

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Charité – Unviversitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Wirkung von
Dexamethason auf CD3/CD28- stimulierte
CD4⁺ - T-Zellen unter Sauerstoffmangel
(Hypoxie)**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Unviversitätsmedizin Berlin

Kerem Benjamin Erekul

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Buttgereit
 2. Prof. Dr. med. G. Keyßer
 3. Prof. Dr. med. A. Krause

eingereicht: 09.01.2008

Datum der Promotion: 23.06.2008

Abstrakt

Einleitung: Die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist charakterisiert durch das Synovium infiltrierende, aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten und das Vorkommen hypoxischer Areale. Die Hypoxie führt zur Stabilisierung des aus einer alpha- und beta-Untereinheit bestehenden Transkriptionsfaktors HIF-1, welcher über die Regulation seiner Zielgene T-Zell- Funktionen beeinflusst. Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Interaktionen zwischen der Aktivierung, Dexamethason und Hypoxie bestehen.

Methoden: Die Gewinnung von CD4⁺- T-Lymphozyten erfolgte aus dem Blut gesunder Spender. Die Zellen wurden für 20 Stunden unter Norm- bzw. Hypoxie inkubiert. Es wurde der Einfluss einer CD3/CD28- Aktivierung und unterschiedlicher Dosen Dexamethason bzw. des Steroidrezeptorantagonisten RU486 auf die mRNA- und Proteinexpression von HIF-1alpha und die mRNA- Expression der RA- relevanten HIF-1- Zielgene GAPDH, GLUT-1, MIF, PBEF und CXCR4 mittels Westernblot und Real-Time- PCR bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durchflusszytometrisch gemessen.

Ergebnisse und Interpretation: Hypoxie führt in T-Zellen zur Stabilisierung von HIF-1alpha, welches die mRNA- Expression von RA- relevanten HIF-1- Zielgenen induziert. Die Aktivierung der T-Zellen führt zu einer deutlichen Steigerung der HIF-1alpha- Proteinexpression, bewirkt aber keine entsprechende Verstärkung der HIF-1- Zielgenexpression. Zugleich wird unter Hypoxie bei aktivierten T-Zellen eine signifikante Vermehrung des Anteils von RA- typischen, CD69⁺/CD25⁻ T-Zellen beobachtet. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hypoxie nicht nur eine Begleiterscheinung von chronischen Entzündungen wie der RA darstellt, sondern besondere Relevanz für deren Pathogenese hat. Zur Behandlung der RA werden Glukokortikoide wie Dexamethason eingesetzt. In vitro bewirkt Dexamethason eine dosisabhängige Abschwächung der HIF-1alpha- Proteinexpression von aktivierten T-Lymphozyten ohne aber zu einer entsprechenden Reduktion der HIF-1- Zielgenexpression zu führen. Beim HIF-1 Zielgen CXCR4 bewirken Dexamethason und Hypoxie sogar eine synergistische Hochregulation der mRNA- Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass Dexamethason die Adaptationsprozesse von T-Lymphozyten an Hypoxie beeinflusst. In zukünftigen Medikamentenstudien sollte der Einflussfaktor Hypoxie deshalb berücksichtigt werden.

Abstract

Introduction: The pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) is characterized by activated CD4⁺- T- Lymphocytes infiltrating the synovium and hypoxic areas in the inflamed tissue. Hypoxia leads to the stabilization of the transcription factor HIF-1, a heterodimer of an alpha- and beta- subunit. Through regulation of its target genes, HIF-1 modulates T-cell functions. The aim of this study was to examine adaptional processes of T-cells to hypoxic conditions in the RA- synovium and the influence of T-cell activation and the glucocorticoid dexamethasone.

Methods: CD4⁺-T-cells were isolated from the blood of healthy donors. The cells were incubated for 20 hours in normoxic or hypoxic conditions. The impact of CD3/CD28- activation and different doses of dexamethasone or the steroid receptor antagonist RU486 on the transcript- and protein expression of HIF-1alpha and the transcript expression of the RA-relevant HIF-1 target genes GAPDH, GLUT-1, CXCR4, MIF and PBEF was measured using western blot and real-time PCR. The impact of hypoxia on the surface expression of activation markers CD25 and CD69 was measured by flow cytometry.

Results and discussion: Hypoxia leads to the stabilization of HIF-1alpha and increases the transcript expression of HIF-1- target genes, relevant for RA. Activation induces an up-regulation of HIF-1alpha protein expression under hypoxia. However, HIF-1-target gene expression is not enhanced further in activated T-lymphocytes. In addition, the proportion of CD69⁺/CD25⁻ T-cells typically found in RA patients is increased in activated T-cells under hypoxia. The experiments show that hypoxia is not simply side effect of chronic inflammatory diseases, such as RA, but instead is a relevant pathogenic factor. Glucocorticoids like dexamethasone are commonly used for treatment of RA- patients. In vitro, Dexamethasone leads to a dose-dependent abrogation of HIF-1alpha- protein expression of activated T-cells. However, this does not lead to an observable decrease in transcript expression of HIF-1 target genes. Moreover, dexamethasone leads to synergistic upregulation of the HIF-1 target gene CXCR4 in hypoxic T-cells. These results show that dexamethasone influences the adaptional processes of T-lymphocytes to hypoxia. Therefore, hypoxia should be taken into consideration in future pharmacological studies.

Schlagwörter:

Rheumatoide Arthritis, RA, Entzündung, Aktivierung, T-Zellen, Hypoxie, CD3, CD4, CD25, CD28, CD69, HIF-1alpha, Dexamethason, GLUT-1, GAPDH, PBEF, MIF, CXCR4

Keywords:

Rheumatoid arthritis, RA, inflammation, activation, t-cells, hypoxia, CD3, CD4, CD25, CD28, CD69, HIF-1alpha, dexamethasone, GLUT-1, GAPDH, PBEF, MIF, CXCR4

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	15
1.1 BEDEUTUNG UND VORKOMMEN VON HYPOXIE IM ORGANISMUS	15
1.2 NACHWEIS VON HYPOXIE BEI DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS (RA).....	16
1.3 DIE AKTIVIERUNG VON CD4 ⁺ - T-LYMPHOZYTEN	17
1.4 DER ENERGIESTOFFWECHSEL VON RUHENDEN UND AKTIVIERTEN T- LYMPHOZYTEN UNTER NORMOXIE UND HYPOXIE	19
1.4.1 <i>Der Energiestoffwechsel von ruhenden T-Lymphozyten unter normoxischen Bedingungen</i>	20
1.4.2 <i>Der Energiestoffwechsel von ruhenden T-Lymphozyten unter hypoxischen Bedingungen</i>	20
1.4.3 <i>Der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten unter Normoxie</i>	21
1.4.4 <i>Der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie</i>	22
1.5 DIE ZELLULÄRE DETEKTION UND ADAPTATION AN HYPOXIE DURCH DEN HYPOXIE- INDUZIERTEN- FAKTOR -1 (HIF-1).....	23
1.5.1 <i>Der Mechanismus der proteasomalen HIF-1α Degradation unter Normoxie</i>	23
1.5.2 <i>Der Mechanismus der HIF-1α Stabilisierung unter Hypoxie</i>	24
1.6 DIE ZIELGENE DES HYPOXIE- INDUZIERTEN FAKTORS- 1 (HIF-1).....	25
1.6.1 <i>Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)</i>	26
1.6.2 <i>Das Zytokin Macrophage migration inhibitory factor (MIF)</i>	27
1.6.3 <i>Das Adipokin pre B-cell colony- enhancing factor (PBEF)</i>	27
1.7 DIE BEDEUTUNG UND WIRKUNG VON ENDOGENEN UND EXOGENEN GLUKOKORTIKOIDEN BEI CHRONISCHEN ENTZÜNDUNGEN WIE DER RA	28
1.7.1 <i>Der molekulare Wirkmechanismus von Glukokortikoiden</i>	28
2 ÜBERLEITUNG ZUR FRAGESTELLUNG	30
3 MATERIAL UND METHODEN	33

3.1	GEWINNUNG PERIPHERER MONONUKLEÄRER ZELLEN (PBMC)	33
3.1.1	<i>Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation</i>	33
3.1.2	<i>Isolierung der CD4⁺- Zellen durch magnetische Zellsortierung</i>	33
3.1.3	<i>Bestimmung der Reinheit und des Überlebens mittels Durchflußzytometrie</i>	34
3.1.4	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	35
3.2	STIMULATION UND BEHANDLUNG DER CD4 ⁺ - T- LYMPHOZYTEN	36
3.3	ZELLKULTUR	37
3.4	STIMULATIONS- UND VITALITÄTSKONTROLLE NACH 20 STUNDEN INKUBATION.....	38
3.5	SDS- PAGE (SODIUM- DODECYLSULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS) UND WESTERNBLOT- ANALYSE ZUR PROTEINBESTIMMUNG	39
3.5.1	<i>SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)</i>	40
3.5.2	<i>Nachweis von HIF- 1α</i>	41
3.5.3	<i>Nachweis des Strukturproteins β-Aktin</i>	42
3.6	AUFARBEITUNG DER RNA UND UMSCHREIBEN IN CDNA	42
3.6.1	<i>Isolierung der RNA</i>	42
3.6.2	<i>Umschreiben in cDNA</i>	43
3.7	LIGHT CYCLER REAL TIME PCR.....	44
4	ERGEBNISSE	47
4.1	ERSTER TEIL DER ERGEBNISSE	47
4.1.1	<i>Einfluss von Hypoxie und CD3/CD28- Aktivierung auf die Vitalität der CD4⁺- T-Lymphozyten</i>	47
4.1.2	<i>Einfluss von Hypoxie auf die HIF-1α- mRNA- Expression</i>	48
4.1.3	<i>Einfluss von Hypoxie auf die HIF-1α- Proteinexpression</i>	49
4.1.4	<i>Zusammenfassung der Untersuchungen zur HIF-1α- mRNA- und Proteinexpression</i>	51
4.1.5	<i>Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen</i>	51
4.1.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	54
4.1.7	<i>Einfluss der Hypoxie auf die Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten</i>	55
4.1.8	<i>Zusammenfassung</i>	62
4.2	ZWEITER TEIL DER ERGEBNISSE	62
4.2.1	<i>Einfluss von Dexamethason und RU486 auf die Vitalität der CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie</i>	62
4.2.2	<i>Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1α- mRNA- Expression</i>	62

4.2.3	<i>Einfluss von Dexamethason und RU486 auf die HIF-1α- Proteinexpression bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie bzw. Hypoxie.....</i>	64
4.2.4	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1α- mRNA- und Proteinexpression.....</i>	65
4.2.5	<i>Einfluss von Dexamethason auf die mRNA- Expression von HIF-1 Zielgenen</i>	66
4.2.6	<i>Zusammenfassung</i>	69
5	DISKUSSION	74
5.1	EINFLUSS DER CD3/CD28- AKTIVIERUNG AUF DIE REGULATION VON HIF-1A UND HIF-1- ZIELGENEN IN CD4 ⁺ - T-LYMPHOZYTEN	74
5.2	EINFLUSS DER HYPOXIE AUF DIE AKTIVIERUNG VON T- LYMPHOZYTEN.....	77
5.3	INTERAKTIONEN ZWISCHEN DER GLUKOKORTIKOID- UND DER HYPOXIESIGNALKASKADE	81
5.4	INTERAKTIONEN ZWISCHEN DER GLUKOKORTIKOID- UND CD3/CD28- AKTIVIERUNGSSIGNALKASKADE VON T-LYMPHOZYTEN	83
5.5	BEDEUTUNG DER EINFLÜSSE VON CD3/CD28- AKTIVIERUNG, HYPOXIE UND DEXAMETHASON AUF DIE UNTERSUCHTEN HIF-1 ZIELGENE.....	85
5.5.1	<i>Der Hypoxie- induzierte Faktor- 1α (HIF-1α).....</i>	85
5.5.2	<i>Das Glykolyseenzym GAPDH und der Glukosetransporter- 1 (GLUT-1)</i>	87
5.5.3	<i>Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4).....</i>	89
5.5.4	<i>Das Zytokin Macrophage migration inhibitory factor (MIF)</i>	91
5.5.5	<i>Das Adipokin pre- B cell colony enhancing factor (PBEF).....</i>	92
6	ZUSAMMENFASSUNG MIT BEZUG AUF DIE RHEUMATOIDE ARTHRITIS	94
	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
	ANHANG	102
	DANKSAGUNG	102
	LEBENS LAUF	103
	EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	104

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Acetyl- CoA	Acetyl- Coenzym A
ACTB	Genname für β - Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Adjuvant- induzierte- Arthritis
AICD	activation induced cell death
AP-1	activator protein- 1
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat

B

BSA	Bovine serum albumin
-----	----------------------

C

Ca ²⁺	Kalzium
CAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB- binding protein
CD	cluster of differentiation
CDNA	klonale DNA

CO ₂	Kohlendioxid
Cp	crossing point
CREB	cAMP response element- binding protein
CRP	C- reaktives Protein
CTAD	C- terminale Aktivierungsdomäne
CTLs	Zytotoxische T- Zellen
CXCR4	Chemokin C-X-C Rezeptor 4

D

Da	Dalton
DAS28	disease activity score an 28 Gelenken
DCs	Dendritische Zellen
DEXA	Dexamethason
DNA	desoxyribonuclein acid
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum

E

EPO	Erythropoetin
-----	---------------

F

FACS	flourescent- activated cell sorting
FIH	factor inhibiting HIF
FITC	Fluorescin isothiocyanate
FSC	Forwärtsstreulicht

G

g	Gravitationskraft
GAPDH	Glyceraldehyd- 3- phosphat- Dehydrogenase
GC	Glukokortikoid
GCR	Glukokortikoidrezeptor
GLUT-1	Glukosetransporter-1
GRE	glucocorticoid responsive element

H

HIF	Hypoxie- Induzierter- Faktor
HIV	human immundeficient virus
HK-2	human proximal tubular epthel cells
HLA	human leukocyte antigen
HREs	hypoxia responsive elements
HRP	horserdish peroxidase
HSP	heat shock protein
H ₂ O	Wasser

I

IL-2	Interleukin- 2
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
IFN-γ	Interferon-γ

L

LDH Laktat- Dehydrogenase

M

MACS Magnetische Zellsortierung

MAPK/ERK = MEK mitogen activated protein kinase/extracellular signal
regulated kinase

MFI Median der Fluoreszenzintensität

MgCl₂ Magnesiumchloride

mGCR Membranständiger Glukokortikoidrezeptor

MIF Macrophage migration inhibitory factor

MMPs Matrix- Metalloproteinasen

mRNA messenger RNA

N

N₂ Stickstoff

NAD Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid

NADH Reduziertes NAD

NFAT Nuclear factor of activated cells

NFκB Nuclear- factor κB

NTAD N- terminale Aktivierungsdomäne

O

O₂ Sauerstoff

ODDs	Oxygen dependent degradation domains
P	
P	Phoshat
PBEF	Pre B-cell colony enhancing factorl
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PE	phycoerythrin
PHDs	Prolyl hydroxylase domain- containing enzymes
PI	Propidiumjodid
PI3K/Akt	Phopho- Inositol-3 Kinase/Akt
PMA	phorbol myristate acetate
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidifluorid
PVHL	Von Hippel- Lindau gene product
R	
RA	Rheumatoide Arthritis
Rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RU486	Mifepriston

S

SDF-1 = CXCL-12	Stroma cell-derived factor
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Seitwärtsstreulicht

T

TBS	Tris-buffered saline
TCA	Tricarboxylic acid cycle (Citratzyklus)
TCR	T- Zell- Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TEMED	Tetra- methyl- ethylenediamine
TNF α	Tumor- Nekrose Faktor α

V

VEGF	Veneral endothelial growth factor
------	-----------------------------------

1 Einleitung

Der menschliche Organismus ist vielfältigen, teilweise extremen, Einflüssen aus seiner Umgebung ausgesetzt. Beispiele hierfür sind Umweltfaktoren wie Klima und Strahlung, aber auch Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Dennoch schafft es der Organismus zumeist, elementare Funktionen wie die Atmung, den Blutkreislauf oder die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Diese Regulation des „inneren Milieus“ wird Homöostase genannt. Eine der wichtigsten Regelgrößen ist der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO_2). Durch zahlreiche Regelprozesse wird der arterielle pO_2 unter physiologischen Bedingungen konstant bei 95mmHg (12,6kPa) gehalten. Sinkt der arterielle pO_2 auf Werte von < 70 mmHg, ist die ausreichende Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder bestimmter Körperregionen nicht mehr gewährleistet. Der Sauerstoffbedarf übersteigt das Angebot. Es herrscht Hypoxie [2].

