufenweises Absenken der Temperatur erfolgen. Dies geschieht, indem die B-Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (Einfrierbox) zunächst für 24 Std. bei – 80 °C gelagert werden, um sie anschließend in flüssigen Stickstoff mit – 196 °C zu überführen. Es ist wichtig, die Zellsuspension (0,5 ml) beim Auftauprozess unverzüglich zu verdünnen und durch Abzentrifugieren vom Einfriermedium zu befreien. Die Kryoröhrchen wurden deshalb aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad transferiert und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die B-Zellen in 10 ml RPMI Medium langsam aufgenommen und für fünf Min. bei 1200 rpm sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet in RPMI Medium resuspendiert und eine Zellzählung durchgeführt.

2.2.6 AUFREINIGUNG DER HUMANEN B-LYMPHOZYTEN AUS DER PBMC-FRAKTION MITTELS POSITIVSELEKTION

Prinzip

Das Verfahren der magnetischen Zellsortierung (MACS) verbindet immunologische Methoden mit physikalischen Gegebenheiten. Ein monoklonaler Antikörper gegen ein spezifisches Zelloberflächenmolekül der jeweils zu isolierenden Zellpopulation wird mit kolloidalen super-paramagnetischen Partikeln (*microbeads*, Durchmesser

ca. 100 nm) konjugiert. Mit diesem Antikörper werden die aufzureinigenden Zellen, die sich in einer Zellsuspension befinden, markiert und durchlaufen anschließend ein starkes Magnetfeld [84]. Unmarkierte Zellen können das Magnetfeld durchlaufen, während die gewünschten, mit den entsprechenden *microbeads* markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden. Dieser Vorgang kann mehrfach wiederholt werden, um eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen [85]. Nach enzymatischer Entfernung der *microbeads* ist eine weitere Sortierung der Zellen nach anderen Oberflächenantigenen möglich.

Method

Die Zellsuspension (15 ml) mit den humanen PBMCs wurde entsprechend den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec) mit 0,01 ml *microbeads* und 0,08 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen inkubiert. In diesem Fall waren die *microbeads* an einen Antikörper gekoppelt, welcher spezifisch für das CD19 Oberflächenprotein von B-Zellen ist. Die Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotec), mit deren Hilfe die gewünschten humanen B-Zellen separiert werden sollten, wurde am Magnetseparator installiert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült, um diese zu kühlen und eventuell zurückgebliebene Zellen von vorangegangenen Durchläufen zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen über einen Zellsuspensionsfilter innerhalb eines Magneten entlang der LS-Säule pipettiert, sodass markierte (Antikörper gekoppelte) Zellen in der Säule verblieben und unmarkierte Zellen im Durchlauf aufgefangen werden konnten. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Zellen wurde die Säule viermal gewaschen (4×3 ml MACS-Puffer) und aus dem Magnetseparator entfernt.

Zur Elution der Antikörper (CD19) -gebundenen B-Zellen wurden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit dem Kolben unter mäßigem Druck eluiert. Die Reinheit der sortierten Populationen wurde in der Durchflusszytometrie überprüft.

2.3 KULTIVIERUNG UND CD40L-VERMITTELTE AKTIVIERUNG VON B-LYMPHOZYTEN

2.3.1 VORBEREITUNG DER „CD40L“-ZELLKULTURPLATTEN

Vor dem Ansetzen einer nahezu reinen B-Lymphozytenkultur aus humanem Vollblut mussten NIH-CD40L Zellkulturplatten vorbereitet werden. Dazu wurden murine CD40L-Fibroblasten aus der Zellkulturflasche entnommen (siehe 2.2.3) und in NIH-Wildtyp Medium aufgenommen. In der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln wurden die Zellen bestrahlt, um die Proliferationsaktivität der Fibroblasten zu hemmen. Die Zellen sollten nicht weiter proliferieren, aber dennoch vital sein, da sie Träger des CD40-Liganden waren und somit essentiell für die spätere Aktivierung der B-Zellen. Sie wurden im Bestrahlungsgerät einer [¹³⁷Cs] Strahlenquelle für 16 Min. ausgesetzt und mit 30 Gray (=J/kg) bestrahlt. Anschließend wurden sie auf eine 6-Well Kulturplatte in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/2 ml pro Well pipettiert. Im Brutschrank erfolgte entweder eine Inkubation über Nacht oder aber über einen Zeitraum von mind. acht Std. bei 37°C mit einem normoxischen pO₂ 21%, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %, um eine optimale Adhärenz der Fibroblasten gewährleisten zu können.

2.3.2 CD40 B-LYMPHOZYTEN KULTUR

Das Ausgangsmaterial für die Generierung einer CD40 B-Zell Kultur waren aufgereinigte B-Lymphozyten (s.2.2.6). Die Zellen wurden in RPMI-Medium aufgenommen. Das WT-Medium der NIH-CD40L Platten wurde abgenommen und jedes Well wurde vorab mit 2 ml PBS gespült. Anschließend wurden 2×10^6 B-Lymphozyten/Well in 4 ml/Well RPMI Medium hinzugegeben. Dabei handelte es sich um eine Co-Kultur - für bis zu sieben Tage – mit transgenen, murinen Fibroblasten, die den humanen CD40-Liganden exprimierten, mit dem Zweck, humane B-Lymphozyten in einen aktivierten Zustand zu versetzen.

2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

2.4.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG

Die Durchflusszytometrie oder auch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (englisch: *fluorescence activated cell sorting, FACS*) dient zur Unterscheidung und Analyse von Zelleigenschaften wie Größe, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen [86]. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzgekoppelten, gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen gerichteten Antikörpern markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geleitet [87]. Durch das Auftreffen der Lichtstrahlen genau definierter Wellenlänge, entsprechend der Ausgangswellenlänge des Fluorochroms, auf die Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung. Das in Verlaufsrichtung des Lasers abgelenkte Vorwärtsstreulicht oder sog. *forwardscatter* (FSC) und das dazu rechtwinklig abgestrahlte Seitwärtsstreulicht oder sog. *sidewardscatter* (SSC) wird von einem Detektor photometrisch analysiert. Das Vorwärtsstreulicht dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht als Maß für die intrazelluläre Granularität (Abb. 2.1). Damit kann die gewünschte Zellpopulation ausgewählt und auf die Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Antikörpermoleküle hin untersucht werden [88]. Das Fluorochrom, das an die zur Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper gekoppelt ist, absorbiert einen Teil der Lichtenergie des Laserstrahls und emittiert niederenergiereiches Fluoreszenzlicht. Linsen sammeln das emittierte Licht und trennen es durch Spiegel und Filter nach Wellenlängenbereichen auf, bevor es unterschiedliche Detektoren erreicht. Ungestreutes Laserlicht wird eliminiert und somit nicht gemessen.

Durch Setzen von elektronischen Analysefenstern („*gate*“) können die gewünschten Zellpopulationen analysiert werden. Das Setzen dieser Analysefenster wird im Folgenden als „*gating*“ bezeichnet. Es bestehen vielfältige Möglichkeiten zur Darstellung und Analyse. Durch das „*gating*“ kann eine bestimmte Subpopulation im FSC-SSC Diagramm ausgesucht und näher auf ihre Eigenschaften untersucht werden. In der Abbildung 2.1 ist die Darstellung „*ungated*“ gegeben, was bedeutet, dass man alle Zellen sieht, die im Durchflusszytometer gemessen worden sind. Möchte man sich eine bestimmte Subpopulation anschauen, so muss diese zunächst mar-

kiert werden, in der Abbildung 2.2 als R 1 bezeichnet. Bei einem erneuten Diagramm würde man diese markierte Subpopulation als Vorlage nehmen, um sich weitere Eigenschaften dieser Population anschauen zu können, was mit Hilfe der *Cluster of differentiation* (CD) (s. 2.4.2) möglich ist. Möchte man z.B. wissen, wie viele der Lymphozyten T-Lymphozyten und wie viele B-Lymphozyten sind, setzt man eine Region („gate“) in das Streulichtdiagramm ein, die nur die Lymphozyten enthält. Im nächsten Diagramm wird analysiert, wie viele der Lymphozyten CD19 (B-Zell Marker) und wie viele CD3 (T-Zell Marker) (s. 2.4.2) positiv sind (Abb. 2.2). Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) sind zur Detektion der Zellen im Durchflusszytometer notwendig. Die Anzahl der Zellen einer Subpopulation die in einem Analysefenster („gate“) vorkommen, werden in Prozent angegeben werden (% „gated“).

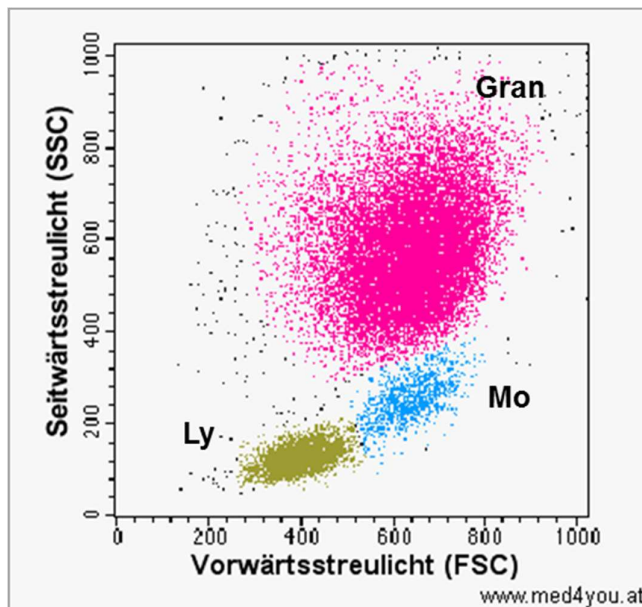


Abb.2.1: Die vorherige Abbildung zeigt beispielhaft eine Punktwolkendarstellung (*DotPlot*) in der Durchflusszytometrie. Die grüne Wolke zeigt die Lymphozyten (Ly), die blaue Wolke die Monozyten (Mo) und die rote Wolke die Granulozyten (Gran). Monozyten sind größer als Lymphozyten, was man anhand des Vorwärtstreulicht (FSC) erkennen kann. Dabei liegen die Monozyten auf der x-Achse (FSC) weiter rechts als die Lymphozyten (www.med4you.at)

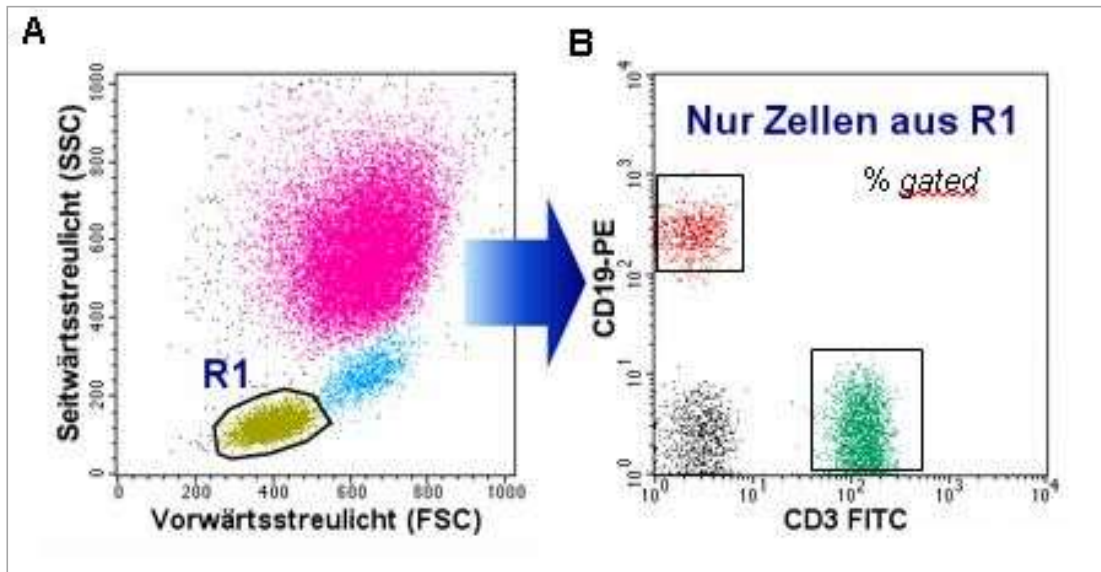


Abb.2.2: Diese Abbildung zeigt beispielhaft die Analyse bestimmter Subpopulationen mit Hilfe der *gating* Strategie. A) Das *gate* (R1) markiert die zu untersuchenden Lymphozytenpopulation. B) Anhand der mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten CD19- spezifischen Antikörper (B-Zell Marker) und CD3-spezifischen Antikörper (T-Zell Marker) werden die gewünschten Subpopulationen markiert: B-Zellen (rote Wolke), T-Zellen (grüne Wolke). Fluoreszenzfarbstoffe: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). % *gated* bedeutet, dass alle Zelle in dem Analysefenster (*gate*) prozentual gemessen an der Lymphozytenpopulation erfasst werden (www.med4you.at).

Die einfachste Form der Darstellung bei der Auswertung stellt das Histogramm dar mit seiner eindimensionalen Variante der Intensitätsverteilung für einen Parameter. Dabei ist nach rechts (x-Achse) die Fluoreszenzintensität aufgetragen und nach oben (y-Achse) die Anzahl der Ereignisse (*counts*) (Abb. 2.3). *Dot-Plot* (Punktwolkendarstellungen) oder *Contour-Plot* (Höhenliniendarstellungen) sind als zweidimensionale Darstellungen möglich. Eine einfache Methode der Vermessung von Zellen in *Dot-Plot* ist es, Regionen in der Form einer Quadrantenanalyse zu definieren.

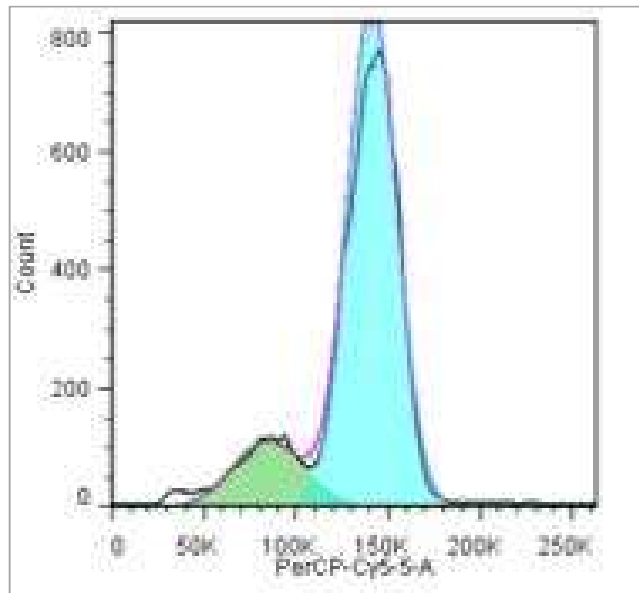


Abb.2.3: Beispielhaftes Histogramm als Darstellungsform bei der Auswertung im Durchflusszytometer. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen, wobei Cyanin5.5 markiertes Peridinin-Chlorophyll (PerCP-Cy5.5) der Fluoreszenzfarbstoff ist. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Ereignisse aufgetragen (*counts*).

2.4.2 ANALYSE DES IMMUNPHÄNOTYPS VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Zum Nachweis von Differenzierungsantigenen (*Cluster of differentiation*) werden spezifische Antikörpern verwendet [89]. Mit „CD“ werden immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen bezeichnet, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Meistens handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine mit spezifischen Funktionen, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden. Manche CDs haben Signal- oder Rezeptorfunktion, bei anderen wiederum konnte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. B-Zellen werden unter anderem durch die Oberflächenantigene CD19 und CD20 charakterisiert [90]. CD20 ist ein Plasmamembran-Phosphoprotein, welches eine Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Zellen spielt [91]. Aktivierte B-Lymphozyten zeichnen sich durch eine gesteigerte Expression von CD80, CD86 sowie MHC-Klasse II Molekülen (wie HLA-DR) aus [92]. Das CD19-Antigen ist ein integrales Membranglykoprotein vom Typ I und wird von allen normalen B-Zellen einschließlich der frühen Stadien sowie von Plasmazellen exprimiert. Auf T-Zellen, Monozyten

und Granulozyten ist es nicht vorhanden. Die Oberflächenantigene CD80 und CD86 sind Membranproteine, welche auf aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Sie gehören zur Immunglobulin-Superfamilie B7. Über die co-stimulatorische Interaktion mit dem Liganden CD28, welcher auf T-Zellen exprimiert wird, kommt es zur T-Zell Aktivierung. HLA steht für humanes Leukozytenantigen-System und ist ein Synonym für Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Dieser Komplex besteht aus Genen, die Proteine kodieren, welche unter anderem für die Antigenpräsentation wichtig sind [93]. Es gibt die beiden Proteinkomplexe MHCI und MHCII. MHCI befindet sich auf der Oberfläche nahezu aller Zellen. MHCII Komplexe werden von Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert.

CD62L, auch L-Selektin genannt, ist ein Glykoprotein [94]. Es gehört zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle und wird bei Lymphozyten an der Zelloberfläche exprimiert. Es vermittelt deren Adhäsion an Endothelzellen und ist somit wichtig für deren Migration aus der Blutbahn in sekundär lymphatische Organe. Der Begriff „Lymphozyten-*homing*“ beschreibt den Prozess, bei dem immunkompetente Lymphozyten aus der Peripherie nach Antigenkontakt entweder über die Lymphbahnen in die Lymphknoten oder über die Blutbahn in sekundär lymphatische Organe, wie z.B. die Milz, einwandern. Damit wird eine spezifische Immunantwort provoziert, die ohne CD62L nicht möglich wäre [95].

2.4.3 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG: ANTIKÖRPERMARKIERUNGEN

Als Vorbereitung auf die FACS-Messung wurden die Einzelzellsuspension auf FACS-Röhrchen verteilt (5×10^5 bis 2×10^6 Zellen), bei 1200 rpm für fünf Min. pelletiert und der Überstand verworfen [96]. Zuvor erfolgte ein Blockierschritt mit 5 μ l Octagam (10 %; humane IgG-Immunglobuline) für fünf Min., wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper verringert werden sollten. Die Oberflächenmarkierung erfolgte mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (1,5 μ l) in einem Probenvolumen von 50 bis 100 μ l. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunklen wurde die Probe zur Entfernung überschüssiger Antikörper mit jeweils 2 ml ZellWash-Puffer (ZellWash) gewaschen und bei 1500 rpm für fünf Min. zentrifugiert. Nach Resuspension in 300 μ l ZellWash wurden die Zellen durch-

flusszytometrisch analysiert. Zur Fixierung der Zellen für eine spätere FACS Messung wurden die mit Antikörpern markierten Zellen in 300 µl Zell-Fix (1:10 verdünnt mit Ampuwa) fixiert und bis zur Messung bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.4.4 MESSUNG DER ZELLGRÖSSE UND ZELLZAHL

Die durchflusszytometrischen Messungen der Zellen erfolgten mit dem Durchflusszytometer Gallios (BeckmanCoulter). Von jeder Zelle wurden das Vorwärtstreulicht und das Seitwärtstreulicht gemessen, aus denen Informationen zur Zellgröße bzw. Zellgranularität gewonnen werden können. Die Auswertung erfolgte mit der Kaluza Software (BeckmanCoulter). Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens wurden die Zellzahlen der unterschiedlichen Kulturen, ausgehend von einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/Well an Tag 0, über die jeweilige Kultivierungszeit zusammengefasst.

2.5 ANALYSE DER APOPTOSE UND DES ZELLZYKLUS CD40L-AKTIVIERTER B-ZELLEN

2.5.1 MESSUNG VON APOPTOSE MITTELS DER PROTEINE ANNEXIN V UND 7AAD

Die Apoptose ist ein genetisch gesteuerter Prozess des Zelltodes. In frühen Stadien finden Veränderungen in der Zellmembran statt. Die Plasmamembran von Zellen stellt eine Lipiddoppelschicht dar, die asymmetrisch aufgebaut ist. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite als ein Zeichen der frühen Apoptose auf [97].

Das Protein Annexin V bindet spezifisch an PS. Durch Markierung von Zellen mit Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen [98]. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, so kann Annexin V in die Zellen eindringen und an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei

alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die Annexin V Markierung mit einer 7-Aminoactinomycin D (7AAD) -Färbung. Das 7AAD dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Lebende Zellen sind daher Annexin V-negativ und 7AAD-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv und 7AAD-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin V-positiv und 7AAD-positiv [99].

Durchführung

Die Aussaat der aufgereinigten B-Lymphozyten erfolgte in 6-Well Platten mit 2×10^6 Zellen pro Well auf NIH-3T3 „feeder“ Zellen. Die aufgereinigten B-Lymphozyten wurden für sieben Tage unter atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck (21 % O₂) oder Hypoxie (0,8 % O₂) auf CD40L-NIH Zellen kultiviert.

Eine FACS Analyse wurde jeweils an Tag 0, 3 und 7 durchgeführt. Nach Abnehmen der CD40L-aktivierten B-Zellen von der Kulturplatte wurden die adhärenen Zellen in Zentrifugenröhrchen übertragen und zentrifugiert (1200 rpm 5 Min. bei RT); der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 100 µl Binding buffer resuspendiert. Die Zugabe des calciumhaltigen Binding buffers war für die Markierung mit Annexin V notwendig, da Annexin V nur calciumabhängig an Phosphatidylserin bindet.

Zu jeder Probe wurden 2,5 µl Annexin V und 2,5 µl 7AAD zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 Min. bei RT wurden die Zellen immunologisch auf Expression der B-Zellmarker CD20 + CD79a hin analysiert und erneut für 15 Min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 400 µl Binding buffer resuspendiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers Gallios analysiert.

2.5.2 ZELLZYKLUSANALYSE MIT 7AAD UND DEM DNA-INTERKALATOR PROPIDIUMIODID (PI)

Sich teilende Zellen unterliegen dem Zellzyklus, der sich durch den unterschiedlichen DNA-Gehalt der jeweiligen Zellen in Stadien einteilen lässt. Nach der mitotischen Zellteilung (M-Phase) treten die Zellen in die G₀- oder G₁-Phase ein. Sowohl in der G₁-Phase (Wachstumsphase) als auch in der G₀-Phase (Ruhephase) weisen

eukaryonte Zellen einen diploiden Chromosomensatz ($2n$) auf. In der darauf folgenden S-Phase (Synthesephase) variiert der DNA-Gehalt zwischen $2n$ und $4n$, bis in der G₂-Phase ein tetraploider Chromosomensatz vorliegt [100]. Danach verteilt sich, in der Mitose der Chromosomensatz auf die jeweiligen Tochterzellen.

Für die DNA-Markierung wurde zunächst 7AAD benutzt, welches ein fluoreszierendes Molekül ist, das nach Bindung an DNA-Moleküle seine Fluoreszenzeigenschaften ändert und mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann [101]. Vitale Zellen nehmen 7AAD und PI aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht auf. Daher wurden die Zellen vorab mit 70% eiskaltem (-20°C) Ethanol über Nacht bei 4°C fixiert, wodurch eine Permeabilisierung der Zellmembran zustande kam. Äquivalent zur DNA-Markierung mit 7AAD kann auch eine Analyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) durchgeführt werden [102], welcher in der Doppelhelix sowohl von RNA (dsRNA) als auch DNA (dsDNA) integriert wird. Das Propidiumiodid-Molekül hat durch die geringe Polarität eine besonders hohe Affinität zu DNA [103,104].

Dieser Farbstoff kann sich interkalierend in die Doppelhelix der DNA zwischen benachbarte Basenpaare einschieben und in diese interkalieren. Da in den einzelnen Zellzyklusphasen ein unterschiedlicher Gehalt an DNA vorzufinden ist, ist es möglich, die Zellen mittels der Autofluoreszenz von PI anhand der detektierten Fluoreszenzsignale den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen.

Nach Kultivierung der Zellen unter Normoxie (21 % O_2) oder Hypoxie (0,8 % O_2) über drei Tage wurde die Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Tag 0 und Tag 3 durchgeführt. Als erstes wurden 1×10^6 aufgereinigte B-Lymphozyten je Probenröhrchen gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für fünf Min. und Entfernen des Überstandes wurden sie durch tropfenweise Zugabe von 70% eiskaltem (-20°C) Ethanol über Nacht bei 4°C fixiert. Dadurch kam eine Permeabilisierung der Zellmembran zustande. Nach zweimaligem Waschen der fixierten Zellen mit Zellwash erfolgte die Markierung über die Autofluoreszenz der Zellen durch Zugabe von $5 \mu\text{l}$ 7AAD je Probenröhrchen und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Ende der Inkubation wurden $300 \mu\text{l}$ ZellWash je Probenröhrchen hinzugefügt und die Fluoreszenzintensitäten jeder Probe in der Durchflusszytometrie gemessen. Diese Bilddaten waren die Grundlage zur Unterscheidung der Zellzyklusphasen [105], die jeweils in stöchiometrischer Beziehung zum DNA-Gehalt stehen. Der größte Zellanteil einer proliferierenden Zellpopulation befindet sich in

der G0/G1-Phase und besitzt einen diploiden Chromosomensatz. Der DNA-Gehalt schwankt in der S-Phase zwischen einem diploiden und kurz vor Eintritt in die M-Phase einem tetraploiden Chromosomensatz, und ebenso die Fluoreszenzintensität der Zellen. In der G2- und M-Phase stehen die Zellen kurz vor oder inmitten der Zellteilung und weisen einen doppelten Chromosomensatz auf. Die Fluoreszenzintensität ist dabei aufgrund des interkalierenden 7AAD doppelt so stark, da sich 7AAD in die Doppelhelix der DNA zwischen benachbarte Basenpaare einschleibt und dadurch das Fluoreszenzsignal bei doppeltem Chromosomensatz stärker ist. Da sich die meisten Zellen einer Zellpopulation entweder in der G0/G1-Phase befinden oder in der G2- oder M-Phase, erscheinen im Histogramm zwei Höchstwerte, im Folgenden „*peaks*“ genannt. Da die G2- und M-Phase durchflusszytometrisch nicht unterschieden werden können, werden sie als gemeinsamer *peak* dargestellt. Die S-Phase wird durch den Bereich, der zwischen den beiden *peaks* liegt, dargestellt [106]. Ein geringer prozentualer Anteil einer Zellpopulation entfällt auf Zellen, die weniger DNA als einem diploiden Chromosomensatz entsprechend besitzen (sub G0/G1, Apoptose) oder Zellen, die mehr als einen tetraploiden Chromosomensatz aufweisen (polyploide Zellen).

2.6 FUNKTIONELLE ANALYSE CD40L AKTIVIERTER B-LYMPHOZYTEN

2.6.1 GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR

Prinzip

Als ein *in vitro* Modell für die Aktivierung von T-Zellen und als Test für die Antigenerkennung durch T-Zellen dient die *mixed lymphocyte reaction* (MLR). Bei einer allogenen MLR kultiviert man die mononukleären Zellen aus dem Blut eines Donors "A" mit bestrahlten PBMCs eines Donors "B" [107]. Vor allem in der Transplantationsimmunologie hat die allogene MLR praktische Bedeutung, da man so die Gewebeverträglichkeit von Spender und Empfänger feststellen kann. Bei der allogenen MLR kommt es zur Proliferation von allo-reaktiven T-Zellen, die umso stärker proliferieren, je verschiedener die HLA Typen der Individuen sind [108]. Da die Zellen von

verschiedenen Donoren stammen, ist dies die allogene Form der MLR. Man erhält eine sogenannte 2-Weg MLR, wenn die Zellen beider Donoren proliferieren können. Verhindert man die Proliferation der Zellen aus einem Spender durch Bestrahlung, so hat man eine 1-Weg MLR.

Da im Medium enthaltene Antigene (z.B. Antibiotika) in Einzelfällen zu einer unspezifischen Proliferation führen könnten [109], erfolgt sowohl in der Kurzzeit als auch in der Langzeit-MLR die Kultivierung von T-Lymphozyten nur mit Medium als Negativkontrolle.

2.6.2 KURZZEIT-GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION (MLR)

Ein *buffy coat* wurde einer herkömmlichen Zellseparation mit Pancoll unterzogen (s. 2.2.4) und die daraus gewonnenen PBMCs mittels MACS Technik (s. 2.2.6) aufgereinigt so dass am Ende reine B- und T-Zell Populationen vorhanden waren. Mit den so gewonnenen B-Lymphozyten wurde eine Co-Kultur auf NIH-3T3 „feeder“ Zellen, die den humanen CD40-Liganden exprimieren und auf NIH-3T3 „feeder“ Zellen, die keinen Liganden besitzen und als Wildtyp bezeichnet werden, angelegt. Diese Co-Kulturen wurden für sieben Tage unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (0,8 % O₂) kultiviert. Das Medium für die Kultur unter Hypoxie wurde für 24 Std. unter 0,8% O₂ präinkubiert. Nach sieben Tagen wurde mit den normoxisch oder hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen bzw. den normoxisch oder hypoxisch kultivierten Wildtyp B-Zellen zusammen mit den T-Zellen eine MLR angelegt. Insgesamt gab es fünf unterschiedliche Versuchsansätze in der MLR:

- a) T-Zellen und normoxisch CD40L-aktivierte B-Zellen
- b) T-Zellen und hypoxisch CD40L-aktivierte B-Zellen
- c) T-Zellen und normoxisch kultivierte Wildtyp B-Zellen
- d) T-Zellen und hypoxisch kultivierte Wildtyp B-Zellen
- e) T-Zellen und Medium, als Negativkontrolle

Die MLR wurde für fünf Std. unter Normoxie kultiviert.

Für die MLR wurden jeweils 8×10^5 T-Lymphozyten im Verhältnis 2:1 zu den normoxisch und hypoxisch CD40L-aktivierten B-Zellen, sowie zu den normoxisch und hypoxisch kultivierten Wildtyp B-Zellen pro Well einer 96-Well Platte angesetzt. Als Negativkontrolle wurden lediglich 8×10^5 /Well T-Zellen mit 200 μ l Medium/Well angesetzt. Je Well wurden die T-Zellen mit jeweils 2 μ l Antikörperlösung spezifisch

für CD107a bzw. CD154 (= CD40L) markiert. CD107a, auch als LAMP-1 (LAMP= *lysosomal associated protein*) bezeichnet, ist ein Glykoprotein, welches als Marker sowohl für zytotoxische T-Zellen (CD8) als auch für T-Helferzellen (CD4) beschrieben ist [110,111]. CD107a findet sich zusammen mit Perforin in sekretorischen Lysosomen und wird bei der Fusion der Granula mit der Zellmembran an die Oberfläche der Zellen transportiert und später wieder internalisiert [112]. Durch Oberflächenmarkierung von CD107a kann so die Degranulation zytotoxischer Zellen, wie z.B. zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL), innerhalb von wenigen Min. nach Stimulation bestimmt werden [113,114].

CD154 bezeichnet den CD40 Liganden (CD40L, s. 1.2), der von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und die T-Zell abhängige B-Zellaktivierung vermittelt [115-117]. Danach wurde die 96-Well Platte bei 1200 rpm für eine Min. zentrifugiert, um einen besseren Zell-Zell Kontakt herzustellen. Nach einer Std. Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, 21 % O₂) wurde Monensin in einer Konzentration von 5 µM (1:8 verdünnt mit Medium) je Well dazugegeben [118]. Die Zugabe dieses Inhibitors blockiert die intrazellulären Proteintransportprozesse wodurch es zu einer Akkumulierung der exprimierten Zytokine im endoplasmatischen Retikulum kommt. Danach wurden die Zellen für weitere vier Std. im Brutschrank kultiviert. Für die Auswertung wurden die Zellen am Ende der Inkubation bei 1000 rpm für drei Min. zentrifugiert und in ZellWash resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 1200 rpm für fünf Min. Danach wurden die Zellen zunächst mit 1 µl Octagam (10 %; humane IgG-Immunglobuline) für fünf Min. bei 4°C geblockt und anschließend mit den Antikörpern spezifisch für die Zelloberflächenmarker CD8, CD3, CD69 und CD4 für 20 Min. bei 4°C markiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen bei 1500 rpm für fünf Min. zentrifugiert und in 300 µl ZellWash resuspendiert. Die Auswertung der Aktivierungsrate der T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse.

2.6.3 LANGZEIT-GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION (MLR)

Ein *buffy coat* wurde einer herkömmlichen Zellseparation mit Pancoll unterzogen (s. 2.2.4) und die daraus gewonnenen PBMCs mittels MACS Technik (s.2.2.6) aufgereinigt, so dass am Ende reine B- und T-Zell Populationen vorhanden waren. Mit den so gewonnenen B-Zellen wurde eine Co-Kultur auf NIH-3T3 „feeder“ Zellen, die den humanen CD40-Liganden exprimierten, unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (0,8 % O₂) über sieben Tage angelegt. Das Medium für die Kultur unter Hypoxie wurde 24 Std. unter 0,8 % O₂ präinkubiert. Nach sieben Tagen wurde mit den normoxisch bzw. hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen zusammen mit den T-Zellen eine MLR auf einer 96-Well Platte angelegt, die für sieben Tage unter Normoxie kultiviert wurde. Die T-Zellen wurden mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) bei RT für fünf Min. markiert, da CFSE, welches als Fluoreszenzfarbstoff nach Anregen mit Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Licht bei 517 nm emittiert, sich erst in Zellen einlagert und bei der Zellteilung durch Verteilen auf die Tochterzellen wieder reduziert wird [119]. Die mitotisch bedingte Reduktion von CFSE und die damit verbundene Abnahme der Fluoreszenzintensität kann als Mitose-Index herangezogen und mit dem Durchflusszytometer detektiert werden [120]. Da CFSE lichtempfindlich ist, wurde ab dem Zugabezeitpunkt bei reduzierter Beleuchtung gearbeitet.

Die T-Zellen wurden mit CFSE (0,5 µM) bei RT für fünf Min. markiert. Bei einer Zellzahl von (5-15) x10⁶ wurden die Zellen mit 10 µl CFSE markiert, bei mehr als 15 x10⁶ mit 20 µl CFSE. Insgesamt gab es vier unterschiedliche Versuchsansätze in der MLR:

- a) T-Zellen und normoxisch CD40L-aktivierte B-Zellen
- b) T-Zellen und hypoxisch CD40L-aktivierte B-Zellen
- c) T-Zellen und normoxisch kultivierte Wildtyp B-Zellen
- d) T-Zellen und hypoxisch kultivierte Wildtyp B-Zellen
- e) T-Zellen und *Dynabeads*, als Positivkontrolle
- f) T-Zellen und Medium, als Negativkontrolle

Die MLR wurde für sieben Tage unter Normoxie kultiviert.

Jeweils 100.000 T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 bzw. 1:10 mit CD40L-aktivierten B-Zellen, sowie mit den normoxisch und hypoxisch kultivierten Wildtyp B-Zellen, die

durch eine [^{137}Cs] Strahlenquelle 16 Min. lang mit 30 Gray bestrahlt worden waren, im Dreifachansatz versetzt und mit RPMI-Medium auf das definierte Volumen von 200 μl pro Well aufgefüllt. Stimulierte T-Zellen mit *Dynabeads* anti-CD3 und anti-CD28 fungierten als Positivkontrolle, da die *Dynabeads* als Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD3 und CD28 gerichtet waren. Dabei wurden T-Zellen (100.000) und *Dynabeads* anti-CD3 und anti-CD28 im Verhältnis 1:1 und 1:10 gemischt. *Dynabeads* sind gleichförmige und monodisperse Partikel, die alle einen magnetischen Kern aus $\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$ und Fe_3O_4 mit daraus resultierenden paramagnetischen Eigenschaften enthalten. *Dynabeads* sind paramagnetisch, d.h. sie verfügen erst über magnetische Eigenschaften, wenn sie sich in einem magnetischen Feld befinden und verlieren sie, sobald sie dieses wieder verlassen. So kann gewährleistet werden, dass es außerhalb des Feldes zu keinen Effekten aufgrund des Magnetismus zwischen den *Dynabeads* und den Zielmolekülen kommen kann. Die gleichförmige und definierte Oberfläche aller *Dynabeads* ist die Voraussetzung dafür, dass deren physikalische und chemische Eigenschaften sich nicht verändern. Durch die gleichförmige Struktur wird das Risiko eines nicht spezifischen Bindungsvermögens verringert. Im Gegensatz dazu erhält man optimale Bindungsbedingungen zwischen den *Dynabeads* und den Target-Molekülen, wodurch eine rasche und effiziente Bindung in den meisten Fällen schon nach wenigen Min. eintritt. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen (100.000/Well) mit 200 μl Medium inkubiert. Nach siebentägiger Inkubation bei 37°C , 5 % CO_2 und 21 % O_2 wurden die Zellen in ZellWash resuspendiert und es folgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm für fünf Min. Danach wurden die Zellen zunächst mit 1 μl Octagam (10 %; humane IgG-Immunglobuline) für fünf Min. bei 4°C geblockt und anschließend mit den Antikörpern spezifisch für den Zelloberflächenmarker CD25, welcher die α -Kette des IL-2 Rezeptors ist und damit einen Aktivierungsmarker darstellt [121], für zwanzig Min. bei 4°C markiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen bei 1500 rpm für fünf Min. zentrifugiert und in 300 μl ZellWash resuspendiert. Die Intensität der CFSE-Färbung als Maß für die Proliferation der Zellen wurde mit der Durchflusszytometrie analysiert.

2.7 EISENCHELATION ALS HYPOXIENACHAHMUNG

2.7.1 ANALYSE DES HYPOXIESIGNALWEGES MITTELS DES EISENCHELATION IN VITRO MODELLS

Deferoxamin (DFO) ist ein Chelatbildner, der im klinischen Alltag beispielsweise bei Eisenintoxikationen als Medikament (Desferal®) Verwendung findet [122]. Darüber hinaus wird DFO auch experimentell als Hypoxieimitator eingesetzt [123]. Deferoxamin bindet sowohl parenchymatöses als auch retikuloendotheliales Eisen und erscheint im Serum und in der Galle als Eisenchelatkomples Feroxamin. Ungefähr 70 % des chelierten Eisens wird renal, 30 % über die Galle ausgeschieden [124].

Durch eine Hemmung von Prolylhydroxylasen kommt es letztlich zur Stabilisierung von HIF1- α und zu einer gesteigerten Expression von HIF1- α abhängigen Genen [125]. Prolylhydroxylasen benötigen Eisen (Fe^{2+}) als essentiellen Co-Faktor. Durch den Einsatz von DFO wird die Enzymaktivität mittels einer sinkenden Eisenkonzentration inhibiert, so dass der Abbau von HIF-1 α verhindert und die Menge des Transkriptionsfaktors erhöht wird [126]. DFO ahmt den Effekt der Hypoxie nach, weil durch seine Gegenwart zum einen dieselben Gene induziert werden wie unter hypoxischen Bedingungen und zum anderen der Transkriptionsfaktor HIF-1 α stabilisiert wird [66]. In dieser Arbeit werden CD40L-aktivierter B-Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den konventionellen Zellkulturbedingungen charakterisiert. Dabei sollten die erzielten Ergebnisse durch die Nachahmung eines hypoxischen Milieus mit Applikation eines Eisenchelators bestätigt werden.