1.1 Bedeutung und Vorkommen von Hypoxie im Organismus

Schon unter physiologischen Bedingungen weisen einige Gewebe aufgrund ihrer geringen Vaskularisierung relativ niedrige Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) auf. So wurden im Thymus von narkotisierten Mäusen Gewebe- Sauerstoffpartialdrücke von durchschnittlich 10mmHg (1,3kPa) gemessen [3]. In vivo Messungen des pO_2 in der Milz von narkotisierten Mäusen variierten von 4- 34mmHg (0,5- 4,5kPa) [4]. Der pO_2 war in der Nähe der Milzarterie am höchsten und nahm mit zunehmender Entfernung kontinuierlich ab. Die Erklärung hierfür liefert das erste Fick'sche Diffusionsgesetz, das besagt, dass die pro Zeiteinheit diffundierende Teilchenmenge u.a. abhängig ist von der Distanz zwischen den Messpunkten (der Diffusionsstrecke).

Fick'sches Diffusionsgesetz in Worten:

die pro Zeiteinheit diffundierende Stoffmenge (hier: Sauerstoff) ist abhängig vom Konzentrationsgradienten (der pO_2 -Differenz), der Distanz zwischen den Messpunkten (der Diffusionsstrecke) und der Permeabilität (Größe und Beschaffenheit der Austauschfläche, an der die Diffusion stattfindet).

Pathologische Prozesse führen häufig zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung von Geweben. Ursache hierfür kann eine global verschlechterte Sauerstoffversorgung des Organismus durch Atmungs- und Herz-Kreislaufstörungen oder Anämie sein. Die Folge ist eine Abnahme des arteriellen pO_2 . Auch die lokal gestörte Perfusion von Gefäßen (z.B. bei Thrombembolien), Diffusionsstörungen durch Verlängerung der Diffusionsstrecke (z.B. bei Lungenödem) oder ein lokal gesteigerter Bedarf an Sauerstoff (z.B. bei schnell wachsenden Tumoren) [5, 6] können einen relativen Sauerstoffmangel im Gewebe herbeiführen. In chronisch entzündeten Geweben, wie bei der Rheumatoiden Arthritis (RA), werden viele Faktoren des Fick'schen Diffusionsgesetzes negativ beeinflusst. Und tatsächlich ist die RA durch das Vorkommen von sauerstoffarmen (hypoxischen) Arealen gekennzeichnet [7].

1.2 Nachweis von Hypoxie bei der Rheumatoiden Arthritis (RA)

Bereits 1970 wurden erste Studien veröffentlicht, die zeigten, dass die Synovia (von der Synovialis gebildete Flüssigkeit) aus dem Knie von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich reduzierte Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) aufwies [8-10]. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise auf die anaerobe Energiegewinnung im Synovialgewebe von RA- Patienten. Die Glukosekonzentration in der Synovia war verringert, während sich eine erhöhte Laktatkonzentration zeigte. In nachfolgenden Studien wurden diese Ergebnisse inzwischen durch intraartikuläre Messungen mit Mikroelektroden sowohl im murinen- als auch im humanen RA- Gelenk bestätigt [11]. Weiterhin konnte in einem Rattenmodell mit adjuvant induzierter Arthritis (AIA- Modell) gezeigt werden, dass nicht nur das Synovialgewebe, sondern auch der entzündliche Pannus, das Knochenmark und der Knorpel dieser Tiere hypoxische Areale zeigte [7].

Als Ursache für die Entstehung hypoxischer Areale im entzündeten Gelenk der RA werden die folgenden pathophysiologischen Vorgänge angesehen [12, 13]:

Perfusionsstörungen: Im Rahmen der chronischen Entzündung resultieren Durchblutungsstörungen. So kann z.B. der venöse Abfluss durch entzündungsbedingte Thrombosen gestört sein. Neben der resultierenden Mikrozirkulationsstörung führt der Blutstau zur Rötung und Schwellung des entzündeten Gelenks. Entzündliche Exsudate

lassen die Schwellung weiter zunehmen, so dass der intraartikuläre Druck ansteigt. Insbesondere bei Bewegungen des Gelenks können intraartikuläre Drücke von bis zu 300mmHg entstehen [13]. Versorgungsgefäße werden durch den hohen Druck komprimiert und die Mikrozirkulationsstörungen im entzündeten Gewebe nehmen weiter zu.

Diffusionsstörungen: Exsudate, Infiltrate und proliferative Vorgänge im entzündeten Gelenk führen zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke zwischen den versorgenden Blutgefäßen und den durch diese zu versorgenden Zellen. Das Sauerstoff-Diffusionslimit von 100- 200µm wird überschritten [8, 12].

Erhöhter Sauerstoffbedarf: Infiltrierende Zellen und proliferative Vorgänge im entzündeten Gewebe erhöhen zusätzlich den Bedarf an Sauerstoff (O₂) und Nährstoffen zur Energiegewinnung, so dass der relative Sauerstoffmangel im Gewebe weiter ansteigt [12].

Gestörte Gefäßneubildung (Angioneogenese): Um dem Sauerstoffmangel im entzündeten Gewebe entgegenzuwirken, wird die Angioneogenese angeregt. Arthroskopische und mikroskopische Untersuchungen von synovialen Biopsaten zeigten eine erhöhte Kapillarisation des Gewebes [13]. Durch die fortwährend bestehenden Entzündungsprozesse ist die Organisation der Angioneogenese aber so stark beeinträchtigt, dass die Sauerstoffhomöostase im Gelenk dennoch nicht aufrechterhalten werden kann.

Das entzündete Synovialgewebe von RA- Patienten ist durch Hyperplasie, hypoxische Areale bei gleichzeitig erhöhter Vaskularität und infiltrierende Immunzellen gekennzeichnet. Eine der größten Gruppe dieser Immunzellen bilden aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten [14]. Sie sind die Initiatoren der erworbenen antigenspezifischen Immunabwehr und müssen durch Immunzellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems aktiviert werden.

1.3 Die Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten

Die Aktivierung der CD4⁺- T-Lymphozyten erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen (DCs). Diese Immunzellen phagozytieren Antigene wie z.B. Erreger oder beschädigte körpereigene Gewebe. Im Inneren der APCs wird das Antigen durch Phagosomen in Peptidfragmente gespalten. Diese Peptidfragmente werden an der Zelloberfläche durch spezifische HLA-

Proteine (human leukocyte antigen) präsentiert. CD4⁺- T-Lymphozyten erkennen selektiv das HLA- Klasse- II- Protein durch den T-Zell- Rezeptor- Komplex (TCR-Komplex), der auch als CD3-Komplex bezeichnet wird. Normalerweise wird der Aktivierungsprozess der CD4⁺- T-Lymphozyten nur fortgesetzt, wenn es sich bei dem präsentierten Protein um ein Fremdanigen handelt. Gegen ein körpereigenes Protein (Autoantigen) zeigen CD4⁺- T-Lymphozyten normalerweise Toleranz. Wird die Toleranz der CD4⁺- T-Lymphozyten gestört, reagieren sie autoreaktiv, und es können z.B. Autoimmunerkrankungen wie die RA entstehen [15]. Um die CD4⁺- T-Lymphozyten vollständig zu aktivieren, ist neben der antigenspezifischen Stimulation über den TCR eine Co- Stimulation notwendig [16]. Der erste entdeckte co- stimulatorische Rezeptor auf T- Lymphozyten war CD28 [17]. CD28 wird durch das auf APCs exprimierte B7.1 und B7.2 stimuliert [18]. Seit der Entdeckung von CD28 hat die Zahl der als co- stimulatorisch geltenden Moleküle stark zugenommen [19]. In vitro und in vivo Experimente zeigten aber, dass CD28 weiterhin das primäre co- stimulatorische Signal für naive und ruhende CD4⁺- T-Lymphozyten ist [16]. Naive und ruhende CD4⁺- T-Lymphozyten wandeln sich nach erfolgreicher CD3/CD28- Stimulation in aktivierte CD4⁺- T- Effektorzellen um und vermitteln die zelluläre Immunabwehr durch die Aktivierung weiterer Immunzellen. Erfolgt eine Stimulation über den CD3- Komplex ohne ein co- stimulatorisches Signal, wird die Zelle inaktiviert (anergisch) oder stirbt den Aktivierungs- induzierten- Zelltod (activation induced cell death, AICD) [15]. Aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten können durch die Expression von Oberflächenproteinen und die verstärkte Sekretion von bestimmten Zytokinen charakterisiert werden. Zu den an der Oberfläche exprimierten Aktivierungsmarkern gehören CD25 (die α -Untereinheit vom Interleukin 2 Rezeptor, IL-2R α) und CD69. Die Zahl der CD69- positiven (CD69⁺) Zellen erreicht 20 bis 24 Stunden nach der erfolgreichen Aktivierung ihr Maximum, die Zahl der CD25 positiven Zellen (CD25⁺) nach frühestens 72 Stunden. Nach etwa 24 Stunden beginnen die CD4⁺- T-Lymphozyten zu proliferieren [20]. Auch die bei der RA im entzündeten Gewebe gefundenen CD4⁺- T-Lymphozyten tragen vermehrt den Aktivierungsmarker CD69 auf ihren Zellmembranen, weshalb im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass sie im Rahmen der Erkrankung aktiviert wurden [14]. Im Gegensatz zu CD69 wird der Aktivierungsmarker CD25 allerdings kaum von den CD4⁺- T-Lymphozyten im chronisch entzündeten Gelenk der RA- Patienten exprimiert, weshalb einige Autoren von einer unvollständigen Aktivierung ausgehen [21].

1.4 Der Energiestoffwechsel von ruhenden und aktivierten T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie

Auf der Suche nach Antigenen patrouillieren naive $CD4^+$ -T-Lymphozyten kontinuierlich im peripheren Blutkreislauf und in den Lymphwegen zu den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten, Milz), bis sie durch Präsentation ihres spezifischen Antigens aktiviert werden. Hierbei sind sie unterschiedlichen Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt. Während sie im arteriellen Blut „optimale“ Sauerstoffbedingungen vorfinden, herrscht in chronisch entzündeten Geweben der RA *Hypoxie* (**Abbildung 1**). Sowohl *Hypoxie* als auch die *Aktivierung* der $CD4^+$ -T-Lymphozyten führen zu einschneidenden Veränderungen des zellulären Energiestoffwechsels. Diese Veränderungen gewährleisten die *Homöostase* der Energieversorgung der $CD4^+$ -T-Lymphozyten unter physiologisch und pathophysiologisch wechselnden Umgebungsbedingungen (**Abbildung 1**).

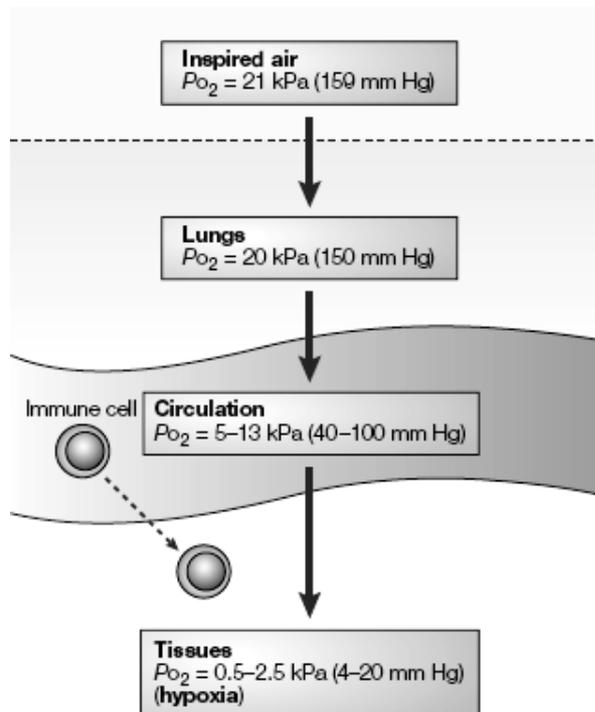


Abbildung 1 aus [1]: Sauerstoffpartialdrücke (P_{O_2}) in den unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers im Vergleich zur eingeatmeten Raumluft.

Der P_{O_2} nimmt von der eingeatmeten Raumluft mit 21 kPa (159 mmHg) in der Lunge auf 20 kPa (150 mmHg) ab. Im Blut sinkt der P_{O_2} von 13 kPa (100 mmHg) direkt nach der Lungenpassage auf bis zu 5 kPa (40 mmHg) im venösen System ab. In verschiedenen Geweben sinkt der P_{O_2} , in Abhängigkeit von der Entfernung von versorgenden Blutgefäßen, schon unter physiologischen Bedingungen teilweise auf Werte zwischen 0,5-2,5 kPa (4-20 mmHg). Immunzellen zirkulieren einerseits im Blut, aber migrieren auch in hypoxische Gewebe und sind deshalb im besonderen Maße den P_{O_2} -Schwankungen ausgesetzt.

1.4.1 Der Energiestoffwechsel von ruhenden T-Lymphozyten unter normoxischen Bedingungen

Die Energiegewinnung (Adenosintriphosphat (ATP)- Gewinnung) von ruhenden T-Lymphozyten erfolgt unter normoxischen Bedingungen in erster Linie über die vollständige Oxidation von Glukose über die Glykolyse, den Citratzyklus (*tricarboxylic acid cycle*, TCA) und die mitochondriale Atmungskette [1, 22]. Bei der Glykolyse werden ein Mol Glukose zu zwei Mol Pyruvat gespalten. Durch die *Substratkettenphosphorylierung* werden dabei zwei Mol ATP pro Mol Glukose gewonnen. Das Pyruvat wird über die mitochondriale Pyruvat- Dehydrogenase (PDH) in Acetyl- CoA umgewandelt. Dieses wird in den Citratzyklus eingeschleust und oxidativ abgebaut. In Zusammenarbeit mit der eng an den Citratzyklus gekoppelten mitochondrialen Atmungskette wird hier durch *oxidative Phosphorylierung* ATP gewonnen. Diese Form der Energiegewinnung ist sehr effizient. Aus einem Mol Glukose können bis zu 38 Mol ATP generiert werden. Diese Zusammenhänge sind in der **Abbildung 2** dargestellt.

1.4.2 Der Energiestoffwechsel von ruhenden T-Lymphozyten unter hypoxischen Bedingungen

Während unter normoxischen Bedingungen die Gewinnung von ATP hauptsächlich durch die *oxidative Phosphorylierung* in der mitochondrialen Atmungskette erfolgt, ist dies unter hypoxischen Bedingungen nicht möglich (**Abbildung 2**) [23, 24]. Die Energiegewinnung kann nur noch über die *Substratkettenphosphorylierung* der *anaeroben Glykolyse* erfolgen. Das entstehende Pyruvat akkumuliert in der Zelle und wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat abgebaut, welches aus der Zelle ausgeschleust werden kann. Diese Form der Energiegewinnung ist weit weniger effizient, da aus einem Mol Glukose nur zwei Mol ATP gewonnen werden. In der Bilanz entsteht bei der *anaeroben Glykoklyse* also mindestens 15 Mal weniger ATP pro Mol Glukose als bei der vollständigen Oxidation der Glukose über den Citratzyklus und die mitochondriale Atmungskette. Um dennoch auch unter hypoxischen Bedingungen eine ausreichende Energiegewinnung (ATP- Gewinnung) zu erreichen, muss der Glukoseumsatz drastisch gesteigert werden. Zum einen wird hierfür die Glukoseaufnahme durch den verstärkten Einbau des Glukosetransporters 1 (GLUT-1) in die Zellmembran gesteigert. Weiterhin wird die Glukose vermehrt in der Glykolyse

umgesetzt. Hierzu werden unter hypoxischen Bedingungen Glykolyseenzyme wie die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) vermehrt synthetisiert. Auf diese Weise kann die Zelle, ohne auf Sauerstoff angewiesen zu sein, ausreichend ATP gewinnen. Allerdings steigt der Glukosebedarf massiv an [1].

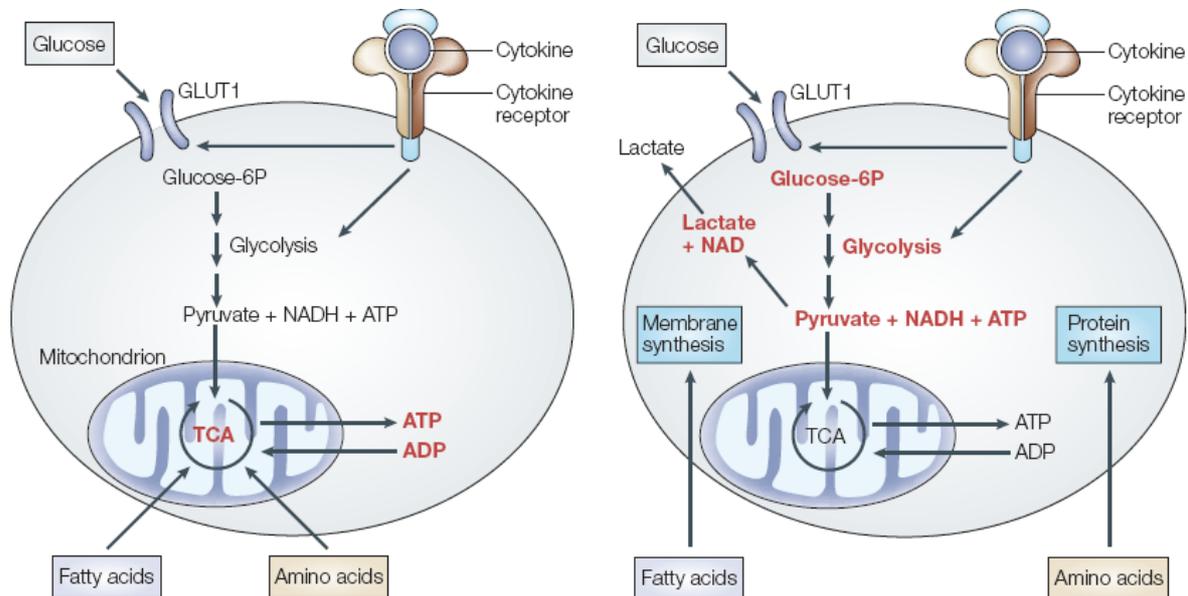


Abbildung 2 aus [22]: Energiestoffwechsel von T-Lymphozyten.

Links ist die Energiegewinnung von ruhenden T-Lymphozyten unter normoxischen Bedingungen dargestellt. Glukose gelangt über Glukosetransporter (GLUT-1) in die Zelle. Über die Glykolyse erfolgt die Umwandlung von Glukose in Pyruvat. Dieses wird im Citratzyklus (TCA) und der anschließenden mitochondrialen Atmungskette vollständig oxidiert, wobei ATP aus ADP entsteht. Die für die ATP-Gewinnung entscheidenden Prozesse sind rot gedruckt. Auch Fettsäuren (Fatty acids) und Aminosäuren (Amino acids) werden zur Energiegewinnung herangezogen. Signale über Zytokinrezeptoren können die Stoffwechselprozesse beeinflussen.

Rechts ist die Energiegewinnung eines ruhenden T-Lymphozyten unter hypoxischen Bedingungen bzw. eines CD3/CD28-aktivierten (proliferierenden) T-Lymphozyten unter normoxischen Bedingungen gezeigt. Die Glukose kann nicht mehr über die Atmungskette verstoffwechselt werden. Das in der Glykolyse entstehende Pyruvat akkumuliert und wird zu Laktat metabolisiert, das aus der Zelle ausgeschleust wird. Fettsäuren und Aminosäuren werden bei aktivierten T-Zellen nicht mehr zur Energiegewinnung herangezogen, da sie für anabole Stoffwechselprozesse benötigt werden.

1.4.3 Der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten unter Normoxie

Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist ein Prozess, der den Energiebedarf der Zellen deutlich ansteigen lässt. CD3/CD28-stimulierte CD4⁺-T-Lymphozyten nehmen an Größe zu (Blastogenese) und beginnen zu proliferieren. Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) und Oberflächenmoleküle wie CD69 werden vermehrt synthetisiert [15]. Um den hohen Energiebedarf dieser und anderer aktivierungsbedingter Prozesse decken zu können, unterliegt der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten drastischen Veränderungen (**Abbildung 2**). Genau wie unter Hypoxie wird der Glukoseumsatz

durch die verstärkte Synthese des Glukosetransporters 1 (GLUT 1) und von Glykolyseenzymen wie GAPDH gesteigert. Gleichzeitig wird die *oxidative Phosphorylierung* in der mitochondrialen Atmungskette unterdrückt. Das Pyruvat wird nicht mehr über den Citratzyklus (TCA) metabolisiert, sondern durch die LDH zu Laktat abgebaut und aus der Zelle ausgeschleust. De facto erfolgt die Energiegewinnung von aktivierten T- Lymphozyten genau wie unter Hypoxie im Wesentlichen durch die *Substratkettenphosphorylierung* der Glykolyse. Zur Abgrenzung von der *anaeroben Glykolyse* unter hypoxischen Bedingungen wird diese Form der Energiegewinnung aber als *aerobe Glykolyse* (Warburg- Effekt) bezeichnet. [22].

Untersuchungen haben gezeigt, dass die alleinige Stimulation der CD4⁺- T- Lymphozyten über den T- Zell- Rezeptor- Komplex (CD3) nicht zur Energiegewinnung über die aerobe Glykolyse führt. Nur die vollständige Aktivierung der Zellen durch die Stimulation über CD3 und die gleichzeitige Co- Stimulation über CD28 initiiert die *aerobe Glykolyse* [25]

1.4.4 Der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie

Bis heute gibt es keine Untersuchungen dazu, ob der Energiestoffwechsel von aktivierten T-Lymphozyten durch Sauerstoffmangel beeinflusst wird. Da CD3/CD28-aktivierte T-Lymphozyten ihre Energie vornehmlich durch die *Substratkettenphosphorylierung* der *aeroben Glykolyse* gewinnen, d.h. ohne auf Sauerstoff angewiesen zu sein, ist anzunehmen, dass Sauerstoffmangel zu keinen wesentlichen Veränderungen in ihrem Energiestoffwechsel führen sollte. Auf der anderen Seite sind sowohl Hypoxie als auch die CD3/CD28- Stimulation sehr starke Signale, die jeweils zu massiven Veränderungen im Transkriptom der T-Lymphozyten führen. Experimente unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ca. 1300 Gene unter Hypoxie differentiell exprimiert wurden. Bei der CD3/CD28- Stimulation sind es etwa 200 Gene [20]. Einige Untersuchungen zeigen zudem, dass es Interaktionen zwischen der Hypoxie und der Aktivierungs- Signalkaskade gibt [26-28], die auch zu Veränderungen des Energiestoffwechsels führen könnten. Um den Einflussfaktor Hypoxie verstehen zu können, werden nachfolgend die molekularen Ereignisse erläutert, die durch Hypoxie verursacht werden.

1.5 Die zelluläre Detektion und Adaptation an Hypoxie durch den Hypoxie- induzierten- Faktor -1 (HIF-1)

Ein Meilenstein in der Erforschung der zellulären Adaptationsprozesse bei Hypoxie war die Entdeckung des Hypoxie- induzierten- Faktors- 1 (HIF-1) durch Semenza et al. [29, 30]. Vermutlich werden die meisten Adaptationsprozesse von T-Lymphozyten an hypoxische Umgebungsbedingungen über HIF-1 vermittelt. Darüber hinaus wurden in jüngster Zeit immer mehr Funktionen von HIF-1 entdeckt, die deutlich machen, dass HIF-1 auch an immunregulatorischen Prozessen intensiv beteiligt ist [31].

HIF-1 ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, d.h. er wird in wahrscheinlich jeder Zelle des Organismus gebildet. HIF-1 ist in seiner aktiven Form ein Heterodimer, bestehend aus den zwei Untereinheiten: HIF-1 α und HIF-1 β (**Abbildung 3**). HIF-1 α wird konstitutiv gebildet, aber i.d.R. nur unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α proteasomal degradiert. Da HIF-1 α zwar konstitutiv gebildet wird, aber nur unter hypoxischen Bedingungen erhalten bleibt, erfolgt die Regulation in erster Linie posttranslational. [29, 30].

1.5.1 Der Mechanismus der proteasomalen HIF-1 α Degradation unter Normoxie

Unter normoxischen Bedingungen wird die Degradation von HIF-1 α durch die Hydroxylierung von zwei Prolinresten (Pro-402 und Pro-564) an den Sauerstoff-abhängigen Degradationsdomänen (*oxygen dependent degradation domains, ODDs*) eingeleitet [32-34] (**Abbildung 3**). Die Hydroxylierung wird durch spezielle Enzyme, die PHDs (*prolyl hydroxylase domain- containing enzymes*), katalysiert und erfolgt in der Regel nur unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O₂). Das an den Prolinresten hydroxylierte HIF-1 α wird durch das Protein pVHL (*von Hippel- Lindau gene product*) erkannt und ubiquitiniert. Das pVHL ist Bestandteil eines Multiproteins, dem E3 Ubiquitin- Ligase Komplex. Das über pVHL ubiquitinierte HIF-1 α wird durch das 26S Proteasom abgebaut [35]. Darüber hinaus wird unter normoxischen Bedingungen auch ein Asparaginrest (Asp803) hydroxyliert. Diese Hydroxylierung wird durch das Enzym FIH (*factor inhibiting HIF*) katalysiert und verhindert die Rekrutierung wichtiger Co-Faktoren, wie CBP (*CREB- binding protein*) und p300 [36].

1.5.2 Der Mechanismus der HIF-1 α Stabilisierung unter Hypoxie

Unter hypoxischen Bedingungen (<5% O₂) bleibt die Hydroxylierung von HIF-1 α aus, so dass HIF-1 α stabilisiert wird (**Abbildung 3**). Das stabilisierte HIF-1 α gelangt aus dem Zytosol in den Zellkern und bindet an die dort lokalisierte β - Untereinheit HIF-1 β . HIF-1 β wird konstitutiv synthetisiert und unabhängig vom Grad der Oxygenierung stabilisiert. Im Zusammenspiel mit Co- Faktoren, wie CREB (*cAMP response element-binding protein*), CBP (*CREB binding protein*) und p300 bindet das aktive Heterodimer HIF-1 an den Promotorregionen von HIF-1- Zielgenen, den HREs (*hypoxia responsive elements*) [37]. Der Transkriptionskomplex HIF-1 reguliert hierdurch die Aktivität der HIF-1- Zielgene, was u.a. die Einleitung der zellulären Adaptationsprozesse an den Sauerstoffmangel bewirkt.

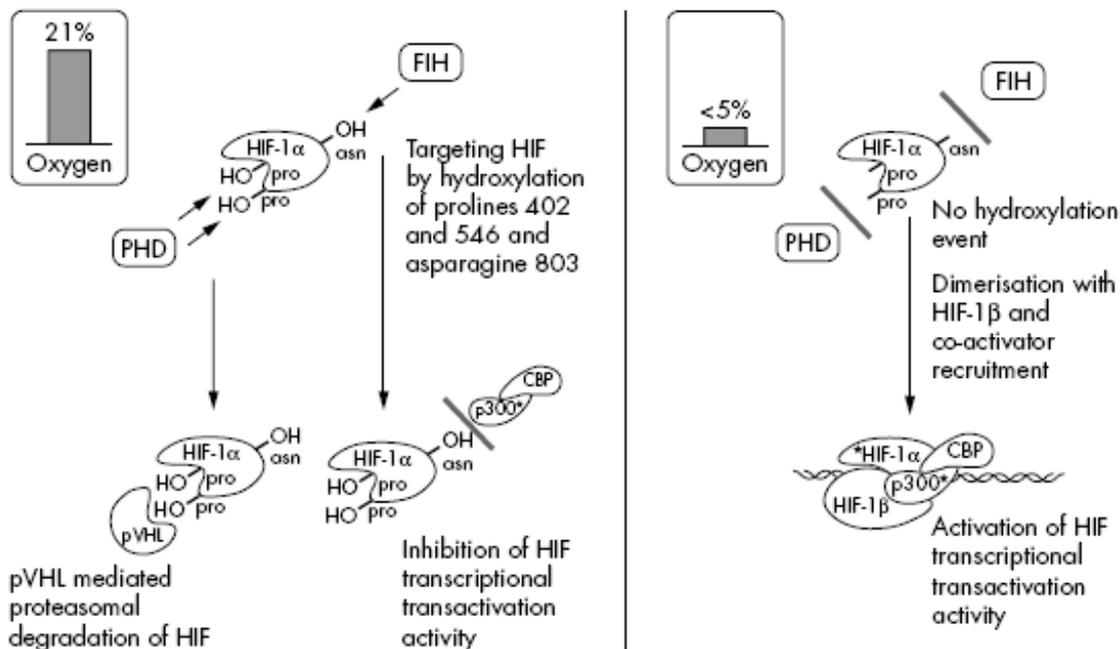


Abbildung 3 aus [12]: Sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 α .

Links ist die proteasomale Degradation von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff; der üblichen Sauerstoffkonzentration bei in vitro Versuchen) dargestellt.

Rechts ist die Stabilisierung von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen (< 5% Sauerstoff), die Dimerisation mit HIF-1 β , die Rekrutierung weiterer Co- Faktoren, wie CBP und p300 und die Bindung des HIF-1- Transkriptionskomplexes an die DNA dargestellt. Abkürzungen: HIF-1 α (Hypoxie- induzierter Faktor 1 α), PHD (prolyl hydroxylase domain-containing enzyme), FIH (factor inhibiting HIF), pVHL (von Hippel- Lindau gene product), CBP (CREB- binding protein).

Inzwischen wurden weitere Hypoxie- induzierte- Faktoren gefunden, über deren Bedeutung in T-Lymphozyten bisher noch weniger bekannt ist als über HIF-1 α . Zu diesen Faktoren gehören HIF-2 α und HIF-3 α [12]. Weiterhin existieren Isoformen von

HIF-1 α [38]. Diese entstehen durch das posttranskriptionelle alternative Spleißen der HIF-1 α - mRNA. Bei Mäusen führte die Aktivierung von T-Lymphozyten zur verstärkten Bildung bestimmter mausspezifischer HIF-1 α - Isoformen [39]. In humanen T-Lymphozyten konnte eine aktivierungsbedingte Induktion von HIF-1 α - Isoformen bislang aber nicht gezeigt werden.

1.6 Die Zielgene des Hypoxie- induzierten Faktors- 1 (HIF-1)

Bis heute konnten mehr als 70 HIF-1- Zielgene experimentell validiert werden [40]. Versuche an Endothelzellen, die durch Adenoviren mit konstitutiv aktivem HIF-1 α infiziert wurden, lassen vermuten, dass es in Abhängigkeit vom Zelltyp mehrere Hundert durch HIF-1 regulierte Gene geben könnte [41].