Zunächst wurden B-Zellen mittels MACS Technik (s. 2.2.6) von den anderen PBMCs separiert und anschließend mit NIH-3T3 „feeder“ Zellen, die den humanen CD40-Liganden exprimierten, auf eine 6-Well Platte in Co-Kultur gebracht. In jedem Well befanden sich 2×10^6 B-Zellen in jeweils 3 ml RPMI Medium. Der Eisenchelator DFO wurde in einer Konzentrationsreihe von 15 μM , 150 μM , sowie 1500 μM den jeweiligen Wells hinzugefügt und die B-Zellen je nach Versuchsablauf über drei bzw. sieben Tage damit inkubiert. In einem Kontrollansatz wurden CD40L-aktivierte B-Lymphozyten ohne DFO kultiviert. Das Modell der Eisenchelation mittels DFO wurde sowohl einer Apoptose- (s. 2.5.1) als auch einer Zellzyklusanalyse (s. 2.5.2)

unterzogen, sowie einer Charakterisierung des Immunphänotyps (s. 2.4.3) und einer Untersuchung der funktionellen Eigenschaften mittels einer MLR in Bezug auf die Fähigkeit, T-Lymphozyten zu aktivieren (s. Kapitel 2.6.2 + 2.6.3).

2.7.2 EINFLUSS EINER EISEN-CHELATORTHERAPIE AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP VON B-ZELLEN BEI PATIENTEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von acht Patienten aus der hämatologischen Ambulanz der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln, bei denen eine Indikation zur Chelattherapie bestand, ausgewertet. Die Patienten hatten sich schriftlich zur Abnahme und Untersuchung von Blutzellen einverstanden erklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission lag hierzu vor (IMMUCAN, Ethik Votum Nr. 04-161).

Zur Behandlung wurde der Eisenchelator Deferasirox (Exjade ®) eingesetzt [127] (empfohlene Anfangsdosis von einmal täglich 10 mg/kg Körpergewicht (KG)) [128]. Zunächst erfolgte eine Abnahme von Blutproben in EDTA beschriftete Röhrchen vor Beginn der Chelattherapie (= Kontrolle). Unter der Therapie wurden die Patienten mit Deferasirox (Exjade ®) oral (Startdosis: 10 mg/kg Körpergewicht (KG)) täglich behandelt. Eine erneute Blutabnahme erfolgte nach 2 bis 10 Wochen, abhängig davon, wie lange der Behandlungszeitraum dauerte. Das Blut wurde einer herkömmlichen Zellseparation mit Pancoll unterzogen (s. 2.2.4) und mit den daraus gewonnenen PBMCs wurde der Immunphänotyp vor und nach Therapie mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.8 STATISTIK

Die Versuchsergebnisse wurden in den Tabellen und Abbildungen allgemein als arithmetische Mittelwerte \bar{x} mit entsprechendem Standardfehler (SEM = *standard error of the mean*) angegeben. Dabei kennzeichnete „n“ die Anzahl der für die Versuche herangezogenen *buffy coats*. Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, www.microsoft.com).

Die statistische und graphische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 5.03 for Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). Da die Daten teilweise nicht normalverteilt waren, erfolgte der paarweise Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen an einzelnen Tagen mit dem Wilcoxon Rank-Test oder der Varianzanalyse für mehrfache Messungen. Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ angesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1 VERÄNDERUNG DER MORPHOLOGIE UND PROLIFERATION CD40L-AKTIVIERTER B-ZELLEN UNTER HYPOXIE

B-Lymphozyten wurden aus humanen *buffy coats* aufgereinigt (s. 2.2.6) und auf einem *monolayer* von humanes CD40L exprimierenden, murinen NIH-3T3 Fibroblasten über sieben Tage co-kultiviert (s. 2.3.2) (Abb. 3.1). Die B-Zellen wurden an Tag 3 und Tag 7 aus der Kultur entnommen und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.4). Für die Bestimmung der Zellgröße und die Beurteilung der Clusterbildung wurden die Zellen an Tag 4 aus der Kultur entnommen. Die Abbildung 3.2 zeigt Co-Kulturen bei normoxischem (21% O₂) und hypoxischem (0,8% O₂) Sauerstoffgehalt nach vier Tagen in der Durchflusszytometrie (FACS; *forward-* und *sidewardscatter*) und im mikroskopischen Bild.

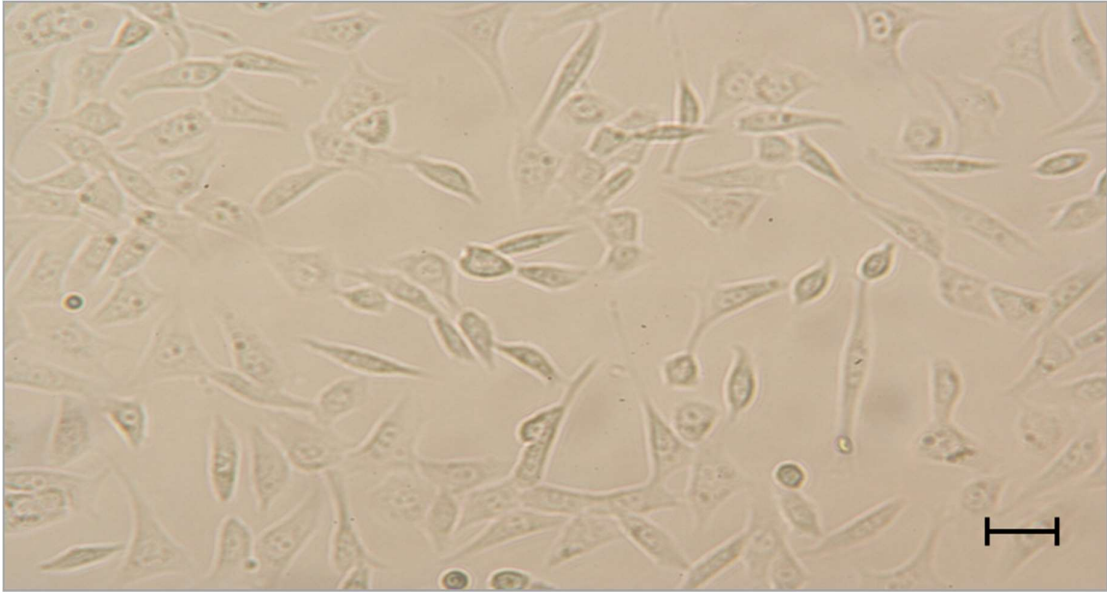
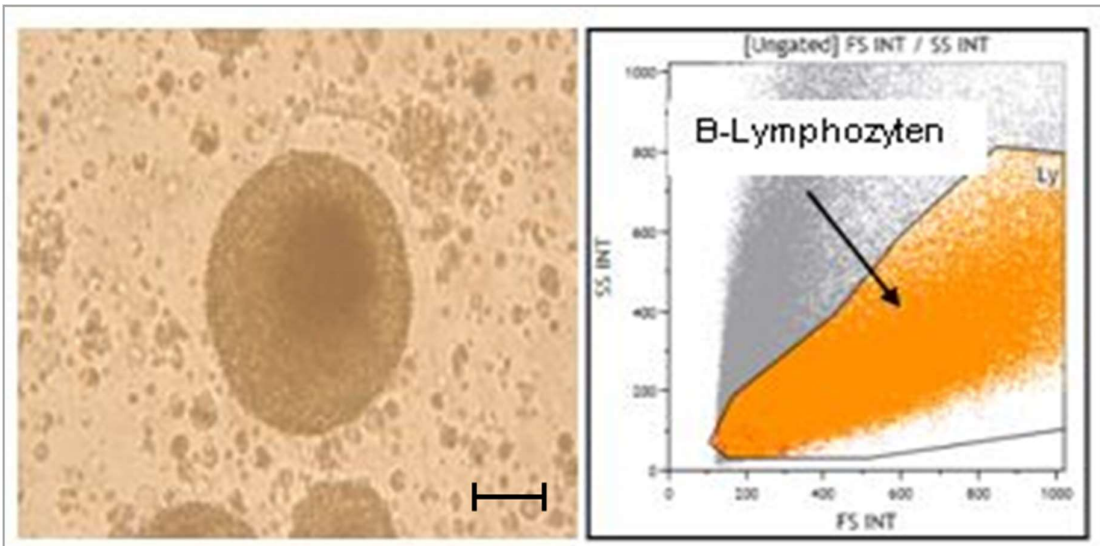


Abb.3.1: Die Darstellung zeigt adhärenente NIH-3T3 Mausfibroblasten in Kultur. Der Balken entspricht 20µm.

21% O₂ Tag 4



0,8% O₂ Tag 4

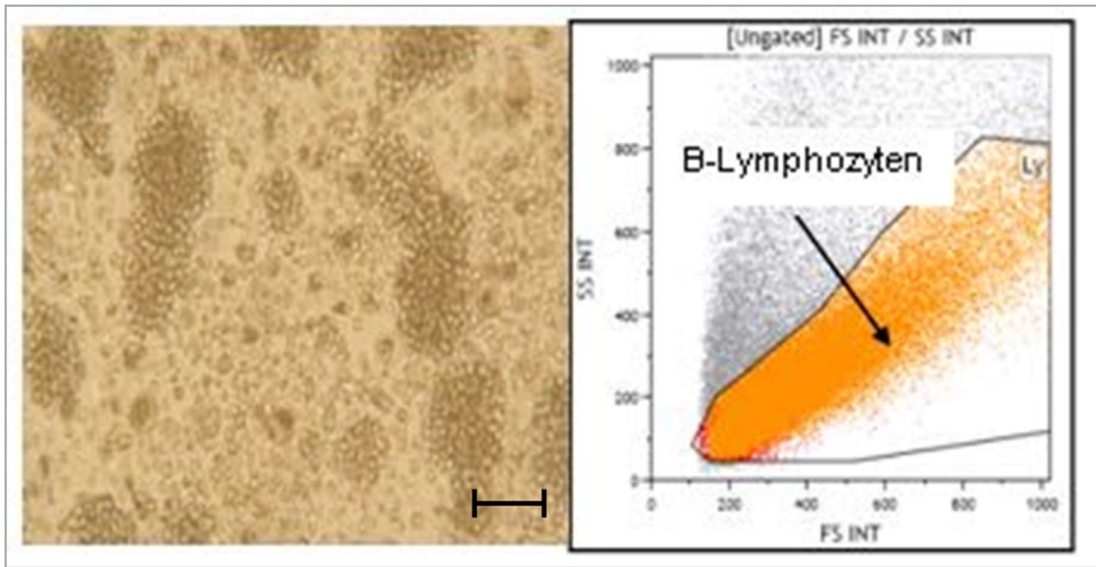


Abb. 3.2: Die Abbildung zeigt Co-Kulturen von CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten nach vier Tagen bei normoxischem (21% O₂) sowie hypoxischem (0,8% O₂) Sauerstoffgehalt, sowohl im mikroskopischen Bild als auch in der Durchflusszytometrie (FACS; forward (FS INT) und side-ward scatter (SS INT)). In der FACS Darstellung wurde auf B-Lymphozyten „gated“ (orange Population). Der Balken entspricht 100µm.

Die B-Lymphozyten zeigten nach vier Tagen unter Hypoxie (0,8% O₂) eine im Vergleich zur normoxischen Kultur (21% O₂) verminderte Clusterbildung (mikroskop. Bild, Abb. 3.2) und kleinere Zellen (siehe *forward-*, *side-ward scatter*, Abb. 3.2). Dass die Zellgröße unter Hypoxie abnimmt, erkennt man daran, dass im FACS Bild die B-Lymphozytenpopulation unter Hypoxie im *forwardscatter*, im Vergleich zur Population unter Normoxie, an Stärke abnimmt (Abb.3.2). Der *forwardscatter* ist ein Maß für die Zellgröße. Die B-Zell-Cluster entsprechen expandierten B-Zellklonen und stellen das *in vitro* Korrelat zum Keimzentrum dar. Eine Clusterbildung war nur reduziert festzustellen. Neben der verringerten Clusterbildung nach vier Tagen zeigte sich auch in der durchflusszytometrischen Analyse eine signifikant ($p \leq 0,01$) geringere Zellgröße der aktivierten B-Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen (Abb. 3.3).

Ausgehend von MFI-Werten an Tag 0 von 310 ± 10 (*arbitrary units* = AU) bedingte die CD40L-Aktivierung der B-Zellen eine Zunahme der MFI-Werte nach vier Tagen auf 600 ± 30 AU unter normoxischen bzw. 400 ± 30 AU unter hypoxischen Versuchsbedingungen. Dabei erwiesen sich letztere als signifikant gegenüber den normoxisch kultivierten B-Zellen reduziert.

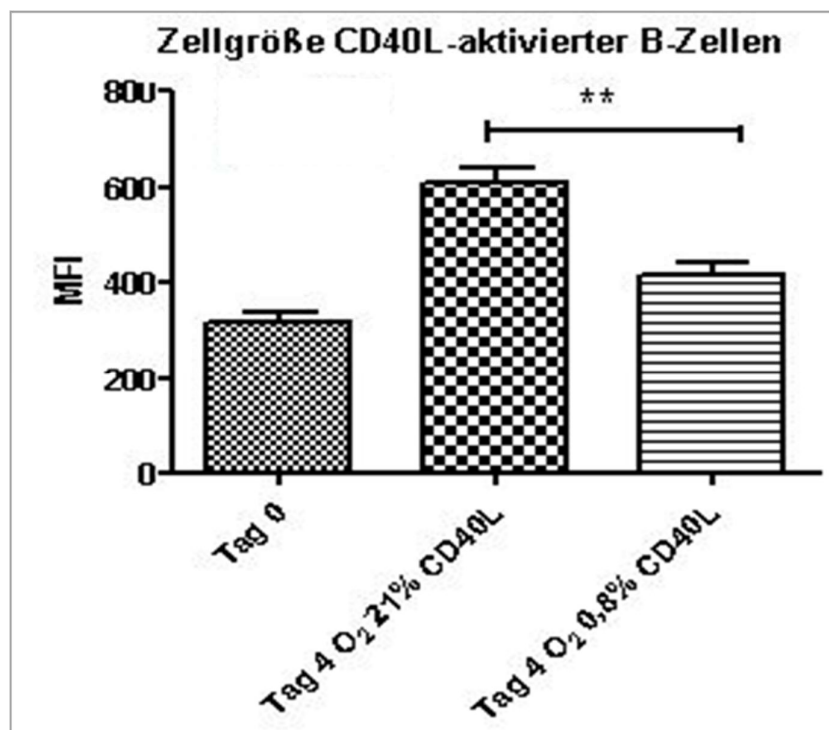


Abb.3.3: Das Balkendiagramm zeigt anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Vorwärtsstreulichts (FSC) die Veränderung der Zellgröße normoxisch (21 % O₂) und hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierter B-Lymphozyten im Vergleich. Diese wurden zur Aktivierung in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) von je n=10 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (** p ≤ 0,01) durchgeführt.

Proliferationsverhalten CD40L-aktivierter B-Zellen unter Hypoxie

Im Rahmen der Stimulation durch humanes CD40L exprimierende NIH-3T3 Fibroblasten kam es unter normoxischen Bedingungen zu einer linearen Proliferation aktivierter B-Zellen [129] (Abb. 3.4). So erwies sich die Anzahl hypoxisch kultivierter, CD40L-aktivierter B-Zellen ($1,8 \pm 0,4 \times 10^6$) im Vergleich zur Zellzahl unter normoxischen Bedingungen ($3,2 \pm 0,7 \times 10^6$) an Tag 3 als hoch signifikant ($p \leq 0,001$) verringert. Die Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen war unter hypoxischen Bedingungen ($2,3 \pm 0,6 \times 10^6$) an Tag 7 ebenfalls signifikant geringer als unter normoxischen Bedingungen ($4,3 \pm 1,1 \times 10^6$). Es war zu klären, ob die verringerte Zellzahl unter

Hypoxie mit einem Zellzyklusarrest zusammenhing oder gegebenenfalls durch eine vermehrte Apoptose induziert.

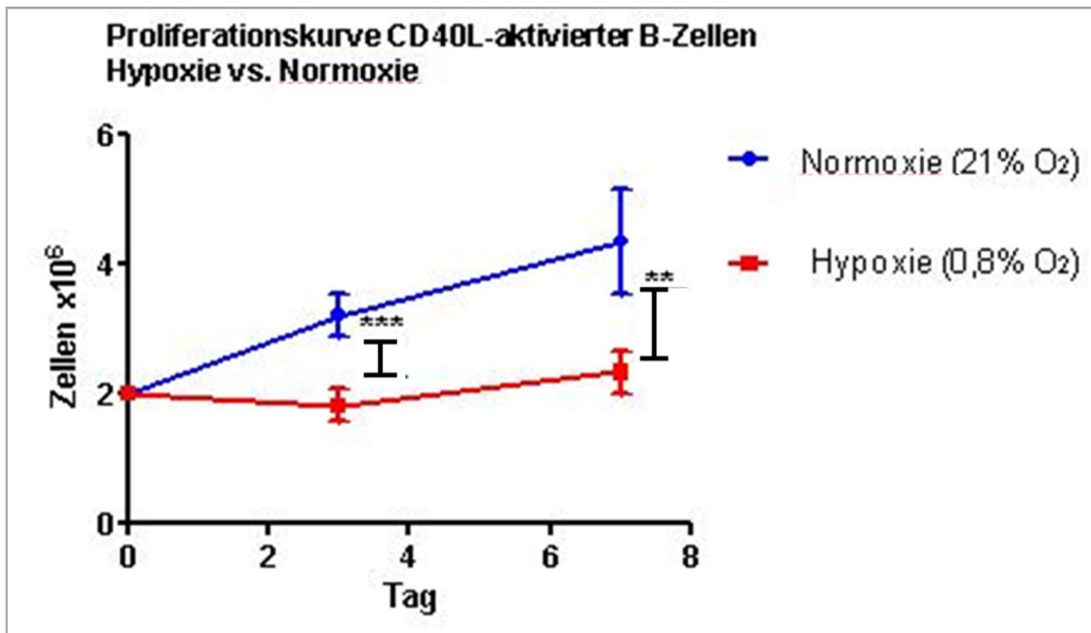


Abb.3.4: Die Abbildung zeigt die Proliferationskinetik von normoxisch (21 % O₂) und hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten B-Lymphozyten über sieben Tage, die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler aus je n=10 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Post-Hoc-Test mit einem Signifikanzniveau von (** p ≤ 0,01 bzw. *** p ≤ 0,001) durchgeführt.

3.2 EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DIE APOPTOSE VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Unter Hypoxie kommt es zu keiner vermehrten Apoptose von CD40L-aktivierten B-Zellen

Um den Einfluss von Hypoxie auf das Apoptoseverhalten CD40L-aktivierter B-Zellen zu untersuchen, wurde eine Doppelmarkierung mit Annexin V und 7AAD (s. 2.5.1) durchgeführt und die B-Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgereinigte B-Lymphozyten wurden dazu für sieben Tage unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (0,8 % O₂) auf humanes CD40L exprimierenden

NIH-3T3 Fibroblasten co-kultiviert. Eine FACS Analyse wurde jeweils an Tag 0, Tag 3 und Tag 7 durchgeführt. Die Anzahl apoptotischer CD40L-aktivierter B-Zellen unter Normoxie (21 % O₂) führte im Vergleich zu Versuchsbeginn (Tag 0) mit 8,2 ± 6,2 % zu einem Anteil früh apoptotischer Zellen von 19,4 ± 8,3 % nach drei Tagen, respektive zu einem Anteil von 5,9 ± 7,1 % nach sieben Tagen. Auch unter Hypoxie (0,8 % O₂) errechnete sich ein Anteil früh apoptotischer, CD40L-aktivierter B-Zellen von 16,5 ± 4,2 % nach drei Tagen und von 7,4 ± 7,2 % nach sieben Tagen. Zu beiden Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7) waren die Unterschiede in der frühen Apoptoserate zwischen Normoxie und Hypoxie nicht signifikant (p>0,05) voneinander (Abb. 3.5). Für beide Versuchsgruppen ergab sich eine tendenziell gesteigerte Zunahme der Apoptoserate nach drei Tagen Co-Kultivierung.

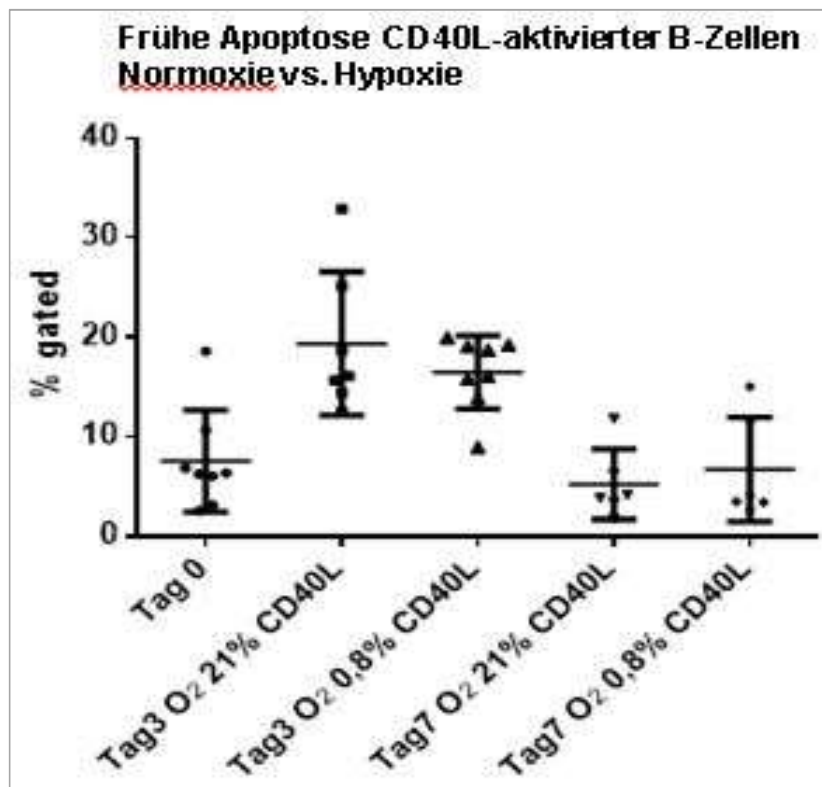


Abb.3.5: Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile (% gated) der frühen Apoptoserate normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierter CD40-positiver B-Lymphozyten, die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten, an Tag 0, Tag 3 und Tag 7. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Auf der y-Achse ist die prozentual gemessene Anzahl der Zellen in einem Analysefenster (gate) aufgetragen. Jeder Wert entspricht einem Experiment, n=8 Experimente. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05) durchgeführt.

Der Anteil vitaler, CD40L-aktivierter B-Zellen unter Normoxie (21 % O₂) führte im Vergleich zu Versuchsbeginn (Tag 0) mit 89,7 ± 8,2 % zu einem Anteil von 56,7 ± 19,8 % nach drei Tagen, respektive zu einem Anteil von 47,5 ± 12,2 % nach sieben Tagen. Der Anteil vitaler, CD40L-aktivierter B-Zellen lag nach drei Tagen Kultur unter Hypoxie bei 72, 3 ± 14,9 %. Nach sieben Tagen war der Anteil vitaler CD40L-aktivierter B- Zellen unter Hypoxie mit 48,3 ± 15,7 % fast genauso hoch, wie bei den Kulturen unter Normoxie (Abb. 3.6). Zu beiden Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7) waren die Unterschiede im Anteil vitaler CD40L-aktivierter B-Zellen zwischen Normoxie und Hypoxie nicht signifikant (p>0,05) (Abb. 3.6).

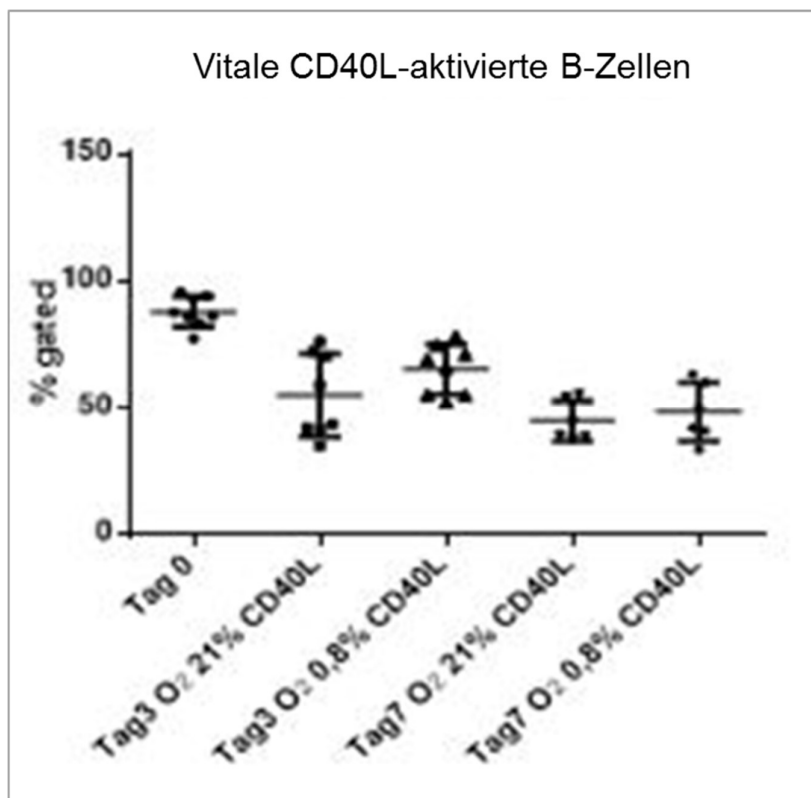


Abb.3.6: Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile (% *gated*) der vitalen normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten CD40 positiven B-Lymphozyten, die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten, an Tag 0, Tag 3 und Tag 7. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Auf der y-Achse ist die prozentual gemessene Anzahl der Zellen in einem Analysefenster (gate) aufgetragen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler aus je n=8 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05) durchgeführt.

3.3 EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DEN ZELLYKLUS VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Zur Messung der Zellzyklusphasen unter Hypoxie (0,8 % O₂) wurden Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte zunächst mittels einer 7AAD-spezifischen Autofluoreszenz (s. 2.5.2) über die Bestimmung des Zell DNA-Gehaltes an Tag 0 und Tag 3 unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (0,8 % O₂). Als erstes wurden B-Lymphozyten aufgereinigt (s. 2.2.6) und damit eine CD40-positive B-Zell Co-Kultur auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten angelegt (s. 2.3.2), welche für drei Tage unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (0,8 % O₂) inkubiert wurde. Die Markierung der Zellen und anschließende Analyse in der Durchflusszytometrie erfolgte wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Die DNA-Histogramme wurden mit Hilfe der Analysesoftware FlowJo (TreeStar) ausgewertet, die ein mathematisches Verfahren benutzt, um die Flächen unter den Kurven zu berechnen (Abb. 3.7).

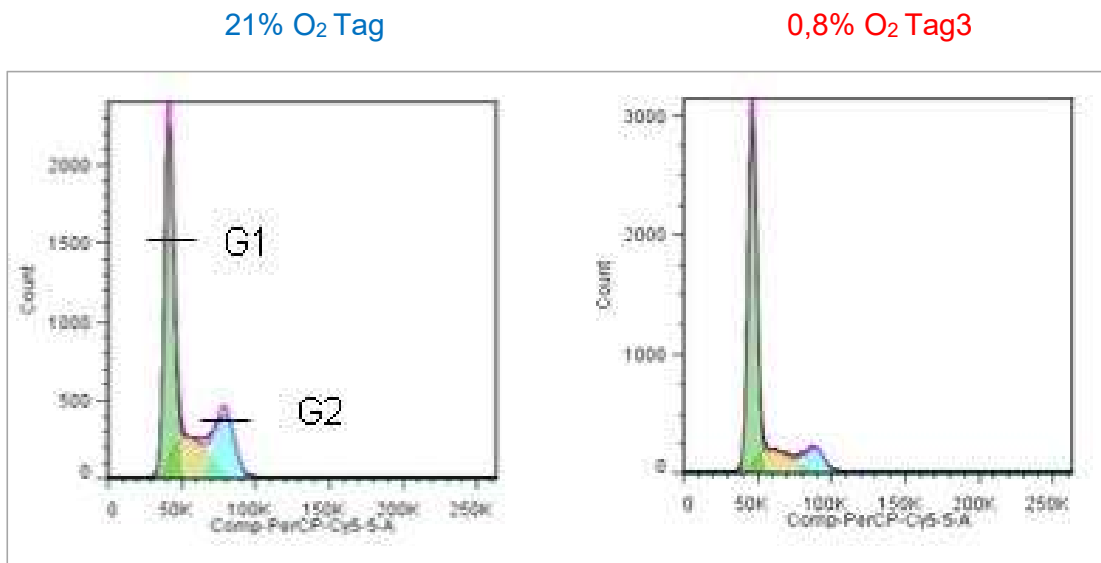


Abb.3.7: Die Abbildung zeigt beispielhaft die Zellzyklusanalyse von CD40L-aktivierten Lymphozyten, die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden exprimierten, unter hypoxischer (0,8 % O₂) bzw. normoxischer Sauerstoffkonzentration (21 % O₂) nach drei Tagen. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt der Zellen an, dabei wird auf der y-Achse die Anzahl der Zellen (count) und auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität angegeben, wobei 7AAD das fluoreszierende Molekül ist. Das linke Histogramm zeigt die Zellzyklusphasen G1 und G2 unter Normoxie (21 % O₂) und das rechte Histogramm die beiden Zellzyklusphasen unter Hypoxie (0,8 % O₂), wobei in der jeweiligen Abbildung das linke Histogramm (grün) die G1 Phase und das rechte Histogramm (hellblau) die G2 Phase darstellt. Darstellung mittels FlowJo.

Bei den normoxisch kultivierten, CD40L-aktivierten B-Zellen lag der Anteil der sich in der G1-Phase befindenden Zellen nach drei Tagen bei $62,0 \pm 9,1 \%$, hingegen bei den hypoxisch kultivierten B-Zellen bei $79,6 \pm 8,4 \%$. In der G2-Phase befanden sich nach drei Tagen $31,5 \pm 8,6 \%$ der unter normoxischem Sauerstoffgehalt kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen, im Vergleich zu $4,6 \pm 3,0 \%$ der hypoxisch kultivierten B-Zellen (Abb.3.8). Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, der sich in der G1- bzw. G2-Phase befindenden Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen zwischen Normoxie und Hypoxie ($p > 0,05$) (Abb.3.8). Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen entspricht der Verteilung in einer wachsenden Zellpopulation. Hypoxische Kulturbedingungen führten zu einer tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrten Arretierung der CD40L-aktivierten B-Zellen in der G1-Zellzyklusphase.

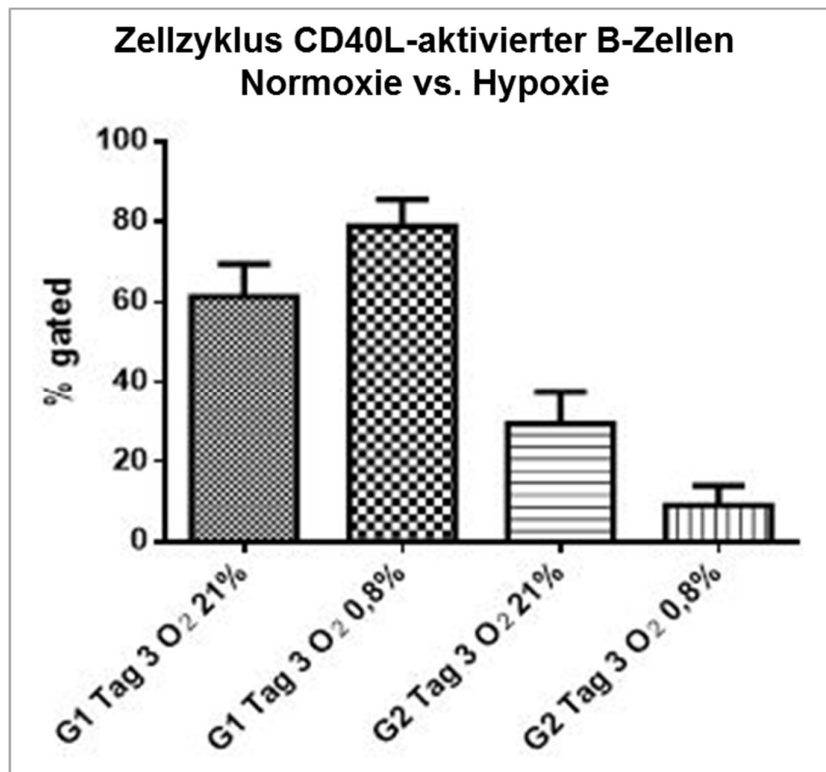


Abb.3.8: Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierter B-Lymphozyten, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befanden. Die B-Zellen waren über drei Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 3. Auf der y-Achse ist die prozentuale Anzahl der Zellen dargestellt, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase (G1, G2) befinden. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von je n=4 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* $p \leq 0,05$) durchgeführt.

3.4 DER EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Verringerung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf CD40L-aktivierten B-Zellen unter Hypoxie

Humane B-Lymphozyten wurden aufgereinigt (s. 2.2.6) und damit eine CD40-positive B-Zell Kultur auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten angelegt (s. 2.3.2), welche für vier Tage unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (0,8 % O₂) co-inkubiert wurden. Die immunocytochemische Markierung der Zellen mit für bestimmte Oberflächenantigene spezifischen Antikörpern und anschließende Analyse nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4 in der Durchflusszytometrie erfolgte wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Zur immunphänotypischen Analyse wurden die B-Lymphozyten mit Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle markiert, die mit der Differenzierung und Aktivierung von B-Lymphozyten assoziiert sind (s. 2.4.3). Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde für jeden Spender der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten sowie die Expressionsdichte der jeweils untersuchten Oberflächenmoleküle über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt, als ein Maß für die Anzahl der auf einzelnen Zellen exprimierten Moleküle. Für die Analyse wurden in der „gating“ Strategie (s. 2.4.1) (Abb. 3.9) als Ausgangspopulation nur lebende CD20- und CD19-positive B-Lymphozyten berücksichtigt. Als Marker für den Grad der Aktivierung wurden mit spezifischen Antikörpern CD80, CD86, HLA-DR und CD62L (s. 2.4.2) markiert.

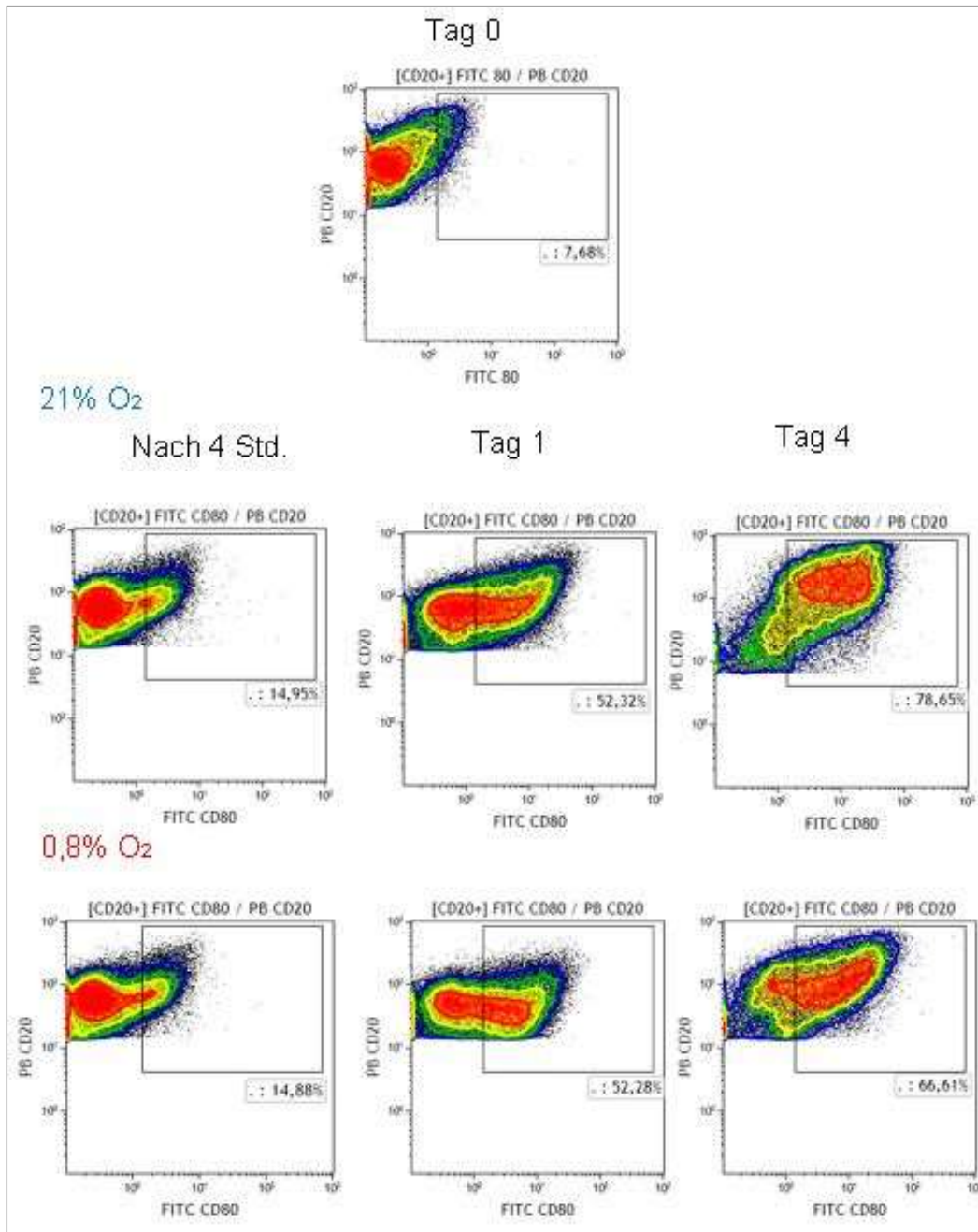


Abb.3.9: Die Abbildung zeigt beispielhaft anhand eines Experiments den Aktivierungsgrad, mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD80, von normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten an Tag 0, nach vier Std. an Tag 1 und Tag 4 der Co-Kulturen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf CD20-positive B-Lymphozyten, die gleichzeitig den Aktivierungsmarker CD80 exprimieren. Darstellung der „gating“ Strategie in der Durchflusszytometrie mittels Höhenliniendarstellung (*ContourPlot*).

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nahm die Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD80 exprimierten, im Vergleich zu Versuchsbeginn (Tag 0) mit $4,8 \pm 1,1$ % kontinuierlich bis Tag 4 auf $75,9 \pm 4,3$ % unter normoxischen Sauerstoffgehalt und auf $52,4 \pm 7,7$ % unter Hypoxie zu (Abb. 3.10). An Tag 4 erwies sich der Unterschied im Makierungsgrad (% *gated*) für den Aktivierungsmarker CD80 zwischen normoxisch und hypoxisch kultivierten, CD40L-aktivierten B-Zellen als signifikant ($p \leq 0,05$).