Die HIF-1- Zielgene lassen sich anhand ihrer Funktionen in mindestens drei Gruppen einordnen (**Tabelle 1**) :

- Gene, die zu einer Verbesserung der **zellulären Adaptation** an Sauerstoffmangel führen, indem sie die Glukoseaufnahme und den Glukoseumsatz durch die Glykolyse erhöhen und somit die anaerobe Energiegewinnung steigern.
- Gene, die zu einer **verbesserten Gewebeoxygenierung** führen, indem sie die Erythropoese und somit die Sauerstoffbindungskapazität des Blutes steigern und durch Angioneogenese und Vasodilatation die Gewebepfusion verbessern
- Gene, die sich nicht in die ersten beiden Gruppen einordnen lassen. Diese Gene greifen in verschiedenste Stoffwechselwege und Signalkaskaden ein und erfüllen z.T. auch wichtige immunologische Funktionen (in der **Tabelle 1** als *Sonstige Gene* bezeichnet).

Tabelle 1: Auswahl an HIF-1- regulierten Zielgenen [12, 42-44] und ihre jeweiligen Funktionen

GEN	Genfunktion
	Verbesserte Sauerstoffversorgung
EPO	Das Genprodukt Erythropoetin (EPO) wird in Nierenzellen gebildet. Der Wachstumsfaktor sorgt für eine gesteigerte Erythropoese, wodurch die Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus verbessert wird [12].
VEGF	Das Genprodukt VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>) wird von verschiedenen Zelltypen (auch CD4 ⁺ - T-Lymphozyten) gebildet. Der Gefäßwachstumsfaktor regt die Angioneogenese an; die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung von Geweben wird verbessert.
	Zelluläre Adaptation an Hypoxie

GLUT-1	Das Genprodukt ist der Glukosetransporter- 1. Durch den Einbau des Transporters in die Zellmembran wird die Glukoseaufnahmefähigkeit der Zelle gesteigert. Zur Funktion von GLUT-1 siehe Abschnitt 1.3 .
GAPDH	Das Genprodukt ist das Glykolyseenzym Glycerinaldehyd- 3 -phosphat- Dehydrogenase. Der Glukoseumsatz der Zelle wird erhöht. Zur Funktion von GAPDH siehe Abschnitt 1.3 .
	Sonstige Gene
HIF-1α	Das Genprodukt HIF-1 α führt über den Transkriptionsfaktor HIF-1 in vielen Zellen neben vielen anderen Funktionen auch zu einer gesteigerten Expression der HIF-1 α - mRNA.
CXCR4	Das Genprodukt ist der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4). Mehrere Studien deuten auf eine entscheidende Bedeutung von CXCR4 in der Pathogenese von chronischen Entzündungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (RA) hin [45].
PBEF	Das Genprodukt PBEF (<i>pre B-cell colony enhancing factor</i>), auch Visfatin genannt, ist ein Adipokin, das u.a. agonistisch am Insulinrezeptor wirkt. Erhöhte PBEF- Konzentrationen wurden auch bei RA festgestellt [46].
MIF	Das Genprodukt MIF (<i>macrophage migration inhibitory factor</i>) ist ein proinflammatorisches Zytokin mit wichtigen immunologischen Funktionen. Erhöhte MIF- Konzentrationen wurden auch bei RA- Patienten gemessen [47].

Die Mechanismen der zellulären Adaptation an hypoxische Umgebungsbedingungen wurden bereits weiter oben erläutert. Nachfolgend soll die Bedeutung von drei HIF-1-Zielgenen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, für die Pathogenese der RA dargestellt werden. Diese sind der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4), das proinflammatorische Zytokin MIF (*makrophage migration inhibitory factor*) und das Adipokin PBEF (*pre B-cell colony-enhancing factor*) (**Tabelle 1**)

1.6.1 Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)

Wie bereits erwähnt wurde, ist die RA u.a. durch die Ansammlung von CD4⁺- T-Lymphozyten im chronisch entzündeten Synovialgewebe gekennzeichnet. Diese CD4⁺- T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Aktivierungsmarker wie CD69 aber auch den Chemokinrezeptor CXCR4 [45]. Gleichzeitig sezernieren Endothelzellen von Blut- und Lymphgefäßen im chronisch entzündeten Synovialgewebe das Chemokin *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), das auch CXCL-12 genannt wird und lange als der einzige Ligand zu CXCR4 galt [45]. Neueste Untersuchungen zeigen aber, dass auch das Zytokin MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*) am Chemokinrezeptor CXCR4 bindet [48]. CXCR4 exprimierende Zellen bewegen sich chemotaktisch in Richtung der SDF-1 oder MIF sezernierenden Zellen, was zu einer verstärkten Retention der CXCR4- exprimierenden CD4⁺- T-Lymphozyten ins Synovialgewebe der RA- Patienten führt [48, 49]. Die Bedeutung von CXCR4 in inflammatorischen

Prozessen wurde eindrucksvoll durch Untersuchungen mit dem spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 belegt. Mit AMD3100 behandelte Mäuse, bei denen eine entzündliche Gelenkerkrankung induziert wurde, zeigten eine deutliche Verbesserung ihrer Krankheitssymptome [50].

1.6.2 Das Zytokin *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF)

In das Entzündungsgebiet eingewanderte Immunzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie z.B. MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*). Untersuchungen vom Serum und synovialen Biopsaten von RA- Patienten zeigten erhöhte Konzentrationen von MIF [47]. Nach der erfolgreichen Behandlung der RA-Patienten wurde ein signifikanter Rückgang der MIF- Konzentrationen beobachtet [47]. In murinen RA- Modellen hatten MIF^{-/-}- Mäuse darüber hinaus einen deutlich schwächeren Krankheitsverlauf. Auch die Behandlung einer bei Ratten adjuvant induzierteren Arthritis (AIA) mit monoklonalen Anti- MIF- Antikörpern führte zur Abschwächung von klinischen und histologischen Krankheitsparametern [47].

1.6.3 Das Adipokin *pre B-cell colony- enhancing factor* (PBEF)

Eine ähnlich entscheidende Bedeutung wie MIF kommt wahrscheinlich auch dem Adipokin PBEF (*pre B-cell colony- enhancing factor*) für die Pathogenese der RA zu. Erhöhte Konzentrationen von PBEF wurden sowohl im Synovialgewebe von AIA-Mäusen als auch in der Synovialflüssigkeit [51] und im Serum von RA- Patienten gemessen [46].

In Zukunft könnte die selektive Beeinflussung der eben dargestellten HIF-1 Zielgene neue Behandlungsoptionen für RA- Patienten ermöglichen. Heute jedoch müssen nach wie vor zwischen 58% und 64% der von der RA betroffenen Patienten mehr oder weniger kontinuierlich mit Glukokortikoiden behandelt werden [52]. Die Bedeutung und Wirkung von Glukokortikoiden zur Eindämmung einer Entzündungsreaktion wird nachfolgend erläutert.

1.7 Die Bedeutung und Wirkung von endogenen und exogenen Glukokortikoiden bei chronischen Entzündungen wie der RA

Die Entzündung ist eine (Abwehr-) Reaktion des Organismus und seiner Gewebe auf verschiedenartige (schädigende) Entzündungsreize. Ein wesentliches Ziel der Entzündung ist i.d.R. die Beseitigung des schädigenden Agens [2]. Die fünf Kardinalsymptome der Entzündung sind: *Rubor* (Rötung), *Calor* (Überwärmung), *Tumor* (Schwellung), *Dolor* (Schmerz) und *Functio laesa* (gestörte Funktion der Zellen). Während eine zeitlich und örtlich begrenzte Entzündungsreaktion wichtig ist, um das schädigende Agens zu beseitigen, führt eine exzessive oder chronisch anhaltende Entzündung aber auch zur Zerstörung von körpereigenen Geweben. Genauso wichtig wie die Initiierung der Entzündungsreaktion ist deshalb auch die rasche Beendigung des entzündlichen Prozesses, sobald das schädigende Agens beseitigt wurde. Von der Nebennierenrinde endogen gebildete Glukokortikoide wie *Kortisol* wirken antiinflammatorisch und helfen bei der Auflösung von Entzündungsherden [53]. Bei Autoimmunerkrankungen wie der RA ist die homöostatische Regulation der Entzündung gestört und endogene antiinflammatorische Mechanismen sind nicht mehr in der Lage, den Entzündungsprozess zu beenden. Es entsteht eine *chronische Entzündung*. Therapeutisch ist der Einsatz exogener Glukokortikoide wie Prednisolon, Methylprednisolon oder Dexamethason oft die einzige Möglichkeit, das entzündliche Geschehen bei Patienten mit RA einzudämmen, wobei häufig schwerwiegende Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen.

1.7.1 Der molekulare Wirkmechanismus von Glukokortikoiden

Das Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil der Glukokortikoide erklärt sich auf molekularer Ebene durch das Eingreifen in zahlreiche Signaltransduktionswege (**Abbildung 4**) [52, 54]:

- **Direkt- genomische Wirkung:** Glukokortikoide (GC) passieren die Zellmembran und binden am zytosolischen Glukortikoidrezeptor (cGCR). GC und cGCR bilden einen Ligand- Rezeptor-Komplex, den GC-cGCR- Komplex. Die Bindung des GC führt zur Abdissoziation von Chaperonen wie den Hitzeschockproteinen (HSP) vom cGCR. Der GC-cGCR- Komplex gelangt schließlich in den Zellkern und bildet zusammen mit einem weiteren GC-cGCR- Komplex ein transkriptionell aktives

Homodimer. Dieses Homodimer bindet an den Promotorregionen bestimmter Gene, den GREs (*glucocorticoid responsive elements*) und reguliert hierdurch deren Expression [54].

- **Indirekt- genomische Wirkung:** Der GC-cGCR- Komplex bindet auch an anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem NFκB (*nuclear- factor κB*), dem AP-1 (*activator protein- 1*) [55] oder dem NFAT (*nuclear factor of activated t-cells*) [56] und moduliert hierdurch deren transkriptionelle Aktivität [54].
- **Nicht- genomische Wirkung:** Wenige Sekunden bis Minuten nach der Applikation von GC können bereits Effekte beobachtet werden. Diese Effekte können aufgrund des sehr schnellen Auftretens nicht über die genomischen Wirkmechanismen erklärt werden. Die schnelle Wirkung der GC wird einerseits über membranständige Glukokortikoidrezeptoren (mGCR) und andererseits über unspezifische Interaktionen zwischen Zellmembran und GC erreicht [57, 58].

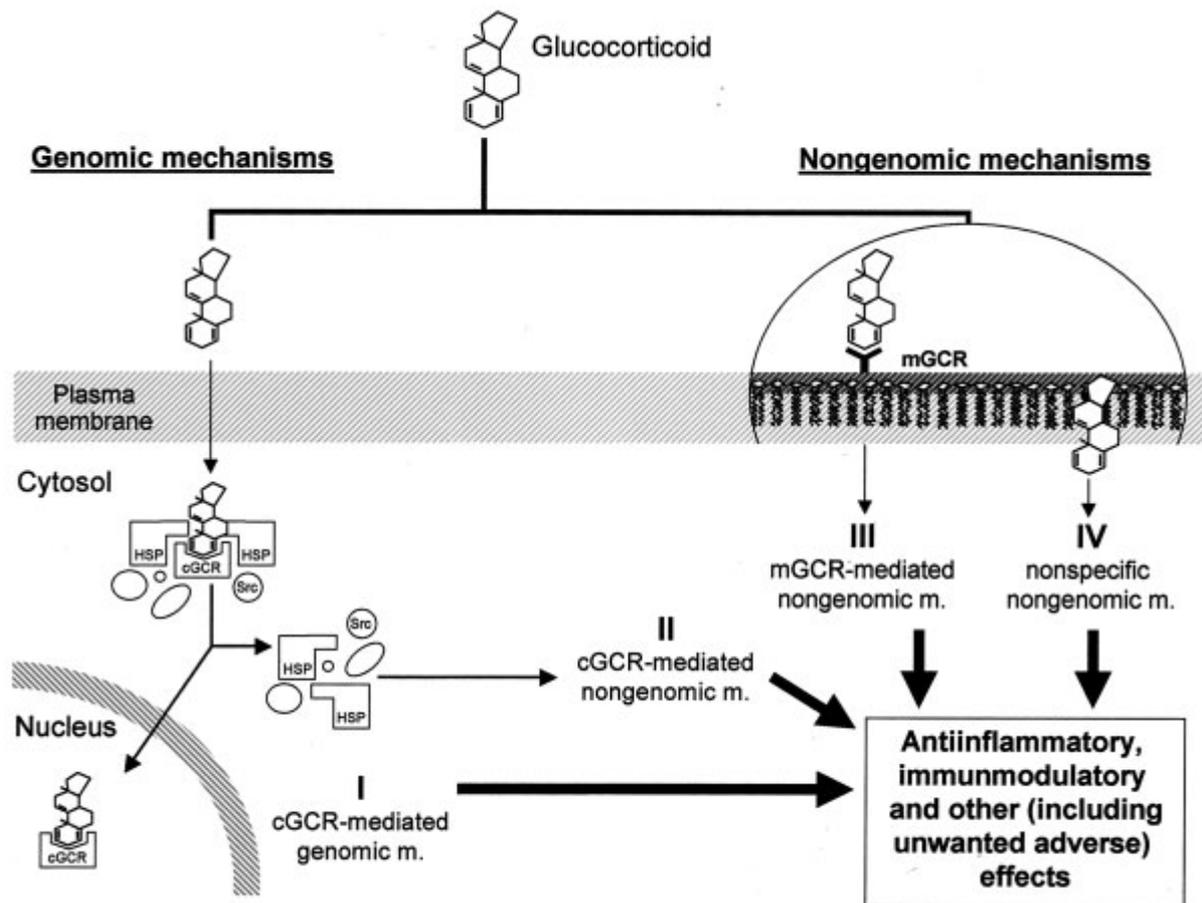


Abbildung 4 aus [52]: Die molekularen Mechanismen der Glukokortikoidwirkung: (I) Direkt genomische Wirkungen (cGCR- mediated genomic mechanisms); (II) Indirekt genomische Wirkung durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (cGCR- mediated nongenomic mechanisms); (III) Nicht- genomische Wirkungen über membranständige Glukokortikoidrezeptoren (mGCR-mediated nongenomic mechanisms) und (IV) über unspezifische Interkalation mit der Zellmembran (nonspecific nongenomic mechanisms). Abkürzungen: cGCR (zytosolischer Glukokortikoidrezeptor), mGCR (membranständiger Glukokortikoidrezeptor), HSP (Hitzeschockprotein), Src (eine Kinase, die gleichzeitig als Chaperon fungiert).

Trotz der sehr detaillierten Kenntnisse über die molekulare Wirkungsweise von Glukokortikoiden sind viele Fragen weiterhin ungeklärt. So ist bis heute nicht bekannt, welchen Einfluss Glukokortikoide auf die Adaptationsprozesse von Immunzellen an hypoxische Umgebungsbedingungen haben.

Nachfolgend sollen die Fragestellungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, dargestellt werden.

2 Überleitung zur Fragestellung

In der Regel werden bis heute *in vitro* Experimente unter Raumlufbedingungen (21% O₂) durchgeführt, d.h. bei einem Sauerstoffpartialdruck, der weder unter

physiologischen noch unter pathologischen Bedingungen im Organismus vorzufinden ist (**Abbildung 1**). Diese Tatsache wird der Bedeutung des Einflussfaktors Hypoxie wahrscheinlich nicht gerecht.

Im chronisch entzündeten Gewebe der RA sind aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten Hypoxie ausgesetzt. Der Sauerstoffmangel führt in den CD4⁺- T-Lymphozyten zur Stabilisierung des Hypoxie- induzierten- Faktors-1 (HIF-1). HIF-1 wiederum steuert die transkriptionelle Aktivität von Genen, die eine Adaptation des Energiestoffwechsels an die hypoxische Umgebung gewährleisten sollen. Gleichzeitig führt HIF-1 aber auch zur Hochregulation von Faktoren, die relevant sind für die Entstehung und Aufrechterhaltung der RA (**Tabelle 1**).

Eines der nach wie vor wichtigsten Medikamente zur Behandlung der RA sind synthetisch hergestellte Glukokortikoide. Bis heute ist jedoch nicht genau bekannt, über welche molekularen Mechanismen Glukokortikoide, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, ihre therapeutische Wirkung entfalten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die hypoxischen Bedingungen, die im chronisch entzündetem Gelenk der RA gefunden werden, in einem *in vitro* Experiment an CD4⁺- T-Lymphozyten gesunder Spender nachgestellt. Das Ziel war es, die Interaktionen zwischen der CD3/CD28- Aktivierung, Hypoxie und dem Glukokortikoid Dexamethason in aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie zu untersuchen.

Die einzelnen Fragestellungen lauteten:

1. Wie beeinflusst die CD3/CD28- Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten die Regulation von HIF-1 α und die mRNA- Expression von für die Pathogenese der RA relevanten HIF-1- Zielgenen unter Hypoxie (**Abbildung 5**)? Wie beeinflusst umgekehrt Hypoxie die Stärke der CD3/CD28- Aktivierung (**Abbildung 5**)?
2. Welchen Einfluss hat das Glukokortikoid Dexamethason auf die Regulation von HIF-1 α und die mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen in CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie (**Abbildung 6**)?

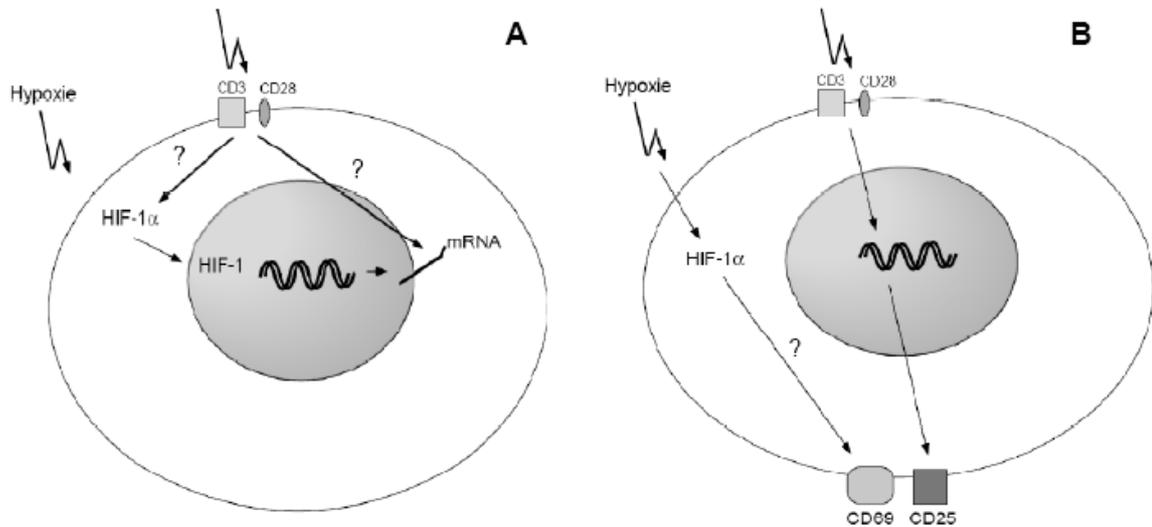


Abbildung 5: **A:** Einfluss der CD3/CD28- Aktivierung auf die Expression von HIF-1 α und HIF-1-Zielgenen bei CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie. **B:** Einfluss von Hypoxie auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten.

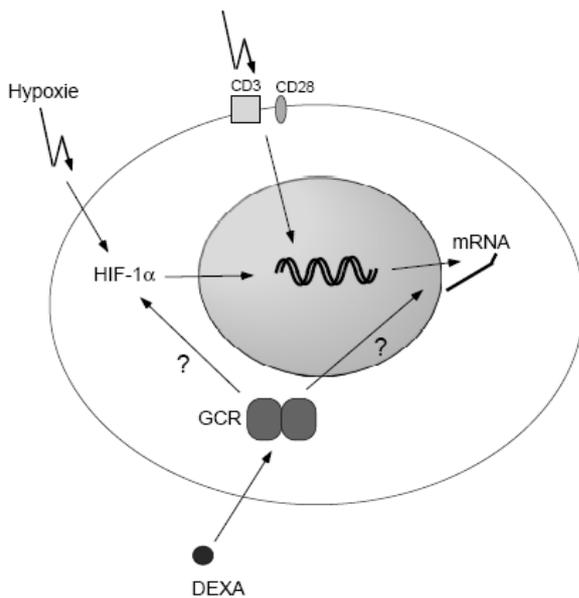


Abbildung 6: Einfluss von Dexamethason (DEXA) über den Glukokortikoidrezeptor (GCR) auf die Expression von HIF-1 α und HIF-1-Zielgenen bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie.

Die Untersuchungsparameter waren die HIF-1 α - mRNA- und HIF-1 α - Proteinexpression, die mRNA-Expression der HIF-1- Zielgene GLUT-1, GAPDH, MIF, PBEF und CXCR4 sowie die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69.

3 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die angewandten Methoden und verwendeten Materialien, die genaue Durchführung der Versuche und die Auswertungsmethoden dargestellt. In *kursiver* Schrift wird einleitend das *Funktionsprinzip* der verwendeten Methoden erläutert.

3.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)

3.1.1 Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation

Prinzip: Bei der Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation werden die zellulären Blutbestandteile nach ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt. Das Blut wird über Ficoll geschichtet und zentrifugiert. Erythrozyten haben eine höhere Dichte als das Ficoll und sammeln sich deshalb unter der Ficollschicht. Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten haben eine geringere Dichte und bilden eine Interphase zwischen Ficoll und dem Zell-Suspensionsmedium. Die Interphase kann nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation abpipettiert werden.

Aus Leukozytenfiltern gesunder Blutspender der Blutspende Charité Campus Mitte erfolgte die Präparation von PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Zunächst wurden die Filter mit jeweils 135ml PBS/BSA und 25ml Luft gespült. Die Zellsuspension wurde in vier 50ml- Reagenzgefäßen auf jeweils 12,5ml Ficoll geschichtet. Die Reagenzgefäße wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 836 x g ohne Bremse zentrifugiert (*Heraeus Laborfuge 400R*). Die Zellen der Interphase wurden abpipettiert und auf zwei neue 50ml- Reagenzgefäße verteilt. Diese wurden jeweils mit PBS/BSA aufgefüllt und in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 328 x g für zehn Minuten gewaschen. Die Überstände wurden verworfen. Der Waschvorgang in PBS/BSA wurde mindestens einmal wiederholt.

3.1.2 Isolierung der CD4⁺- Zellen durch magnetische Zellsortierung

Prinzip: Bei der magnetischen Zellsortierung (magnetic cell sorting, MACS) werden Zellen mit Hilfe von paramagnetisch markierten Antikörpern getrennt, die gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet sind. T-Helfer- Zellen exprimieren das

Oberflächenmolekül CD4 und können mit Hilfe der paramagnetisch markierten Antikörper an einer magnetischen Säule von Zellen getrennt werden, die nicht CD4 an der Oberfläche exprimieren.

Die nach der Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurden jeweils in 720µl PBS/BSA resuspendiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde 80µl Immunglobuline (*Flebogamma*) (Endkonzentration 1:10) zugegeben und die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200µl paramagnetisch markierter Antikörper gegen CD4 (*Anti-human- CD4- Microbeads, Miltenyi*) zugefügt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 12°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in PBS/BSA für zehn Minuten in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 328 x g gewaschen. Die Überstände wurden verworfen. Die Sortierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des AutoMACS (*Miltenyi*).

3.1.3 Bestimmung der Reinheit und des Überlebens mittels Durchflußzytometrie

Prinzip: Mit dem Durchflußzytometer (fluorescent- activated cell sorting, FACS) kann die relative Größe und Granularität von Zellen durch Beugung und Brechung des Lichts eines Laserstrahls gemessen werden. Mittels Fluoreszenzfarbstoff- gekoppelter Antikörper ist es weiterhin möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen auf der Zellmembran zu messen. Ein Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe an, so dass diese Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren, dass durch Detektoren erfasst werden kann. T-Lymphozyten zeichnen sich durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD3 aus. T-Helfer Zellen tragen zusätzlich den CD4- Rezeptor, wobei auch andere Zellen wie Monozyten CD4 schwach exprimieren. Zellen, die sowohl CD3 als auch CD4 exprimieren (CD3/CD4- doppelt positive Zellen), können durchflußzytometrisch zweifelsfrei als T-Helfer- Zellen identifiziert und somit auch ihr Anteil an der Gesamtpopulation bestimmt werden (Bestimmung der Reinheit). Auch der Anteil der lebenden Zellen kann durchflußzytometrisch ermittelt werden Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) verwendet. PI gelangt in Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist (nekrotische Zellen) und interkaliert hier mit der DNA, während es sich in lebenden Zellen nicht anreichert.

Die nach der magnetischen Zellsortierung gewonnene Zellsuspension wurde auf ihre Reinheit, d.h. auf den Anteil CD3/CD4- doppelt positiver Zellen und ihre Vitalität, d.h. auf den Anteil an PI- negativen Zellen, überprüft. 25µl der Zellsuspension wurden zu einer vorbereiteten Lösung, bestehend aus 74µl PBS/BSA, 2.5µl CD4-FITC Antikörper (*DRFZ*) (Endkonzentration 1:400), 1µl CD3-PE Antikörper (*DRFZ*) (Endkonzentration 1:100), 10µl Flebogamma (Endkonzentration 1:10) und 61,5µl PBS/BSA, gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 1ml PBS/BSA wurde die Färbereaktion unterbrochen. Die Proben wurden in einer auf 4°C gekühlten Eppendorfzentrifuge (*Heraeus Biofuge fresco*) bei 502 x g für 8 Minuten gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes, wurde das Pellet in 500µl PBS/BSA resuspendiert. Unmittelbar vor der durchflußzytometrischen Messung wurde der Probe Propidiumjodid (PI) (0,1 mg/ml) im Verhältnis 1:100 zugefügt. Mittels Durchflußzytometrie wurde die Reinheit und Vitalität der Zellen bestimmt. Die gewonnenen Zellen wurden nur dann für die nachfolgenden Experimente verwendet, wenn der Anteil der CD3/CD4- doppelt-positiven Zellen bei mindestens 99% (Reinheit) und der Anteil der Propidiumjodid-negativen- Zellen (Vitalität) bei mindestens 96% lag (**Abbildung 7**).

Die hohe Anforderung an die Reinheit der für die Experimente verwendeten Zellen stellte sicher, dass die gemessenen Effekte wirklich auf Veränderungen der CD4⁺- T-Lymphozyten zurückzuführen waren. Außerdem sollte erreicht werden, dass es zu keiner unbeabsichtigten Aktivierung der CD4⁺- T-Lymphozyten durch einen größeren Anteil von Makrophagen/ Monozyten kommen konnte. Der Anteil der PI- negativen (vitalen) Zellen von über 96% gewährleistete, dass die mehrere Stunden dauernde Isolierung zu keiner schwerwiegenden Schädigung der Zellen geführt hatte. Die Vitalitätsmessung mit Propidiumjodid wurde nach 20 Stunden Inkubation wiederholt. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die gewonnenen CD4⁺- T-Lymphozyten wurden in RPMI- Kulturmedium resuspendiert und in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für zehn Minuten mit 328 x g zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 1- 4ml RPMI- Kulturmedium resuspendiert. 10µl dieser Zellsuspension wurden zu 10ml PBA (PBS/BSA azid) gegeben und die Zellkonzentration mit Hilfe eines Zellzählgerätes (*Casy TT*) bestimmt. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge des

RPMI- Kulturmediums wurde die Zellkonzentration auf 4×10^6 Zellen pro ml Medium eingestellt.

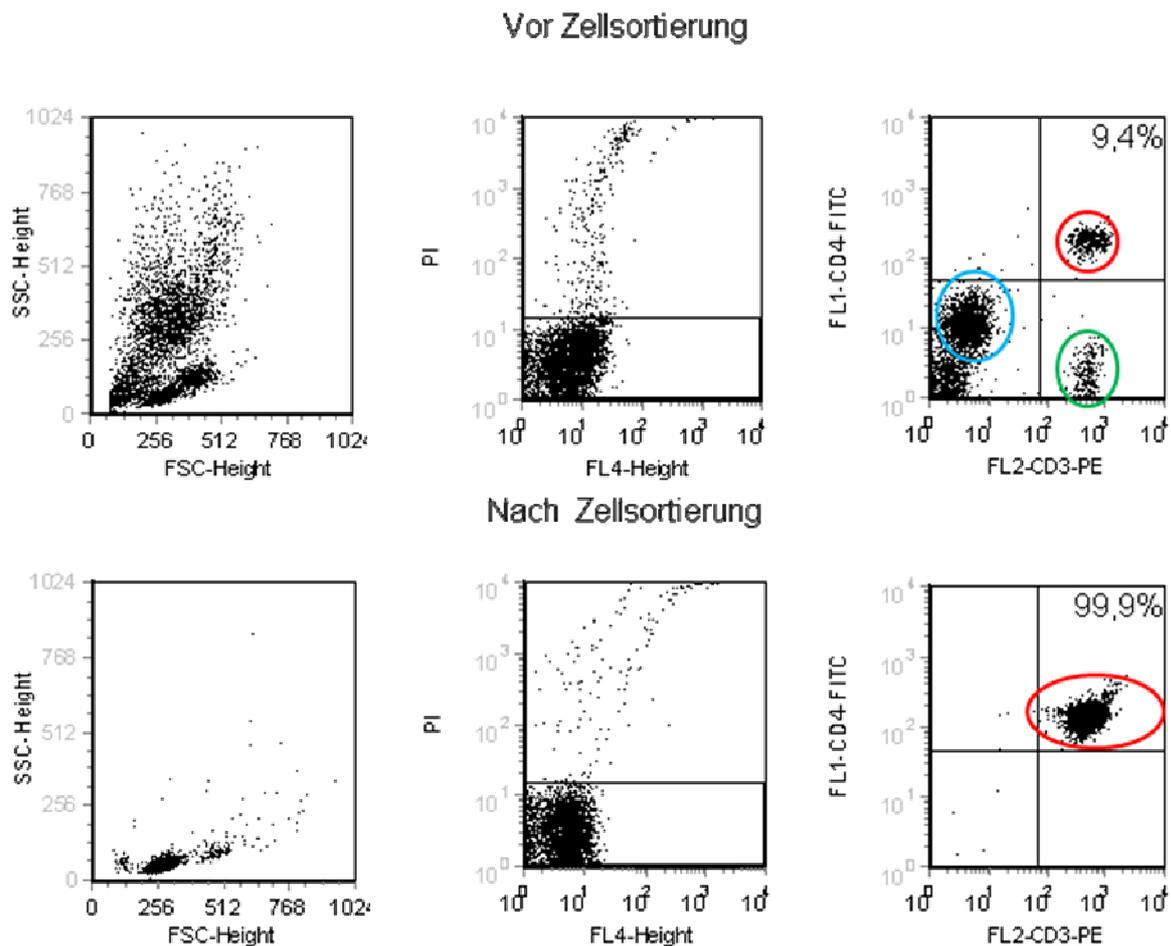


Abbildung 7: Durchflußzytometrische Bestimmung der Vitalität und der Reinheit der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) vor (Dotplots der 1. Reihe) und nach (Dotplots der 2. Reihe) der magnetischen Zellsortierung (MACS- Check). Jeweils dargestellt von links nach rechts: 1. Größe (FSC-Height) und Granularität (SSC-Height) der Zellen 2. Propidiumjodid (PI)- Region 3. Bestimmung der CD4 FITC und CD3 PE positiven Zellen. Rot eingekreist: CD4⁺- T-Lymphozyten; Grün eingekreist: CD4⁻- T-Lymphozyten; Blau eingekreist: Makrophagen/ Monozyten, Granulozyten. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines MACS- Checks, repräsentativ für alle durchgeführten Versuche.