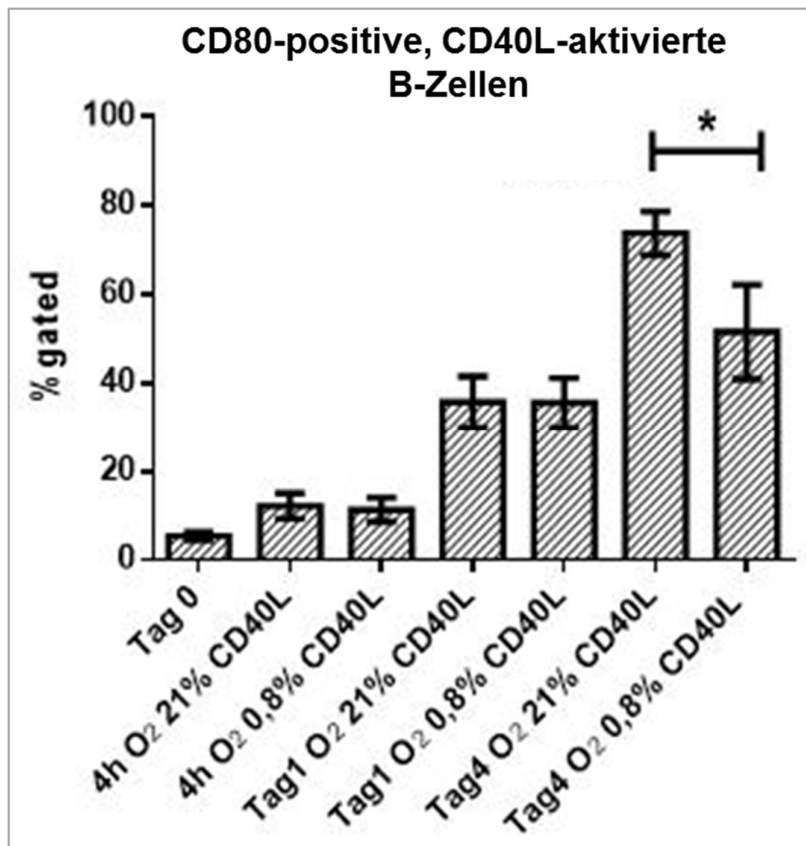


Abb. 3.10: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Zellen, mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD80, von normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, humanen B-Lymphozyten an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4. Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=28$ Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von CD80 auf CD80-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als ein Maß für die Anzahl der auf einzelnen Zellen exprimierten Moleküle, zeigte sich ebenso ein Anstieg des Aktivierungsgrades von CD40L-aktivierten B-Zellen im Vergleich zum Versuchsbeginn (Tag 0) von $4,9 \pm 0,9$ AU kontinuierlich bis Tag 4 auf $14,6 \pm 3,1$ AU unter normoxischem Sauerstoffgehalt und auf $11,3 \pm 1,8$ AU unter Hypoxie (Abb. 3.11). Zu allen drei Zeitpunkten (vier Std., Tag 1 und Tag 4) erwiesen sich die Unterschiede im Aktivierungsgrad normoxisch bzw. hypoxisch kultivierter CD40L-aktivierter B-Zellen als signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.11).

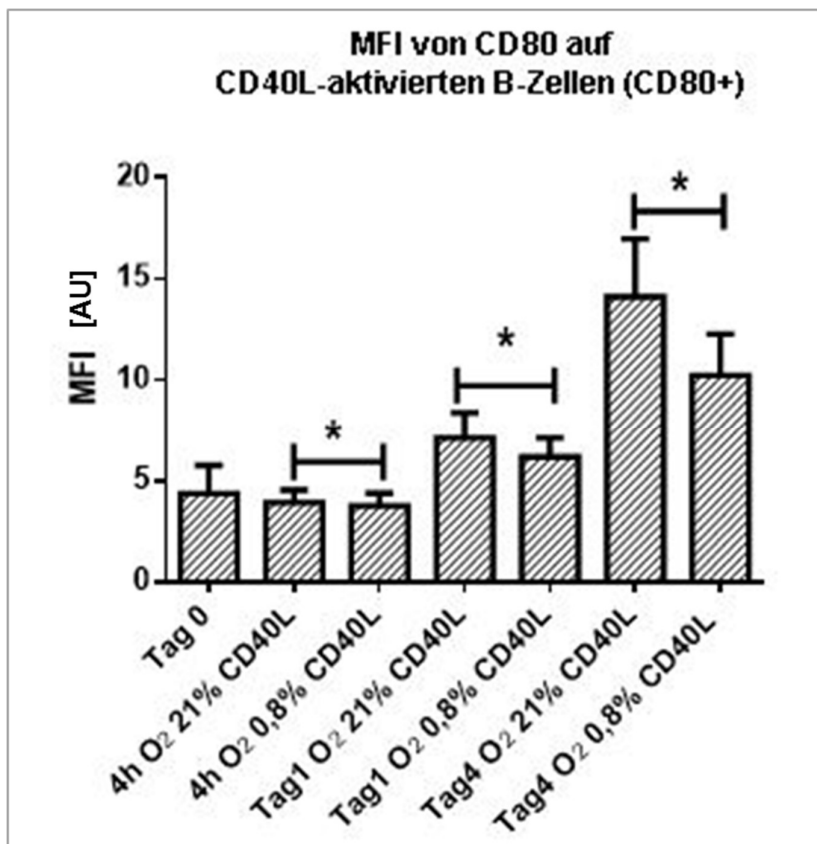


Abb.3.11: Die Abbildung zeigt die Expression von CD80 auf CD80-positiven, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Normoxie (21 % O₂) und Hypoxie (0,8 % O₂) an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von n=28 Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt. AU= *arbitrary units*

Vergleichbar zu den für CD80 dargestellten Daten nahm auch die Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD86 exprimierten, unter normoxischen Versuchsbedingungen von $3,2 \pm 1,3$ % zu Versuchsbeginn auf $41,6 \pm 4,2$ % nach vier Std., weiter auf $78,4 \pm 3,9$ % an Tag 1, respektive auf $87,4 \pm 2,1$ % an Tag 4 zu. Bei den CD40L-aktivierten B-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD86 exprimierten, nahm die Zellzahl unter Hypoxie von $3,2 \pm 1,3$ % zu Versuchsbeginn auf $37,7 \pm 1,5$ % nach vier Std., weiter auf $71,8 \pm 4,9$ % an Tag 1, respektive auf $82,6 \pm 2,2$ % an Tag 4 zu. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikant unterschiedlichen Expressionsraten für membranständiges CD86 zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 3.12).

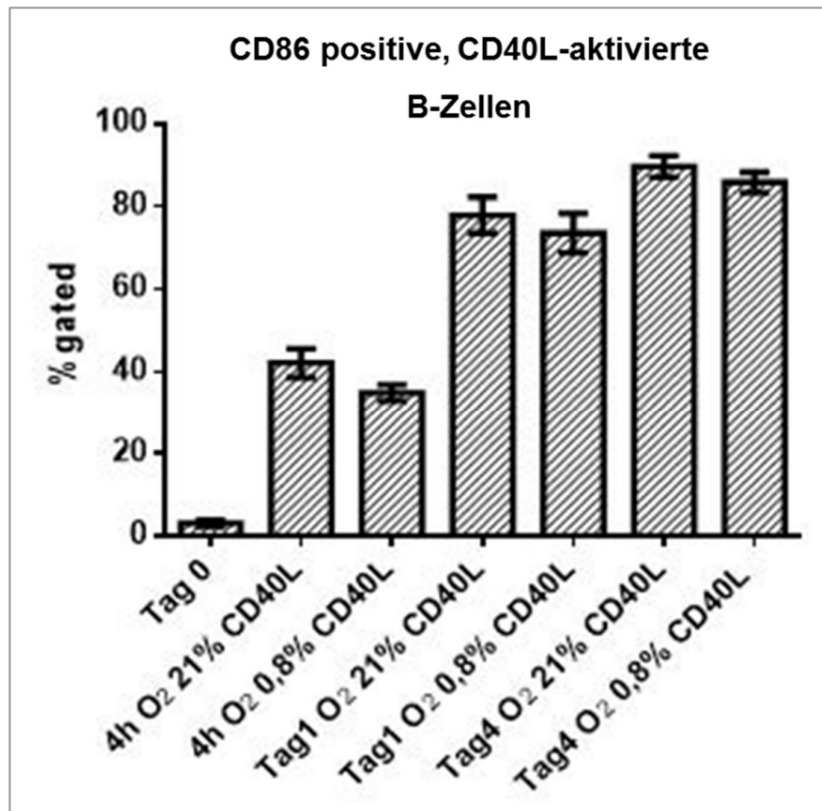


Abb.3.12: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% gated) CD40L-aktivierter B-Zellen, mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD86, von normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten humanen B-Lymphozyten an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4. Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von n=28 Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von CD86 auf CD86-positiven CD40L-aktivierten B-Zellen, ermittelt als Intensität des Fluoreszenzmarkers - bedingten MFI-Wertes - zeigte sich unter normoxischem Sauerstoffgehalt keine Änderung des Aktivierungsgrades von CD40L-aktivierten B-Zellen im Vergleich zwischen Versuchsbeginn (Tag 0) mit Werten von $10,2 \pm 0,8$ AU bzw. $10,5 \pm 0,4$ AU nach vier Std. Nachfolgend ergaben sich Anstiege auf $94,3 \pm 5,2$ AU an Tag 1, respektive auf $230,4 \pm 8,7$ AU nach vier Tagen (Abb. 3.13). Unter Hypoxie ergaben sich ebenfalls vergleichbare MFI-Werte für die Expression von CD86 auf CD86-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen für die Zeitpunkte Tag 0 sowie vier Std. mit mit mittleren Werten von $10,2 \pm 0,8$ AU respektive $9,1 \pm 0,3$ AU. Nachfolgend ergab sich eine Zunahme auf $54,3 \pm 3,7$ AU an Tag 1, respektive auf $144,6 \pm 6,7$ AU nach vier Tagen (Abb. 3.13). An Tag 1 und Tag 4 erwiesen sich die Unterschiede im Aktivierungsgrad normoxisch und hypoxisch kultivierter CD40L-aktivierter B-Zellen als signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.13).

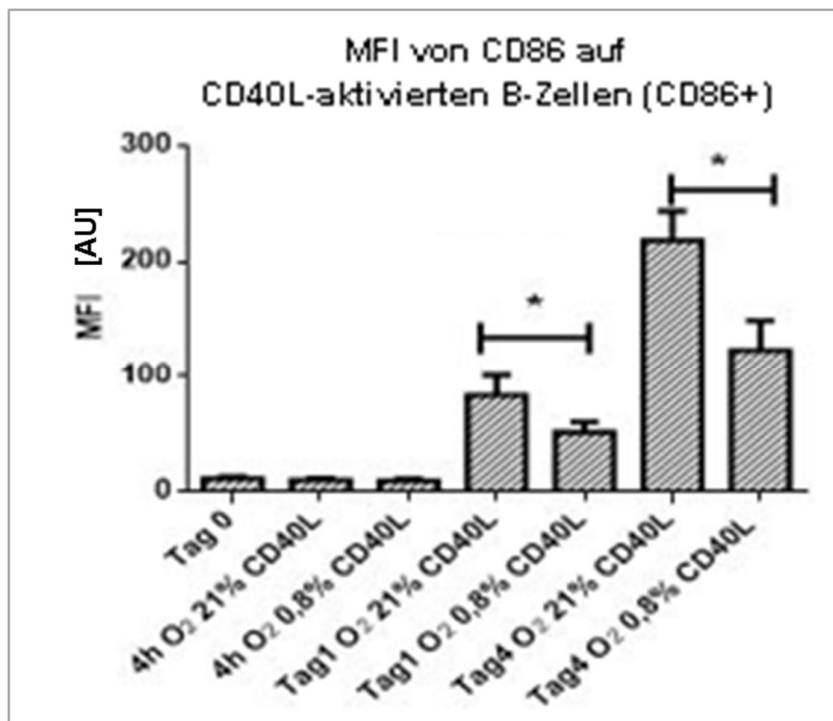


Abb.3.13: Die Abbildung zeigt die Expression von CD86 auf CD86-positiven, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Normoxie (21 % O₂) und Hypoxie (0,8 % O₂) an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n=28 Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt. AU= *arbitrary units*

Die Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen, die das humane Leukozytenantigen (HLA-DR) exprimierten, blieb sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im Vergleich zu Werten von $94,2 \pm 0,3 \%$ zu Versuchsbeginn über alle drei Zeitpunkte (vier Std., Tag 1 und Tag 4) auf unverändert hohen Niveau. Lediglich an Tag 4 errechnete sich ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den prozentualen Werten normoxisch respektive hypoxisch kultivierter, CD40L-aktivierter B-Zellen, die HLA-DR exprimierten (Abb. 3.14).

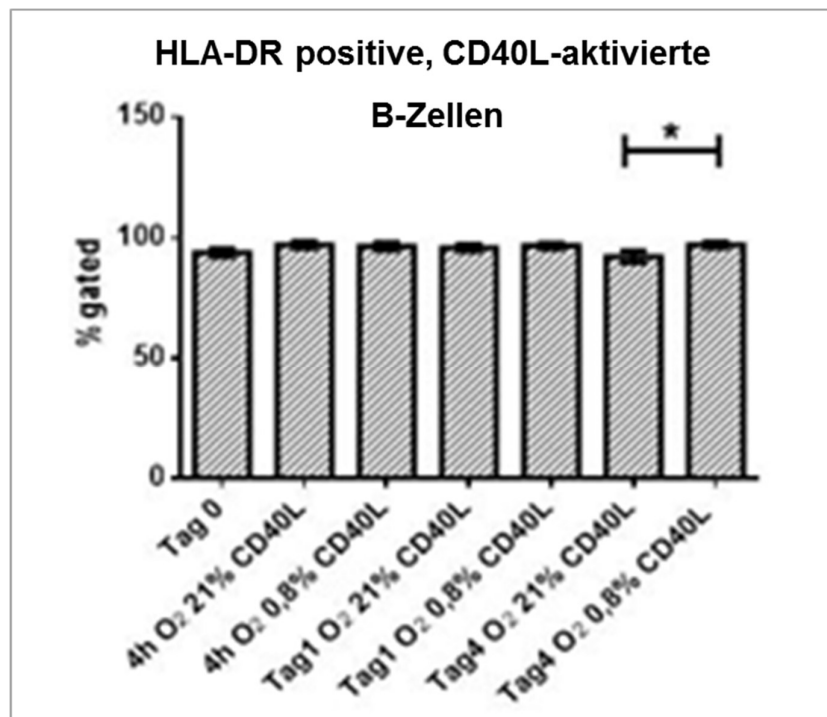


ABB.3.14: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) von normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten, die das humane Leukozytenantigen (HLA-DR) exprimierten, an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4. Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=28$ Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Die Expressionsdichte des humanen Leukozytenantigens (HLA-DR) auf HLA-DR-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen, quantitativ über die mittlere MFI des entsprechenden Fluorochroms erfasst, ergab unter Normoxie für die Zeitpunkte Tag 0, nach vier Std. respektive Tag 1 Werte von $5,3 \pm 0,8$ AU, $6,8 \pm 1,1$ AU und $9,4 \pm 2,5$ AU. Nach vier Tagen zeigte sich eine Expressionsdichte mit einem Wert von $7,7 \pm 2,9$ AU (Abb. 3.15). Unter Hypoxie ergab die mittlere MFI von HLA-DR auf HLA-DR-

positiven CD40L-aktivierten B-Zellen für die Zeitpunkte Tag 0, nach vier Std. respektive Tag 1 Werte von $5,3 \pm 0,8$ AU, $6,7 \pm 1,1$ AU und $9,5 \pm 2,4$ AU. Nach vier Tagen zeigte sich eine Expressionsdichte mit einem Wert von $9,7 \pm 4,7$ AU (Abb. 3.15). Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Expressionsraten zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p > 0,05$).

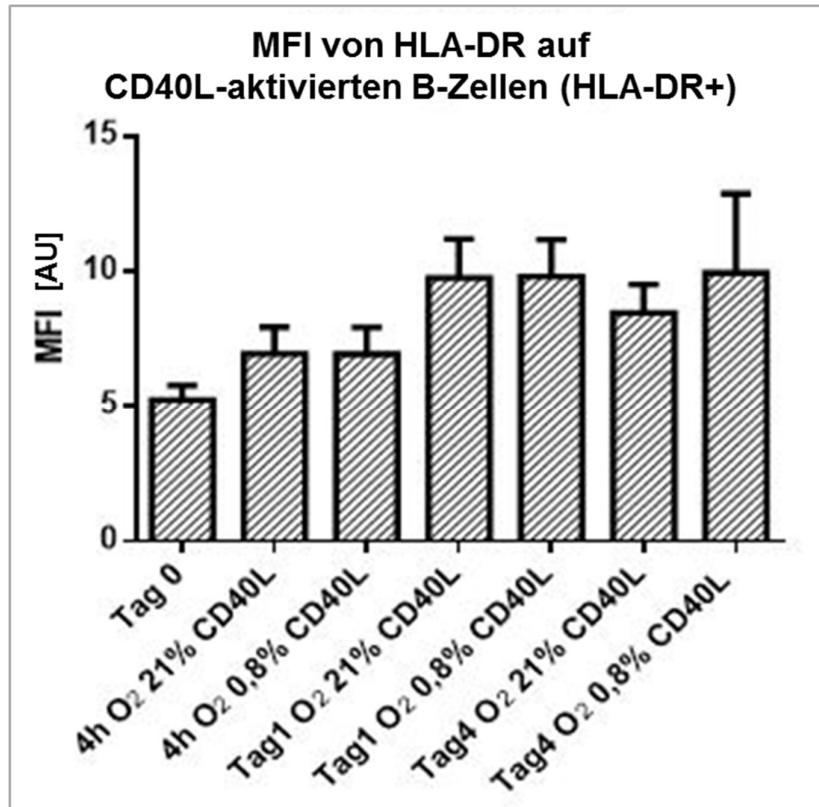


Abb.3.15: Die Abbildung zeigt die Expression von HLA-DR auf HLA-DR-positiven, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Normoxie (21 % O₂) und Hypoxie (0,8 % O₂) an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=28$ Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt. AU= *arbitrary units*

Die Anzahl CD40L-aktivierter B-Zellen, die das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimierten, ergab unter Normoxie Werte von $93,3 \pm 0,5$ % zu Versuchsbeginn, $74,8 \pm 12,1$ % nach vier Std. und $63,7 \pm 14,7$ % an Tag 1 ab. An Tag 4 ergaben sich Werte von $91,9 \pm 3,9$ % (Abb. 3.16). Bei den unter hypoxischen Bedingungen kulti-

vierten CD40L-aktivierten B-Zellen, die das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimierten, ergab die Anzahl aktivierter B-Zellen Werte von $93,3 \pm 0,5$ % zu Versuchsbeginn, $74,7 \pm 11,8$ % nach vier Std. und $58,4 \pm 8,2$ % an Tag 1. An Tag 4 ergaben sich Werte von $95,3 \pm 0,3$ % (Abb. 3.16). Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Expressionsraten für CD62L zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p > 0,05$).

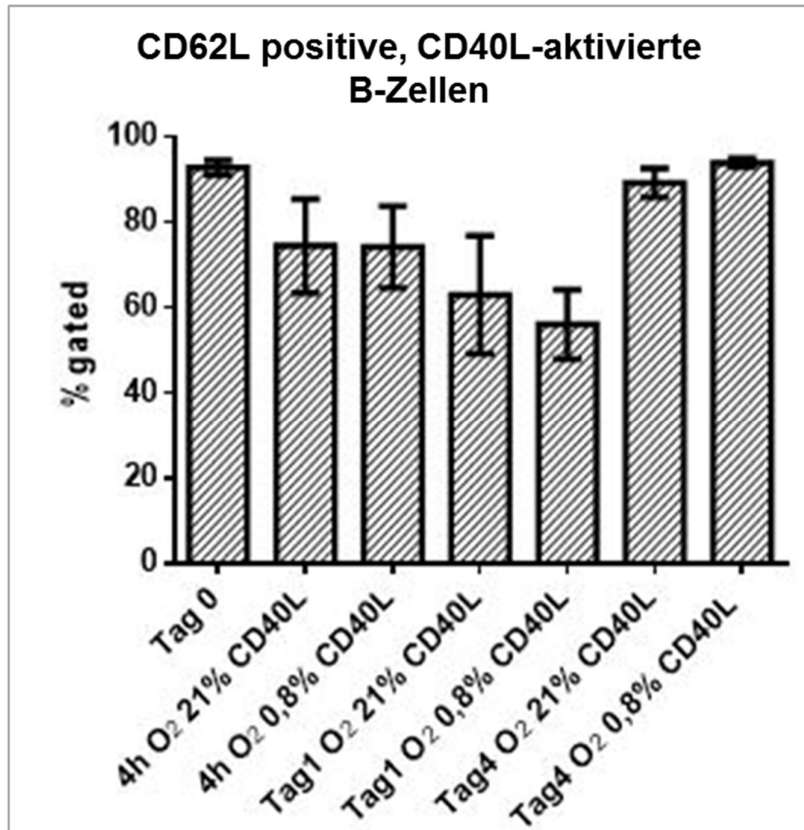


Abb.3.16: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) von normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten, die das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimierten, an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4. Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=28$ Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Die Expressionsdichte des Zelladhäsionsmoleküls CD62L auf CD62L-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen, quantitativ erfasst über die mittlere MFI in der FACS-Analyse, ergab unter Normoxie zu den Zeitpunkten Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und respektive an Tag 4 Werte von $34,3 \pm 12,4$ AU, $3,5 \pm 1,4$ AU, $5,7 \pm 1,1$ AU und $34,1 \pm 11,8$ AU (Abb. 3.17).

Unter Hypoxie ergab die mittlere MFI der CD62L-Expression auf CD62L-positiven CD40L-aktivierten B-Zellen zu den Zeitpunkten Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und respektive an Tag 4 Werte von $34,3 \pm 12,4$ AU, $3,4 \pm 0,7$ AU, $2,9 \pm 0,4$ AU und $15,6 \pm 4,5$ AU (Abb. 3.17). Der Unterschied an Tag 4 zwischen normoxisch und hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen war signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.17). Insgesamt war zu beobachten, dass es an Tag 4 unter Hypoxie zu einer Reduktion der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie von CD62L auf CD40L-aktivierten B-Lymphozyten kam.

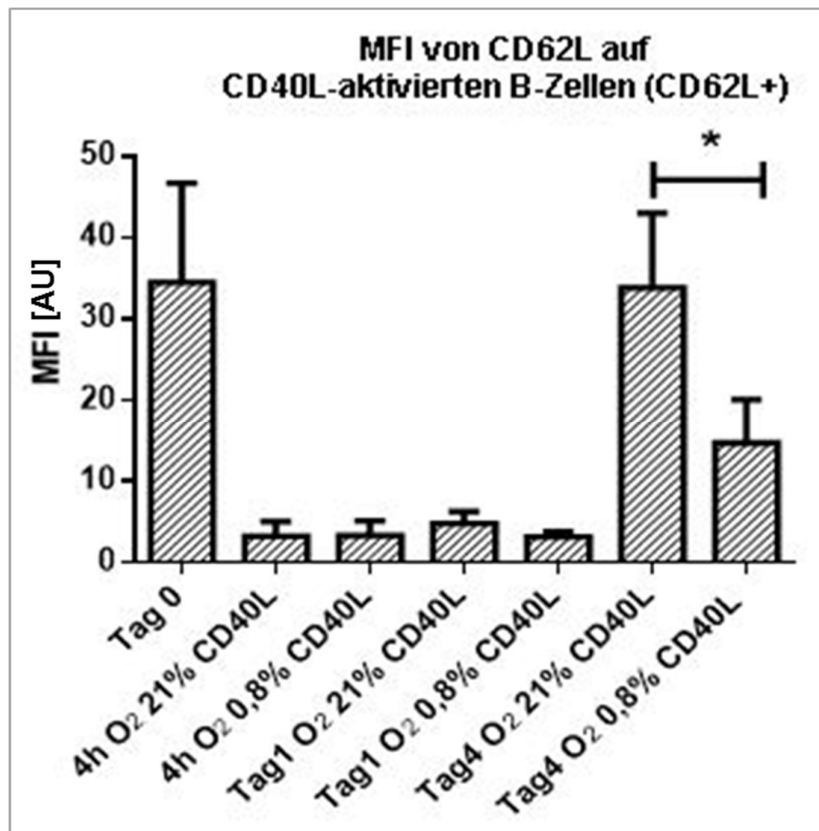


Abb.3.17: Die Abbildung zeigt die Expression von CD62L auf CD62L-positiven, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Normoxie (21 % O₂) und Hypoxie (0,8 % O₂) an Tag 0, nach vier Std., an Tag 1 und Tag 4 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch humanes CD40L exprimierende Fibroblasten aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n=28 Experimenten in 6 Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt. AU= *arbitrary units*

3.5 DER EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DIE FUNKTION VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Um die vorgenannten immunphänotypischen Veränderungen von CD40L-aktivierten B-Zellen unter Hypoxie (0,8 % O₂) auch funktionell zu charakterisieren, wurden als nächster Schritt *in vitro* Funktionstests durchgeführt. Diese wurden in Form einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) erhoben. Zunächst wurden Kurzzeit-MLRs über fünf Std. mit zuvor CD40L-aktivierten B-Lymphozyten und allogenen T-Zellen durchgeführt. Die CD40-positiven B-Zellen waren zuvor über sieben Tage auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (0,8 % O₂) co-kultiviert worden. Die eigentliche MLR lief unter Normoxie ab, um eine Beeinflussung der T-Zellen durch Hypoxie zu vermeiden.

3.5.1 KURZZEIT-GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION (MLR)

Die T-Zell Aktivierung nimmt in einer Kurzzeit-Kultur unter Hypoxie ab

Bei der Kurzzeit-MLR wurden aufgereinigte humane T-Lymphozyten mit Antigen präsentierenden Zellen eines allogenen Spenders, im vorliegenden Fall mit CD40L-aktivierten B-Lymphozyten, über fünf Std. co-inkubiert. Diese Zellen präsentieren ihre eigenen Alloantigene und stimulieren die Proliferation alloreaktiver T-Zellen unter anderem über Produktion verschiedener Zytokine [130,131].

Bei der MLR wurden T-Zellen in Co-Kultur mit sowohl normoxisch (21 % O₂) als auch hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (= CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (= WT) inkubiert, die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert waren. Um eine Voraktivierung der T-Zellen auszuschließen, wurden zudem T-Zellen lediglich mit Medium ohne B-Zellen inkubiert (= Negativkontrolle). Durch Oberflächenmarkierung für das Glykoprotein CD107a (s. 2.6.2) wurde die Degranulation von CD8-positiven und CD4-positiven T-Zellen bestimmt. Der Nachweis von CD154 (= CD40L) und CD69 wurde jeweils als früher Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten genutzt. Abbildung 3.18 repräsentiert ein Beispiel der durchflusszytometrischen „gating“ Strategie (s. 2.4.1) der MLR über fünf Std., wobei hier exemplarisch die Daten eines Spenders gezeigt werden. Nach Charakterisierung

CD3-positiver T-Zellen wurde auf die Detektion von CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen „gated“. Anschließend wurden in einer Höhenliniendarstellung (*Contour-Plot*) CD4-positive bzw. CD8-positiv T-Zellen, die gleichzeitig entweder CD107a-positiv, CD154-positiv oder CD69-positiv waren, dargestellt und der Prozentsatz z.B. CD107a-positiver T-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der CD4-positiven bzw. CD8-positiven T-Zellen bestimmt.

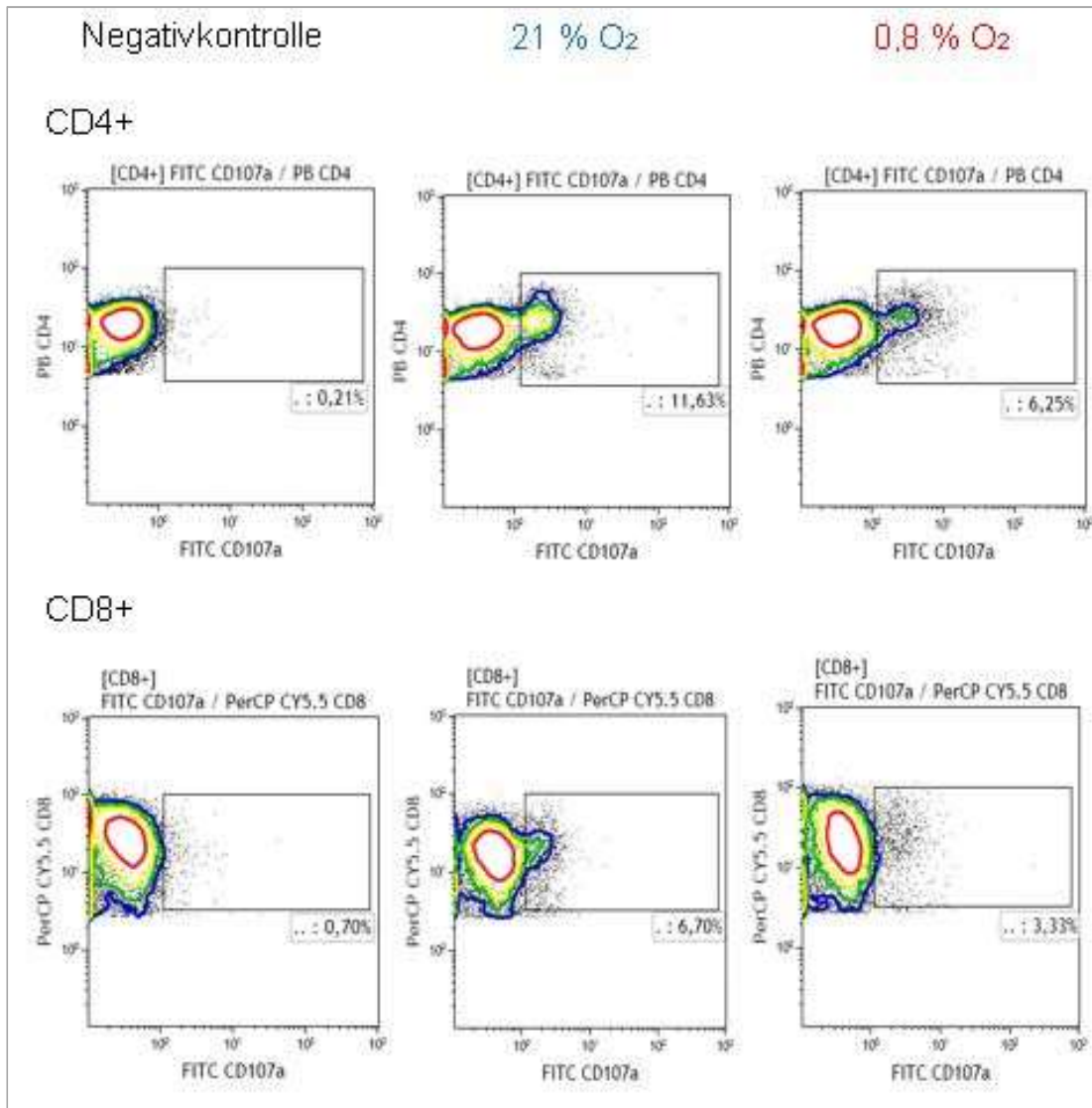


Abb.3.18: Beispielhafte Darstellung der Zytotoxizität, von CD4-positiven (CD4+) und CD8-positiven (CD8+) T-Zellen, die mit normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) für fünf Std. co-inkubiert worden waren. Darstellung der „gating“ Strategie der Durchflusszytometrie mittels Höhenliniendarstellungen (*Contour-Plot*) anhand der Oberflächenexpression von CD107a als Marker für zelluläre Degranulation. Die prozentualen Zahlen zeigen die Expressionsdichte des Markers CD107a auf CD4-positiven (CD4+) bzw. CD8-positiven (CD8+) T-Zellen. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen.

Die Zunahme des prozentualen Anteils (% *gated*) immunpositiver CD4-positiver T-Zellen von $0,5 \pm 0,2$ % bei den normoxisch kultivierten, Wildtyp-Zellen auf $9,4 \pm 3,1$ % bei den normoxisch kultivierten, CD40L-aktivierten B-Zellen errechnete sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$) (Abb. 3.19: A). Die statistische Analyse zwischen CD40L-aktivierten B-Zellen und Wildtyp-B-Zellen wurde hier einmalig durchgeführt, um deutlich zu machen, dass die Aktivierung mittels des CD40-Liganden funktioniert hat. Der Anstieg des prozentualen Anteils CD4-positiver T-Zellen unter Hypoxie von $1,2 \pm 0,5$ % bei den Wildtyp-Zellen auf $4,7 \pm 2,2$ % bei den CD40L-aktivierten B-Zellen erwies sich als signifikant ($p \leq 0,01$). Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD4-positiver T-Zellen, die CD107a als einen Marker für die zelluläre Degranulation exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen signifikant niedriger als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p \leq 0,05$).

Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD8-positiver T-Zellen, die CD107a als einen Marker für die zelluläre Degranulation exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen signifikant niedriger als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p \leq 0,05$). CD8-positiv T-Zellen, die auch CD107a als einen Marker für zelluläre Degranulation exprimierten, bildeten einen Anteil von $4,7 \pm 2,2$ % aller mit normoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-kultivierten CD8-positiver T-Zellen. Ebenso kam es im Vergleich zu $2,5 \pm 1,2$ % CD107a-positiven CD8-Zellen, die mit hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-inkubiert wurden, zu einem Anteil von lediglich $0,9 \pm 1,3$ %, wenn die Co-Inkubation mit den hypoxisch kultivierten Wildtyp-Zellen erfolgte (Abb. 3.19: B).

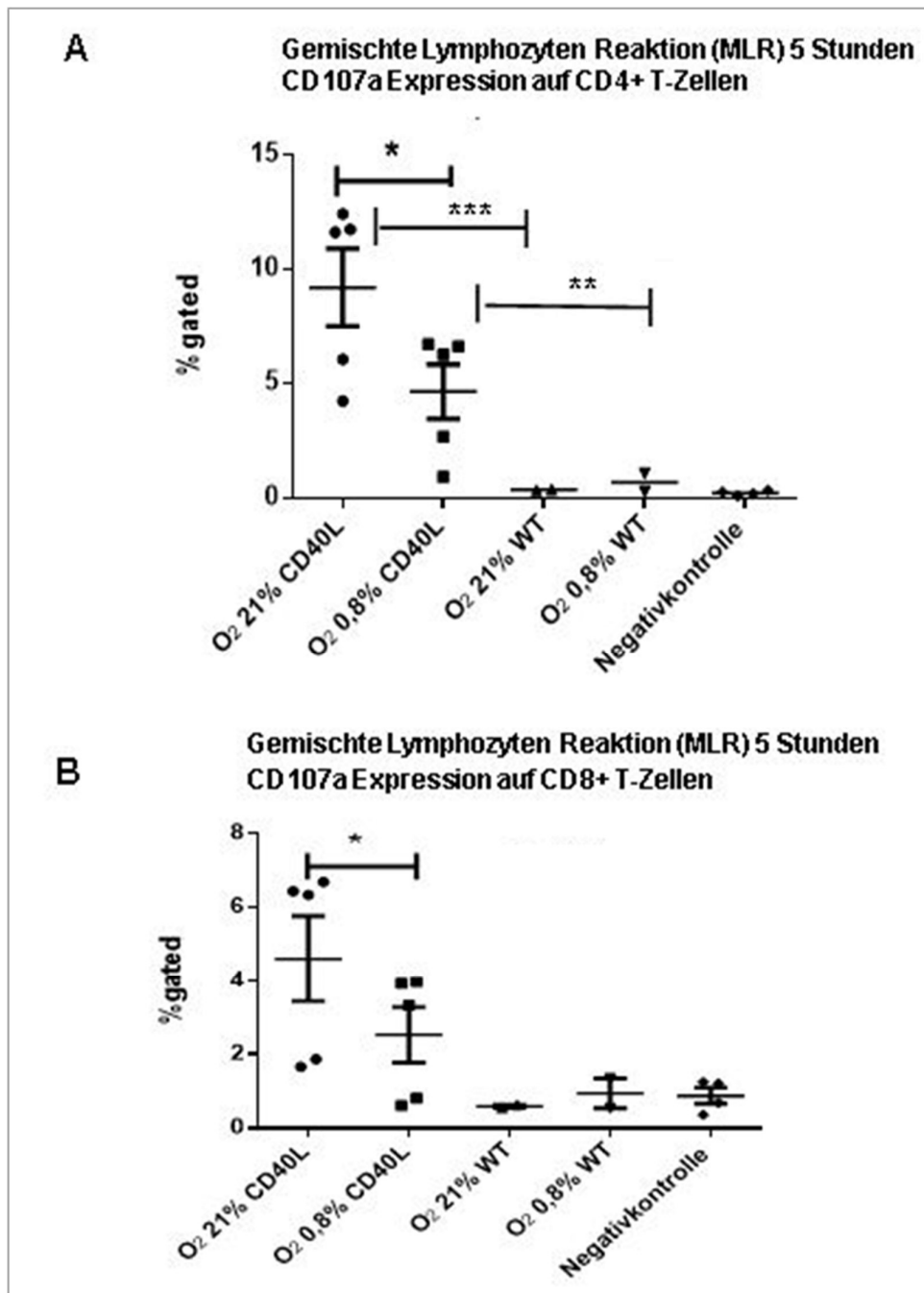


Abb.3.19: Expression des Oberflächenantigens CD107a als Marker für die Zytotoxizität von T-Zellen. Prozentualer Anteil (% gated) der zytotoxischen T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (WT), die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert worden waren. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001) durchgeführt.

CD4-positive T-Zellen, die auch CD154 als einen Marker für frühe Zellaktivierung exprimierten, bildeten einen Anteil von $7,9 \pm 2,0$ % aller mit normoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-kultivierten CD4-positiven T-Zellen. Nur $0,1 \pm 0,2$ % der CD4-positiven Zellen, welche mit Wildtyp-Zellen (WT) im Rahmen der MLR co-kultiviert wurden, erwiesen sich auch als CD154 immunpositiv (Abb. 3.20: A). Ebenso kam es zum Vergleich von $4,5 \pm 0,7$ % CD154-positiven CD4-Zellen, die mit hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-inkubiert wurden, zu einem Anteil von lediglich $0,2 \pm 0,2$ %, wenn die Co-Inkubation mit hypoxisch kultivierten Wildtyp-Zellen erfolgte (Abb. 3.20: A). Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD4-positiver T-Zellen, die CD154 als Marker für eine frühe Zellaktivierung exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen signifikant geringer als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.20: A).