3.2 Stimulation und Behandlung der CD4⁺- T- Lymphozyten

Für die CD3- Stimulation der CD4⁺- T- Lymphozyten wurden 96- Well Kulturplatten mit CD3- Antikörpern (*CD3 α h UCHT-1*, *DRFZ*) beschichtet. Die CD3- Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml PBS eingesetzt. 250 μ l dieser Lösung wurden in jeweils ein *Well* pipettiert und für mindestens drei Stunden in einem 37°C warmen Brutschrank oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Co- Stimulation der CD4⁺- T- Lymphozyten erfolgte unmittelbar vor der Inkubation mit einem Antikörper

gegen CD28 (*BD Pharmingen*). Dieser wurde in der Konzentration von 5µg/ml direkt der Zellsuspension zugegeben. Für die Experimente wurden jeweils 250µl Zellsuspension (1×10^6 Zellen) in ein mit CD3- Antikörpern beschichtetes *Well* gegeben. Dexamethason (*Sigma- Aldrich, St. Louise, MO, USA*) wurde in Wasser gelöst und je nach Versuchsansatz in den Endkonzentrationen 10^{-5} M, 10^{-8} M oder 10^{-11} M eingesetzt. Eine Glukokortikoidkonzentration von 10^{-5} M wird im Organismus normalerweise nur während einer intravenösen Hochdosistherapie oder durch Lokalinjektion (z.B. bei intraartikulärer Gabe) erreicht [52]. Körpereigene Glukokortikoide sind in Konzentrationen von 10^{-11} M im Organismus physiologisch nachzuweisen. Um sicherzustellen, dass Dexamethasoneffekte auf die Wirkung von Dexamethason am Glukokortikoidrezeptor (GCR) zurückzuführen sind, wurde der Steroidrezeptorantagonist Mifepriston (RU486, *Sigma- Aldrich*) eingesetzt. RU486 bindet an Steroidrezeptoren wie dem Glukokortikoidrezeptor und wirkt aufgrund der schwachen intrinsischen Aktivität kompetitiv hemmend. In den folgenden Versuchen wurde RU486 in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt. In Vorversuchen konnte RU486 in niedrigeren Dosierungen die Effekte von Dexamethason zum Teil nicht antagonisieren. Dosierungen von mehr als 10^{-6} M zeigten teilweise eine Dexamethason- ähnliche Wirkung, so dass eine intrinsische Aktivität von RU486 am Glukokortikoidrezeptor nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Zugabe von RU486 für die entsprechenden Versuchsansätze erfolgte 15 Minuten vor der Behandlung mit Dexamethason, um eine möglichst vollständige Blockade des Glukokortikoidrezeptors zu gewährleisten.

3.3 Zellkultur

Die unterschiedlich behandelten CD4⁺- T-Lymphozyten wurden entweder unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen für 20 Stunden in einem 37°C warmen Brutschrank inkubiert. Die Inkubation unter Normoxie erfolgte in einem Gasgemisch aus 95% Raumluft und 5% CO₂. Zur Erzeugung hypoxischer Bedingungen wurden die Proben in einer luftdicht verschlossenen Hypoxiekammer für 10 Minuten mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ mit 0,5 bar begast. Um Verdunstungseffekte zu verhindern, wurden zusätzlich mit Wasser gefüllte Kulturplatten in die Hypoxiekammer gestellt. Eine Entnahme von Zellen unter Aufrechterhaltung der Hypoxie war nicht möglich, so dass nur ein einziger Inkubationszeitraum für die Experimente gewählt werden konnte. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die CD4⁺- T-Lymphozyten

für 20 Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit von 20 Stunden gewährleistete, dass die CD4⁺- T-Lymphozyten ausreichend lange der Hypoxie ausgesetzt waren, so dass auf jeden Fall eine Stabilisierung von HIF-1 α und die Hochregulation von HIF-1- Zielgenen zu erwarten war. Die 20- stündige Stimulation der CD4⁺- T-Lymphozyten mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 ließ eine starke Aktivierung ohne aktivierungsbedingte Proliferation der Zellen erwarten, da diese normalerweise frühestens nach 24 Stunden beginnt [20].

3.4 Stimulations- und Vitalitätskontrolle nach 20 Stunden Inkubation

Prinzip: Werden CD4⁺- T-Lymphozyten CD3/CD28- aktiviert, nehmen sie an Größe zu (Blastogenese) und exprimieren Aktivierungsmarker wie CD69 und CD25.

Durchflußzytometrisch kann im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) die Größenzunahme und Änderung der Granularität der CD4⁺- T-Lymphozyten bestimmt werden. Die Oberflächenmarker CD69 und CD25 können mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert und mit einem Laser zum Leuchten angeregt werden. Die Messung des emittierten Lichts ermöglicht die Bestimmung des Anteils CD25 bzw. CD69 positiver (aktivierter) Zellen an der Gesamtpopulation.

Nach 20 Stunden Inkubation wurde durchflußzytometrisch die relative Größenänderung der CD4⁺- T-Lymphozyten im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) und die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 bestimmt. Für die Messungen wurden 1×10^6 Zellen in 250 μ l Medium eingesetzt. Die Zellen wurden auf zwei 1,5ml-Reagenzgefäße aufgeteilt, jeweils 1ml PBS/BSA zugegeben und die Proben für 8 Minuten in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 2300rpm gewaschen. Die Überstände über den entstandenen Zellpelletts wurden abpipettiert und verworfen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit den Antikörpern CD69-APC (*Caltag*) (Endkonzentration 1:20) und CD25-FITC (*BD*) (Endkonzentration 1:20) in einem Volumen von 25 μ l oder mit isotypen Antikörpern. Diese Antikörper sind an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, richten sich aber gegen ein Epitop, das nicht an der Oberfläche der zu untersuchenden Zellen vorhanden ist. Die isotypen Antikörper dienen der Negativkontrolle, d.h. durch sie lassen sich unerwünschte, unspezifische Bindungen des Zielantikörpers feststellen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen wurde Flebogamma in einer

Endkonzentration von 1:10 eingesetzt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Beendigung der Färbereaktion wurde 1ml PBS/BSA zugegeben und die Zellen für 8 Minuten bei 502 x g in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge gewaschen. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen und die Zellpellets in 300µl PBS/BSA resuspendiert. Unmittelbar vor der durchflußzytometrischen Messung wurde Propidiumjodid (PI) im Verhältnis 1:100 zugegeben, um die Vitalität der Zellen zu bestimmen.

Die Aktivierungstärke wurde anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 ermittelt. Zur Auswertung wurde einerseits der Anteil der aktivierten (CD69⁺ bzw. CD25⁺) Zellen unter Normoxie und Hypoxie gemessen, wobei nicht berücksichtigt wurde wie stark der jeweilige Aktivierungsmarker an der Zelloberfläche der einzelnen Zellen exprimiert wurde. Bei der zweiten Auswertungsmethode wurde die Expressionstärke von CD69 und CD25 auf jeder einzelnen Zellen berücksichtigt. Gemessen wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des jeweiligen Aktivierungsmarkers unter Normoxie bzw. Hypoxie.

Alle Bearbeitungsschritte wurden schnellstmöglich durchgeführt und die Proben konsequent auf Eis gelagert, um zu vermeiden, dass die Zellen während der Färbereaktionen wieder auf einen aktiven normoxischen Stoffwechsel zurückgreifen konnten.

3.5 SDS- Page (sodium- dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) und Westernblot- Analyse zur Proteinbestimmung

Prinzip: Der Westernblot dient dem Nachweis bestimmter Proteine in einem Proteingemisch. Vor dem eigentlichen Westernblot wird das Proteingemisch in einem Polyacrylamid- Gel aufgetrennt. Hierzu wird eine Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt. Kleine Proteine durchwandern das Gel schneller als größere Proteine, so dass eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erreicht wird. Anschließend erfolgt der Transfer der aufgetrennten Proben auf eine Trägermembran. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein (hier: HIF-1α), wird das Protein markiert (Primärantikörper). Ein zweiter Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist (hier

HRP; horseradish peroxidase) bindet am F_c-Fragment des Primärantikörpers (Sekundärantikörper). Das Enzym HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol, wobei eine Lumineszenzreaktion entsteht. Diese kann z.B. durch Schwärzung eines Films nachgewiesen werden. Die Stärke der Lumineszenz entspricht dann der Menge des zu untersuchenden Proteins.

3.5.1 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Die für die Proteinbestimmung vorgesehenen Proben wurden aus dem jeweiligen Well in 1,5ml Reagenzgefäße überführt. Diese wurden bei 4°C für eine Minute mit maximaler Geschwindigkeit (16060 x g) zentrifugiert und die zellarmen Überstände abgenommen und verworfen. Die Zellpelletts wurden in 16µl destilliertem Wasser und 4µl Laemmli-Puffer (100mg Bromphenolblau; 3,5ml Glycerin; 2,5ml β-Mercaptoethanol; 1,5g SDS (sodium dodecylsulfate), 1M Tris-HCl, pH 6,8) resuspendiert. Die so verarbeiteten Proben wurden bei -20°C gelagert. Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte in einem 10% bzw. 6% SDS- PAGE- Trenngel bestehend aus:

Tabelle 2: Zusammensetzung des SDS- Trenngels

Menge für 10% SDS-Gel	Menge für 6% SDS-Gel	Substanz
4 ml	5,3ml	Aqua dest.
3,3 ml	2,0ml	30% Acrylamidmix (Roth)
2,5 ml	2,5ml	1,5 M Trispuffer (pH 8,8)
0,1 ml	0,1ml	10% SDS (Roth)
0,1 ml	0,1ml	APS (Ammoniumpersulfat) (10%; Roth)
5 µl	8µl	TEMED (Tetra- methyl- ethylenediamine) (Roth)

Die Auftragung der Proben erfolgte in Sammelgeltaschen bestehend aus:

Tabelle 3: Zusammenstzung des Sammelgels

Menge	Substanz
1,45 ml	Aqua dest.
0,5 ml	30 % Acrylamidmix
2,5 ml	0,25M Tris (pH 6,8)
0,05 ml	SDS 10%
0,025 ml	APS 10%
6 µl	TEMED

Die im Experiment gewonnenen und mit fünffachem Laemmli- Puffer versetzten Proben wurden in einem Heizblock für 5 Minuten bei mindestens 96°C erhitzt. In jede Sammelgeltasche wurden 15µl der Probe aufgetragen, deren Proteingehalt dem von $0,75 \times 10^6$ Zellen des jeweiligen Experiments entsprach. Mindestens eine Sammelertasche jedes Gels wurde mit 10µl Marker (*Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad*) beladen. Es wurde eine Stromstärke von 15mA pro Gel für ungefähr 30 Minuten angelegt, bis die Bandenfront das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Stromstärke für ungefähr 90 Minuten auf 30mA pro Gel erhöht bis die Bandenfront das Trenngel durchlaufen hatte. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele in eine Blottingvorrichtung gesetzt. Hier erfolgte der Transfer der Proteine auf eine mit Methanol equilibrierte Blottingmembran aus PVDF (*Polyvinylidendifluorid*) mit einer Porengröße von 0,45µm (*Immobilon-P, Millipore*) bei einer Spannung von 40V. Dieser Vorgang erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Übertragung auf die Membran mittels fünfminütiger Ponceau-S Färbung überprüft und die Membran anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Membran wurde zusammengerollt in ein 50ml- Reagenzgefäß geschoben. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die im weiteren Verlauf verwendeten Antikörper erfolgte mit jeweils 25ml 5% Magermilchpulverlösung (2,5g Magermilchpulver in 50ml TBS-Tween20 (*Tris-buffered saline*; Tweenanteil 0,05%) für 2 Stunden auf einem Falconrotator bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten in 10- 20ml TBS- Tween gewaschen.

3.5.2 Nachweis von HIF- 1α

Zum Nachweis von HIF-1α wurden Antikörper gegen humanes HIF-1α (*murine IgG₁ Antikörper, BD*) in einer Endkonzentration von 1:250 in 5ml TBS- Tween zu jeweils einer Blotmembran zugegeben. Die Blotmembranen wurden erneut dreimal für jeweils 10 Minuten in 10- 20ml TBS- Tween gewaschen. Zu jeder Membran wurden 10ml des zweiten Antikörpers (*anti murin IgG_{heavy and light} gekoppelt mit HRP, PROMEGA*) gegeben. Dieser, an eine Peroxidase gekoppelte Antikörper, wurde in einer TBS- Tween Verdünnung von 1: 10.000 eingesetzt und wurde für 60 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 10-20ml TBS- Tween für jeweils 10 Minuten, wurden die Blotmembranen auf eine Folie gelegt und mit ECL-Lösung (*Amersham*) für 5 Minuten inkubiert. In einer Filmkassette (*Hypercassette, Amersham*) wurde der Film

(Kodak[®]) für 1- 15 Minuten belichtet. Die anschließende Entwicklung des Filmes erfolgte im X- OMAT 1.000 Processor (Kodak[®]).

3.5.3 Nachweis des Strukturproteins β -Aktin

Der Nachweis des Strukturproteins β -Aktin erfolgte wie die Detektion von HIF-1 α . Die Blotmembranen wurden für 10 Minuten in TBS- Tween gewaschen. Anstelle des Antikörpers gegen HIF-1 α wurden 10ml β -Aktin- IgG₁ -Antikörper (*Sigma*) in einer TBS -Tween Verdünnung von 1: 10.000 für 90 Minuten inkubiert. Die nachfolgenden Schritte entsprachen dem Nachweis von HIF-1 α . Die ECL- Lösung (*Amersham*) wurde erst unmittelbar vor der Belichtung des Filmes zugegeben. Die Belichtungszeit betrug 10-15 Sekunden.

3.6 Aufarbeitung der RNA und Umschreiben in cDNA

3.6.1 Isolierung der RNA

Die für die *Real time PCR* vorgesehenen Proben wurden nach 20 Stunden Inkubation aus den Wells in 1,5ml Reagenzgefäße überführt. Diese wurden bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit (16060 x g) zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und gesammelt. Die Zellpelletts wurden in mit 350 μ l β -Mercapto- Ethanol versetztem RLT- Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden bei -20°C für die weitere Bearbeitung aufbewahrt. Die spätere Aufarbeitung der mit RLT- Puffer versetzten Proben erfolgte mit dem *RNAeasy Minikit* (*Qiagen*) nach Herstellerprotokoll. Die Proben wurden in Homogenisierungssäulen (*QIAshredderTM*, *Qiagen*) pipettiert. Die Säulen wurden für zwei Minuten mit maximaler Geschwindigkeit (16060 x g) zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 70% Ethanol im Verhältnis 1:2 gemischt. Das RNA- Ethanol Gemisch wurde in eine weitere Säule (*RNeasy spin column*, *Qiagen*) gegeben und für weitere 15 Sekunden bei 16060 x g zentrifugiert. Ein Waschpuffer (*RW1- Puffer*, *Qiagen*) wurde hinzugefügt und die Säule erneut für 15 Sekunden bei 10.000rpm zentrifugiert. Ein 15- minütiger DNA- Verdau erfolgte durch Zugabe von 10 μ l DNase (*DNase I*, *Qiagen*) und 70 μ l RDD- Puffer. Nach dem Verdau wurde ein weiterer Waschschrift mit dem RW1- Puffer durchgeführt. Die Säule wurde mit 500 μ l ethanolversetztem RPE- Puffer für 15 Sekunden bei 16060 x g gewaschen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt,

wobei beim zweiten Mal für eine Minute gewaschen wurde. Die Eluate der Waschschriffe wurden jeweils verworfen. Schließlich wurden 32µl RNAse freies Wasser auf die Säulenmembran gegeben und die Säule bei 16060 x g für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde ein weiteres Mal auf die Säulenmembran pipettiert und die Säule für zwei Minuten zentrifugiert. Die Eluate enthielten nun in Wasser gelöste RNA. Der RNA- Gehalt der jeweiligen Probe wurde mit Hilfe des Nano- Drop bestimmt, wofür immer 1µl aus der 32µl- Probe abgenommen und verwendet wurde.

3.6.2 Umschreiben in cDNA

Im folgenden Arbeitsschritt wurden die RNA Proben in cDNA umgeschrieben. Es wurden jeweils 300- 450ng RNA eingesetzt. Um diese Menge zu erreichen, wurden die Proben jeweils entweder eingeeengt (Vakuumrotator) oder mit Wasser verdünnt. Zum Umschreiben wurde das TaqMan[®] Kit (*Applied Biosystems*) verwendet. Folgender Ansatz wurde hergestellt.

Tabelle 4: 20µl- Ansatz zum Umschreiben der RNA- Proben in cDNA

Substanz	Menge
RNA Probe (300- 450ng)	7,7µl
TaqMan [®] 10 x Puffer	2µl
MgCl ₂	4,4µl
DNTPs	4µl
Random Hexamere	0,5µl
Oligo-dTs	0,5µl
RNAse Inhibitor	0,4µl
Reverse Transkriptase	0,5µl
RNAse freies Wasser	0,2µl

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte in einem Thermocycler. Dieser wurde folgendermaßen programmiert:

Tabelle 5: Programmierung des Thermocyclers

Schritte	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	25°C	10 Minuten	Anlagerung der Oligo-dTs und Random Hexamere
2.	48°C	40 Minuten	Aktivierung der reversen Transkriptase

3.	95°C	5 Minuten	Denaturierung der reversen Transkriptase
4.	4°C	Pause	Programmende

Die cDNA- Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei –20°C gelagert.

3.7 Light Cycler Real time PCR

Prinzip: Die Real time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase- Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (hier: SYBR Green), die sich in doppelsträngiger DNA einlagern (interkalieren), wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigt. Die Zunahme der Ziel- DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus, wobei diese in Echtzeit (real- time) gemessen und aufgezeichnet werden kann.

Vor den Messungen wurde eine 1:10 Verdünnung aus 2µl cDNA- Probe und 18µl Wasser hergestellt. Für die *Light Cycler Real time PCR* wurde 1µl dieser Verdünnung zu einem 9µl Master-Mix (**Tabelle 6**) hinzugefügt.

Tabelle 6: *Real time PCR* Ansatz (Master-Mix):

Substanz	Menge
H ₂ O	5,0µl
Roche SYBR Green Mix	1,0µl
Magnesiumchlorid MgCl ₂	2,0µl
Primer +	0,5µl (10µM)
Primer -	0,5µl (10µM)

Für jedes Gen wurde die optimale Magnesiumchloridkonzentration durch eine Verdünnungsreihe mit Magnesiumchlorid und die optimale Reaktionstemperatur bestimmt. Die bei jedem Gen eingesetzte Magnesiumchloridmenge (MgCl₂) und die Reaktionstemperatur für die *Real time PCR* sind in **Tabelle 7** angegeben. Die Primersequenzen finden sich in **Tabelle 8**.

Die Auswertung der *Real time PCR* erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Roche (Δ CT- Methode) für die relative Quantifizierung der mRNA- Expression. Mittels *Real time PCR* wurde der Cp- (*crossing point*) Wert ermittelt, der den Zyklus beschreibt, an

dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Um Variationen in der eingesetzten cDNA- Ausgangsmenge auszugleichen, wurde gegen das interne Kontrollgen (Referenzgen oder *housekeeper*) β -Aktin (ACTB) abgeglichen (Normalisierung).

Tabelle 7: Magnesiumchloridkonzentrationen ($MgCl_2$) und Reaktionstemperaturen

GEN	$MgCl_2$ - Endkonzentration	Denaturierungs- zeit in Sekunden bei 95°C	Annealing-zeit in Sekunden bei 64°C	Elongations-Zeit in Sekunden bei 72°C
ACTB	5mM	5s	5s	9s
PBEF	5mM	5s	5s	9s
MIF	5mM	15s	10s (68°C)	20s
CXCR4	3mM	5s	5s	5s
HIF-1 α	3mM	5s	5s	9s
GAPDH	10mM	5s	5s	9s
GLUT-1 (SLC2A1)	15mM	5s	5s	9s

Tabelle 8: Primersequenzen

Genname	Primersequenz forward (+)/ Primersequenz reverse (-)
β -Aktin (ACTB)	+ : gAC Agg ATg CAg AAg gAg ATC ACT - : TgA TCC ACA TCT gCT ggA Agg T
Pre B-cell colony-enhancing factor (PBEF)	+ : CgT gTg AgA AAA TAT ggg gTg A - : ggT ggC AgC AAC TTg TAA CC
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	+ : CAG TGG TGT CCG AGA AGT CA - : TAG GCG AAG GTG GAG TTG TT
Chemokin CXC Rezeptor 4 (CXCR4)	+ : gCA TgA Cgg ACA AgT ACA ggC T - : AAA gTA CCA gTT TgC CAC ggC
Hypoxie induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α)	+ : CCA TTA gAA AgC AgT TCC gC - : Tgg gTA ggA gAT ggA gAT gC
Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	+ : AAT gAC CCC TTC ATT gAC - : TCC ACg ACg TAC TCA gCg C
Glukosetransporter 1 (GLUT-1 oder SLC2A1)	+ : ACGCTCTGATCCCTCTCAGT - : GCAGTACACACCGATGATGAAG

Tabelle 9: Puffer und Medien

Puffer / Medium	Zusammensetzung
RPMI Kulturmedium mit Glukose	RPMI 1640; 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) 50mM β - Mercaptoethanol, 11,1 mM Glukose

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,6	80 mM Na ₂ HPO ₄ ; 19mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O; 100 mM NaCl
Tris-buffered saline (TBS) pH 7,5	150 mM NaCl (Roth) ; 10mM Tris-HCl (Roth)
TBS-Tween	Siehe TBS + 0,05% Tween 20 (Sigma P-1397)
Blottingpuffer pH 8,3	26mM Tris (Roth), 190mM Glycin (Roth), 20% (v/v) Methanol
PBS/BSA (Bovine serum albumin)	Siehe PBS + 1%(w/v) BSA
PBA (PBS/BSA acid)	Siehe PBS/BSA + Natrium- acid (0,02%) (w/v)
Ponceau-S Red	0,2% Ponceau-S red, 1% Essigsäure
5 x Laemmli Puffer pH 6,8	Bromphenolblau 100 mg; 3,5 mL Glycerin; 2,5 mL β-Mercaptoethanol; 1,5 g SDS, 1 M Tris-HCl
Westernblot blocking-Lösung	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

Magnetische Zellsortierung	Hersteller
CD4-Macs-Beads	Miltenyi
Durchflußzytometrie (FACS)	Hersteller
CD4-FITC	Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ)
CD3-PE	Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ)
CD69-APC	Caltag
CD25-FITC	BD
Westernblot	Hersteller
HIF-1α (Primärantikörper)	BD
HRP-gekoppelter -F _c -Antikörper (Sekundärantikörper)	Promega
β-Aktin (Primärantikörper)	Sigma- Aldrich

Tabelle 11: Verwendete Pharmaka

Medikament	Hersteller
Dexamethason	Sigma- Aldrich
Mifepriston (RU486)	Sigma- Aldrich

4 Ergebnisse

Die folgende Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teil werden die Untersuchungen zum Einfluss der CD3/CD28- Aktivierung auf die Regulation von HIF-1 α und ausgewählter HIF-1- Zielgene bei CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie und umgekehrt der Einfluss von Hypoxie auf die Stärke der CD3/CD28- Aktivierung beschrieben (**Abbildung 5**). Im zweiten Teil folgt die Darstellung der Ergebnisse zum Einfluss von Dexamethason auf die Expression von HIF-1 α und ausgewählter HIF-1- Zielgener bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 6**).

4.1 Erster Teil der Ergebnisse

4.1.1 Einfluss von Hypoxie und CD3/CD28- Aktivierung auf die Vitalität der CD4⁺- T-Lymphozyten

Die CD3/CD28- Aktivierung gefolgt von einer 20- stündigen Inkubation unter Hypoxie führt zu keiner erhöhten Mortalität der CD4⁺- T-Lymphozyten.

Um sicherzustellen, dass sowohl die Inkubation unter Hypoxie als auch die CD3/CD28- Aktivierung nicht zu einem verstärkten Zelltod führten, wurde der Anteil lebender Zellen in jeder Probe nach der 20- stündigen Inkubation bestimmt. Die Zellen wurden hierfür mit Propidiumjodid (PI) gefärbt und der Anteil der PI- negativen Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Nach 20 Stunden Inkubation lag der Anteil der PI- negativen (vitalen) Zellen unter Normoxie und Hypoxie bei unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten immer über 98% bezogen auf die Gesamtpopulation. Die CD3/CD28- Aktivierung und die 20- stündige Inkubation unter Hypoxie hatten somit keinen Einfluss auf die Vitalität der T-Zellen. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die nachfolgend gemessenen Effekte unter Hypoxie oder CD3/CD28- Aktivierung nicht auf einen verminderten Anteil lebender Zellen zurückführen lassen.

4.1.2 Einfluss von Hypoxie auf die HIF-1 α - mRNA- Expression

Die Messungen der mRNA- Expression erfolgte wie in Kapitel 3.7 „Light Cycler Real time PCR“ dieser Arbeit beschrieben wurde. Gemessen wurde der Einfluss der Hypoxie auf die mRNA- Expression von ausgewählten HIF-1- Zielgenen bei CD3/CD28- aktivierten und unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten. Die folgende Gleichung wurde für die Auswertung der Daten angewandt:

$$\text{Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression} = \frac{\text{mRNA- Expression unter Hypoxie}}{\text{mRNA- Expression unter Normoxie}}$$

Ein Wert von 1 in den folgenden Abbildungen zeigt, dass die mRNA- Expression unter Hypoxie genauso groß war wie unter Normoxie. Ein Wert von z.B. 2 beschreibt eine Verdoppelung und ein Wert von z.B. 0,5 eine Halbierung der mRNA- Expression unter Hypoxie relativ zu Normoxie.

Der Hypoxie- induzierte Faktor- 1 α (HIF-1 α)

Nur bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten wird unter Hypoxie eine Zunahme der HIF-1 α - mRNA- Expression beobachtet, während die HIF-1 α - mRNA- Expression der CD3/CD28- aktivierten T-Zellen unter Hypoxie nahezu unverändert bleibt.

Bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten wurde unter Hypoxie eine 2,22 fache (\pm 0.37 SEM) der HIF-1 α - mRNA- Expression relativ zur Normoxie festgestellt (**Abbildung 8**). Dieser Anstieg war statistisch signifikant (n=6; p1=0,0219). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei CD3/CD28- stimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie keine signifikante Änderung der HIF-1 α - mRNA- Expression (n=6; p=0,472). Im Vergleich des Einflusses von Hypoxie auf unstimulierte und CD3/CD28- aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten zeigte sich ein tendenziell signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (n=6; p2=0,0681). Der statistische Vergleich zwischen den beiden Gruppen erfolgte mit einem zweiseitigen Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben.

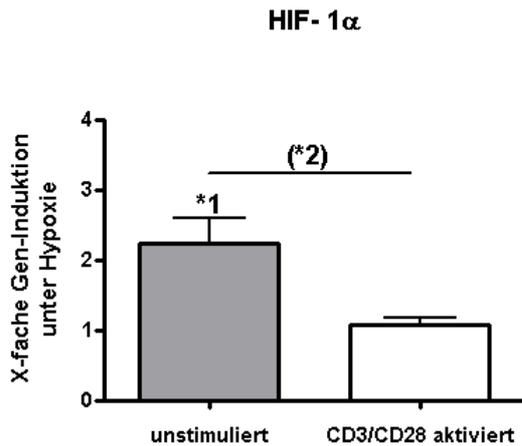


Abbildung 8: Einfluss der Hypoxie auf die mRNA- Expression von HIF-1 α (Hypoxie induzierter Faktor-1 α) im Vergleich von unstimulierten (graue Säule) und CD3/CD28- aktivierten (weiße Säule) CD4⁺- T-Lymphozyten relativ zur Normoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die Balken zeigen den SEM (standard error of the mean). Dargestellt ist das Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung des Anstiegs der mRNA- Expression unter Hypoxie relativ zur Normoxie erfolgte mit Hilfe des Ein- parametrischen T-Tests für verbundene Stichproben gegen 1. Für den Vergleich zwischen unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten T-Zellen wurde ein zweiseitiger Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewandt.
*1 $p=0,0219$, (*2) $p = 0,0681$

4.1.3 Einfluss von Hypoxie auf die HIF-1 α - Proteinexpression

Die CD3/CD28- Aktivierung der CD4⁺- T-Lymphozyten führt unter Hypoxie zu einer gesteigerten HIF-1 α - Proteinexpression und zur Verbreiterung der HIF-1 α - Bande in den niedermolekularen Bereich.

Die Untersuchung der HIF-1 α - Proteinexpression erfolgte mittels Westernblot- Analyse. Die Gewinnung der Proteinlysate, die elektrophoretische Auftrennung der Proteine und der Nachweis von HIF-1 α durch einen spezifischen Antikörper wurden wie im Abschnitt 3.5, „Westernblot- Analyse zur Proteinbestimmung“ beschrieben durchgeführt.

HIF-1 α (116kDa) konnte nur unter Hypoxie, nicht aber unter Normoxie nachgewiesen werden (**Abbildung 9**). Das Immunoblotting von HIF-1 α diente somit auch zur Kontrolle der jeweiligen Inkubation. Wurde HIF-1 α im Westernblot detektiert, konnte von einer erfolgreichen Hypoxie- Inkubation ausgegangen werden. Hatten die Zellen während der Inkubation Zugang zu Sauerstoff, wurde HIF-1 α abgebaut und war somit nicht nachweisbar. Die CD3/CD28- Aktivierung führte unter Hypoxie zu einer Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression, wobei immer auch eine Verbreiterung der Bande in den niedermolekularen Bereich zu beobachten war (**Abbildung 9**). Ein gleichmäßiger

Proteinauftrag wurde durch den Nachweis des Strukturproteins β -Aktin (42kDa) auf derselben Membran kontrolliert (Ladungskontrolle). Die Ladungskontrolle zeigt, dass die vermehrte Nachweisbarkeit von HIF-1 α bei den CD3/CD28- aktivierten Zellen, im Vergleich zu den unstimulierten Lymphozyten nicht durch einen größeren Proteinauftrag verursacht wurde (**Abbildung 9**).

Um die bei CD3/CD28- aktivierten Zellen unter Hypoxie beobachtete Verbreiterung der HIF-1 α - Bande genauer beurteilen zu können, erfolgte im nächsten Versuch eine Auftrennung der Proteine in einem 6% SDS- Gel. Hierdurch wurde eine stärkere Größenauftrennung der Proteine erreicht. Der Versuch bestätigte die zuvor gesehenen Ergebnisse. Wiederum war HIF-1 α nur unter Hypoxie nachweisbar (**Abbildung 9**). Die Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression und die Verbreiterung der HIF-1 α - Bande bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten waren deutlicher als im vorangegangenen Versuch zu erkennen (**Abbildung 9**). Wegen der starken Größenauftrennung der Proteine im 6% SDS- Gel war das kleine Strukturprotein β -Aktin (42kDa) nicht mehr nachweisbar. Eine Ladungskontrolle mit β -Aktin war deshalb nicht möglich. Die Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge erfolgte hier durch Färbung der Blotmembran mit Ponceau-S (Daten nicht gezeigt).