CD8-positive T-Zellen, die auch CD154 als einen Marker für frühe Zellaktivierung exprimierten, bildeten einen Anteil von $5,5 \pm 1,8$ % aller mit normoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-kultivierten CD8-positiven T-Zellen. Ebenso kam es im Vergleich zu $3,4 \pm 1,2$ % CD154-positiven CD8-Zellen, die mit hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-inkubiert wurden, zu einem Anteil von lediglich $0,5 \pm 0,3$ % bei den hypoxisch kultivierten Wildtyp-Zellen (Abb. 3.20: B). Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD8-positiver T-Zellen, die CD154 als Marker für eine frühe Zellaktivierung exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen signifikant geringer als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.20: B).

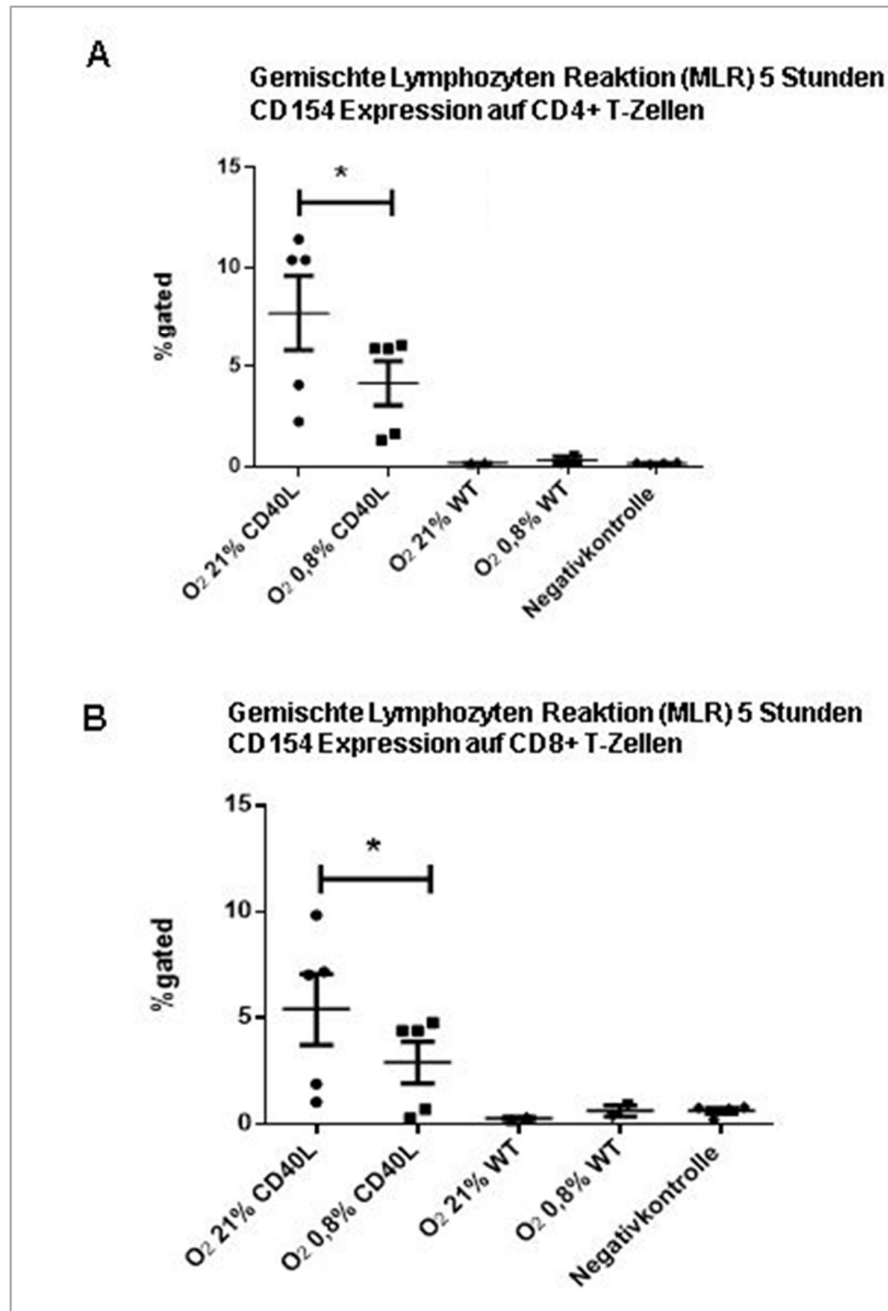


Abb.3.20: Expression des Oberflächenantigens CD154 als Marker für frühe Zellaktivierung von T-Zellen. Prozentualer Anteil (% *gated*) der aktivierten T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (WT), die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert waren. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05) durchgeführt.

CD4-positive T-Zellen, die CD69 als einen Marker für frühe Zellaktivierung exprimierten, bildeten einen Anteil von $3,1 \pm 0,8$ % aller mit normoxisch kultivierten, CD40L-aktivierten B-Zellen co-kultivierten CD4-positiven T-Zellen. Ebenso kam es im Vergleich zu $2,7 \pm 0,5$ % CD69-positiven CD4-Zellen, die mit hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-inkubiert wurden, zu einem Anteil von lediglich $0,5 \pm 0,1$ %, wenn die Co-Inkubation mit hypoxisch kultivierten Wildtyp-Zellen erfolgte. (Abb. 3.21: A). Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD4-positiver T-Zellen, die CD69 als Marker für eine frühe Zellaktivierung exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen nicht signifikant niedriger als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p > 0,05$) (Abb. 3.21: A).

Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD8-positiver T-Zellen, die auch CD69 als Marker für eine frühe Zellaktivierung exprimierten, war unter hypoxischen Bedingungen nicht signifikant niedriger als unter normoxischen Versuchsbedingungen ($p > 0,05$) (Abb. 3.21: B). CD8-positive T-Zellen, die auch CD69 als einen Marker für frühe Zellaktivierung exprimierten, bildeten einen Anteil von $1,5 \pm 0,5$ % aller mit normoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-kultivierten CD8-positiven T-Zellen. Ebenso kam es im Vergleich zu $1,1 \pm 0,4$ % CD69-positiven CD8-Zellen die mit hypoxisch kultivierten CD40L-aktivierten B-Zellen co-inkubiert wurden, zu einem Anteil von lediglich $0,6 \pm 0,1$ %, wenn die Co-Inkubation mit hypoxisch kultivierten Wildtyp-Zellen erfolgte. (Abb. 3.21: B)

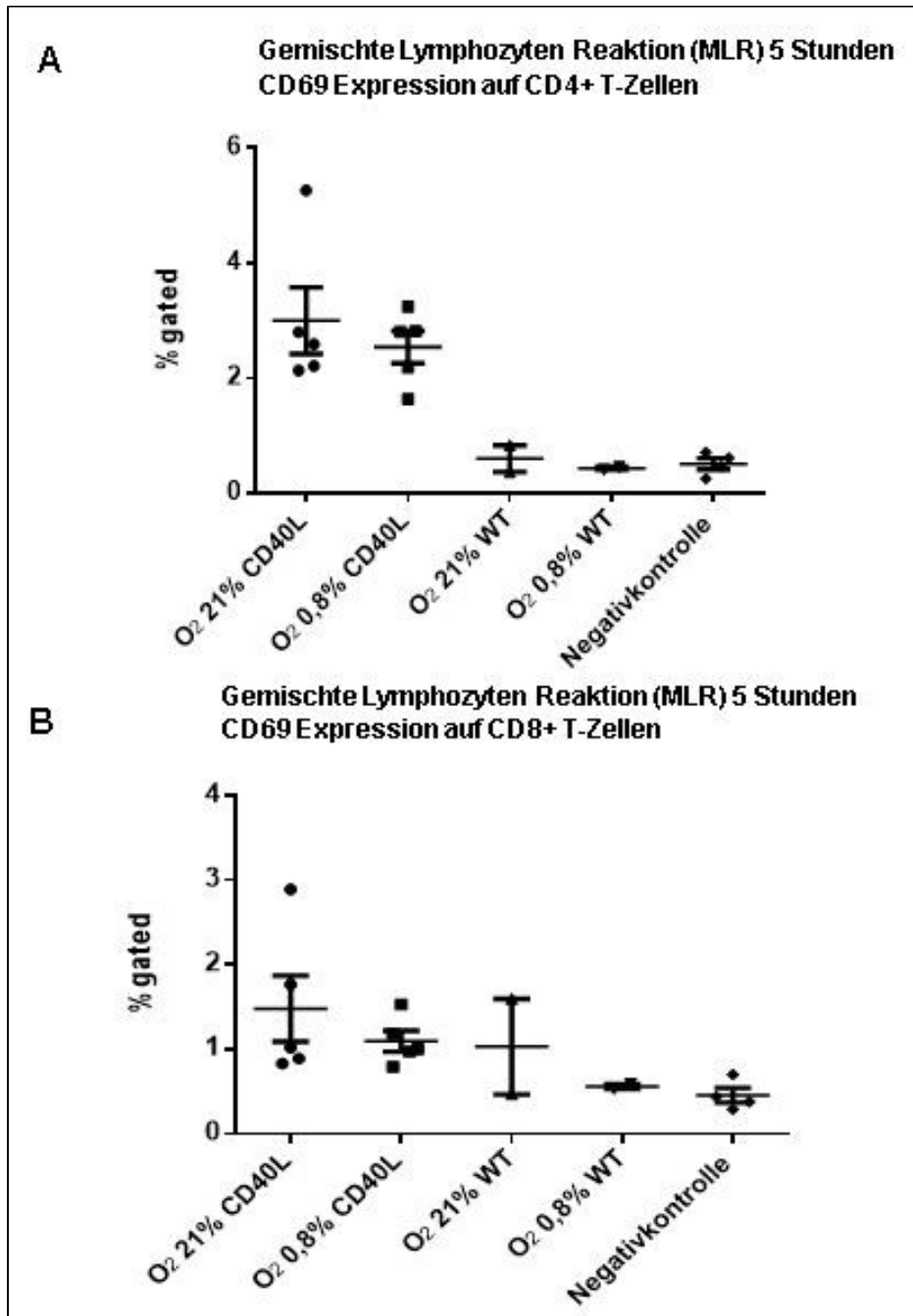


Abb.3.21: Expression des Oberflächenantigens CD69 als Marker für frühe Zellaktivierung von T-Zellen. Prozentualer Anteil (% gated) der aktivierten T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (WT), die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert waren. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05) durchgeführt.

3.5.2 LANGZEIT-GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION (MLR)

Die T-Zell Aktivierung nimmt in einer Langzeit-Kultur unter Hypoxie ab.

Im Rahmen der Langzeit-MLR wurde die Proliferation der T-Zellen mittels Einbau von Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gemessen, wie sie nach einer Stimulation mit immungenetisch fremden Blutzellen auftritt. CFSE wird während der Zellteilung interkalierend in die DNA der Zellen eingebaut und mittels Durchflusssy-tometrie quantitativ erfasst. Je höher die Zellteilungsrate ist, desto geringer ist der CFSE-Gehalt einer Zelle.

Responder T-Lymphozyten wurden von gesunden humanen Spendern gewonnen. Als Stimulatorzellen dienten CD40L-aktivierte B-Lymphozyten, die durch eine [¹³⁷Cs] Strahlenquelle mit 30 Gray bestrahlt wurden, um deren eigene Proliferation zu hemmen. Bei der MLR wurden die allogenen T-Zellen in Co-Kultur mit sowohl normoxisch (21 % O₂) als auch hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (= CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (= WT) co-inkubiert, die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert waren. Um eine Voraktivierung der T-Zellen auszuschließen, wurden T-Zellen auch ausschließlich mit Medium inkubiert (= Negativkontrolle). Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit paramagnetischen *Dynabeads* (s.2.6.3) inkubiert, die mit Antikörper gegen den T-Zell Rezeptor (TCR) beschichtet waren, wodurch es zu einer nahezu maximalen Aktivierung der T-Zellen kam. Die MLR wurde für sieben Tage unter Normoxie (21 % O₂) inkubiert.

Für die Analyse wurden in der „gating“ Strategie nur lebende CD4-positive bzw. CD8-positive T-Lymphozyten berücksichtigt. Zunächst erfolgte das „gating“ mit einer Punktwolkendarstellung (*DotPlot*), wie exemplarisch anhand des Aktivierungsmarkers CD25 und des Proliferationsmarkers CFSE in Abb. 3.22 für ein Experiment dargestellt. Die Zahlen im „gate“ geben jeweils den prozentualen Anteil der sich geteilten bzw. proliferierten T-Lymphozyten an.

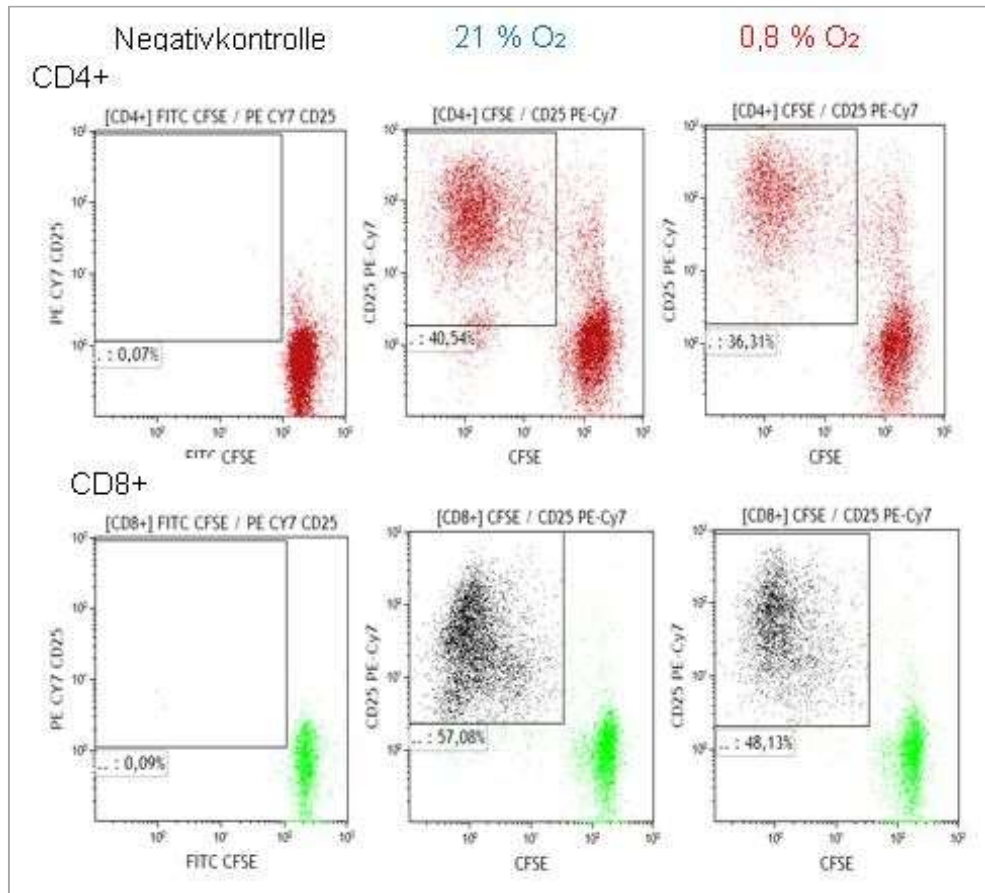


Abb.3.22: Beispielhafte Darstellung (anhand eines Experiments) der Aktivierung und Proliferation, mit Hilfe der Marker CD25 und CFSE, von CD4-positiven (CD4+) und CD8-positiven (CD8+) T-Zellen, die mit normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) für sieben Tage co-inkubiert worden waren. Darstellung der „gating“ Strategie der Durchflusszytometrie mittels Punktwolkendarstellung (*DotPlot*). Die prozentualen Zahlen zeigen sowohl die Expressionsdichte des Markers CD25 auf CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen und damit den Aktivierungsgrad der T-Zellen, als auch den Anteil des Proliferationsmarkers CFSE in der Zelle. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen.

CD4-positive, proliferierende T-Zellen, welche mit normoxisch vorkultivierten, CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten für sieben Tage im Rahmen einer Langzeit-MLR co-kultiviert worden waren, bildeten einen Anteil von $59,7 \pm 5,3$ % aller aktivierten CD4+ Zellen. Mit Wildtyp B-Lymphozyten co-kultivierte CD4+ Zellen zeigten eine statistisch hoch signifikant ($p \leq 0,001$) geringere Proliferationsaktivität mit verändertem CFSE Signal in nur $9,8 \pm 0,8$ % aller CD4+ Zellen (Abb. 3.23: A). Langzeit-MLRs mit CD4+ T-Zellen und unter hypoxischen Bedingungen vorkultivierten B-Lymphozyten ergab arithmetische Mittelwerte proliferierender CD4+ T-Zellen – bestimmt als Abnahme der CFSE Fluoreszenz in der FACS-

Analyse – von $52,4 \pm 8,2$ % aller aktivierter CD4+ Zellen, bzw. lediglich $14,5 \pm 5,1$ % aller T-Zellen nach Co-Kultur mit Wildtyp B-Lymphozyten ($p \leq 0,01$) (Abb. 3.23: A). Dabei errechnete sich der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter (CD25+) und proliferierender (Abnahme der CFSE Fluoreszenz) CD4+ Zellen unter hypoxischen Bedingungen für die B-Lymphozyten als signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als unter normoxischen Versuchsbedingungen für die B-Lymphozytenreifung (Abb. 3.23: A). Die als Positivkontrolle dienenden CD4+ T-Zellen nach Inkubation mit an Dynabeads gebundenen TCR Antikörpern zeigten im arithmetischen Mittel zu 86 %, die als Negativkontrolle dienenden und nur mit Medium inkubierten CD4+ Zellen lediglich zu $< 0,5$ % eine stimulierte T-Zell Proliferation.

CD8-positive, proliferierende T-Zellen, welche mit normoxisch vorkultivierten, CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten für sieben Tage im Rahmen einer Langzeit-MLR co-kultiviert worden waren, bildeten einen Anteil von $61,3 \pm 4,1$ % aller aktivierten CD8+ Zellen. Mit Wildtyp B-Lymphozyten co-kultivierte CD8+ Zellen zeigten eine statistisch signifikant ($p \leq 0,01$) geringere Proliferationsaktivität mit verändertem CFSE Signal in nur $17,6 \pm 0,7$ % aller CD8+ Zellen (Abb. 3.23: B). Langzeit-MLRs mit CD8+ T-Zellen und unter hypoxischen Bedingungen vorkultivierten B-Lymphozyten ergab arithmetische Mittelwerte proliferierender CD8+ T-Zellen – bestimmt als Abnahme der CFSE Fluoreszenz in der FACS-Analyse – von $54,6 \pm 4,5$ % aller aktivierter CD8+ Zellen, bzw. lediglich $37,1 \pm 16,2$ % aller T-Zellen nach Co-Kultur mit Wildtyp B-Lymphozyten ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.23: B). Dabei errechnete sich der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter (CD25+) und proliferierender (Abnahme der CFSE Fluoreszenz) CD8+ Zellen unter hypoxischen Bedingungen für die B-Lymphozyten als signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als unter normoxischen Versuchsbedingungen für die B-Lymphozytenreifung (Abb. 3.23: B). Die als Positivkontrolle dienenden CD8+ T-Zellen nach Inkubation mit an Dynabeads gebundenen TCR Antikörpern zeigten im arithmetischen Mittel zu 88 %, die als Negativkontrolle dienenden und nur mit Medium inkubierten CD8+ Zellen lediglich zu $< 0,5$ % eine stimulierte T-Zell Proliferation.

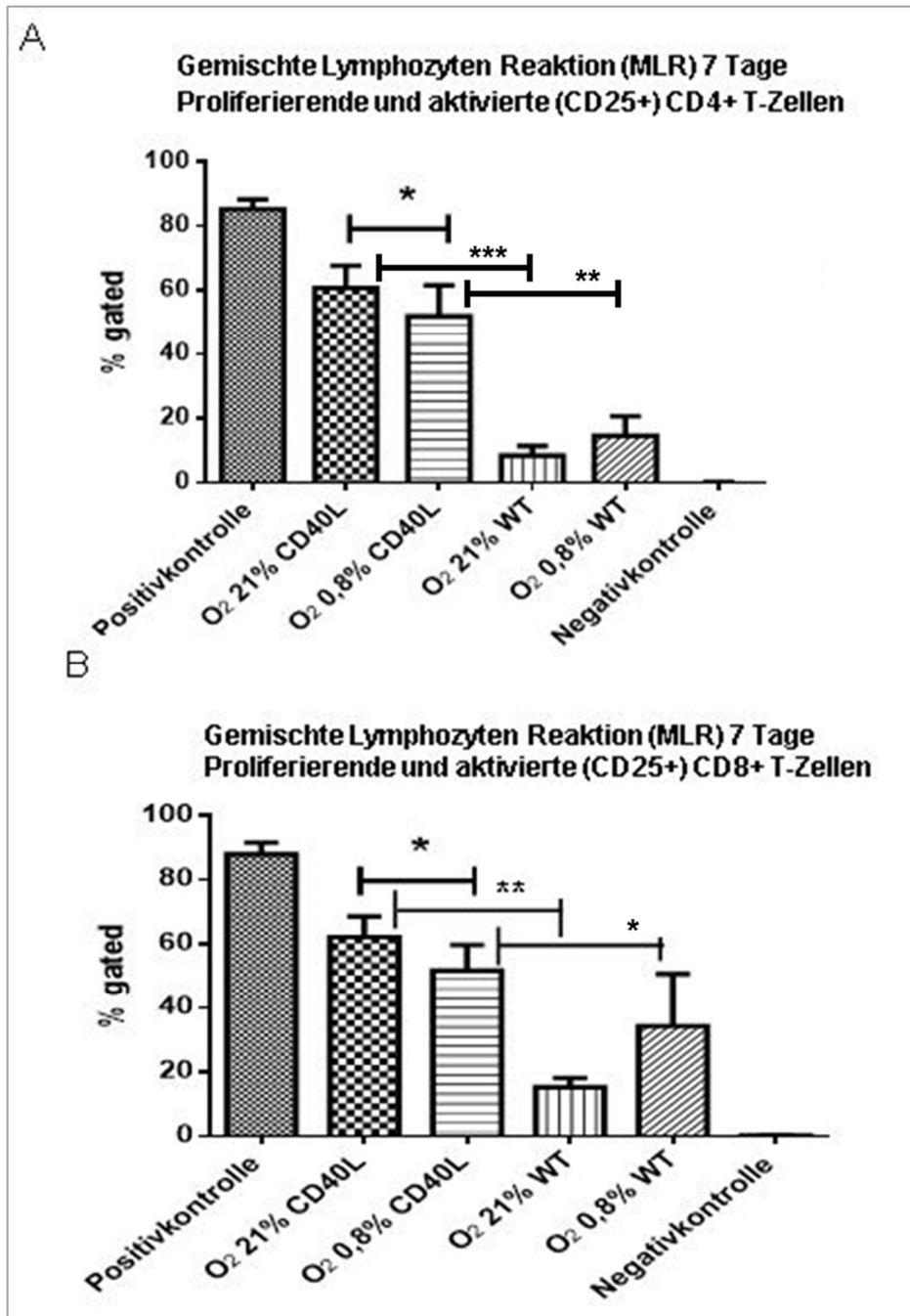


Abb.3.23: Expression des Oberflächenantigens CD25 als Marker für die Zellaktivierung und Fluoreszenznachweis für zellulär reduziertes CFSE als Proliferationsmarker von T-Zellen. Prozentualer Anteil (% *gated*) aktivierter und proliferierender T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über sieben Tage. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (= CD40L) bzw. Wildtyp-Zellen (= WT), die nicht durch den CD40-Liganden aktiviert waren. Positivkontrolle: Inkubation der T-Zellen mit an *Dynabeads* gebundenen TCR-Antikörpern. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 4 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001) durchgeführt.

3.6 AKTIVIERUNG DES HYPOXIESIGNALWEGS DURCH EISENCHELATION (HYPOXIE NACHAHMUNG)

3.6.1 *IN VITRO* MODELL

3.6.1.1 PROLIFERATIONSVERHALTEN CD40L-AKTIVIERTER B-LYMPHOZYTEN UNTER DEM EINFLUSS DER EISENCHELATION

Es kommt zur einer Reduktion der Proliferation von CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss des Eisenchelators DFO

In den vorangegangenen Versuchen konnte der Einfluss von Hypoxie auf den Immunphänotypus und die Funktion von humanen CD40L-aktivierten B-Zellen gezeigt werden. Um die Frage zu untersuchen, ob die Komplexbildung von Fe^{2+} (= Eisenchelation) vergleichbare Effekte auf CD40L-aktivierte B-Zellen wie Hypoxie (0,8 % O_2) hat, wurde der Eisenchelator Deferoxamin (= DFO) eingesetzt. Um das Proliferationsverhalten von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter Eisenchelation (s. 2.7.1) zu untersuchen, wurden aufgereinigte humane B-Lymphozyten (s. 2.2.6) auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten, die den humanen CD40 Liganden exprimierten (s. 2.3.2), über sieben Tage co-kultiviert. Dabei erfolgte an Tag 0 eine DFO Zugabe, wobei finale Konzentrationen im Medium von 0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM sowie 1500 μM je Well erreicht wurden. An Tag 3 bzw. Tag 7 wurden die Zellen aus den Wells entnommen und ihre Anzahl bestimmt (s. 2.2.4). Die Anzahl CD40L-aktivierter B-Lymphozyten pro Well erwies sich im Vergleich zu $2,0 \pm 0,3 \times 10^6$ bei der Positivkontrolle an Tag 3 als unverändert, unabhängig von der eingesetzten Konzentration an DFO. Es ergaben sich Werte von $1,7 \pm 0,2 \times 10^6$ (15 μM), $1,6 \pm 0,2 \times 10^6$ (150 μM) sowie $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ (500 μM) unter dem Einfluss von DFO. Die geringen Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 3.24). An Tag 7 waren die Zellzahlen CD40L-aktivierter B-Lymphozyten im Vergleich zu $3,9 \pm 0,5 \times 10^6$ bei der Positivkontrolle signifikant auf $1,6 \pm 0,2 \times 10^6$ (15 μM), $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ (150

μM) sowie $1,7 \pm 0,2 \times 10^6$ ($1500 \mu\text{M}$) unter dem Einfluss von DFO reduziert ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.24).

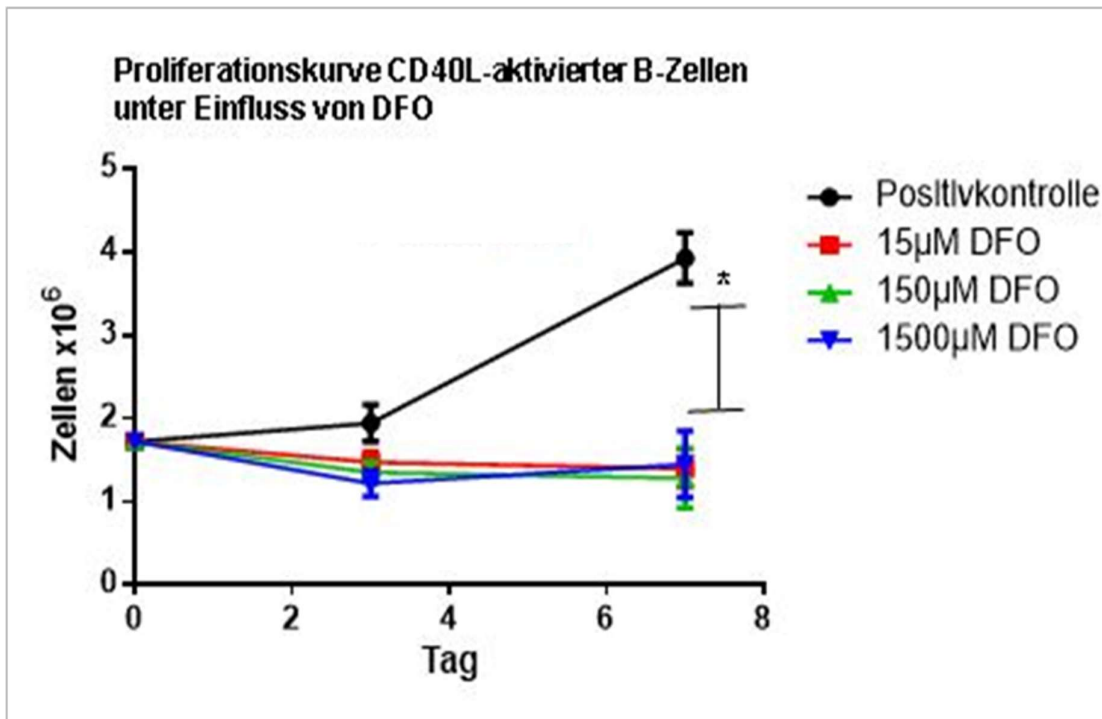


Abb.3.24: Proliferation von humanen B-Lymphozyten, die über sieben Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, welche den humanen CD40-Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Dabei erfolgte an Tag 0 eine Deferoxamin (DFO) Zugabe, wobei finale Konzentrationen im Medium von $0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$ sowie $1500 \mu\text{M}$ je Well erreicht wurden. Die y-Achse gibt die absolute Zellzahl je Well an. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n = 6$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Post-Hoc-Test mit einem Signifikanzniveau von ($* p \leq 0,05$) durchgeführt.

3.6.1.2 EINFLUSS DER EISENCHELATION AUF DIE APOPTOSERATE BEI CD40L- AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Zur Überprüfung, wie hoch die Apoptoserate von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten bei der Zugabe von DFO war, wurden aufgereinigte B-Zellen auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten für sieben Tage co-kultiviert. Wie unter 3.6.1.1 beschrieben, wurde DFO an Tag 0 der Kultur zugesetzt, wobei finale Konzentrationen von 0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 15 μM sowie 1500 μM je Well erzielt wurden. Der Anteil früh apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl wurde an Tag 0 sowie an Tag 3 und Tag 7 nach DFO-Zugabe bestimmt. Dabei wurde eine Doppelmarkierung mit Annexin V und 7AAD (s. 2.5.1) durchgeführt und die B-Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 3.25 zeigt ein Beispiel der durchflusszytometrischen „gating“ Strategie (s. 2.4.1) mit den Markern Annexin V und 7AAD anhand einer Höhenliniendarstellung (*Contour-Plot*).

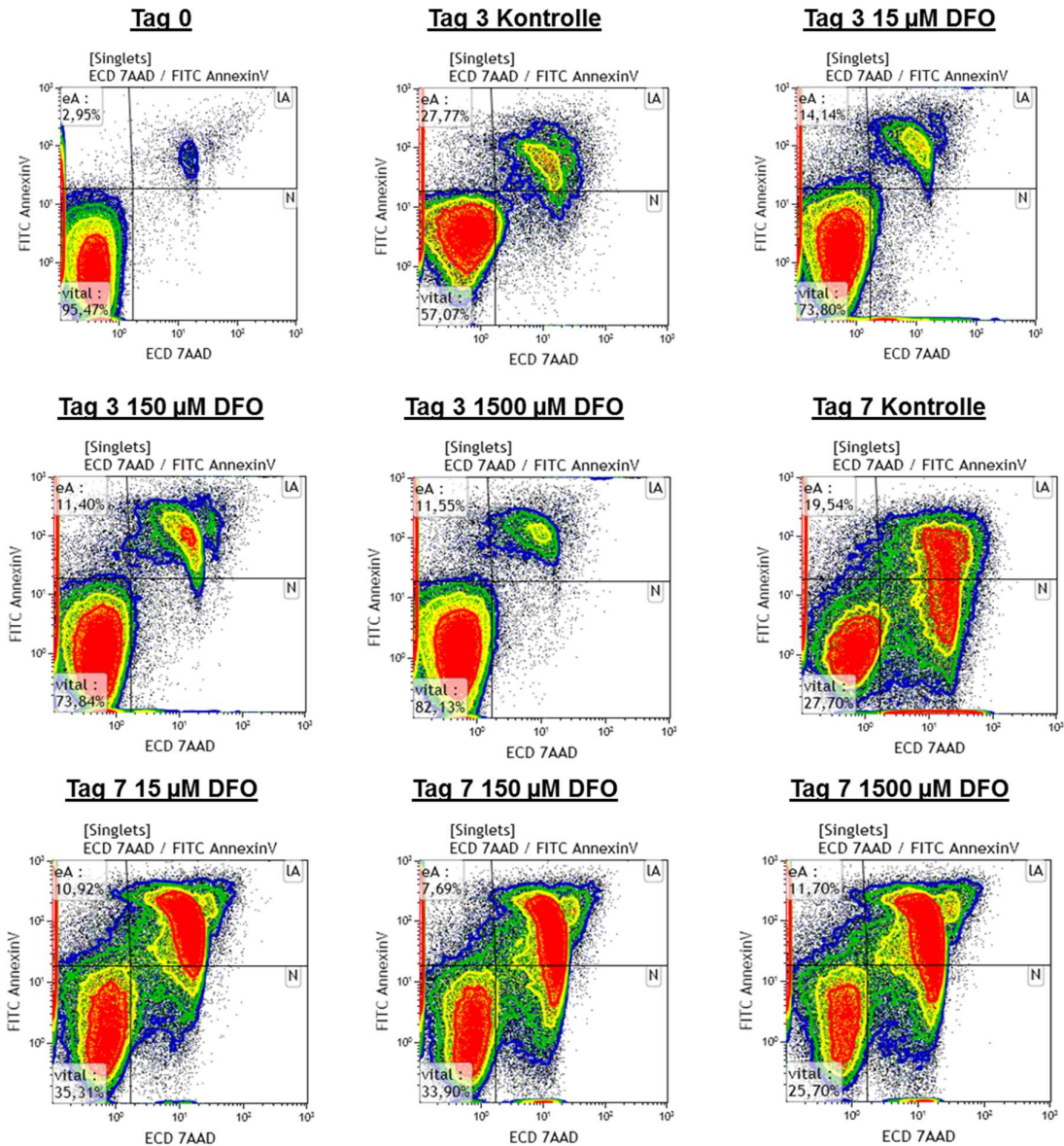


Abb. 3.25: Die Abbildung zeigt beispielhaft anhand eines Experiments die frühe Apoptose-rate, durch Markierung mit 7AAD und Annexin V, von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten an Tag 0, Tag 3 und Tag 7, nach Zugabe des Eisenchelators DFO in steigenden Konzentrationen (0 μ M (= Kontrolle), 15 μ M, 150 μ M, 1500 μ M). Die B-Zellen wurden insgesamt über sieben Tage auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten inkubiert. Als Kontrolle dienen auf NIH-3T3 Fibroblasten kultivierte CD40L-aktivierte B-Zellen ohne DFO. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen mit einer frühen Apoptose-Rate (= Quadrant oben links) und der vitalen Zellen (= Quadrant unten links) an. Darstellung der „gating“ Strategie in der Durchflusszytometrie mittels Höhenliniendarstellungen (*Contour-Plot*).

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die in frühe Apoptose gingen, erhöhte sich in Abwesenheit von DFO von $3,2 \pm 0,2$ % zu Versuchsbeginn (Tag 0) auf $27,4 \pm 0,6$ % (Positivkontrolle ohne DFO) an Tag 3. In Gegenwart von DFO erfolgte eine dosisunabhängige Reduktion der Apoptoserate CD40L-aktivierter B-Lymphozyten auf $15,3 \pm 1,1$ % (15 μM), $12,9 \pm 0,9$ % (150 μM) bzw. auf $14,1 \pm 0,3$ % (1500 μM) (Abb. 3.26). Aufgrund der limitierten Anzahl an Experimenten ($n=3$) konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden. An Tag 7 ergab sich eine Reduktion des prozentualen Anteils früh apoptotischer CD40L-aktivierter B-Lymphozyten von $14,6 \pm 5,7$ % (Positivkontrolle ohne DFO) auf $9,5 \pm 0,6$ % (15 μM) bzw. $9,3 \pm 0,4$ % (150 μM), um dann auf $14,3 \pm 0,2$ % (1500 μM) zu steigen (Abb. 3.26).

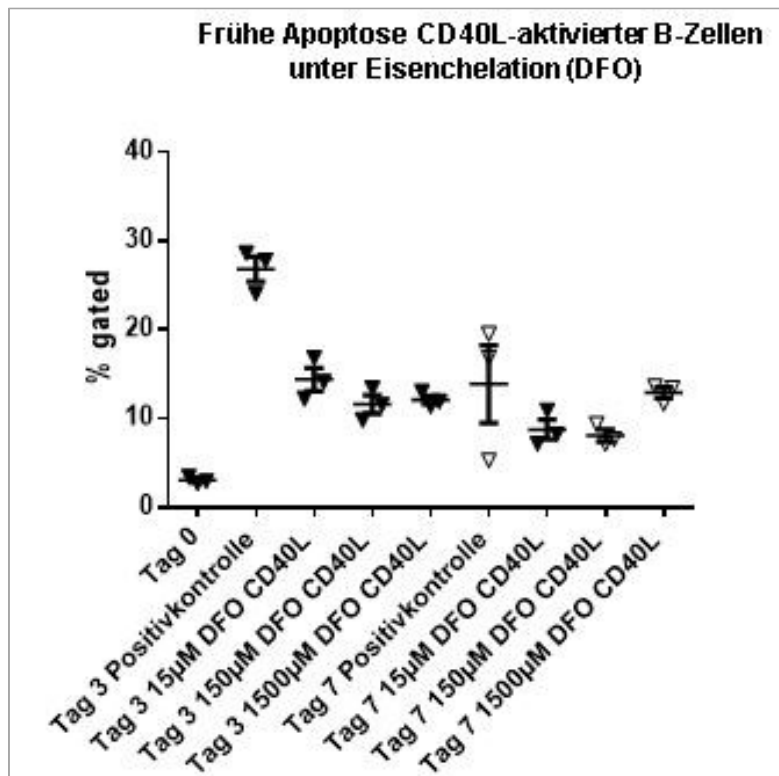


Abb.3.26: Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile (% *gated*) der frühen Apoptoserate humanen B-Lymphozyten (CD40L), die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die CD40L-aktivierten B-Lymphozyten wurden über die gesamte Versuchsdauer mit steigender Konzentration (0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM , 1500 μM) des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) inkubiert. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 0, Tag 3 und Tag 7. Auf der y-Achse ist die prozentual gemessene Anzahl der Zellen in einem Analysefenster aufgetragen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=3$ Experimenten dar. Aufgrund der limitierten Anzahl an Experimenten ($n=3$) konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) vitaler, CD40L-aktivierter B-Lymphozyten wurde folgerichtig von $97,1 \pm 0,1$ % zu Versuchsbeginn (Tag 0) auf $58,6 \pm 0,2$ % in Abwesenheit von DFO (= Positivkontrolle) an Tag 3 reduziert. Im Vergleich dazu deuten die unter DFO-Behandlung erhaltenen Daten hinsichtlich des prozentualen Anteils vitaler CD40L-aktivierter B-Lymphozyten auf eine anti-apoptotische Wirkung der Eisenchelation hin. So ergaben sich prozentuale Anteile von $67,3 \pm 1,1$ % (15 μM), $73,5 \pm 0,7$ % (150 μM) und $67,8 \pm 0,1$ % (1500 μM) an Tag 3 (Abb. 3.27). An Tag 7 ergab sich eine Reduktion des prozentualen Anteils vitaler CD40L-aktivierter B-Lymphozyten von $41,2 \pm 20,1$ % in Abwesenheit von DFO auf $25,5 \pm 15,4$ % (15 μM), $21,6 \pm 14,7$ % (150 μM) und $20,8 \pm 0,7$ % (1500 μM) (Abb. 3.27).

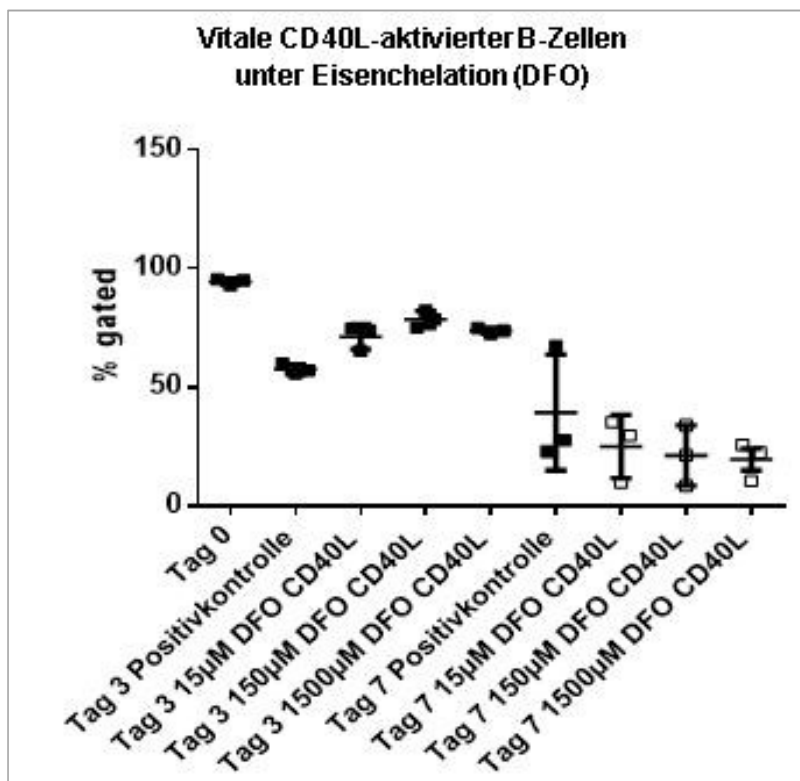


Abb.3.27: Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile (% *gated*) vitaler humaner B-Lymphozyten (CD40L), die in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die CD40L-aktivierten B-Lymphozyten wurden über die gesamte Versuchsdauer mit steigender Konzentration (0 μM = Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM , 1500 μM) des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) inkubiert. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 0, Tag 3 und Tag 7. Auf der y-Achse ist die prozentual gemessene Anzahl der Zellen in einem Analysefenster aufgetragen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von n=3 Experimenten dar.

3.6.1.3 EINFLUSS DER EISENCHELATION AUF DEN ZELLYKLUS VON CD40L- AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Reduktion der Zellzahl CD40L-aktivierter B-Zellen in der G1-Zellzyklusphase unter Eisenchelation

B-Lymphozyten wurden aufgereinigt (s. 2.2.6) und damit CD40-positive B-Zell Co-Kulturen auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten angelegt (s. 2.3.2), welche für drei Tage mit steigenden Konzentrationen (0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM , 1500 μM), des Eisenchelators DFO inkubiert wurden. Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte zunächst mittels einer 7AAD Markierung (s. 2.5.2) über die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle. Die Erfassung der 7AAD-spezifischen Autofluoreszenz in den B-Zellen und dessen anschließende Analyse in der Durchflusszytometrie erfolgte wie in Kapitel 2.5.2 + 2.4.3 beschrieben. Die Histogramme wurden mit Hilfe der Analysesoftware FlowJo (TreeStar) ausgewertet. Die Abbildung 3.28 zeigt beispielhaft anhand eines Experiments die durchflusszytometrische „gating“ Strategie (s. 2.4.1) mittels Histogramm. Das linke (grüne) Histogramm zeigt die Zellzyklusphase G1 an, das rechte (blaue) Histogramm die Zellzyklusphase G2.

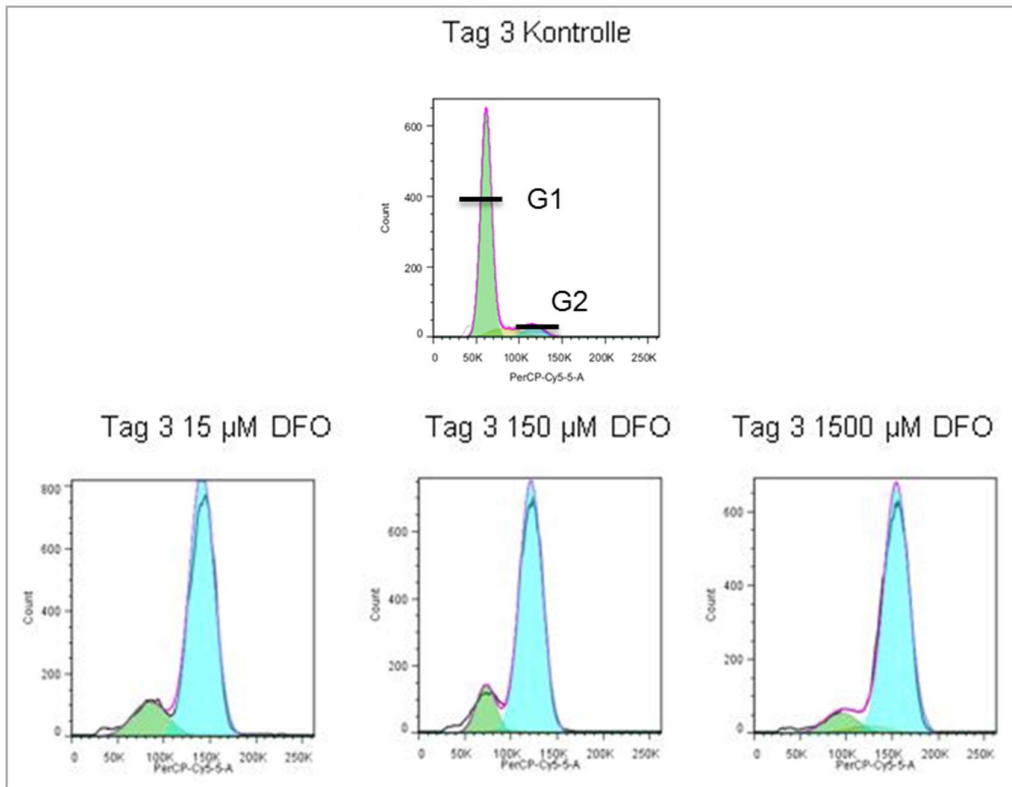


Abb.3.28: Die Abbildung zeigt die Zellzyklusanalyse von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten, die für drei Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten wurden, unter dem Einfluss des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) in steigenden Konzentrationen (0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM , 1500 μM). Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt der Zellen an; dabei wird auf der y-Achse die Anzahl der Zellen (count) und auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität angegeben, wobei 7AAD das fluoreszierende Molekül ist. Das linke Histogramm (grün) stellt die Zellzyklusphase G1 dar. Das Histogramm daneben (hellblau) die Zellzyklusphase G2. Darstellung mittels FlowJo.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die sich an Tag 3 in der Zellzyklusphase G1 befanden, sank im Vergleich zu $69,8 \pm 11,1 \%$ bei der Positivkontrolle in Abwesenheit von DFO auf $40,6 \pm 15,2 \%$ (15 μM), auf $37,4 \pm 10,5 \%$ (150 μM) und auf $39,3 \pm 15,6 \%$ (1500 μM) DFO signifikant ($p \leq 0,05$). Der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die sich an Tag 3 in der Zellzyklusphase G2 befanden, stieg im Vergleich zu $12,5 \pm 13,1 \%$ bei der Positivkontrolle in Abwesenheit von DFO auf $38,6 \pm 19,8 \%$ (15 μM), auf $39,9 \pm 19,5 \%$ (150 μM) und auf $38,2 \pm 14,6 \%$ (1500 μM) DFO signifikant ($p \leq 0,05$) an (Abb. 3.29).

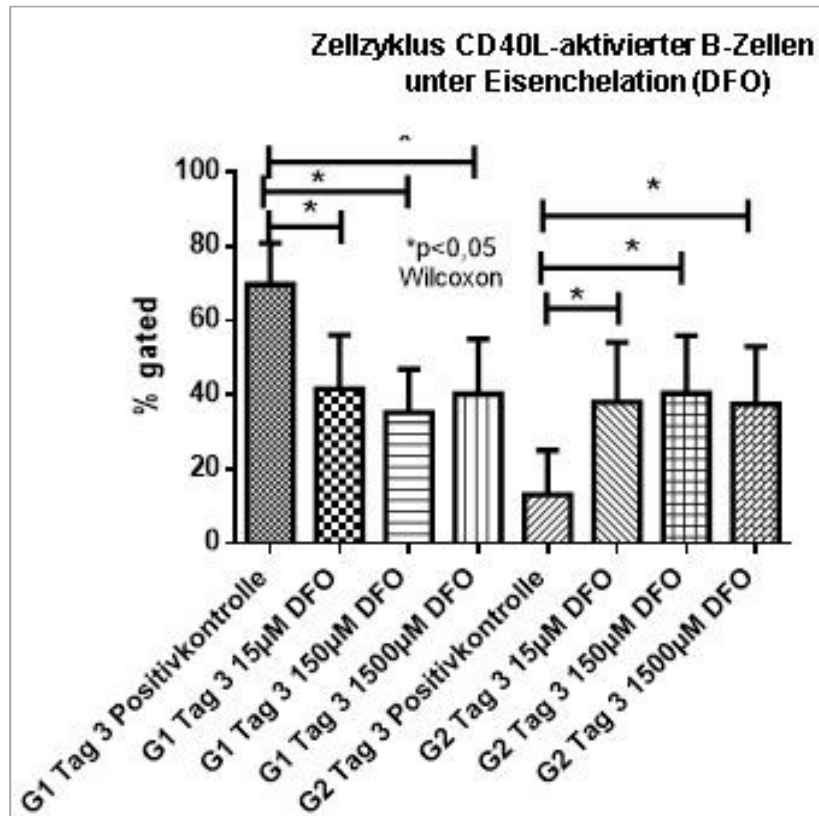


Abb.3.29: Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile (% gated) humanen B-Lymphozyten (CD40L), die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befanden. Die B-Zellen wurden für sieben Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die CD40L-aktivierter B-Lymphozyten waren zum Vergleich mit steigender Konzentration (0 µM (= Positivkontrolle), 15 µM, 150 µM, 1500 µM) des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) inkubiert. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 3. Auf der y-Achse ist die prozentuale Anzahl der Zellen, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befinden, dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n=6 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05) durchgeführt.

3.6.1.4 EINFLUSS DER EISENCHELATION AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Verringerung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss der Eisenchelation

Aufgereinigte humane B-Lymphozyten (s. 2.2.6) wurden über drei Tage mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten, die den humanen CD40-Liganden exprimierten, co-kultiviert. Die so aktivierte B-Zellen wurden mit dem Eisenchelator Deferoxamin in steigender Konzentration (0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM und 1500 μM) inkubiert. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an Tag 0 und Tag 3 durchgeführt. Wie auch schon für die Studien unter Hypoxie dargestellt, wurden B-Lymphozyten mit Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle markiert, die mit der Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen assoziiert sind (s. 2.4.3).

Für die Analyse wurden in der „gating“ Strategie (s. 2.4.1) nur vitale CD20-positive und CD19-positive B-Lymphozyten berücksichtigt. Die Differenzierung erfolgte über die Expression der Marker CD80 und CD86, HLA-DR und CD62L. Abbildung 3.30 repräsentiert ein exemplarisches Experiment der durchflusszytometrischen „gating“ Strategie (s. 2.4.1) für den Aktivierungsmarker CD80 anhand einer Höhenliniendarstellung (*Contour-Plot*).

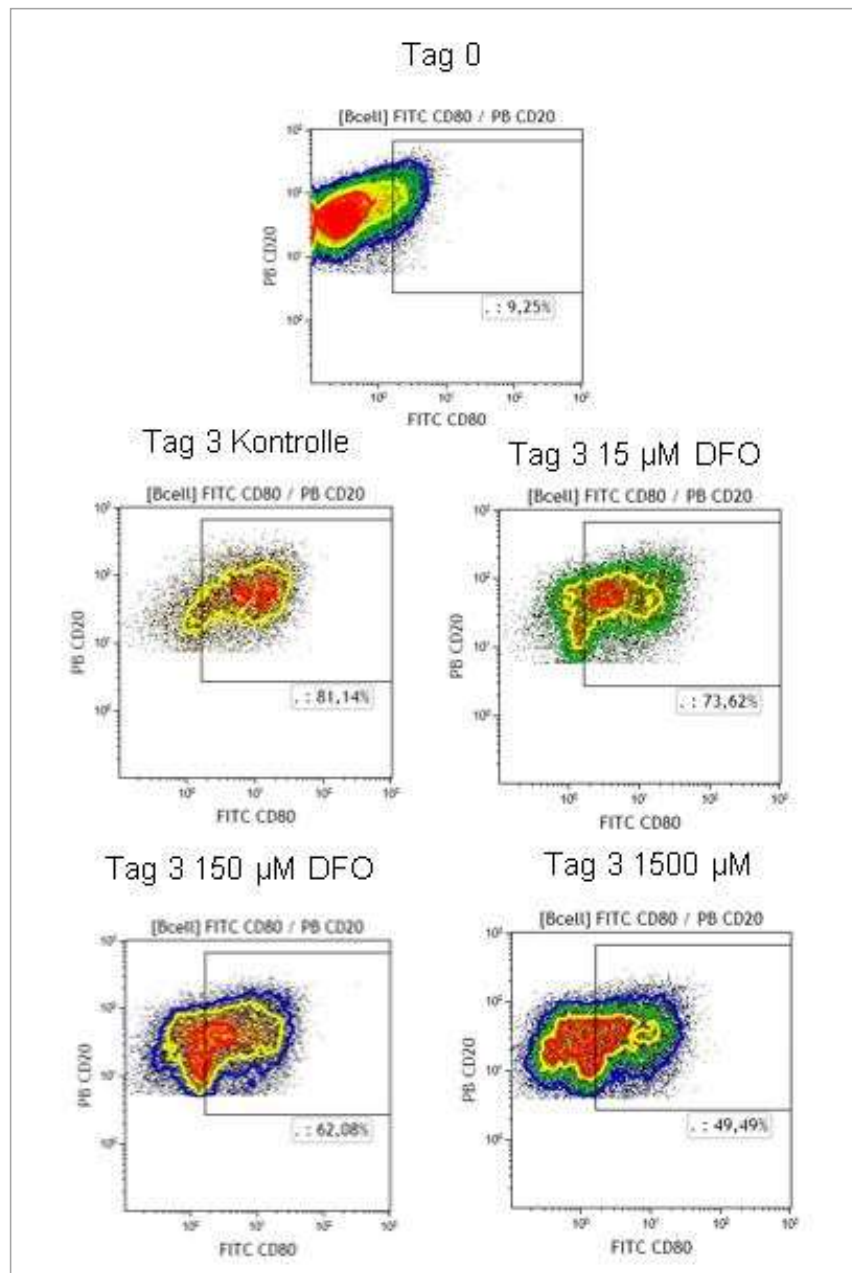


Abb.3.30: Die Abbildung zeigt beispielhaft anhand eines Experiments den Aktivierungsgrad, mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD80, von humanen B-Lymphozyten. Die B-Zellen wurden für sieben Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten wurden zum Vergleich mit steigender Konzentration (0 μM (= Kontrolle), 15 μM, 150 μM, 1500 μM) des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) inkubiert. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 3. Darstellung der „gating“ Strategie in der Durchflusszytometrie mittels Höhenliniendarstellung (ContourPlot). Die Rechtecke („gate“) zeigen den prozentualen Anteil CD20-positiver B-Zellen, die durch CD80 charakterisiert sind.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die den Aktivierungsmarker CD80 exprimierten, nahm im Vergleich zu $8,2 \pm 0,2$ % bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $85,4 \pm 9,1$ % bei der Positivkontrolle ohne DFO an Tag 3 zu. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle war der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten in Gegenwart von DFO auf $59,5 \pm 10,2$ % ($15 \mu\text{M}$), $55,3 \pm 9,7$ % ($150 \mu\text{M}$), respektive auf $50,4 \pm 8,9$ % ($1500 \mu\text{M}$) verringert (Abb. 3.31). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den drei Versuchsgruppen mit steigender DFO Konzentration sowie den DFO- Gruppen untereinander ($p > 0,05$) (Abb. 3.31).

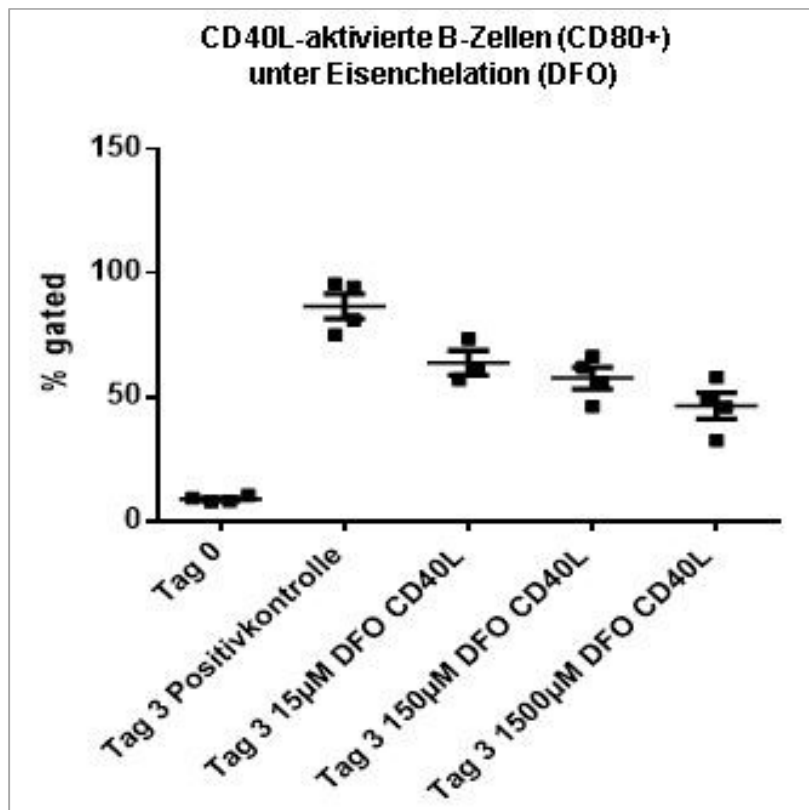


Abb.3.31: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) humaner B-Zellen durch Nachweis des Aktivierungsmarkers CD80 in Gegenwart steigender Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) des Eisenchelator Deferoxamin (DFO) an Tag 0 und Tag 3. Die B-Zellen wurden für sieben Tage in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten gehalten, die den humanen CD40 Liganden (CD40L) exprimierten. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von CD80 auf CD80-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss von DFO über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als ein Maß für die Anzahl der auf einzelnen Zellen exprimierten Moleküle, zeigte sich ein erhöhter Anteil im Vergleich zu $3,3 \pm 0,1$ AU bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $15,2 \pm 3,4$ AU bei der Positivkontrolle an Tag 3. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle erwies sich die MFI der CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter DFO-Einwirkung auf $13,6 \pm 2,5$ AU ($15 \mu\text{M}$), $12,4 \pm 2,1$ AU ($150 \mu\text{M}$), respektive auf $10,3 \pm 3,1$ AU ($1500 \mu\text{M}$) als tendenziell verringert (Abb. 3.32). Die Unterschiede in der MFI an Tag 3 zwischen der Positivkontrolle und den drei Versuchsgruppen mit DFO sowie den DFO Gruppen untereinander, waren nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 3.32).

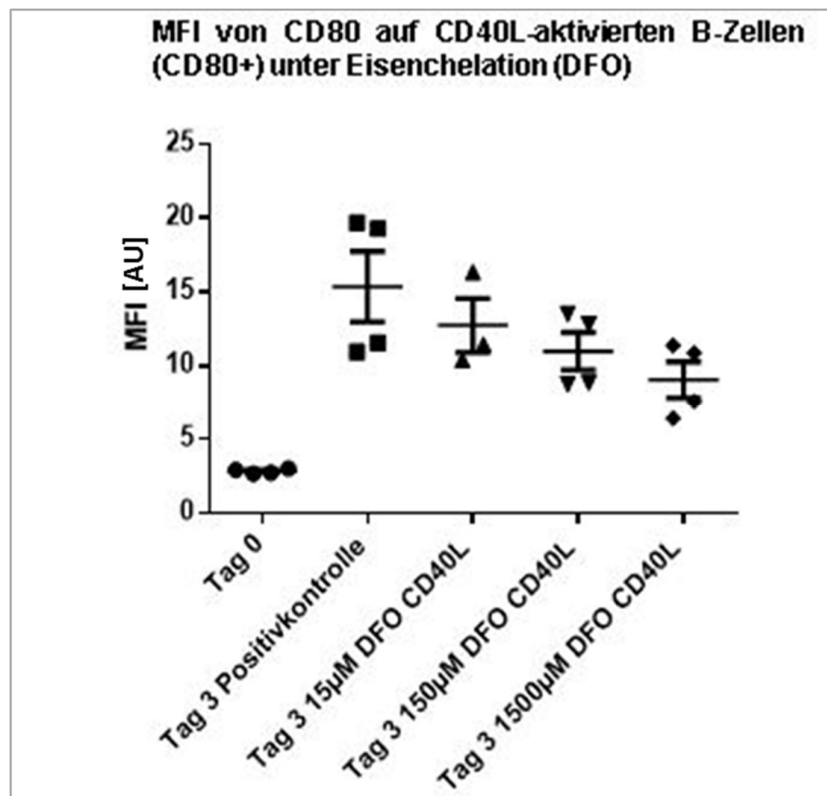


Abb.3.32: Die Abbildung zeigt die Expression von CD80 auf CD80-positiven humanen B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die den Aktivierungsmarker CD86 exprimierten, war im Vergleich zu $2,1 \pm 0,1$ % bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $91,4 \pm 7,2$ % bei der Positivkontrolle an Tag 3 erhöht. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle, blieb der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten mit mittleren Werten von $90,2 \pm 2,3$ % ($15 \mu\text{M}$), $89,8 \pm 2,7$ % ($150 \mu\text{M}$) und von $86,4 \pm 3,8$ % ($500 \mu\text{M}$) unter DFO-Behandlung auf vergleichbarem Niveau (Abb. 3.33). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den drei Versuchsgruppen mit DFO sowie den DFO-Gruppen untereinander ($p > 0,05$) (Abb. 3.33).

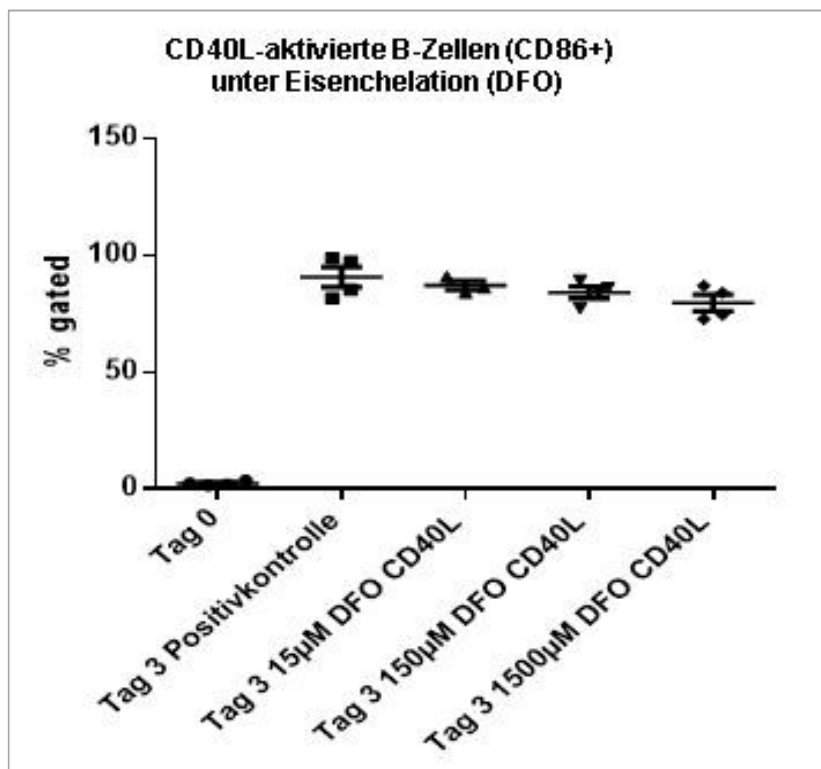


Abb.3.33: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) humaner B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten durch Nachweis des Aktivierungsmarkers CD86 in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3. Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von CD86 auf CD86-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss von DFO über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zeigte sich als Maß für die Anzahl exprimierter Moleküle ein erhöhter Anteil im Vergleich zu $5,2 \pm 0,1$ AU bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $220,2 \pm 40,5$ AU bei der Positivkontrolle an Tag 3. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle war die MFI der CD40L-aktivierten B-Lymphozyten auf $207,6 \pm 38,5$ AU $15 \mu\text{M}$, $151,4 \pm 9,8$ AU $150 \mu\text{M}$, respektive auf $100,1 \pm 8,6$ AU $1500 \mu\text{M}$ unter DFO-Einwirkung verringert (Abb. 3.3). Für alle drei DFO-Konzentrationen ergaben sich im Vergleich zur Positivkontrolle sowie für die DFO-Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) (Abb. 3.34).

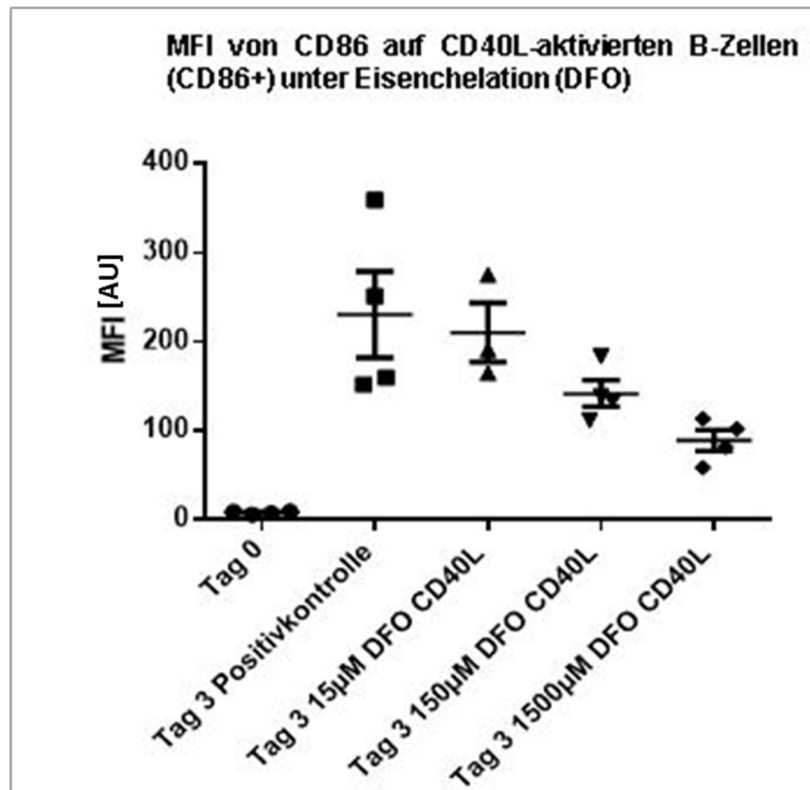


Abb.3.34: Die Abbildung zeigt die Expression von CD86 auf CD86-positiven humanen B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten, in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die das humane Leukozytenantigen HLA-DR exprimierten, war im Vergleich zu $2,3 \pm 0,2$ % bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $43,5 \pm 20,2$ % bei der Positivkontrolle an Tag 3 erhöht. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle war der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten auf $29,6 \pm 9,7$ % ($15 \mu\text{M}$), auf $36,6 \pm 6,8$ % ($150 \mu\text{M}$) und auf $27,4 \pm 13,5$ % ($1500 \mu\text{M}$) unter DFO-Behandlung tendenziell verringert (Abb. 3.35). Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den drei Versuchsgruppen mit DFO sowie den DFO-Gruppen untereinander ($p > 0,05$) (Abb. 3.35).

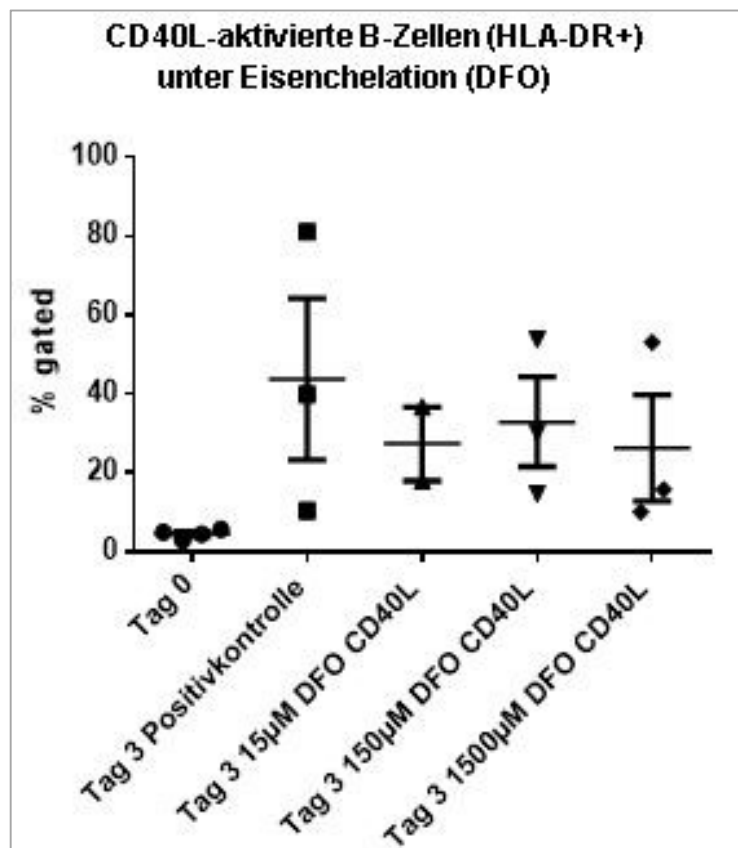


Abb.3.35: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) humaner B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten durch Nachweis des humanen Leukozytenantigens (HLA-DR) in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3. Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von HLA-DR auf HLA-DR-positiven, CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss von DFO über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Anzahl exprimierter Moleküle zeigte sich ein marginal erhöhter Anteil im Vergleich zu $9,5 \pm 2,3$ AU bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $12,4 \pm 2,8$ AU bei der Positivkontrolle an Tag 3. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle zeigte die MFI der CD40L-aktivierter B-Lymphozyten Werte auf unverändertem Niveau mit $9,8 \pm 2,5$ AU ($15 \mu\text{M}$), $10,4 \pm 2,5$ AU ($150 \mu\text{M}$) und $10,8 \pm 2,9$ AU ($1500 \mu\text{M}$) bei steigender DFO-Konzentration (Abb. 3.36). Für alle drei DFO-Konzentrationen ergaben sich im Vergleich zur Positivkontrolle sowie untereinander keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) (Abb. 3.36).

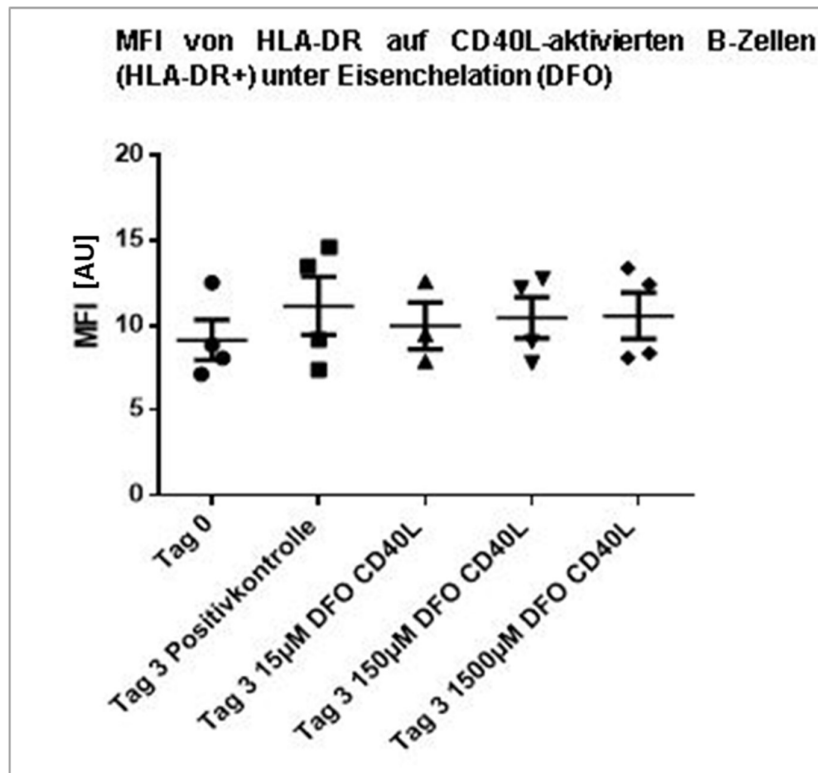


Abb.3.36: Die Abbildung zeigt die Expression von humanem Leukozytenantigen (HLA-DR) auf HLA-DR-positiven humanen B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD40L-aktivierter B-Lymphozyten, die das Zellaadhäsionsmolekül CD62L exprimierten, war im Vergleich zu $8,9 \pm 1,4$ % bei Versuchsbeginn (Tag 0) auf $18,5 \pm 21,4$ % bei der Positivkontrolle an Tag 3 erhöht. Im Vergleich dieser Positivkontrolle war der prozentuale Anteil CD40L-aktivierter B-Lymphozyten unter DFO-Behandlung auf $7,6 \pm 3,4$ % (15 μ M), auf $5,5 \pm 4,6$ % (150 μ M), respektive auf $4,2 \pm 3,9$ % (1500 μ M) verringert (Abb. 3.37). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den drei Versuchsgruppen mit DFO sowie den DFO-Gruppen untereinander ($p > 0,05$) (Abb. 3.37).

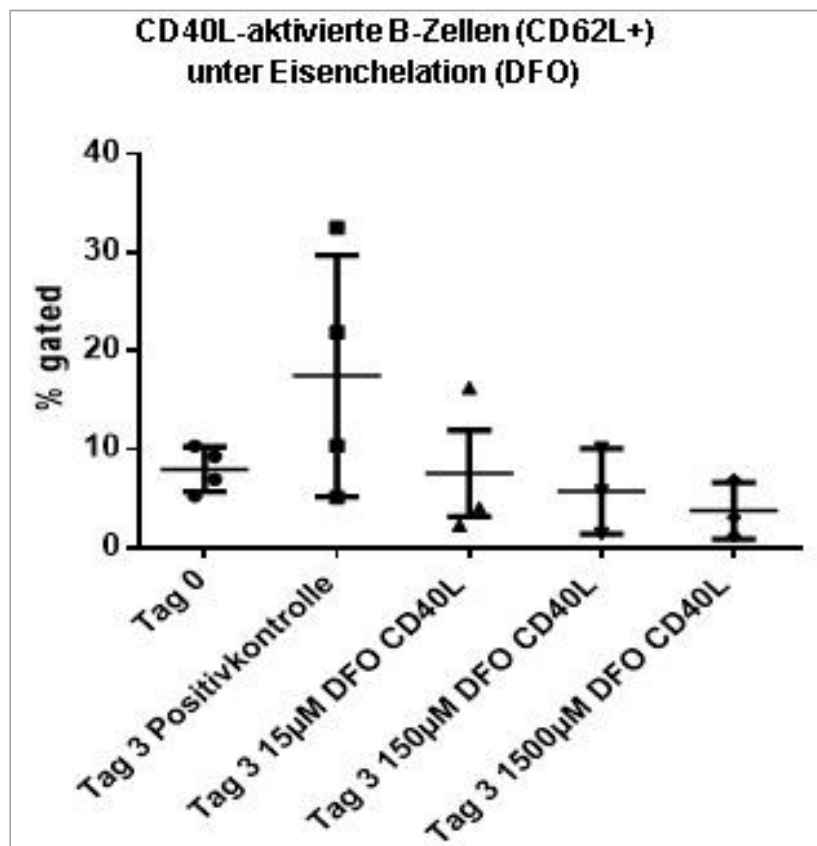


Abb.3.37: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) humaner B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten durch Nachweis des Zelladhäsionsmolekül CD62L in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration (0 μ M (= Positivkontrolle), 15 μ M, 150 μ M, 1500 μ M) an Tag 0 und Tag 3. Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von n=4 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Bei der Darstellung der Expressionsdichte von CD62L auf CD62L-positiven CD40L-aktivierten B-Zellen unter dem Einfluss des Eisenchelators Deferoxamin über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Anzahl exprimierter Moleküle zeigte sich ein im arithmetischen Mittel unverändert hoher Anteil im Vergleich zu $95,3 \pm 15,2$ AU bei Versuchsbeginn (Tag 0) von $94,7 \pm 17,3$ AU bei der Positivkontrolle an Tag 3. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle blieb die MFI der CD40L-aktivierter B-Lymphozyten mit großen Standardfehlern mit Werten von $137,5 \pm 60,5$ AU ($15 \mu\text{M}$), $99,6 \pm 49,1$ AU ($150 \mu\text{M}$), respektive $97,3 \pm 42,3$ AU ($1500 \mu\text{M}$) unverändert (Abb. 3.38). Folgerichtig ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p > 0,05$) (Abb. 3.38).

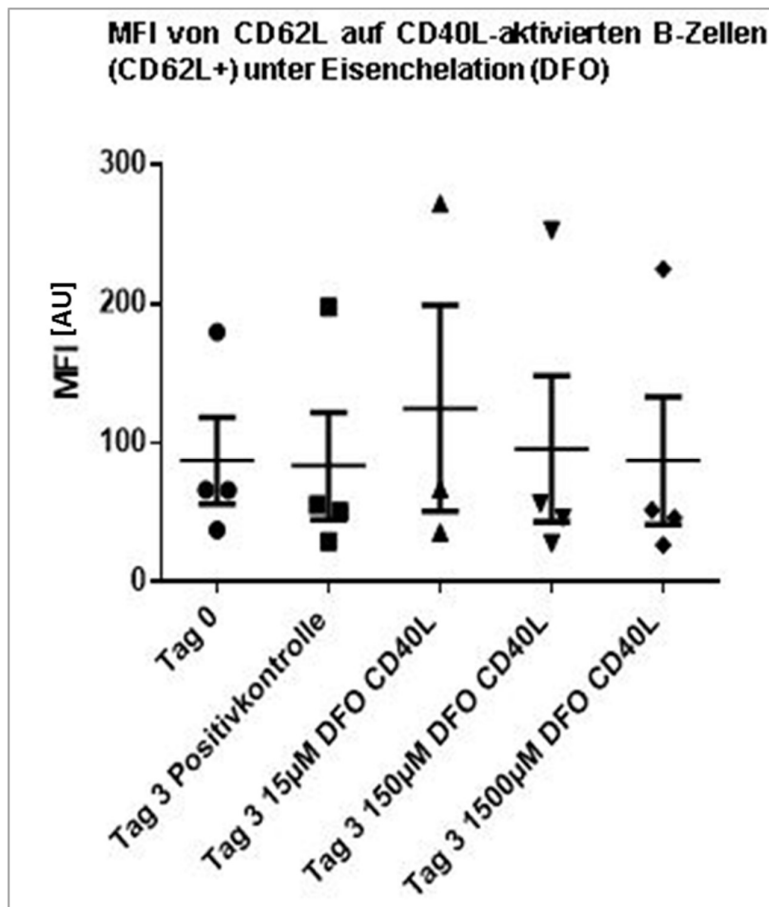


Abb.3.38: Die Abbildung zeigt die Expression von CD62L auf CD62L-positiven humanen B-Zellen in Co-Kultur mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten in Gegenwart steigender Eisenchelator (DFO) Konzentration ($0 \mu\text{M}$ (= Positivkontrolle), $15 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $1500 \mu\text{M}$) an Tag 0 und Tag 3 mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die durch Co-Kultur aktivierten B-Lymphozyten werden als „CD40L“ bezeichnet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

3.6.1.5 EINFLUSS DER EISENCHELATION AUF DIE FUNKTION VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Steigerung der T-Zell Aktivität unter dem Einfluss von Eisenchelation nach fünf Stunden

Im Rahmen einer Kurzzeit-MLR wurde der Effekt steigender Konzentrationen des Eisenchelators DFO auf die Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten untersucht. Dazu wurden aufgereinigte humane B-Zellen (s. 2.2.6) über sieben Tage auf murinen NIH-3T3 Fibroblasten kultiviert, die den humanen CD40-Liganden exprimierten. Dabei wurde DFO in steigenden Konzentrationen (0 μM (= Positivkontrolle), 15 μM , 150 μM und 1500 μM) je Well hinzugefügt. Anschließend wurde eine Kurzzeit-MLR (s. 2.6.2) mit humanen T-Zellen über durchgeführt. Um eine Voraktivierung der T-Zellen auszuschließen, wurden Wells mit T-Zellen nur mit Medium inkubiert (= Negativkontrolle). Nach fünf Std. Inkubation wurden die Zellen aus den Wells entnommen und durch Oberflächenmarkierung für CD107a (s. 2.6.2) wurde die Degranulation von T-Zellen bestimmt. Der FACS analytische Nachweis einer Oberflächenexpression von CD154 (= CD40L) und CD69 wurde zur quantitativen Erfassung früher Aktivierungsmarker genutzt. Abbildung 3.39 repräsentiert ein Beispiel der durchflusszytometrischen „gating“ Strategie (s. 2.4.1) der Kurzzeit-MLR. Nach Identifizierung CD3-positiver T-Zellen wurden diese auf CD4-positive und CD8-positive T-Zellen „gated“. Anschließend wurden in einer Höhenliniendarstellung (Contour-Plot) die Expressionsrate von CD4-positive respektive CD8-positive T-Zellen gegen diejenigen von CD107a (Abb. 3.40), CD154 oder CD69 dargestellt und der prozentuale Anteil z.B. CD107a-positiver T-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der CD4-positiven bzw. CD8-positiven T-Zellen (Abb. 3.39) bestimmt.

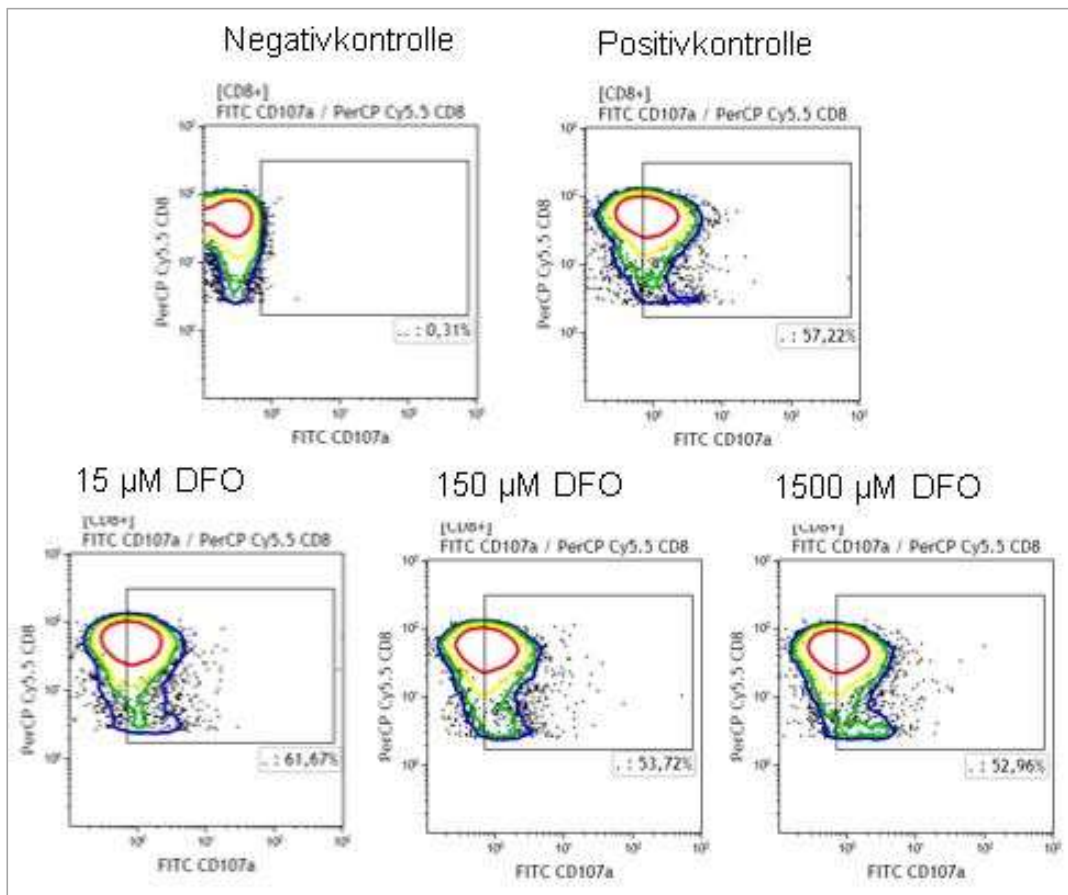


Abb. 3.39: Beispielhafte Darstellung der Zytotoxizität, von CD8-positiven (CD8+) T-Zellen, die mit normoxisch (21 % O₂) bzw. hypoxisch (0,8 % O₂) kultivierten, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) für fünf Std. co-inkubiert worden waren. Darstellung der „gating“ Strategie der Durchflusszytometrie mittels Höhenliniendarstellungen (*Contour-Plot*) anhand der Oberflächenexpression von CD107a als Marker für Zytotoxizität. Die prozentualen Zahlen zeigen die Expressionsdichte des Markers CD107a auf CD8-positiven (CD8+) T-Zellen. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen.

Der relative Anteil (= 1,0) aktivierter, CD4-positiver T-Zellen, die in Co-Kultur mit CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in einer Kurzzeit-MLR inkubiert worden waren und die den Marker CD107a exprimierten, war von $0,22 \pm 0,25$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich mit dieser Positivkontrolle reduzierte sich der relative Anteil CD107a-exprimierender, CD4-positiver T-Zellen auf $0,66 \pm 0,13$ (15 µM), weiter auf $0,59 \pm 0,11$ (150 µM) und auf $0,6 \pm 0,24$ (1500 µM) in Gegenwart steigender Konzentrationen DFO (Abb. 3.40: A). Im Vergleich zur Positivkontrolle waren die Unterschiede zu allen drei Versuchsgruppen mit DFO, nicht jedoch den DFO-Gruppen untereinander signifikant

($p \leq 0,05$) (Abb. 3.40: A). Bei den aktivierten CD8-positiven T-Zellen war der relative Anteil CD107a exprimierender Zellen von $0,52 \pm 0,31$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle erwies sich der relative Anteil CD107a exprimierender, CD8-positiver T-Zellen mit mittleren Werten von $1,39 \pm 0,24$ (15 μM), $1,1 \pm 0,15$ (150 μM), respektive $1,05 \pm 0,06$ (1500 μM) in Gegenwart steigender DFO-Konzentrationen als unverändert (Abb. 3.40: B). Folgerichtig ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p > 0,05$) (Abb. 3.40: B).

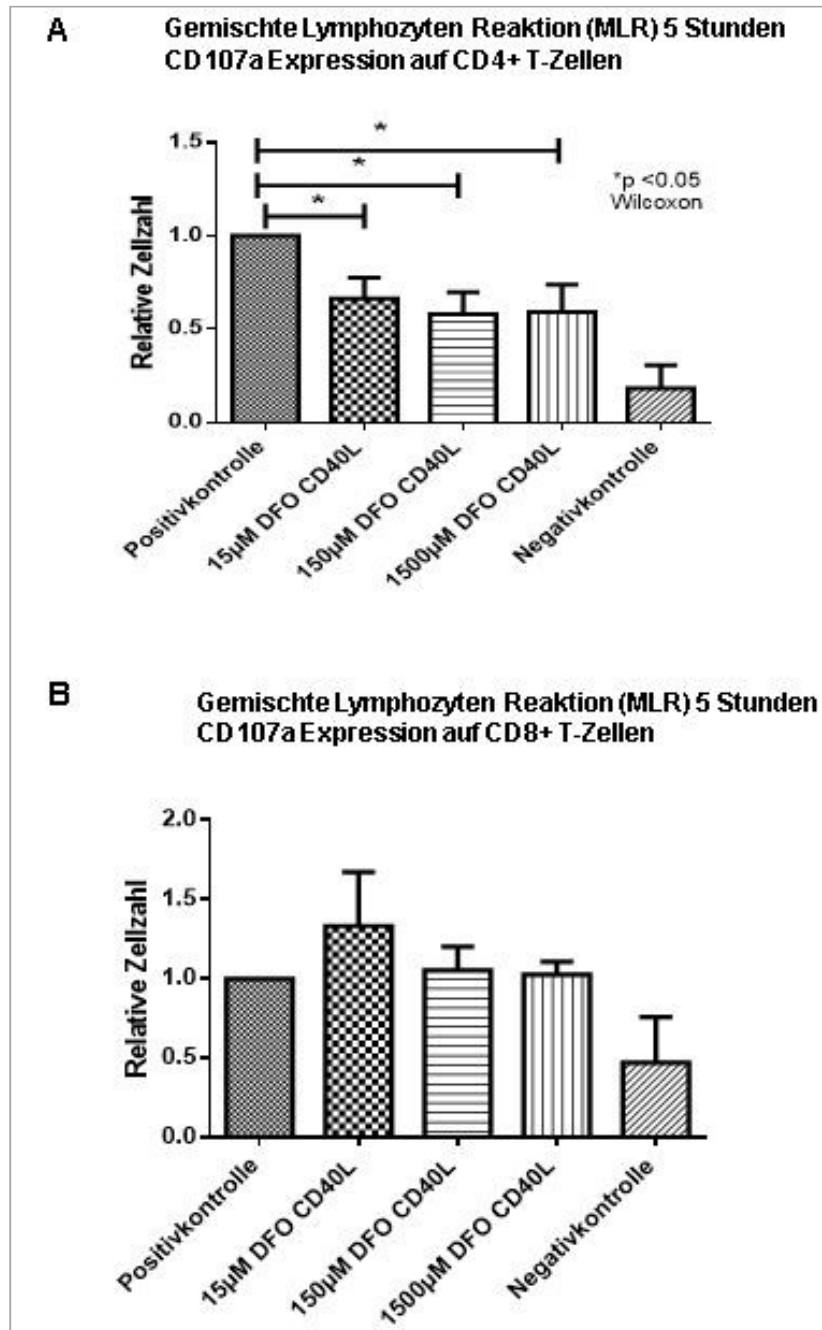


Abb.3.40: Expression des Oberflächenantigens CD107a als Marker für die Degranulation von T-Zellen. Relativer Anteil der zytotoxischen T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierten B-Lymphozyten (CD40L). Positivkontrolle: ohne DFO inkubierte CD40L-aktivierten B-Lymphozyten. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001) durchgeführt.

Der relative Anteil (= 1,0) aktivierter CD4-positiver T-Zellen, die in Co-Kultur mit CD40L-aktivierter B-Lymphozyten in einer fünf Std. gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR) inkubiert worden waren und die den Aktivierungsmarker CD154 exprimierten, war von $0,13 \pm 0,02$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich mit dieser Positivkontrolle stieg der relative Anteil CD154-exprimierender, CD4-positiver T-Zellen auf $1,45 \pm 0,21$ (15 μM) und auf $1,45 \pm 0,23$ (150 μM) in Gegenwart steigender DFO-Konzentrationen. Der Unterschied zwischen der Positivkontrolle und den Werten von $1,48 \pm 0,08$ bei DFO in höchster Konzentration (1500 μM) war dabei signifikant ($p \leq 0,05$), nicht jedoch bei den DFO-Gruppen untereinander (Abb. 3.41: A). Bei den aktivierten CD8-positiven T-Zellen war der relative Anteil CD154-exprimierender Zellen von $0,26 \pm 0,05$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle erwies sich der relative Anteil CD154-exprimierender, CD8-positiver T-Zellen mit mittleren Werten von $2,27 \pm 0,04$ (15 μM), $2,3 \pm 0,1$ (150 μM), respektive $2,78 \pm 0,3$ (1500 μM) in Gegenwart steigender DFO-Konzentrationen als signifikant erhöht ($p \leq 0,05$) an (Abb. 3.41: B).

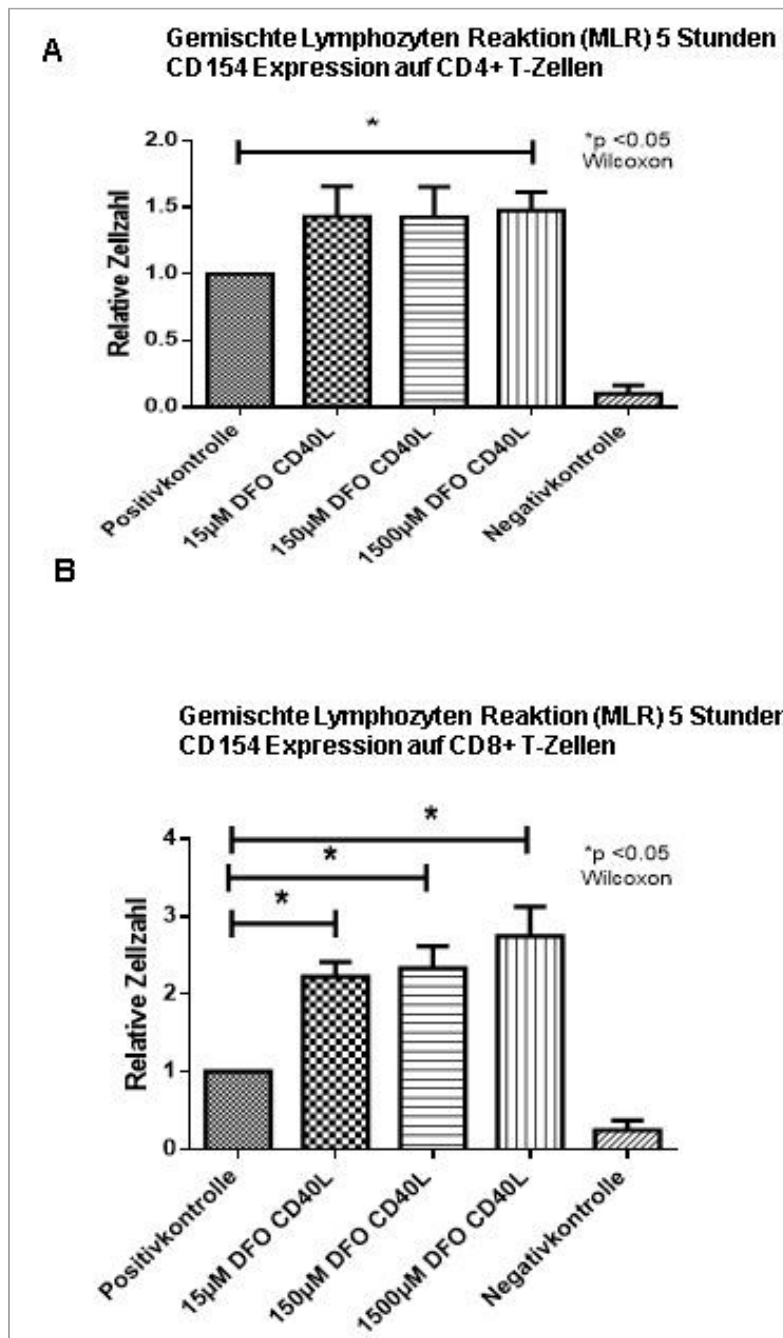


Abb.3.41: Expression des Oberflächenantigens CD154 als Aktivierungsmarker von T-Zellen. Relativer Anteil der T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierte B-Lymphozyten (CD40L). Positivkontrolle: ohne DFO inkubierte CD40L-aktivierte B-Lymphozyten. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (p ≤ 0,05) durchgeführt.

Der relative Anteil (= 1,0) aktivierter, CD4-positiver T-Zellen, die in Co-Kultur mit CD40L-aktivierter B-Lymphozyten in einer fünf Std. gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR) inkubiert worden waren und die den Aktivierungsmarker CD69 exprimierten, war von $0,23 \pm 0,01$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich mit dieser Positivkontrolle reduzierte sich der relative Anteil CD69 exprimierender, CD4-positiver T-Zellen auf $0,45 \pm 0,12$ (15 μM), auf $0,49 \pm 0,04$ (150 μM), und auf $0,77 \pm 0,13$ (1500 μM) in Gegenwart steigender DFO-Konzentrationen (Abb. 3.42: A). Im Vergleich zur Positivkontrolle war der Unterschied zu den Versuchsgruppen mit 15 μM und 150 μM DFO signifikant ($p \leq 0,05$), nicht jedoch bei den DFO-Gruppen untereinander (Abb. 3.42: A). Bei den aktivierten CD8-positiven T-Zellen war der relative Anteil CD69 exprimierender Zellen von $0,71 \pm 0,01$ bei der Negativkontrolle (T-Zellen mit Medium) auf 1,0 bei der Positivkontrolle erhöht. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle erwies sich der relative Anteil CD69 exprimierender, CD8-positiver T-Zellen mit mittleren Werten von $0,95 \pm 0,05$ (15 μM), $0,96 \pm 0,04$ (150 μM), respektive $1,18 \pm 0,03$ (1500 μM) in Gegenwart steigender DFO-Konzentrationen als unverändert (Abb. 3.42: B). Folgerichtig ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p > 0,05$) (Abb. 3.42: B).

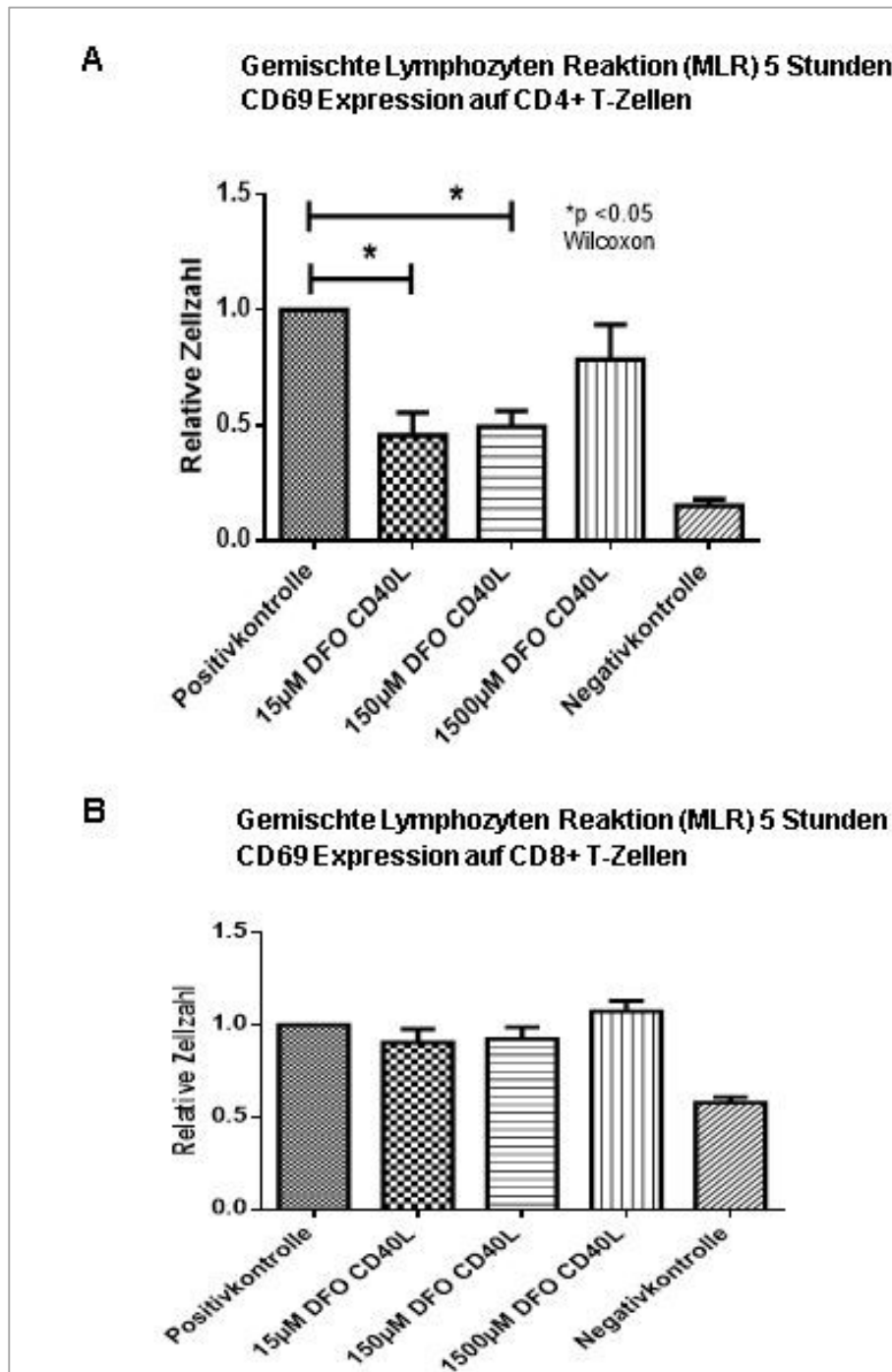


Abb.3.42: Expression des Oberflächenantigens CD69 als Aktivierungsmarker von T-Zellen. Relativer Anteil der T-Zellen [A: CD4-positive (CD4+) T-Zellen; B: CD8-positive (CD8+) T-Zellen] im Rahmen einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) über fünf Std. Co-Kultivierung unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (0,8 % O₂) Versuchsbedingungen mit durch CD40L-aktivierte B-Lymphozyten (CD40L). Positivkontrolle: ohne DFO inkubierte CD40L-aktivierte B-Lymphozyten. Negativkontrolle: Lediglich mit Kulturmedium inkubierte T-Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von n = 5 Experimenten dar. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (p ≤ 0,05) durchgeführt.

3.6.2 EINFLUSS DER EISENCHELATION AUF ZIRKULIERENDE B-ZELLEN BEI PATIENTEN

3.6.2.1 EINFLUSS DER EISENCHELATION *IN VIVO* AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP VON ZIRKULIERENDEN B-ZELLEN

Untersucht wurde der Einfluss der Eisenchelatherapie mit Deferasirox Exjade® auf den Immunphänotyp von humanen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Die Studie beinhaltete acht Patienten mit Eisenüberladung aufgrund verschiedener Erkrankungen wie z.B. der *myeloischen Leukämie*, der *aplastischen Anämie* oder dem *myelodysplastischen Syndrom* (Tab. 3.43). Der Immunphänotyp der PBMCs dieser Patienten wurde vor und nach der Therapie mit Exjade® mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde für jeden Spender der prozentuale Anteil der untersuchten Oberflächenmoleküle auf PBMCs sowie die Expressionsdichte dieser Oberflächenmoleküle über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), als ein Maß für die Anzahl der auf einzelnen Zellen exprimierten Moleküle, bestimmt.

| | | | | |
|----------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|
| Patient | A10-11-4-23 | A10-11-1-7 | A10-11-8-14 | A10-11-10-11 |
| Diagnose | AML | OMF | RAEBII | CML |
| Dosis | 1500 mg | 100 mg | 500 mg | 500 mg |
| Messzeitpunkt | 10 Wo | 2 Wo | 3 Wo | 2 Wo |
| | | | | |
| Patient | A10-11-16-18 | A10-11-19-20 | A10-11-22-12-1 | A10-12-2-4 |
| Diagnose | RAEBII | ALL | SAA | MDS |
| Dosis | 1.Wo 500 mg | 1000 mg | 1250 mg | 500 mg |
| | 2.Wo 1000 mg | | | |
| Messzeitpunkt | 3 Wo | 2 Wo | 8 Wo | 2 Wo |

Abb.3.43: Differentialdiagnose des Patientengutes hinsichtlich Ursache der Eisenüberladung: AML: akute myeloische Leukämie, OMF: Osteomyelofibrose, RAEBII: akutes myeloisches Syndrom, CML: chronische myeloische Leukämie, ALL: akute lymphatische Leukämie, SAA: schwere aplastische Anämie, MDS: myelodysplastisches Syndrom. Angabe der jeweilig zugeführten Dosis an Deferasirox Exjade® sowie des Zeitpunktes für die Blutentnahme zur PBMC Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie

Der prozentuale Anteil (% *gated*) CD19- und CD20-positiver B-Zellen an der Gesamtzahl von PBMCs der Patienten erwies sich bei sechs von acht Patienten nach der Therapie mit dem Eisenchelator Exjade® als erhöht. Bei einem Patienten war der prozentuale Anteil CD19- und CD20-positiver B-Zellen erniedrigt und bei einem Patienten war kaum ein Unterschied festzustellen (Abb. 3.44).

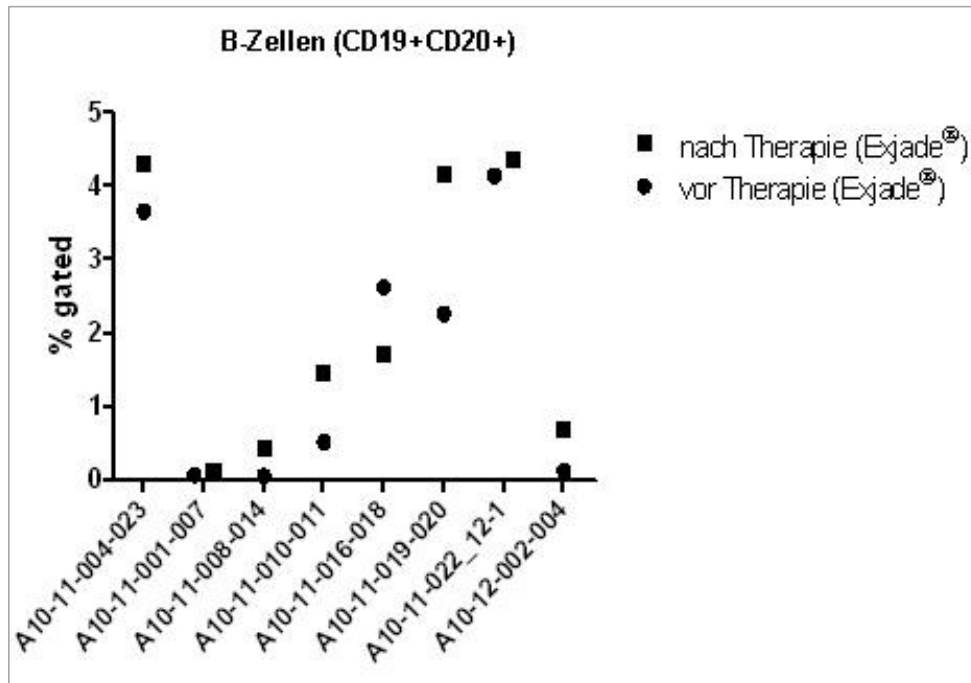


Abb.3.44: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil (% *gated*) von CD19- und CD20-positiven B-Zellen, an der Gesamtzahl von PBMCs im Vergleich vor (●) und nach Therapie (■) mit dem Eisenchelator Exjade®, für jeden Patienten einzeln aufgetragen. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von (* $p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, und daher CD80-, CD19- und CD20-positiver B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs zeigte sich bei vier von acht Patienten nach der Therapie mit dem Eisenchelator Exjade® als erhöht. Bei drei Patienten war der prozentuale Anteil erniedrigt und bei einem Patienten war kaum ein Unterschied festzustellen (Abb. 3.45: A). Im arithmetischen Mittel betrug der prozentuale Anteil (% *gated*) an CD19- und CD20-positiven B-Zellen, die auch den Aktivierungsmarker CD80 exprimierten, $4,8 \pm 1,1$ % vor sowie $5,1 \pm 1,7$ % nach der Eisenchelator-Therapie, bezogen auf die Gesamtzahl aller PBMCs. Im Rahmen der Darstellung der zellulären Expressionsdichte von CD80 auf B-Lymphozyten, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie, erwies sich die MFI bei zwei von acht Patienten nach der Therapie Exjade® als erhöht, bei fünf Patienten erniedrigt und bei einem Patienten als unverändert (Abb. 3.45: B). Im arithmetischen Mittel ergab sich eine nicht signifikante Reduktion der MFI-Werte von $12,6 \pm 5,5$ AU auf $4,1 \pm 0,2$ AU.

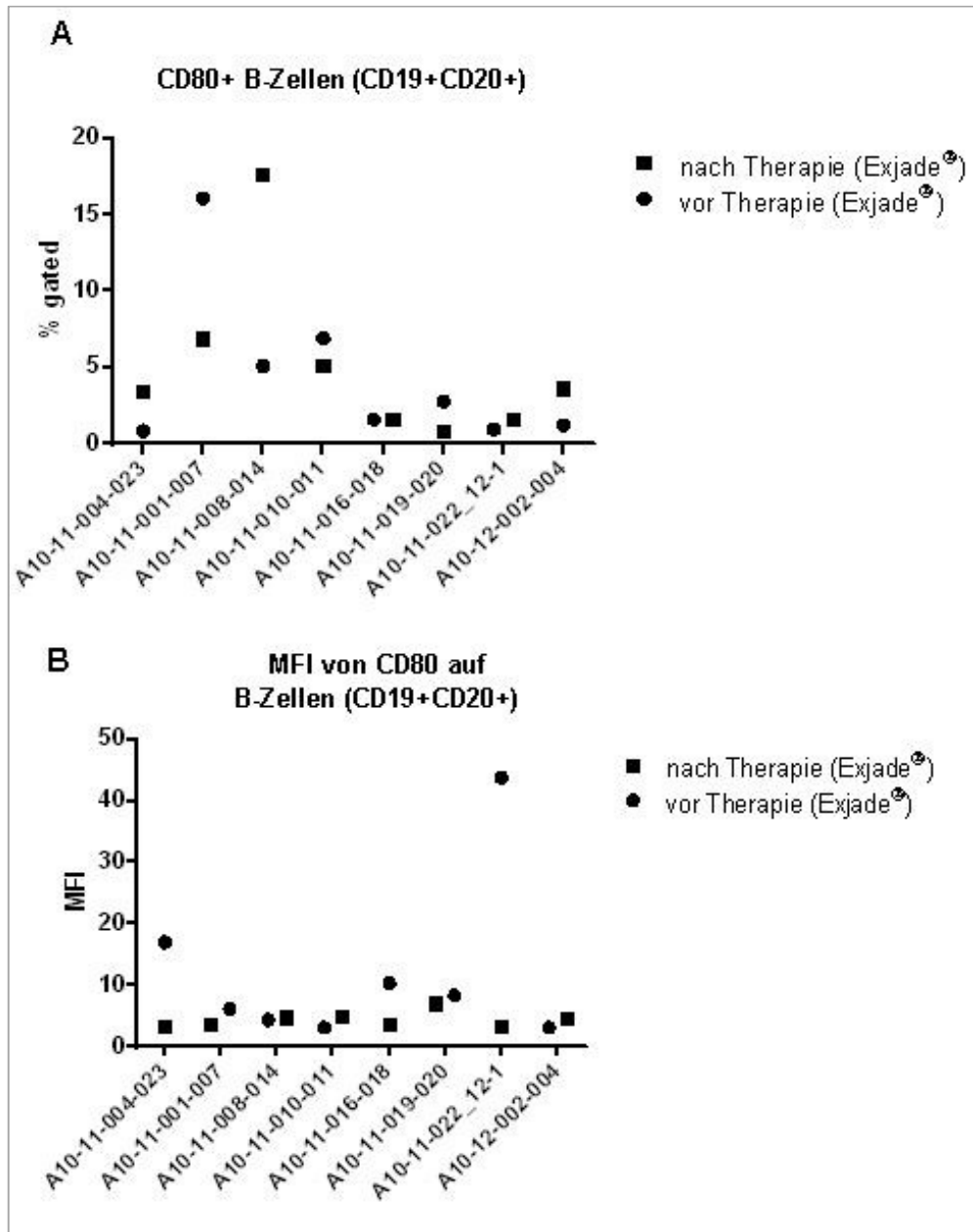


Abb.3.45: Expression von CD80- durch CD19- und CD20-positive humane B-Lymphozyten, im Vergleich vor (●) und nach Therapie (■) mit dem Eisenchelator Exjade®, für jeden der acht Patienten einzeln aufgetragen: [A] Prozentualer Anteil (% gated) von aktivierten, und daher CD80-, CD19- und CD20-positiven B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs. [B] Semiquantitative Erfassung der zellulären CD80 Expression, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% gated) aktivierter, und daher CD86-, CD19- und CD20-positiver B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs zeigte sich bei fünf von acht Patienten nach der Therapie mit dem Eisenchelator Exjade® als erniedrigt. Bei drei

Patienten war der prozentuale Anteil erhöht (Abb. 3.46: A). Im arithmetischen Mittel betrug der prozentuale Anteil (% *gated*) an CD19- und CD20-positiven B-Zellen, die auch den Aktivierungsmarker CD86 exprimierten, $14,4 \pm 4,6$ % vor sowie $15,3 \pm 4,9$ % nach der Eisenchelator-Therapie, bezogen auf die Gesamtzahl aller PBMCs. Im Rahmen der Darstellung der zellulären Expressionsdichte von CD86 auf B-Lymphozyten, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie, erwies sich die MFI bei sechs von acht Patienten nach der Therapie Exjade® als erniedrigt, bei einem Patienten erhöht und bei einem Patienten als unverändert (Abb. 3.46: B). Im arithmetischen Mittel ergab sich eine nicht signifikante Reduktion der MFI-Werte von $21,4 \pm 3,2$ AU auf $17,6 \pm 0,2$ AU nach der Therapie.

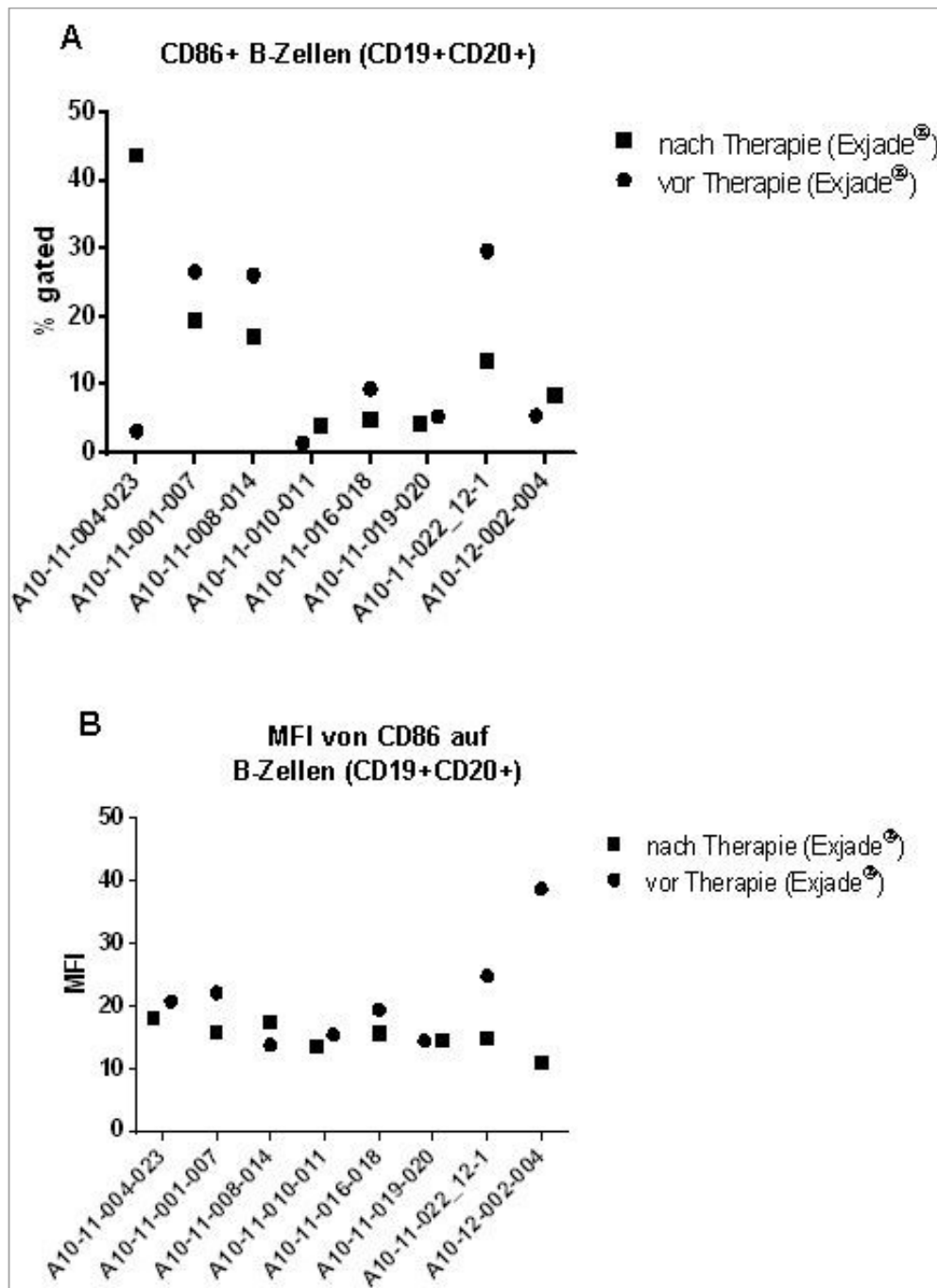


Abb.3.46: Expression von CD86- durch CD19- und CD20-positive humane B-Lymphozyten, im Vergleich vor (●) und nach Therapie (■) mit dem Eisenchelator Exjade®, für jeden der acht Patienten einzeln aufgetragen: [A] Prozentualer Anteil (% gated) von aktivierten, und daher CD86-, CD19- und CD20-positiven B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs. [B] Semiquantitative Erfassung der zellulären CD86 Expression, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD19- und CD20-positiver B-Zellen, die das humane Leukozytenantigen HLA-DR exprimierten, an der Gesamtzahl aller PBMCs zeigte sich bei vier von acht Patienten nach der Therapie mit dem Eisenchelator Exjade® als erhöht. Bei drei Patienten war der prozentuale Anteil erniedrigt und bei einem Patient war kein Unterschied feststellbar (Abb. 3.47: A). Im arithmetischen Mittel betrug der prozentuale Anteil (% *gated*) an CD19- und CD20-positiven B-Zellen, die auch das humane Leukozytenantigen HLA-DR exprimierten, $61,1 \pm 8,8$ % vor sowie $62,7 \pm 9,6$ % nach der Eisenchelator-Therapie, bezogen auf die Gesamtzahl aller PBMCs. Im Rahmen der Darstellung der zellulären Expressionsdichte von HLA-DR auf B-Lymphozyten, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie, erwies sich die MFI bei vier von acht Patienten nach der Therapie Exjade® als erniedrigt, bei zwei Patienten erhöht und bei zwei Patienten als unverändert (Abb. 3.47: B). Im arithmetischen Mittel ergab sich eine nicht signifikante Reduktion der MFI-Werte von $6,2 \pm 0,7$ AU auf $6,0 \pm 0,4$ AU nach der Therapie.

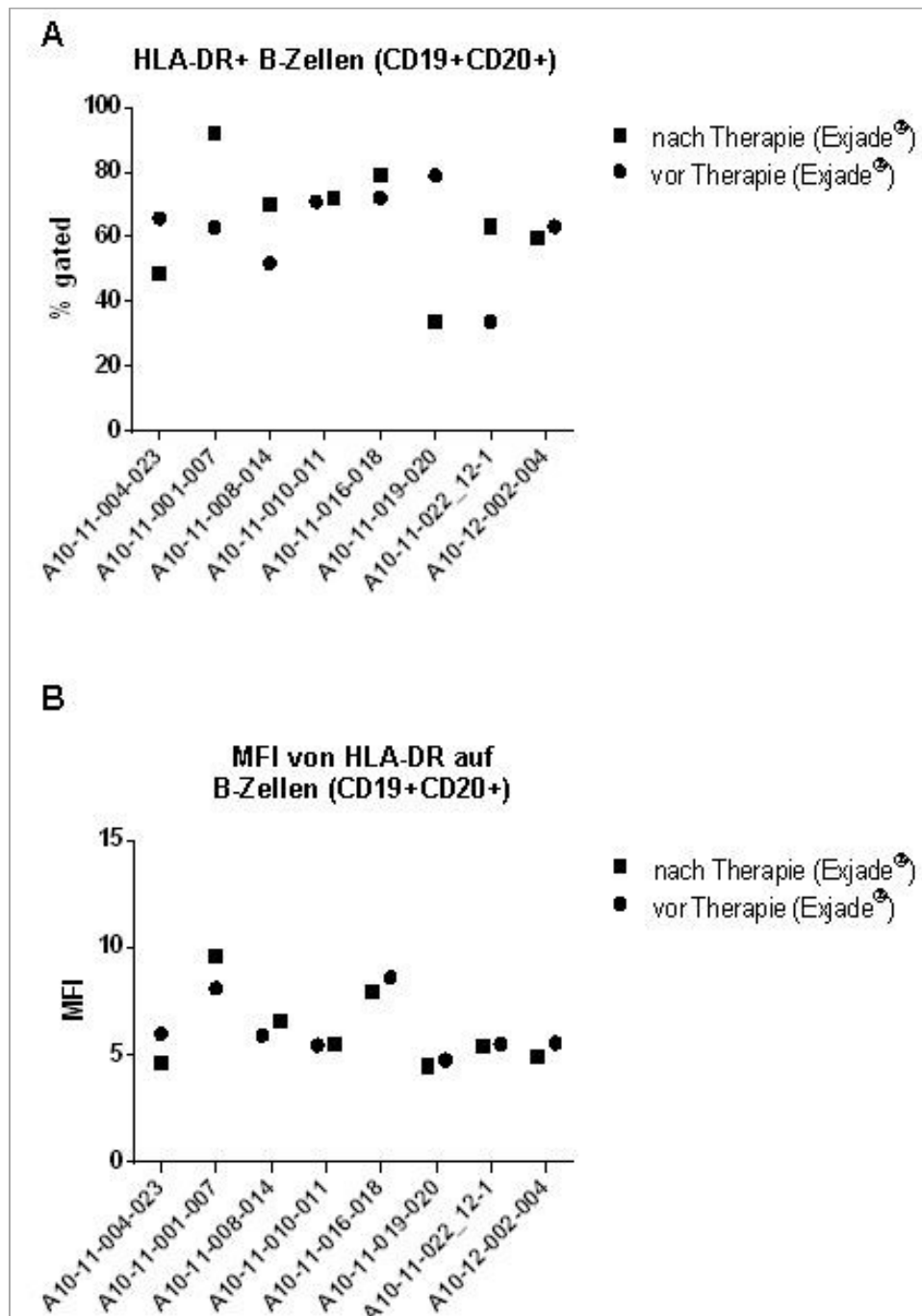


Abb. 3.47: Expression von HLA-DR durch CD19- und CD20-positive humane B-Lymphozyten, im Vergleich vor (●) und nach Therapie (■) mit dem Eisenchelator Exjade®, für jeden der acht Patienten einzeln aufgetragen: [A] Prozentualer Anteil (% gated) von aktivierten, und daher HLA-DR-, CD19- und CD20-positiven B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs. [B] Semiquantitative Erfassung der zellulären HLA-DR Expression, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Der prozentuale Anteil (% *gated*) aktivierter, CD19- und CD20-positiver B-Zellen, die das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimierten, an der Gesamtzahl aller PBMCs zeigte sich bei drei von acht Patienten nach der Therapie mit dem Eisenchelator Exjade® als erhöht. Bei zwei Patienten war der prozentuale Anteil erniedrigt und bei drei Patienten war kein Unterschied feststellbar (Abb. 3.48: A). Im arithmetischen Mittel betrug der prozentuale Anteil (% *gated*) an CD19- und CD20-positiven B-Zellen, die auch das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimierten, $81,2 \pm 7,8$ % vor sowie $79,5 \pm 8,4$ % nach der Eisenchelator-Therapie, bezogen auf die Gesamtzahl aller PBMCs. Im Rahmen der Darstellung der zellulären Expressionsdichte von CD62L auf B-Lymphozyten, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie, erwies sich die MFI bei vier von acht Patienten nach der Therapie Exjade® als erniedrigt und bei vier Patienten als erhöht (Abb. 3.48: B). Im arithmetischen Mittel ergab sich eine nicht signifikante Reduktion der MFI-Werte von $60,8 \pm 19,2$ AU auf $55,3 \pm 11,7$ AU nach der Therapie.

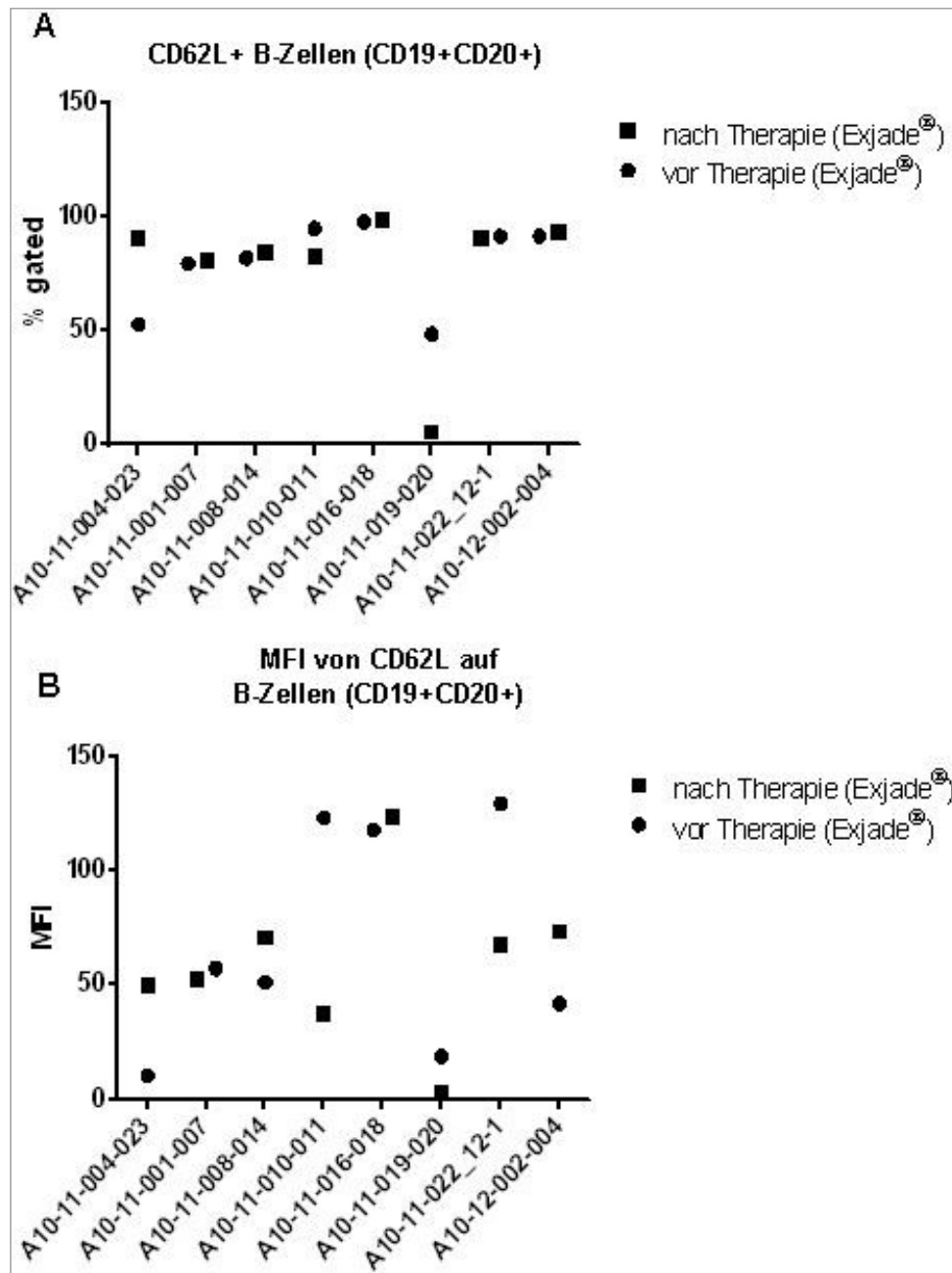


Abb.3.48: Expression von CD62L durch CD19- und CD20-positive humane B-Lymphozyten, im Vergleich vor (●) und nach Therapie (■) mit dem Eisenchelator Exjade®, für jeden der acht Patienten einzeln aufgetragen: [A] Prozentualer Anteil (% gated) von aktivierten, und daher CD62L-, CD19- und CD20-positiven B-Zellen an der Gesamtzahl aller PBMCs. [B] Semiquantitative Erfassung der zellulären CD62L Expression, bestimmt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test mit einem Signifikanzniveau von ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

4. DISKUSSION

Die vorliegende klinisch experimentelle Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Unterschiede bei CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten unter ausgeprägter Hypoxie (0,8 % O₂) im Hinblick auf deren Immunphänotypus und funktionelle Merkmale - im Vergleich zur Normoxie (21 % O₂) festzustellen sind.

Diese Untersuchungen sind insofern von Bedeutung, als nahezu alle bisherigen *in vitro* Studien mit aktivierten B-Zellen unter konventionellen Bedingungen bei Normoxie stattfanden, und somit der Einfluss von Hypoxie auf die verschiedenen Eigenschaften der B-Lymphozyten weitestgehend ungeklärt ist. Nachfolgend werden die Resultate der erarbeiteten Untersuchungen diskutiert.

4.1 AUSWIRKUNG VON HYPOXIE AUF CD40L-AKTIVIERTE B-LYMPHOZYTEN

Es wurden zunächst die Auswirkungen der Hypoxie auf Morphologie und Zellwachstum untersucht. Die Behandlung der mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten co-kultivierten transgenen CD40L-aktivierten B-Lymphozyten mit 0,8 % O₂ Sauerstoff gilt als moderate Hypoxie [56] und führte in den vorliegenden Versuchen sowohl zur Inhibition der Zellproliferation während der siebentägigen Kulturphase als auch zur Verringerung der Zellgröße einzelner B-Zellen. Bei der geringeren Zellgröße stellte sich die Frage, ob dies als Korrelat zu einem verringerten Aktivierungsstatus zu werten war und/oder ob die Proliferationsinhibition als Folge eines Zellzyklusarrestes oder einer vermehrten Apoptose anzusehen war.

Bei der Zellzyklusanalyse führten hypoxische Kulturbedingungen zu einer tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrten Arretierung der CD40L-aktivierten B-Zellen in der G1-Zellzyklusphase.

Die Proliferationshemmung bei CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen basierte somit zumindestens teilweise auf einen potentiell möglicherweise vermehrten Zellzyklusarrest der B-Lymphozyten in der G1

Phase. Ein solcher Zellzyklusarrest in der G1-Phase unter hypoxischen Bedingungen wurde auch bereits von Hammond et al. und Yoshida et al. [132,133] in Tumorzellen entdeckt. Dies könnte eine Ursache für die verminderte Expansionsrate der CD40L-aktivierten B-Zellen unter Hypoxie sein. Untersuchungen zur Apoptose unter Hypoxie ergaben keine Hinweise auf eine Induktion der Apoptose an Tag 0, 3 und Tag 7 unter hypoxischen versus normoxischen Kulturbedingungen. Nach siebentägiger Kultur zeigte sich somit weder bei der frühen Apoptoserate, noch bei den vitalen, CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter Hypoxie ein signifikanter Unterschied.

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden Sauerstoffbedingungen mit 0,8 % O₂ für die nachfolgenden Analysen von Immunphänotyp und Funktion geeignet sind und nicht durch einen übermäßigen apoptotischen Zelltod verfälscht würden [134,135].

Unter Berücksichtigung der bisher erhobenen Daten soll nachfolgend der Immunphänotyp und die Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter Hypoxie diskutiert werden. Die Expression der co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf CD40L-aktivierten B-Lymphozyten nahm unter Hypoxie ab, wohingegen die Expression von HLA-DR auf unverändert hohem Niveau blieb [136]. Essentiell für die Initiierung einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort und damit für die spezifische Immunantwort ist eine ausreichende Expression der Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen [30]. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die APC-Funktion von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter Hypoxie abnimmt. Bei der funktionellen Analyse wurde erkenntlich, dass es zu einer signifikanten Reduktion in der T-Lymphozyten Aktivierung zum einen über fünf Std. und zum anderen auch über sieben Tage sowohl für die CD4-positiven T-Helferzellen als auch der CD8-positiven T-Killerzellen unter Hypoxie - im Vergleich zur Normoxie kam.

Eine der Ursachen für die durch Hypoxie induzierte Reduktion der APC-Funktion CD40L-aktivierter B-Lymphozyten könnte die verminderte T-Zell Stimulation sein. So benötigen B-Zellen zwei co-stimulatorische Signale, um aktiviert zu werden. Ein Stimulus ist der CD40L-CD40 Signalweg. Der CD40-Ligand wird nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Somit könnte eine Reduktion der T-Zell Aktivierung zu einer Abnahme der APC-Funktion von B-Zellen führen.

Bei den Untersuchungen zur Erforschung der Rolle von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter Hypoxie sei der Fokus auf B-Zell Subtypen wie Memory- und naive B-Zellen, zu legen. Die Subpopulationen könnten untersucht werden, um zu schauen, ob unter Hypoxie überhaupt ein Switch von Naiven zu Gedächtnis B-Zellen (Memory) stattfindet oder ob diese direkt gehemmt werden. Wäre der Einfluss von Hypoxie größer auf die präformierten Gedächtniszellen, sprich auf die Reaktivierung, oder auf den Switch zwischen naiven und B-Gedächtniszellen. Die Identifizierung und Charakterisierung der Hypoxie-abhängigen Genexpression könnte zu einem verbesserten Verständnis über bestehende oder wenig erforschte Signaltransduktions- und Regulationsmöglichkeiten unter Hypoxie beitragen.

4.2 APC-FUNKTION VON CD40L-AKTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN

Eine erst seit einigen Jahren erneut in den Fokus des Interesses gerückte Funktion von B-Lymphozyten ist die der Antigenpräsentation: B-Lymphozyten können nach B-Zell Rezeptor-vermittelter Endozytose exogener Antigenen diese prozessieren und T-Lymphozyten im Sinne einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) darbieten. Dabei wird die Aussagekraft der APC-Funktion von B-Zellen kontrovers diskutiert. Schultze et al. [137] verglichen die Antigen präsentierenden Eigenschaften solcher B-Zellen mit denen von dendritischen Zellen und stellten fest, dass aktivierte B-Zellen eine ebenbürtige Alternative darstellen und auch zur Induktion autologer zytotoxischer T-Zellen verwendet werden können. Hingegen bezeichnen Yuan et al. dendritische Zellen als die potentesten APCs [138]. Die Möglichkeit, über die CD40L-CD40-Interaktion auch maligne B-Zellen zu stimulieren und eine hohe Expression von Adhäsions- und Co-stimulationsmolekülen zu induzieren, war bereits durch einige Arbeitsgruppen nachgewiesen worden [139]. Maligne B-Zellen sind durch die Entnahme einer venösen Blutprobe bei den meisten Patienten in ausreichender Anzahl zu gewinnen und erfordern nur eine Aufarbeitung mittels Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation. Die Aktivierung über CD40L-CD40 erfolgt schnell über den Zeitraum von vier Tagen. Bei einer nachfolgenden *in vivo* Nutzung müssen CD40L-Fibroblasten lediglich durch die lösliche trimere Form des CD40L ersetzt werden.

Diese lösliche trimere Form besitzt den gleichen Wirkungsmechanismus und ist daher äquivalent einsetzbar, wie von Bergwelt-Baildon et al. [49] bereits publiziert haben. Über die CD40L-CD40-Interaktion können Antigen präsentierende B-Zellen gewonnen werden, welche sich durch eine hohe Expression von Adhäsions- und Co-stimulationsmolekülen bei gleichbleibend hoher MHC-Expression auszeichnen und eine allogene T-Zell-Antwort induzieren [140,74]. Die Aktivierung von B-Zellen *in vitro* über den CD40L-CD40 Signalweg sollte zu einem besseren Verständnis über die *in vivo* Möglichkeiten führen.

4.3 DIE EISENCHELATION ALS HYPOXIENACHAHMUNG

HIF-1 α stellt einen zentralen und molekularen Sauerstoffsensor für Säugerzellen jeglicher Art dar. Durch Steuerung der Transkription entsprechender Gene ist er in der Lage, auf die Zellproliferation, verschiedene Transportvorgänge, die Angiogenese und die Glykolyse Einfluss zu nehmen. Den Zusammenhang zwischen HIF-1 α Überexpression in soliden Tumoren und Verkürzung der Überlebens bzw. der rezidivfreien Zeit belegen mehrere Studien. Schon lange ist die Assoziation von Tumorphoxie mit der Verschlechterung der Prognose der Erkrankung bekannt. HIF-1 ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Einheit. Die α -Einheit wird unter Hypoxie und/oder unter Entzug von Eisen stabilisiert, so dass die Aktivierung des Heterodimers HIF-1 erfolgt. Bei Vorhandensein von Sauerstoff und/oder Eisen wird HIF-1 α rasch über eine Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade abgebaut. Unter atmosphärischen Bedingungen liegt die Halbwertszeit von HIF-1 α ungefähr bei zehn Minuten [62]. PHD (Prolylhydroxylasen) leiten den Abbau ein. PHDs benötigen zur Hydroxylierung neben dem Sauerstoff zusätzlich unter anderem den Co-Faktor Eisen. Beim Menschen ist der Eisenhaushalt ein exakt reguliertes System, welches den Zellen genügend Eisen bereitstellt. Wenn das Transportprotein Transferrin seine physiologischen Kapazität übersteigt und die Zellen überschüssiges Eisen in stabiler Form speichern, wird dies als Eisenüberladung (Siderose) bezeichnet [141]. Das labile Plasmaeisen (LPI) wird in nicht regulierter Form von der Zelle aufgenommen. Wenn die intrazelluläre Speicherkapazität überschritten ist,

kommt es zu einem Anstieg des labilen zellulären Eisenpools (LCI). Durch die Generierung von Hydroxylradikalen und die Bildung redoxaktiver Metabolite ist dieses Eisen toxisch [142]. Mit Hilfe der Eisenchelation (Hypoxienachahmung), die unter anderem auch in der Klinik z.B. bei Transfusionspatienten zum Einsatz kommt, sollte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die Bedeutung des HIF-1 Signalwegs nachgestellt und überprüft werden, ob ähnliche Effekte wie unter Hypoxie zu erkennen sind. Deferoxamin (DFO) bindet als Chelator Eisen mit hoher Affinität und führt zu einer gesteigerten Eisenausscheidung im Urin [143]. Wie bereits ausgeführt, ahmt DFO den Effekt der Hypoxie nach, weil durch seine Gegenwart zum einen dieselben Gene induziert werden wie unter hypoxischen Bedingungen und zum anderen der Transkriptionsfaktor HIF-1 α stabilisiert wird [66]. Die durch Hypoxie bewirkte Proliferationsinhibition von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten war im Ausmaß mit der durch DFO Behandlung induzierten vergleichbar. Während die Zellzahl unter Normoxie bzw. ohne DFO innerhalb von sieben Tagen fast auf das Doppelte anstieg, lag die Proliferation unter Hypoxie bzw. mit DFO (1500 μ M) gerade mal bei $\pm 25\%$ der Ausgangspopulation. Es konnte sowohl unter Hypoxie als auch unter dem Einfluss der Eisenchelation nach drei Tagen keine vermehrte frühe Apoptoserate verzeichnet werden. Auffällig war, dass es sowohl bei Normoxie vs. Hypoxie, als auch bei Positivkontrolle vs. DFO, zu einer Abnahme der frühen Apoptoserate von Tag 3 bis Tag 7 kam. Dabei zeigte die Kultur mit 1500 μ M DFO an Tag 7 fast den gleichen Anteil an apoptotischen Zellen wie die Positivkontrolle, was damit zusammenhängen könnte, dass eine so hohe Konzentration über einen solch langen Zeitraum von sieben Tagen zu toxisch für die B-Zellen war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es unter dem Einsatz des Eisenchelators DFO zu keiner vermehrten Apoptoserate bei CD40L-aktivierten B-Lymphozyten kam. Gründe für die zellprotektive Wirkung einer erhöhten HIF-1 Aktivität können vielseitig sein. Mögliche Erklärungsansätze könnten sein, dass Gene wie das Tumor suppressor gen p53 [144] und Fas [145] unter extrem hypoxischen Bedingungen aktiviert werden. Aktuelle Studien scheinen zu bestätigen, dass es eine Verbindung zwischen p53 und HIF-1 α gibt, jedoch ist der genaue Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt. Der Mechanismus scheint abhängig von der jeweiligen Zellart zu sein. Eine Interaktion mit dem anti-apoptotischen Protein bcl-2 könnte für die protektive Wirkung von HIF-1 verantwortlich sein. Bcl-2 verringert die Apoptose, wie an einer bcl-2 Antisense-Zelllinie gezeigt wurde [146] und die intrazelluläre Konzentration an bcl-

2 korreliert mit der HIF-1-Aktivität [147]. Dass chronische Hypoxie eine anti-apoptische Wirkung in unterschiedlichen Zellen erzielen kann, ist bekannt. Der Aktivierung des HIF/VEGF-Signalweges wird diese Wirkungsweise auch zugeschrieben [148]. Die Literatur beschreibt aber auch Gegenteiliges. An et al. [149] zum Beispiel berichtet, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen HIF-1 α und dem p53-Protein gibt. Ein pro-apoptotischer Effekt von HIF-1 in embryonalen Stammzellen unter Hypoxie ist in anderen Studien beschrieben worden [150]. Sowohl die HIF-1 induzierte Aktivierung von p53 als auch die Hemmung der bcl-2 Expression führte zum Zelltod.

Beim Zellzyklus konnte eine signifikante Erhöhung der G2-Phase Aktivität von $\pm 10\%$ der Positivkontrolle bis auf $\pm 40\%$ durch den Eisenchelator DFO beobachtet werden, was auf eine Arretierung der CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in der G2-Zellzyklusphase schließen lässt. Die G0/G1-Phase (Wachstums- und Ruhephase) ist für die Interpretation der Wirkung nach Eisenchelation insofern von besonderer Bedeutung, als Zellen in dieser Phase unter hypoxischen Bedingungen in Arrest gingen. Bekannt ist, dass Eisenchelatoren den Zellzyklus an der Grenze zwischen G1- und S-Phase inhibieren und damit die zelluläre Proliferationsrate senken [151]. Chenoufi et al. [152] berichtet ebenfalls, dass der Zellzyklus unter dem Eisenchelator DFO vor Erreichen der DNA-Synthesephase S blockiert wird. Dieser inhibierende Einfluss der Eisenchelation auf den Zellzyklus zwischen G1 und S-Phase konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. In einer Arbeit von Renton et al. wurden jedoch teilweise ähnliche Ergebnisse erzielt, wie in der vorliegenden Arbeit [153]. Renton et al. spricht von einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase nach 24 stündiger Inkubation mit DFO, wohingegen nach 72 Std. ein Zellzyklusarrest in der G2/M Phase vorzufinden war. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit der Zellzyklus an Tag 0 und Tag 3 untersucht, so dass eine Aussage über ein Ergebnis lediglich nach einer eintägigen Inkubation nicht getroffen werden kann.

Der Immunphänotyp von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten zeigte unter Eisenchelation eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 an Tag 3, vergleichbar den unter Hypoxie erhaltenen Ergebnissen. Das könnte damit zusammenhängen, dass der Sauerstoff- und Eisengehalt die HIF-1 Aktivierung reguliert und den gleichen Signalweg aktiviert. Die Expression von HLA-DR verändert sich nach drei Tagen unter Eisenchelation

kaum. Auch Bierer et al. [154] beschrieben sowohl eine Reduktion der T-Zell Proliferation als auch die unveränderte Expression von HLA-DR durch Eisenchelation. Interessant ist, dass die T-Zell Aktivierung unter Hypoxie signifikant abnahm, sowohl nach fünf Std., als auch nach sieben Tagen, hingegen unter Eisenchelation kam es eher zu einer Zunahme der T-Zell Aktivierung in der Kurzzeit-MLR, die jedoch nicht immer signifikant war. Eine Langzeit-MLR über sieben Tage unter DFO wurde zwar zweimal durchgeführt, jedoch waren am Ende nur noch tote Zellen vorhanden (Daten hier nicht gezeigt). Dies würde mit den Erkenntnissen von Bierer et al. übereinstimmen.

Zu klären wäre weiterhin, warum die T-Zell Aktivierung in der Kurzzeit-MLR unter Hypoxie abnahm und es unter DFO zu keiner Reduktion kam, obwohl der gleiche Signalweg aktiviert wird.

Einen Erklärungsansatz könnte die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) liefern. ROS sind zwar im Zusammenhang mit oxidativen Stress bekannt, wobei in den letzten Jahren diese pathogenetische Rolle eher differenziert gesehen wird. Es konnte gezeigt werden, dass ROS das Zellwachstum stimulieren oder hemmen und den Zelltod im Sinne einer Nekrose oder einer Apoptose auslösen kann [155,156]. Man geht davon aus, dass ROS in die Signaltransduktion der T-Zelle eingreifen und ihren Aktivierungsgrad beeinflussen. Die Wachstumsrate von T-Zellen konnte, in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad, durch ROS entweder gesteigert oder herabgesetzt werden [157]. Bei Voraktivierung und in Gegenwart bestimmter ROS-Konzentrationen wurde die Proliferationsrate begünstigt. Wang et al. [158] zeigten, dass Hypoxie die ROS Bildung und einen Ca^{2+} Anstieg in murinen glatten Muskelzellen der Lungenarterie induziert. Eine intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration kann auf hohem Niveau andere Signalwege aktivieren bzw. hemmen als auf einem niedrigeren Niveau [159]. Die Amplitude der Frequenz des Ca^{2+} Niveaus sind wahrscheinlich entscheidende Faktoren [160,161]. Unter Berücksichtigung dieser Informationen ist nicht ganz klar, ob in der vorliegenden Arbeit die T-Zellen in Gegenwart aktivierter B-Zellen durch die Co-Stimulation selbst mehr ROS generierten oder ob eine andere Interaktion zwischen den T-Zellen und DFO bestand. Philipp et al. zeigten, dass DFO die Produktion der ROS zu steigern vermag [162]. So könnte es z.B. sein, dass T-Zellen, in Gegenwart von ROS ihre zytolytische Effektivität zu steigern vermögen. Es bleibt jedoch die Frage, ob die Ursache dafür bei den Ca^{2+} Signalen zu

suchen ist oder ob dem ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt. Da es zu Überlagerung von Effekten gekommen sein kann und es leider auch keine Referenzen aus der Literatur gibt, liegt die Problematik in der Interpretation dieser Versuche. Die Vielfältigkeit von Interaktionen zwischen T-Zellen, ROS, Ca²⁺ und Eisenchelation, lässt die Vielzahl existierender Möglichkeiten erahnen und macht die Schwierigkeit einer spezifischen Aussage deutlich. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen, teilweise heterogenen Ergebnisse, sowohl im Rahmen der Zellzyklusanalyse als auch der T-Zell Aktivierung, verdeutlichen, dass Eisenchelation nur zum Teil das gleiche bewirkt wie Hypoxie. Eisenchelation scheint noch andere Mechanismen zu aktivieren. Die genauen Mechanismen, über die DFO teilweise die Hypoxie imitierende Wirkung entfaltet, sind aber weitgehend unbekannt. Trotz Berichten über identische Wirkungen von DFO und Hypoxie in der Zelle gibt es bisher nur sehr wenige Publikationen, in denen die Effekte auf zelluläre Funktionen verglichen wurden. Insgesamt ist noch sehr wenig über den Einfluss der Eisenchelation auf die Funktion von Immunzellen bekannt. Die Untersuchungen können daher lediglich als Einzelergebnis diskutiert werden und bedürfen einer weiteren Abklärung in zukünftigen Versuchen.

4.4 EINSATZ UND MÖGLICHER NUTZEN IN DER KLINIK

Für eine Eisenchelatortherapie wurden bei Transfusionspatienten die Transfusionsmenge, der Lebereisengehalt und der Ferritinwert im Serum als Referenzwerte herangezogen [163]. Das genaue Bemessen des vorliegenden Schweregrades einer Eisenüberladung ist schwierig, da es sich bei den genannten lediglich um indirekte Parameter handelt.

So stellen zu dem die Art der betroffenen Zellen (parenchymale oder makrophageale Eisenspeicherung), aber auch die Größe der Eisenspeicher bestimmende Parameter für das klinische Ergebnis bei systemischer Eisenüberladungen dar – unabhängig davon, ob diese durch Bluttransfusionen (wie bei *Thalassaemia major*, *Sichelzellanämie* oder *myelodysplastischem Syndrom*) oder durch hochregulierte Eisenabsorption aus der Nahrung (*hereditäre Hämochromatose*, *Thalassaemia intermedia*) verursacht wurde. Um sowohl die Toxizität durch erhöhte Organ-Eisenkonzentrationen, als auch die Nebenwirkungen einer Eisenentzugstherapie durch

eine Überdosierung des Eisenchelators zu vermeiden, ist es für die Behandlung essenziell, die Größe des Eisenspeichers zu erfassen [164].

Folgende Ziele werden bei der Verwendung von Eisenchelatoren angestrebt a) reaktives freies Eisen zu „neutralisieren“ und b) überschüssiges Speichereisen zu entfernen [165]. Der Eisenchelator Deferoxamin (Desferal®) steht seit einigen Jahren als Standardbehandlung zur Verfügung [105] und wird zusammen mit dem gebundenen Eisen über Galle und Urin ausgeschieden. Die schlechte orale Bioverfügbarkeit und eine kurze Plasma-Halbwertszeit sind die Nachteile dieses Medikaments. Das macht lange und kontinuierliche Infusionstherapien erforderlich. Seit Herbst 2006 ist in Deutschland als neue Therapieoption der oral verabreichbare Eisenchelator Deferasirox (Exjade®) zugelassen.

Durch die bisherige parenterale Standardtherapie mit DFO können erhebliche Compliance-Probleme auftreten. Zuviel Eisen im Körper kann demnach lebensbedrohlich sein. Der erste Eisenchelatbildner, der einmal täglich oral eingenommen wird, ist das neue Medikament Deferasirox (Exjade®). Patienten mit transfusionsbedingter chronischer Eisenüberladung können mit der neuen Chelattherapie viel Lebensqualität gewinnen, indem sie auf stundenlange Infusionen verzichten können.

Als Substrat wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit der Eisenchelator Deferasirox Exjade® gewählt. Exjade® kann bei folgenden Gruppen eingesetzt werden, wenn die Therapie mit Deferoxamin (Desferal®) kontraindiziert ist: a) Patienten im Alter zwischen zwei und fünf Jahren b) bei Patienten mit anderen Anämien wie beispielsweise *myelodysplastische Syndromen* (MDS) oder *Sichelzellanämie*. Grundsätzlich wird bei chronischen Transfusions-Patienten (mehr als acht Einheiten Erythrozytenkonzentrate pro Jahr) empfohlen, nach der *Transfusion* von ungefähr 20 Einheiten Erythrozytenkonzentrat (entspricht ca. 100 ml/kg) und bei klinischen Hinweisen auf eine chronische Eisenüberladung (Serumferritin >100 µg/l) mit der Exjade Therapie zu beginnen [166].

Für die vorliegende Arbeit wurden Daten von acht Patienten herangezogen, die aufgrund von Erkrankungen wie der *myeloischen Leukämie*, der *aplastischen Anämie* oder dem *myelodysplastischen Syndrom* unterschiedliche Dosen und Behandlungsdauern mit Deferasirox (Exjade®) in der Uniklinik Köln behandelt worden sind.

Diese Heterogenität innerhalb der Studiengruppe wirft die Frage auf, inwieweit die Aussagen der Studie valide sind. Da sich jedoch alle Patienten gleichermaßen der Chelattherapie mit Exjade® unterzogen haben und die Ergebnisse auch für jeden

Patienten einzeln dargestellt sind, ist der Einschluss dieser Heterogenität in die Studie vertretbar. Die aktuelle Studienlage hinsichtlich des Einflusses des Eisenchelators auf den Immunphänotyp von PBMCs lässt folgende Tendenzen erkennen: Es konnte gezeigt werden, dass es unter der Chelattherapie mit Exjade® zu einer nicht signifikanten Reduktion der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf aktivierten B-Zellen (CD19-positiven CD20-positiven) nach der Therapie kam. Da beide Moleküle maßgeblich an der APC-Funktion von B-Zellen beteiligt sind, lässt sich daraus schließen, dass die APC-Funktion unter Therapie abnahm. Eine einmalige orale Dosis von Exjade® ist aufgrund der Plasma-Halbwertszeit von acht bis sechzehn Std. ausreichend. Die Effizienz wurde in einer großen, internationalen, randomisierten Studie gezeigt [167]. Bei hämatologischen Erkrankungen hat der Eisenstoffwechsel in letzter Zeit zunehmend Beachtung gefunden. Nun ist eine therapeutische Intervention mit dem oralen Eisenchelator Deferasirox möglich. Eisenchelattherapie wird aber weiterhin zum Teil kontrovers diskutiert. Retrospektive und zum Teil prospektive Daten geben Hinweise auf einen Überlebensvorteil unter Chelattherapie [168]. Freie Radikale und reaktiver Sauerstoff (ROS) werden als Mechanismus diskutiert. Aber Exjade® birgt auch Risiken. Anhand des Immunphänotyps zeigte sich, dass die APC-Funktion der B-Zellen von Patienten, die eine Chelattherapie bekommen hatten, abnahm. Dies bedeutet, dass Exjade® auch immunsuppressiv wirkt. Derzeit wird Exjade®, wie oben beschrieben, überwiegend Therapie begleitend eingesetzt, um primär eine Eisenüberladung zu bekämpfen. Zu überlegen wäre, ob man den Effekt der Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen nutzen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersuchte, welche Unterschiede bei CD40L-aktivierten humanen B-Lymphozyten unter ausgeprägter Hypoxie (0,8 % O₂) im Hinblick auf deren Immunphänotypus und funktionelle Merkmale - im Vergleich zur Normoxie (21 % O₂) festzustellen sind bzw. inwieweit Hypoxie CD40L-aktivierte B-Lymphozyten und deren APC-Funktion beeinflusst und welches Potenzial die *in vitro* Generierung CD40L-aktivierter B-Zellen bietet. Über die T-Zell vermittelte B-Zell Aktivierung *in vitro* sollten die *in vivo* Bedingungen besser verstanden werden.

Dabei wurden die mit murinen NIH-3T3 Fibroblasten co-kultivierten transgenen CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den konventionellen normoxischen Zellkulturbedingungen immunphänotypisch und funktionell charakterisiert. Ergänzend sollten die erzielten Ergebnisse durch die Nachahmung eines hypoxischen Milieus *in vitro* mit Applikation eines Eisenchelators bestätigt werden. Der CD40L-CD40 Signalweg diente dabei als Versuchsmodell. Desweiteren wurde *in vivo* der Einfluss der Eisenchelatherapie mit Deferasirox Exjade® auf den Immunphänotyp von humanen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) untersucht. Dabei waren acht Patienten mit Eisenüberladung aufgrund verschiedener Erkrankungen wie z.B. der *myeloischen Leukämie* untersucht worden und der Immunphänotyp vor und nach der Therapie mit Exjade® mittels Durchflusszytometrie analysiert worden.

Die vorliegende Arbeit liefert den Nachweis, dass Hypoxie die homotypische Clusterbildung von CD40L-aktivierten B-Zellen stört und die Zellgröße verringert. Unter Hypoxie (0,8 % O₂) kam es zur Inhibierung der Zellproliferation während der sieben-tägigen Kulturphase sowie zur Verringerung der Zellgröße einzelner B-Zellen. Bei der Zellzyklusanalyse führten hypoxische Kulturbedingungen zu einer tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrten Arretierung der CD40L-aktivierten B-Zellen in der G1-Zellzyklusphase.

Die Untersuchungen zur Apoptose unter Hypoxie ergaben keine Hinweise auf eine gesteigerte Induktion der Apoptose an Tag 0, 3 und Tag 7 unter hypoxischen versus normoxischen Kulturbedingungen. Die Expression der co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf CD40L-aktivierten B-Lymphozyten nahm unter

Hypoxie ab, wohingegen die Expression von HLA-DR auf unverändert hohem Niveau blieb. Bei der funktionellen Analyse wurde erkenntlich, dass es zu einer signifikanten Reduktion in der T-Lymphozyten Aktivierung zum einen über fünf Std. und zum anderen über sieben Tage sowohl für die CD4-positiven T-Helferzellen als auch die CD8-positiven T-Killerzellen unter Hypoxie - im Vergleich zur Normoxie kam.

Die Nachahmung eines hypoxischen Milieus *in vitro* mit Applikation des Eisenchelators DFO bewirkte eine Proliferationsinhibition von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten, welche im Ausmaß mit der durch Hypoxiebehandlung induzierten vergleichbar war. Unter dem Einsatz des Eisenchelators DFO konnte ebenso wie unter Hypoxie keine vermehrte Apoptoserate bei CD40L-aktivierten B-Lymphozyten nach drei Tagen verzeichnet werden.

Hinsichtlich des Zellzyklus konnte eine signifikante Erhöhung der G2-Phase-Aktivität von $\pm 10\%$ der Positivkontrolle bis auf $\pm 40\%$ durch den Eisenchelator DFO beobachtet werden, was auf eine Arretierung der CD40L-aktivierten B-Lymphozyten in der G2-Zellzyklusphase schließen lässt. Der Immunphänotyp von CD40L-aktivierten B-Lymphozyten zeigte unter Eisenchelation eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 an Tag 3. Bei der Aktivierung der T-Lymphozyten unter dem Einfluss von DFO kam es eher zu einer Zunahme der T-Zell Aktivierung in der Kurzzeit-MLR, die jedoch nicht immer signifikant war. Durch die translationale Übertragung aus der Klinik konnte anhand eines Patientenkollektivs von acht Patienten die Wirkung der Eisenchelatherapie mit Exjade® auf den Immunphänotypus von zirkulierenden B-Zellen untersucht werden. Es kam dabei zu einer nicht signifikanten Reduktion der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf aktivierten B-Zellen (CD19-positiven CD20-positiven) nach der Therapie.

Da es zu einer Reduktion der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf CD40L-aktivierten B-Zellen und zu einer Reduktion der T-Zell Aktivierung sowohl in einer Kurzzeit als auch in einer Langzeit-MLR unter Hypoxie kam, lässt sich daraus schließen, dass die APC-Funktion unter Hypoxie abnimmt. Die co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle sind beide maßgeblich an der APC-Funktion von B-Zellen beteiligt, genauso wie der CD40-Ligand, welcher nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen könnten einen Teil, sowohl zu der Entwicklung der Wirksamkeit CD40L-aktivierter B-Lymphozyten als Zelltherapeutikum, als auch zu einem weiteren Einblick in den Einfluss der Eisenchelatherapie beitragen. Im Hinblick auf die Entwicklung einer adaptiven Immuntherapie geben die vorgelegten Ergebnisse einen weiterführenden Einblick in die Generierung und Spezifität CD40L-aktivierter B-Zellen und die Möglichkeiten, über die CD40L-Aktivierung eine spezifische Immunantwort durch T-Zellen zu induzieren. Der Nutzen als Zelltherapeutikum kann in der Entwicklung neuer anti-neoplastischer Therapien als eine der vielversprechendsten Forschungsmethoden angesehen werden.

6. SUMMARY

The principal purpose of the present graduation work was the detailed characterisation of CD40L-activated, human B-lymphocyte cells under test conditions of a pronounced hypoxia (0.8% oxygen) in vitro, like it also can be proved in lymphatic tissue in vivo, in direct comparison to the under normoxic test conditions (21% oxygen) cultivated B-lymphocyte cells. Effects of the hypoxia on the immune phenotype and functional aspects like that of the CD40L-activated human B-lymphocyte cells thereby stood in the focus of the interest. Besides the question should be followed which potential the in vitro generation of CD40L-activated human B-cells offers. The in vivo conditions by the T-cell mediated B-cell activation in vitro the in vivo conditions should be better understood.

For the activation of the human CD40-positive B-lymphocyte cells which were by means of the pancoll separated from full blood and purified by magnetic cell sorting, they were cultivated for up to seven days with murine NIH-3T3 fibroblasts, which expressed the human CD40 ligand (CD40L) stably transformed. Additionally to the characterisation of the immune phenotype as well as the functional characteristics of the activated B-lymphocyte cells under hypoxic test conditions the received result should be confirmed by the imitation of a hypoxic environment in vitro due to the application of an iron chelator. Further in vivo the influence of the iron chelation

therapy with Deferasirox Exjade® on the immune phenotype of humane peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was examined. Eight patients with iron overload due to different illnesses like myeloid leukaemia had been analyzed and the immune phenotype had been examined before and after the therapy with Exjade® by means of flow cytometry.

The present work supplied the proof that hypoxia (0.8 % oxygen) disturbed the homotypic cluster forming of CD40L-activated B-lymphocyte cells and had as a consequence a partial inhibition of cell proliferation as well as a decrease of the cell size during the seven day cultural phase. Investigations under hypoxia vs. normoxia however showed no referring to an increased induction of apoptotic cell decline. In the flow cytometric analysis of the cell cycle stages the CD40L-activated B-lymphocyte cells showed after three days an arrest of hypoxic cultivation to 80% in the G1 phase, contrary to the cells under normoxia with a portion of 60% in the G1 phase. The expression of the co-stimulatory surface molecules CD80 and CD86 on CD40L-activated B-lymphocyte cells pointed itself particularly after a four-day concerning cultivation under hypoxia as significantly reduced, less concerning the percentage rate of activated B-lymphocyte cells (% gated) than the immunoreactive total signal (MFI value). A comparable result proved for the expression of the cell adhesion molecule CD62L, whereby the salient reduction of the immune-reactive total signal for CD62L under standard as well as under hypoxic test conditions after 4 - 24 hr. can hardly be explained. The expression of the human leukocyte antigen HLA-DR however proved throughout as unchanged.

In the context of a mixed lymphocyte reaction (MLR) realized about five hr. („short time “), the CD4-positive T-helpercells and the CD8-positive T-killercells showed under hypoxia - in comparison to the normoxia - a significant reduction of the activation of human T-lymphocytes induced by CD40L-activated B-lymphocyte cells in the context of the antigen presentation. As a quantitative measuring signal served the flow cytometric analysis of the immunoreactive cell surface marker for CD107a (marker for degranulation and cytotoxicity of T-cells), CD154 and CD69 (early markers for T-cell activation). The employment of both cultivated under standard and hypoxic test conditions non-activated B-lymphocyte cells only led to a marginal proof of these surface antigens. Besides the MLR realized over seven days („long-term “)

furnished proof to an easy reduction of proliferation of activated CD4 and CD8-positive T-lymphocytes after antigen presentation through CD40L-activated B-lymphocyte cells cultivated under hypoxic vs. normoxic test conditions.

The imitation of a hypoxic environment in vitro with application of the iron chelator DFO caused a proliferation inhibition of CD40L-activated B-lymphocyte cells, which was comparable in the extent with the ones induced by hypoxia treatment. Under the employment of the iron chelator DFO and under hypoxia no increased apoptosis rate could be registered with CD40L-activated B-lymphocyte cells after three days. With the cell cycle a significant increase of the G2-Phase activity could be observed from $\pm 10\%$ of positive control up to $\pm 40\%$ by the iron chelator DFO, from which you can conclude on a detent of the CD40L-activated B-lymphocyte cells in the G2-cell cycle stage. The immune phenotype of CD40L-activated B-lymphocyte cell showed under iron chelation a concentration-dependent decrease under of the expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on day 3. The activation of the T-lymphocytes under the influence of DFO showed an increase of the T-cell activation in the short time MLR, which however was not always significant. The effect of the iron chelation with Exjade® on the immune phenotype of circulating B-cells could be examined by the translational transmission from the hospital on the basis of a patient collective by eight patients. It didn't show a significant reduction of the expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on activated B-cells (CD19-positive CD20-positive) after the therapy. Because you could see a reduction of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on CD40L-activated B-cells and to a reduction of the T-cell activation both in a cure time and in a long-time MLR under hypoxia, it can be concluded that the APC function under hypoxia decreases. The co-stimulatory surface molecules are both considerably involved in the APC function by B-cells and the CD40-ligand, which is only expressed on activated T-cells.

The observations described in the present work could contribute a part both to effectiveness of CD40L-activated B-lymphocyte cells and cell therapeutic agent as well as to a further insight of the influence of the iron chelation therapy. Regarding the development of an adaptive immune therapy the submitted results give a resuming idea into the generation and specificity of CD40L-activated B-cells and the pos-

sibilities to induce a specific immune response by T-cells by means of CD40L- activation. The benefit as cell therapeutic agent can be viewed as one of the most promising research methods in the development of new anti neoplastic therapies.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| Abb | Abbildung |
| Ag | Antigen |
| APC | Antigen präsentierende Zelle |
| AU | arbitrary units |
| BCR | B-Zell Rezeptor |
| CD | cluster of differentiation |
| CD40-L | CD40-Ligand |
| CFSE | Carboxyfluoresceinsuccinimidylester |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CTL | zytotoxischer T-Lymphozyt |
| DC | dendritische Zellen |
| DFO | Desferrioxamin (Desferal®) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DotPlot | Punktwolkendarstellungen |
| EPO | Erythropoetin |
| FACS | fluorescence-activated cell sorter |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FDC | follikulär-dendritische Zellen |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | forward scatter |

| | |
|-----------------|---|
| Gy | Gray |
| HEV | high endothelial venules |
| HIF | hypoxia-inducible factor |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-4 | Interleukin-4 |
| IL-5 | Interleukin-5 |
| KG | Körpergewicht |
| KNM | Knochenmark |
| kPa | Kilopascal |
| LDH-A | Laktat-Dehydrogenase A |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | magnetische Zellsortierung |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| MHC | major histocompatibility complex |
| Min. | Minute |
| MLR | mixed lymphocyte reaction |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NIH | National Institutes of Health |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| p | Signifikanz |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PE | Phycoerythrin |
| PenStrep | Penicillin-Strepomycin |
| PHD | Prolylhydroxylase |
| PI | Propidiumiodid |
| pO ₂ | Sauerstoff-Partialdruck |
| PS | Phosphatidylserin |

| | |
|-------|--|
| pVHL | Protein des Tumorsuppressor-Gens Von-Hippel-Lindau |
| rpm | revolutions per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SLE | Lupus erythematosus |
| SEM | Standardabweichung |
| SSC | sideward scatter |
| Std. | Stunde |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| TLR | Toll-Like-Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tregs | regulatorische T-Zellen |
| VEGF | vascular endothelial grow factor |
| WT | Wildtyp |
| 7AAD | 7-Amino-Actinomycin |

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. T. Leanderson and S. Pettersson, *Characterization of activities inducing polyclonal maturation of activated B lymphocytes to immunoglobulin secretion*, Scand J Immunol, 1985, 21, 297-304
2. C. C. Goodnow, *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93, 2264-71
3. D. Nemazee and K. Buerki, *Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86, 8039-43
4. D. G. Osmond, *B cell development in the bone marrow*, Semin Immunol, 1990, 2, 173-80
5. T. Okada, V. N. Ngo, E. H. Ekland, R. Forster, M. Lipp, D. R. Littman and J. G. Cyster, *Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches*, J Exp Med, 2002, 196, 65-75
6. E. C. Butcher, *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*, Cell, 1991, 67, 1033-6
7. E. Kondo, L. Gryschok, N. Klein-Gonzalez, S. Rademacher, M. R. Weihrauch, T. Liebig, A. Shimabukuro-Vornhagen, *CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential*, Clin Exp Immunol, 2009, 155, 249-56
8. I. C. MacLennan, *Germinal centers*, Annu Rev Immunol, 1994, 12, 117-39
9. Y. J. Liu and J. Banchereau, *Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells*, Semin Immunol, 1997, 9, 235-40
10. R. L. Coffman, D. A. Leberman and P. Rothman, *Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching*, Adv Immunol, 1993, 54, 229-70
11. Y. J. Liu, C. Arpin, O. de Bouteiller, C. Guret, J. Banchereau, H. Martinez-Valdez and S. Lebecque, *Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development*, Semin Immunol, 1996, 8, 169-77
12. C. Lutz, B. Ledermann, M. H. Kosco-Vilbois, A. F. Ochsenbein, R. M. Zinkernagel, G. Kohler and F. Brombacher, *IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells*, Nature, 1998, 393, 797-801
13. M. J. Shlomchik and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*, Immunol Rev, 2012, 247, 52-63
14. S. Jacquot, *CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation*, Immunol Res, 2000, 21, 23-30
15. L. J. McHeyzer-Williams, L. P. Malherbe and M. G. McHeyzer-Williams, *Helper T cell-regulated B cell immunity*, Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311, 59-83
16. R. F. Coico, B. S. Bhogal and G. J. Thorbecke, *Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin*, J Immunol, 1983, 131, 2254-7
17. M. A. Oropallo and A. Cerutti, *Germinal center reaction: antigen affinity and presentation explain it all*, Trends Immunol, 2014,
18. T. Kuritani, S. Negoro and S. Kishimoto, *[CD antigens and the differentiation of human lymphocytes]*, Hum Cell, 1988, 1, 282-8

19. K. Sagawa, [*Human leukocyte differentiation antigens and the International CD (cluster of differentiation) classification*], *Nihon Rinsho*, 1987, 45, 2804-13
20. M. H. Kosco, E. Pflugfelder and D. Gray, *Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro*, *J Immunol*, 1992, 148, 2331-9
21. J. G. Cyster, S. B. Hartley and C. C. Goodnow, *Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire*, *Nature*, 1994, 371, 389-95
22. Y. Elhanati, A. Murugan, C. G. Callan, Jr., T. Mora and A. M. Walczak, *Quantifying selection in immune receptor repertoires*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014,
23. Y. R. Zou and B. Diamond, *Fate determination of mature autoreactive B cells*, *Adv Immunol*, 2013, 118, 1-36
24. C. Johnson-Leger, J. R. Christenson, M. Holman and G. G. Klaus, *Evidence for a critical role for IL-2 in CD40-mediated activation of naive B cells by primary CD4 T cells*, *J Immunol*, 1998, 161, 4618-26
25. D. C. Parker, *T cell-dependent B cell activation*, *Annu Rev Immunol*, 1993, 11, 331-60
26. A. I. Jaiswal and M. Croft, *CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response*, *J Immunol*, 1997, 159, 2282-91
27. A. F. Cunningham, K. Serre, K. M. Toellner, M. Khan, J. Alexander, F. Brombacher and I. C. MacLennan, *Pinpointing IL-4-independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity by CD4 T cells*, *Eur J Immunol*, 2004, 34, 686-94
28. J. Gordon, M. J. Millsum, G. R. Guy and J. A. Ledbetter, *Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling*, *J Immunol*, 1988, 140, 1425-30
29. Y. Wu, J. Xu, S. Shinde, I. Grewal, T. Henderson, R. A. Flavell and Y. Liu, *Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40 ligand*, *Curr Biol*, 1995, 5, 1303-11
30. K. S. Hathcock, G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley and R. J. Hodes, *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*, *J Exp Med*, 1994, 180, 631-40
31. O. D'Orlando, G. Gri, G. Cattaruzzi, S. Merluzzi, E. Betto, V. Gattei and C. Pucillo, *Outside inside signalling in CD40-mediated B cell activation*, *J Biol Regul Homeost Agents*, 2007, 21, 49-62
32. M. Lafage-Pochitaloff, P. Herman, F. Birg, J. P. Galizzi, J. Simonetti, P. Mannoni and J. Banchereau, *Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2*, *Leukemia*, 1994, 8, 1172-5
33. K. Karmann, C. C. Hughes, J. Schechner, W. C. Fanslow and J. S. Pober, *CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, 4342-6
34. D. Graf, U. Korthauer, H. W. Mages, G. Senger and R. A. Kroccek, *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*, *Eur J Immunol*, 1992, 22, 3191-4
35. J. F. Gauchat, S. Henchoz, D. Fattah, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Jomotte, L. Dash, *CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils*, *Eur J Immunol*, 1995, 25, 863-5
36. E. Carbone, G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*, *J Exp Med*, 1997, 185, 2053-60

37. S. Han, K. Hathcock, B. Zheng, T. B. Kepler, R. Hodes and G. Kelsoe, *Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers*, J Immunol, 1995, 155, 556-67
38. Z. Qin, G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao and T. Blankenstein, *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*, Nat Med, 1998, 4, 627-30
39. J. L. Schultze, S. Grabbe and M. S. von Bergwelt-Baildon, *DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy*, Trends Immunol, 2004, 25, 659-64
40. S. Fagarasan and T. Honjo, *T-Independent immune response: new aspects of B cell biology*, Science, 2000, 290, 89-92
41. E. J. Schattner, K. B. Elkon, D. H. Yoo, J. Tumang, P. H. Krammer, M. K. Crow and S. M. Friedman, *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway*, J Exp Med, 1995, 182, 1557-65
42. G. B. Carey, D. Donjerkovic, C. M. Mueller, S. Liu, J. A. Hinshaw, L. Tonnetti, W. Davidson, *B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death*, Immunol Rev, 2000, 176, 105-15
43. Y. Souwer, A. Griekspoor, T. Jorritsma, J. de Wit, H. Janssen, J. Neefjes and S. M. van Ham, *B cell receptor-mediated internalization of salmonella: a novel pathway for autonomous B cell activation and antibody production*, J Immunol, 2009, 182, 7473-81
44. A. Lanzavecchia, *Antigen-specific interaction between T and B cells*, Nature, 1985, 314, 537-9
45. F. Mach, U. Schonbeck, G. K. Sukhova, T. Bourcier, J. Y. Bonnefoy, J. S. Pober and P. Libby, *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94, 1931-6
46. J. D. Bouaziz, H. Le Buanec, A. Saussine, A. Bensussan and M. Bagot, *IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art*, Curr Mol Med, 2012, 12, 519-27
47. D. P. Harris, L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*, Nat Immunol, 2000, 1, 475-82
48. P. A. Blair, L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri, *CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*, Immunity, 2010, 32, 129-40
49. M. S. von Bergwelt-Baildon, R. H. Vonderheide, B. Maecker, N. Hirano, K. S. Anderson, M. O. Butler, Z. Xia, *Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application*, Blood, 2002, 99, 3319-25
50. M. C. Brahimi-Horn and J. Pouyssegur, *Oxygen, a source of life and stress*, FEBS Lett, 2007, 581, 3582-91
51. T. Finkel, M. Serrano and M. A. Blasco, *The common biology of cancer and ageing*, Nature, 2007, 448, 767-74
52. M. C. Brahimi-Horn, J. Chiche and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cancer*, J Mol Med (Berl), 2007, 85, 1301-7
53. E. Piovan, V. Tosello, S. Indraccolo, M. Masiero, L. Persano, G. Esposito, R. Zamarchi, *Differential regulation of hypoxia-induced CXCR4 triggering during B-cell development and lymphomagenesis*, Cancer Res, 2007, 67, 8605-14

54. A. Ohta, R. Diwanji, R. Kini, M. Subramanian and M. Sitkovsky, *In vivo T cell activation in lymphoid tissues is inhibited in the oxygen-poor microenvironment*, Front Immunol, 2011, 2, 27
55. L. P. Hale, R. D. Braun, W. M. Gwinn, P. K. Greer and M. W. Dewhirst, *Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282, H1467-77
56. P. Vaupel and L. Harrison, *Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response*, Oncologist, 2004, 9 Suppl 5, 4-9
57. J. M. Brown and A. J. Giaccia, *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*, Cancer Res, 1998, 58, 1408-16
58. C. P. Bracken, M. L. Whitelaw and D. J. Peet, *The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses*, Cell Mol Life Sci, 2003, 60, 1376-93
59. J. W. Lee, S. H. Bae, J. W. Jeong, S. H. Kim and K. W. Kim, *Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions*, Exp Mol Med, 2004, 36, 1-12
60. S. C. Clifford, D. Astuti, L. Hooper, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe and E. R. Maher, *The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma*, Oncogene, 2001, 20, 5067-74
61. V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda and A. Varshavsky, *A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein*, Science, 1989, 243, 1576-83
62. U. R. Jewell, I. Kvietikova, A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger and M. Gassmann, *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*, FASEB J, 2001, 15, 1312-4
63. V. Srinivas, L. P. Zhang, X. H. Zhu and J. Caro, *Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins*, Biochem Biophys Res Commun, 1999, 260, 557-61
64. R. H. Wenger and M. Gassmann, *Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1*, Biol Chem, 1997, 378, 609-16
65. G. L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway*, Sci STKE, 2007, 2007, cm8
66. G. L. Wang and G. L. Semenza, *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*, Blood, 1993, 82, 3610-5
67. W. G. Kaelin, Jr. and P. J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway*, Mol Cell, 2008, 30, 393-402
68. J. D. Firth, B. L. Ebert, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe, *Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91, 6496-500
69. G. L. Semenza, *Targeting HIF-1 for cancer therapy*, Nat Rev Cancer, 2003, 3, 721-32
70. J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos and G. L. Semenza, *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*, Mol Cell Biol, 1996, 16, 4604-13
71. T. Cramer and R. S. Johnson, *A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1alpha: critical regulation of inflammatory cell function*, Cell Cycle, 2003, 2, 192-3

72. M. von Bergwelt-Baildon, J. L. Schultze, B. Maecker, I. Menezes and L. M. Nadler, *Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. Cancer Res 2003;63:2836-43, Cancer Res, 2004, 64, 4055-6; author reply 4056-7*
73. J. G. Rajendran, D. A. Mankoff, F. O'Sullivan, L. M. Peterson, D. L. Schwartz, E. U. Conrad, A. M. Spence, *Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging, Clin Cancer Res, 2004, 10, 2245-52*
74. T. M. Liebig, A. Fiedler, S. Zoghi, A. Shimabukuro-Vornhagen and M. S. von Bergwelt-Baildon, *Generation of human CD40-activated B cells, J Vis Exp, 2009,*
75. G. Wohlleben, D. Gray and A. Schimpl, *In vitro immunization of naive mouse B cells: establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts, Int Immunol, 1996, 8, 343-9*
76. J. P. Revel, P. Hoch and D. Ho, *Adhesion of culture cells to their substratum, Exp Cell Res, 1974, 84, 207-18*
77. A. Boyum, *Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent, Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968, 97, 9-29*
78. D. English and B. R. Andersen, *Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque, J Immunol Methods, 1974, 5, 249-52*
79. L. P. Bignold and A. Ferrante, *Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method, J Immunol Methods, 1987, 96, 29-33*
80. A. Boyum, *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages, Scand J Immunol, 1976, Suppl 5, 9-15*
81. J. J. Going, *Counting cells made easier, Histopathology, 2006, 49, 309-11*
82. C. Delfini, G. Grilli, P. Polchi, A. Porcellini and G. Lucarelli, *Cryopreservation of human lymphoid cells from various tissues, Ric Clin Lab, 1979, 9, 61-6*
83. A. B. Glassman and C. E. Bennett, *Cryopreservation of human lymphocytes: a brief review and evaluation of an automated liquid nitrogen freezer, Transfusion, 1979, 19, 178-81*
84. S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch, *High gradient magnetic cell separation with MACS, Cytometry, 1990, 11, 231-8*
85. J. W. Semple, D. Allen, W. Chang, P. Castaldi and J. Freedman, *Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS), Cytometry, 1993, 14, 955-60*
86. W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet and L. A. Herzenberg, *Fluorescence activated cell sorting, Rev Sci Instrum, 1972, 43, 404-9*
87. L. A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez and M. Roederer, *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford, Clin Chem, 2002, 48, 1819-27*
88. L. A. Herzenberg and R. G. Sweet, *Fluorescence-activated cell sorting, Sci Am, 1976, 234, 108-17*
89. A. Bikoue, F. George, P. Poncelet, M. Mutin, G. Janossy and J. Sampol, *Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values, Cytometry, 1996, 26, 137-47*

90. M. A. de Rie, T. N. Schumacher, G. M. van Schijndel, R. A. van Lier and F. Miedema, *Regulatory role of CD19 molecules in B-cell activation and differentiation*, Cell Immunol, 1989, 118, 368-81
91. J. K. Buben, L. J. Zhou, P. D. Bell, R. A. Frizzell and T. F. Tedder, *Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes*, J Cell Biol, 1993, 121, 1121-32
92. P. Engel, J. G. Gribben, G. J. Freeman, L. J. Zhou, Y. Nozawa, M. Abe, L. M. Nadler, *The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen*, Blood, 1994, 84, 1402-7
93. W. F. Bodmer, *HLA structure and function: a contemporary view*, Tissue Antigens, 1981, 17, 9-20
94. O. Spertini, F. W. Luscinskas, G. S. Kansas, J. M. Munro, J. D. Griffin, M. A. Gimbrone, Jr. and T. F. Tedder, *Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion*, J Immunol, 1991, 147, 2565-73
95. C. R. Mackay, *Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm*, J Exp Med, 2000, 192, F31-4
96. K. Holmes, L. M. Lantz, B. J. Fowlkes, I. Schmid and J. V. Giorgi, *Preparation of cells and reagents for flow cytometry*, Curr Protoc Immunol, 2001, Chapter 5, Unit 5 3
97. G. Majno and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*, Am J Pathol, 1995, 146, 3-15
98. G. Koopman, C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals and M. H. van Oers, *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*, Blood, 1994, 84, 1415-20
99. H. Lecoecur, E. Ledru, M. C. Prevost and M. L. Gougeon, *Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods*, J Immunol Methods, 1997, 209, 111-23
100. A. B. Pardee, *G1 events and regulation of cell proliferation*, Science, 1989, 246, 603-8
101. J. E. Gill, M. M. Jotz, S. G. Young, E. J. Modest and S. K. Sengupta, *7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties*, J Histochem Cytochem, 1975, 23, 793-9
102. A. Krishan, *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*, J Cell Biol, 1975, 66, 188-93
103. I. P. Beletsky and S. R. Umansky, *A new assay for cell death*, J Immunol Methods, 1990, 134, 201-5
104. R. Lopez-Amoros, J. Comas and J. Vives-Rego, *Flow cytometric assessment of Escherichia coli and Salmonella typhimurium starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol*, Appl Environ Microbiol, 1995, 61, 2521-6
105. P. S. Rabinovitch, *DNA content histogram and cell-cycle analysis*, Methods Cell Biol, 1994, 41, 263-96
106. H. Krug, *[Flow cytophotometry and cell cycle analysis]*, Acta Histochem Suppl, 1983, 27, 43-61
107. S. F. Sorensen, *The mixed lymphocyte culture interaction. Techniques and immunogenetics*, Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol, 1972, 230, 3-82

108. M. B. Widmer and F. H. Bach, *Allogeneic and xenogeneic response in mixed leukocyte cultures*, J Exp Med, 1972, 135, 1204-8
109. K. Hirschhorn, F. Bach, R. L. Kolodny, I. L. Firschein and N. Hashem, *Immune Response and Mitosis of Human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro*, Science, 1963, 142, 1185-7
110. L. Lin, J. Couturier, X. Yu, M. A. Medina, C. A. Kozinetz and D. E. Lewis, *Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells*, BMC Immunol, 2014, 15, 36
111. K. Terahara, H. Ishii, T. Nomura, N. Takahashi, A. Takeda, T. Shiino, Y. Tsunetsugu-Yokota, *Vaccine-induced CD107a+ CD4+ T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection*, J Virol, 2014, 88, 14232-40
112. M. Febbraio and R. L. Silverstein, *Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein*, J Biol Chem, 1990, 265, 18531-7
113. M. R. Betts and R. A. Koup, *Detection of T-cell degranulation: CD107a and b*, Methods Cell Biol, 2004, 75, 497-512
114. Y. T. Bryceson, M. E. March, D. F. Barber, H. G. Ljunggren and E. O. Long, *Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells*, J Exp Med, 2005, 202, 1001-12
115. I. S. Grewal and R. A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*, Annu Rev Immunol, 1998, 16, 111-35
116. J. Banchereau, F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, *The CD40 antigen and its ligand*, Annu Rev Immunol, 1994, 12, 881-922
117. E. A. Ranheim and T. J. Kipps, *Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L*, Cell Immunol, 1995, 161, 226-35
118. A. J. Mendez, *Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. Implications for intracellular cholesterol transport*, J Biol Chem, 1995, 270, 5891-900
119. D. Fulcher and S. Wong, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory*, Immunol Cell Biol, 1999, 77, 559-64
120. A. B. Lyons and C. R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*, J Immunol Methods, 1994, 171, 131-7
121. B. Fehse, O. Frerk, M. Goldmann, M. Bulduk and A. R. Zander, *Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69)*, Br J Haematol, 2000, 109, 644-51
122. C. M. Hershko, G. M. Link, A. M. Konijn and Z. I. Cabantchik, *Iron chelation therapy*, Curr Hematol Rep, 2005, 4, 110-6
123. J. H. Baek, C. E. Reiter, D. J. Manalo, P. W. Buehler, R. C. Hider and A. I. Alayash, *Induction of hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) in rat kidneys by iron chelation with the hydroxypyridinone, CP94*, Biochim Biophys Acta, 2011, 1809, 262-8
124. C. Borgna-Pignatti, S. Rugolotto, P. De Stefano, A. Piga, F. Di Gregorio, M. R. Gamberini, V. Sabato, *Survival and disease complications in thalassemia major*, Ann N Y Acad Sci, 1998, 850, 227-31
125. S. S. Karuppagounder and R. R. Ratan, *Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics?*, J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32, 1347-61

126. S. E. Hamrick, P. S. McQuillen, X. Jiang, D. Mu, A. Madan and D. M. Ferriero, *A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection*, *Neurosci Lett*, 2005, 379, 96-100
127. E. Vichinsky, *Clinical application of deferasirox: practical patient management*, *Am J Hematol*, 2008, 83, 398-402
128. H. E. Vanorden and T. M. Hagemann, *Deferasirox--an oral agent for chronic iron overload*, *Ann Pharmacother*, 2006, 40, 1110-7
129. M. von Bergwelt-Baildon, A. Shimabukuro-Vornhagen, A. Popov, N. Klein-Gonzalez, F. Fiore, S. Debey, A. Draube, *CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants*, *Blood*, 2006, 107, 2786-9
130. G. B. Ahmann, P. I. Nadler, A. Birnkrant and R. J. Hodes, *T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation-resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction*, *J Immunol*, 1979, 123, 903-9
131. E. Pure, K. Inaba and J. Metlay, *Lymphokine production by murine T cells in the mixed leukocyte reaction*, *J Exp Med*, 1988, 168, 795-800
132. E. M. Hammond, S. L. Green and A. J. Giaccia, *Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest*, *Mutat Res*, 2003, 532, 205-13
133. S. Yoshiba, D. Ito, T. Nagumo, T. Shiota, M. Hatori and S. Shintani, *Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest*, *Oral Oncol*, 2009, 45, 109-15
134. C. R. Lenihan and C. T. Taylor, *The impact of hypoxia on cell death pathways*, *Biochem Soc Trans*, 2013, 41, 657-63
135. R. Scaringi, M. Piccoli, N. Papini, F. Cirillo, E. Conforti, S. Bergante, C. Tringali, *NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha*, *J Biol Chem*, 2013, 288, 3153-62
136. M. C. Bosseto, P. V. Palma, D. T. Covas and S. Giorgio, *Hypoxia modulates phenotype, inflammatory response, and leishmanial infection of human dendritic cells*, *APMIS*, 2010, 118, 108-14
137. J. L. Schultze, S. Michalak, M. J. Seamon, G. Dranoff, K. Jung, J. Daley, J. C. Delgado, *CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy*, *J Clin Invest*, 1997, 100, 2757-65
138. T. T. Yuan and Y. R. Liu, *[Progress in biology of dendritic cells]*, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2010, 18, 1074-8
139. L. E. Van den Hove, S. W. Van Gool, P. Vandenberghe, M. Bakkus, K. Thielemans, M. A. Boogaerts and J. L. Ceuppens, *CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules*, *Leukemia*, 1997, 11, 572-80
140. D. C. Parker, *The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation*, *Semin Immunol*, 1993, 5, 413-20
141. A. Pietrangelo, E. Rocchi, A. Ferrari, E. Ventura and G. Cairo, *Regulation of hepatic transferrin, transferrin receptor and ferritin genes in human siderosis*, *Hepatology*, 1991, 14, 1083-9
142. J. Emerit, C. Beaumont and F. Trivin, *Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury*, *Biomed Pharmacother*, 2001, 55, 333-9

143. G. M. Brittenham, P. M. Griffith, A. W. Nienhuis, C. E. McLaren, N. S. Young, E. E. Tucker, C. J. Allen, *Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major*, N Engl J Med, 1994, 331, 567-73
144. K. J. Banasiak and G. G. Haddad, *Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death*, Brain Res, 1998, 797, 295-304
145. U. Felderhoff-Mueser, D. L. Taylor, K. Greenwood, M. Kozma, D. Stibenz, U. C. Joashi, A. D. Edwards, *Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain*, Brain Pathol, 2000, 10, 17-29
146. K. J. Banasiak, T. Cronin and G. G. Haddad, *bcl-2 prolongs neuronal survival during hypoxia-induced apoptosis*, Brain Res Mol Brain Res, 1999, 72, 214-25
147. P. J. Real, A. Sierra, A. De Juan, J. C. Segovia, J. M. Lopez-Vega and J. L. Fernandez-Luna, *Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells*, Oncogene, 2002, 21, 7611-8
148. J. Y. Chung, Y. Song, Y. Wang, R. R. Magness and J. Zheng, *Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies*, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89, 2484-90
149. W. G. An, M. Kanekal, M. C. Simon, E. Maltepe, M. V. Blagosklonny and L. M. Neckers, *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha*, Nature, 1998, 392, 405-8
150. P. Carmeliet, Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*, Nature, 1998, 394, 485-90
151. C. Brodie, G. Siriwardana, J. Lucas, R. Schleicher, N. Terada, A. Szepesi, E. Gelfand, *Neuroblastoma sensitivity to growth inhibition by deferoxamine: evidence for a block in G1 phase of the cell cycle*, Cancer Res, 1993, 53, 3968-75
152. N. Chenoufi, G. Baffet, B. Drenou, S. Cariou, M. Desille, B. Clement, P. Brissot, *Deferoxamine arrests in vitro the proliferation of porcine hepatocyte in G1 phase of the cell cycle*, Liver, 1998, 18, 60-6
153. F. J. Renton and T. M. Jeitner, *Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators*, Biochem Pharmacol, 1996, 51, 1553-61
154. B. E. Bierer and D. G. Nathan, *The effect of desferriethiocin, an oral iron chelator, on T-cell function*, Blood, 1990, 76, 2052-9
155. R. H. Burdon, *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation*, Free Radic Biol Med, 1995, 18, 775-94
156. H. J. Palmer and K. E. Paulson, *Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression*, Nutr Rev, 1997, 55, 353-61
157. I. Bogeski, C. Kummerow, D. Al-Ansary, E. C. Schwarz, R. Koehler, D. Kozai, N. Takahashi, *Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling*, Sci Signal, 2010, 3, ra24
158. Q. S. Wang, Y. M. Zheng, L. Dong, Y. S. Ho, Z. Guo and Y. X. Wang, *Role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia-dependent increase in intracellular calcium in pulmonary artery myocytes*, Free Radic Biol Med, 2007, 42, 642-53
159. K. M. Fracchia, C. Y. Pai and C. M. Walsh, *Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling*, Front Immunol, 2013, 4, 324

160. R. E. Dolmetsch and R. S. Lewis, *Signaling between intracellular Ca²⁺ stores and depletion-activated Ca²⁺ channels generates [Ca²⁺]_i oscillations in T lymphocytes*, J Gen Physiol, 1994, 103, 365-88
161. S. Feske, J. Giltzane, R. Dolmetsch, L. M. Staudt and A. Rao, *Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes*, Nat Immunol, 2001, 2, 316-24
162. S. Philipp, L. Cui, B. Ludolph, M. Kelm, R. Schulz, M. V. Cohen and J. M. Downey, *Desferoxamine and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate protect myocardium by activating NOS and generating mitochondrial ROS*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290, H450-7
163. G. M. Addison, M. R. Beamish, C. N. Hales, M. Hodgkins, A. Jacobs and P. Llewellyn, *An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload*, J Clin Pathol, 1972, 25, 326-9
164. G. M. Brittenham and D. G. Badman, *Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop*, Blood, 2003, 101, 15-9
165. A. R. Cohen, *New advances in iron chelation therapy*, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006, 42-7
166. G. M. Brittenham, *Iron-chelating therapy for transfusional iron overload*, N Engl J Med, 2011, 364, 146-56
167. M. D. Cappellini, J. Porter, A. El-Beshlawy, C. K. Li, J. F. Seymour, M. Elalfy, N. Gattermann, *Tailoring iron chelation by iron intake and serum ferritin: the prospective EPIC study of deferasirox in 1744 patients with transfusion-dependent anemias*, Haematologica, 2010, 95, 557-66
168. J. Neukirchen, F. Fox, A. Kundgen, K. Nachtkamp, C. Strupp, R. Haas, U. Germing, *Improved survival in MDS patients receiving iron chelation therapy - a matched pair analysis of 188 patients from the Dusseldorf MDS registry*, Leuk Res, 2012, 36, 1067-70

9. ANHANG

9.1 DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es mir ein Bedürfnis, mich bei allen zu bedanken, die mich bei der Erarbeitung und Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die entgegenkommende Betreuung seitens der Veterinärmedizinischen Hochschule Gießen bedanken. Ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für mich.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon für die Überlassung des Themas und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe mit hervorragender Atmosphäre, die ein eigenständiges und engagiertes Arbeiten ermöglichte.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Theurich bedanken, der mir mit seinem wissenschaftlichen Rat zur Seite stand.
Dr. Alexander Shimabukuro-Vornhagen danke ich für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Offenheit.

Weiterhin möchte ich meiner gesamten Arbeitsgruppe danken für die herzliche Aufnahme, die hervorragende Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere Anne Fiedler für die Einweisung in die Laborarbeit und die ständige Offenheit für Fragen.

Danken möchte ich auch allen anderen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, wie Thomas Krakau, Philipp Vieren und Heike Reiferscheid.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich das Studium und die Promotion nicht geschafft hätte.

9.2 ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.