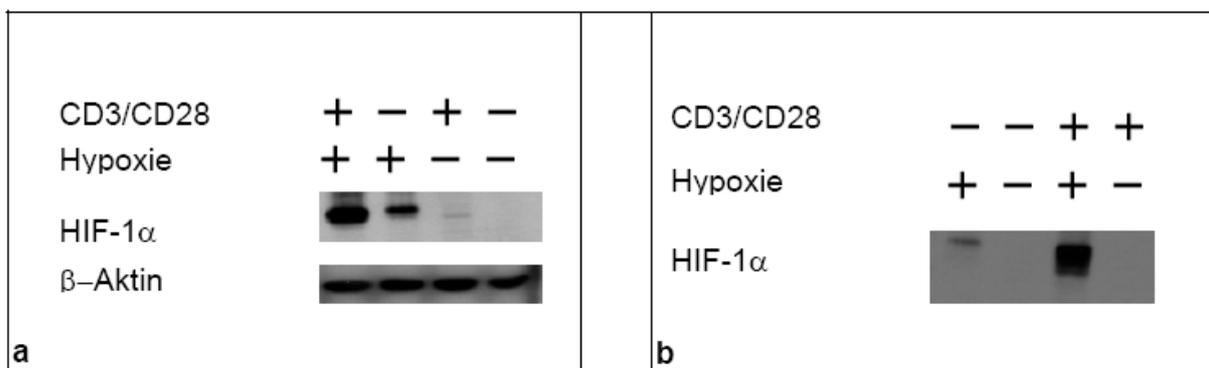


Abbildung 9: Einfluss der CD3/CD28- Aktivierung auf die HIF-1 α - Proteinexpression bei CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie.

Abbildung 9a: Dargestellt ist das Ergebnis eines Westernblots repräsentativ für fünf Versuche. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem 10% SDS Gel. Die HIF-1 α - Banden von links nach rechts: 1. CD3/CD28- aktiviert, Hypoxie 2. Unstimuliert, Hypoxie 3. CD3/CD28- aktiviert, Normoxie 4. Unstimuliert, Normoxie. Die Ladungskontrolle erfolgte mit β -Aktin.

Abbildung 9b: Dargestellt ist das Ergebnis eines Westernblots, repräsentativ für zwei Versuche. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem 6% SDS Gel. Die HIF-1 α - Banden von links nach rechts: 1. Unstimuliert, Hypoxie 2. Unstimuliert, Normoxie 3. CD3/CD28- aktiviert, Hypoxie 4. CD3/CD28- aktiviert, Normoxie. Eine Ladungskontrolle mit β -Aktin war nicht möglich.

4.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungen zur HIF-1 α - mRNA- und Proteinexpression

Die Untersuchungen zeigen, dass

- das Protein HIF-1 α in CD4⁺- T-Lymphozyten nur unter Hypoxie stabilisiert wird, während es unter Normoxie nicht nachweisbar ist.
- die CD3/CD28- Aktivierung der CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie zu einer quantitativen Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression und Verbreiterung der Bande in den niedermolekularen Bereich führt.
- die bei den CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie beobachtete Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression nicht allein auf eine erhöhte HIF-1 α - mRNA- Expression zurückgeführt werden kann, da sich nur bei unstimulierten Zellen unter Hypoxie eine gesteigerte HIF-1 α - mRNA- Expression zeigt.

Als nächstes wurde der Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression von ausgewählten HIF-1- Zielgenen bei unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten untersucht. Die folgende Frage sollte beantwortet werden:

Wie beeinflusst die CD3/CD28- Aktivierung unter Hypoxie die mRNA- Expression von ausgewählten HIF-1- Zielgenen? Führt die unter Hypoxie und CD3/CD28- Aktivierung beobachtete Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression auch zu einer gesteigerten mRNA- Expression der untersuchten HIF-1- Zielgene?

4.1.5 Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen

Nachfolgend werden die Untersuchungen zum Einfluss der Hypoxie auf die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene GAPDH, GLUT-1, PBEF, MIF und CXCR4 dargestellt.

Die Glyceraldehyd- 3- Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) und der Glukosetransporter- 1 (GLUT-1)

Hypoxie führt sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten zu einer Steigerung der GAPDH- und GLUT-1- mRNA- Expression relativ zur Normoxie.

Unter dem Einfluss von Hypoxie kam es sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten zu einer signifikanten Zunahme der GAPDH- mRNA- Expression relativ zur Normoxie (n=6; p1= 0,0244; p2=0,0112) (**Abbildung 10**). Im Vergleich von CD3/CD28- aktivierten und unstimulierten T-Zellen wurde die GAPDH- mRNA- Expression bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie signifikant stärker gesteigert als bei CD3/CD28- aktivierten Lymphozyten (n=6; p3=0,0313). In Zahlen ausgedrückt zeigte sich unter Hypoxie eine 10,23- fach (\pm 2.90 SEM) gesteigerte mRNA- Expression bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten gegenüber einer 3,31- fach (\pm 0.59 SEM) gesteigerten Expression bei CD3/CD28- aktivierten (**Abbildung 10**).

Die GLUT-1- mRNA- Expression wurde sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten relativ zur Normoxie ungefähr zehnfach gesteigert (10,06- fach \pm 3,54 SEM und 10,01- fach \pm 3,72 SEM). Der Anstieg war in beiden Fällen tendenziell signifikant (n=5; p1=0,0625 ,p2=0,0725) (**Abbildung 10**).

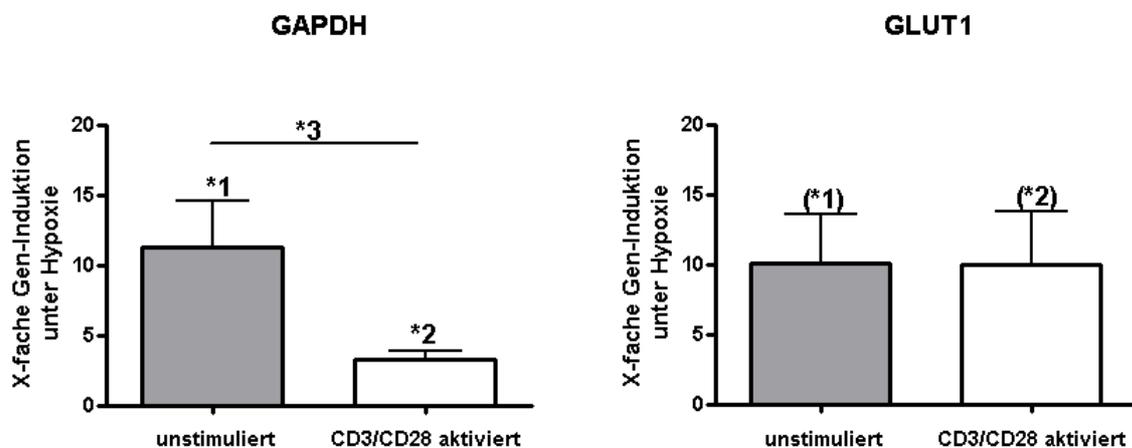


Abbildung 10: Einfluss der Hypoxie auf die mRNA- Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase) und GLUT-1 (Glukosetransporter-1) im Vergleich von unstimulierten (graue Säule) und CD3/CD28- aktivierten (weiße Säule) CD4⁺- T-Lymphozyten. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung des Anstiegs der mRNA- Expression unter Hypoxie relativ zur Normoxie erfolgte mit Hilfe des Ein- parametrischen T-Tests für verbundene Stichproben gegen 1. Für den Vergleich zwischen unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten T-Zellen wurde ein zweiseitiger Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewandt. Die Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Dargestellt ist das Ergebnis von sechs (GAPDH) und fünf (GLUT-1) unabhängigen Versuchen
GAPDH: *1 p=0,0244, *2 p=0,0112, *3 p=0,0313
GLUT-1: (*1) p=0.0625, (*2) p=0,0725

Der pre B-cell colony enhancing factor (PBEF), der macrophage migration inhibitory factor (MIF) und der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)

Hypoxie führt sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten zu einer Steigerung der mRNA- Expression von PBEF, MIF und CXCR4 relativ zur Normoxie.

Die **Abbildung 11** zeigt, dass es bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter dem Einfluss der Hypoxie zu einer 3,52- fachen ($\pm 0,8$ SEM), signifikanten Steigerung ($n=6$; $p_1=0,0254$) der PBEF- mRNA- Expression kam. Auch bei CD3/CD28- aktivierten Zellen zeigte sich eine hoch signifikante ($n=6$; $p=0,0038$) Zunahme der PBEF- mRNA- Expression um ca. 50% (Faktor $1,48 \pm 0,09$ SEM). Im direkten Vergleich war der Anstieg bei unstimuliertender Zellen deutlich höher als bei CD3/CD28- aktivierten. Ein zweiseitiger Wilcoxon Test für verbundene Stichproben war tendenziell signifikant ($n=6$; $p=0,0938$).

Die mRNA- Expression vom HIF-1- Zielgen MIF wurde unter Hypoxie sowohl bei unstimulierten ($4,25$ - fach $\pm 1,19$ SEM) als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten ($3,41$ - fach $\pm 1,29$ SEM) relativ zur Normoxie hochreguliert (**Abbildung 11**). Der Anstieg war für unstimulierte Zellen statistisch signifikant ($n=6$; $p_1=0,0414$). Bei CD3/CD28- aktivierten war der Anstieg nicht signifikant ($n=6$; $p=0,122$). Es zeigte sich kein Unterschied der MIF- mRNA- Expression unter Hypoxie im Vergleich von unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten (**Abbildung 11**).

Genau wie für MIF konnte auch für das HIF-1- Zielgen CXCR4 unter Hypoxie eine signifikante Zunahme der mRNA- Expression sowohl bei unstimulierten ($3,26$ -fach $\pm 0,69$ SEM) als auch bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten ($3,38$ fach $\pm 0,91$ SEM) beobachtet werden ($n=6$; $p_1=0,0217$, $p_2=0,0478$). Im Vergleich der CXCR4- mRNA- Expression von unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten T-Zellen unter dem Einfluss der Hypoxie zeigte sich kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 11**).

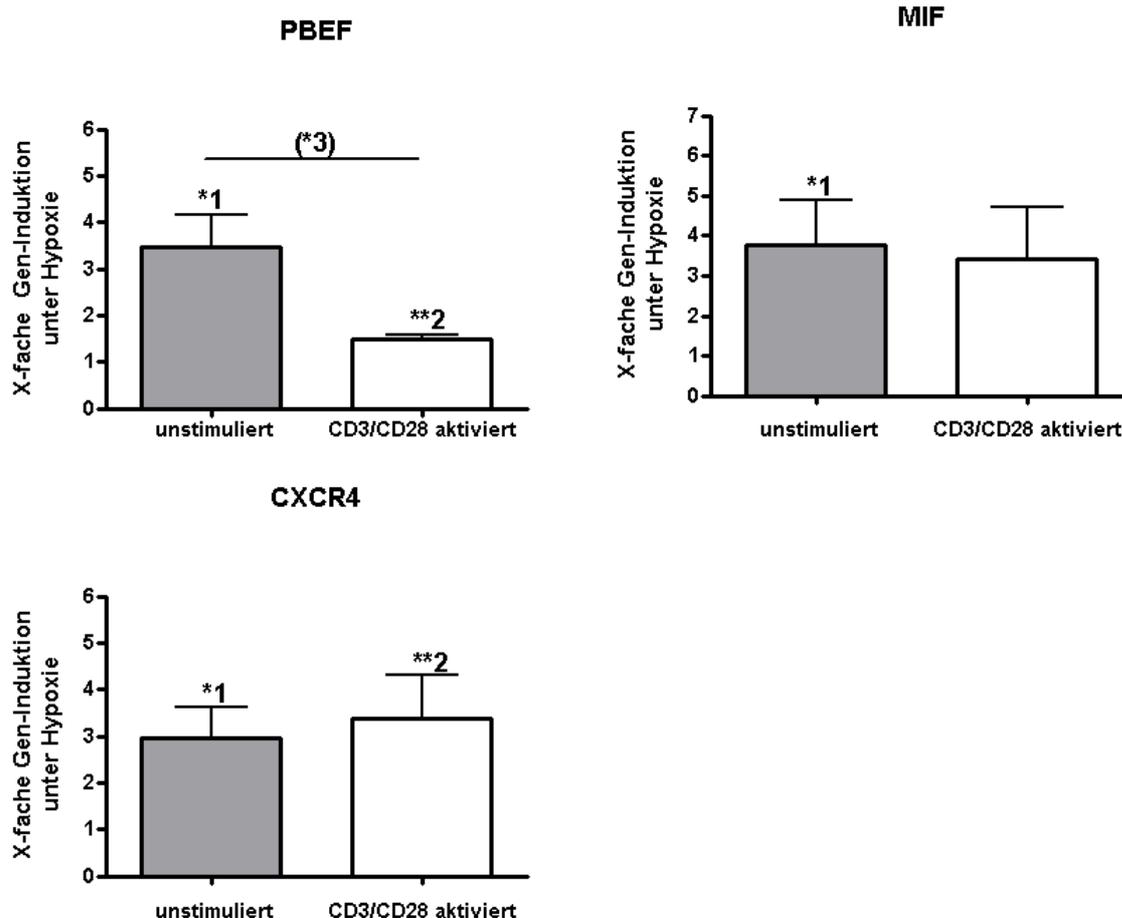


Abbildung 11: Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression von PBEF (*pre B-cell colony enhancing factor*), MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) und CXCR4 (Chemokin C-X-C Rezeptor 4) im Vergleich von unstimulierten (graue Säule) und CD3/CD28- aktivierten (weiße Säule) CD4⁺- T-Lymphozyten relativ zur Normoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung des Anstiegs der mRNA- Expression unter Hypoxie relativ zur Normoxie erfolgte mit Hilfe des Ein- parametrischen T-Tests für verbundene Stichproben gegen 1. Für den Vergleich zwischen unstimulierten und CD3/CD28- aktivierten T-Zellen wurde ein zweiseitiger Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben angewandt. Die Balken zeigen den SEM (standard error of the mean) an. Dargestellt ist das Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen

PBEF: *1 $p=0,0254$, **2 $p=0,0038$, (*3) $p=0,0938$

MIF: *1 $p=0,0414$

CXCR4: *1 $p=0,0217$ *2 $p=0,0478$

4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Unter Hypoxie wird die mRNA- Expression der für den Energiestoffwechsel bedeutenden HIF-1- Zielgene GAPDH und GLUT-1 sowie die für die Pathogenese der RA bedeutenden HIF-1- Zielgene PBEF, MIF und CXCR4 sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten T-Zellen hochreguliert.
- Die unter Hypoxie bei aktivierten T-Lymphozyten beobachtete quantitative Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen (**Abbildung**

9) führt nach 20 Stunden nicht zu einer entsprechend stärkeren HIF-1- Zielgen-Expression (**Abbildung 10** und **Abbildung 11**).

Bei der zweiten Aussage muss allerdings beachtet werden, dass nur der relative Einfluss der CD3/CD28- Aktivierung auf die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene ermittelt wurde. Möglicherweise führt schon die CD3/CD28- Aktivierung zu einer erheblichen Steigerung der Transkripte. Ausgehend von einem erhöhten Ausgangswert könnte unter Hypoxie dann selbst eine geringere relative Zunahme der mRNA-Expression bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten eine höhere absolute Menge von Transkripten zur Folge haben.

Nachfolgend wurde der Einfluss der Hypoxie auf die Aktivierung der CD4⁺- T-Lymphozyten untersucht (**Abbildung 5**).

4.1.7 Einfluss der Hypoxie auf die Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten

CD3/CD28- aktivierte T-Lymphozyten zeigen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine Zunahme ihrer Zellgröße und eine verstärkte Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25.

Werden T-Lymphozyten über die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 aktiviert, beginnen sie vermehrt Proteine und andere Zellbestandteile zu synthetisieren. Diese anabolen Stoffwechselprozesse führen zu einem raschen Größenzuwachs der Zelle (Blastogenese). Weiterhin erscheinen nach der Aktivierung zuvor nicht nachweisbare Moleküle an der Zelloberfläche, die deshalb auch als Aktivierungsmarker bezeichnet werden. Einer der ersten nach der Zellaktivierung nachweisbaren Aktivierungsmarker ist das Oberflächenmolekül CD69 (*very early activation* antigen). Das Maximum der CD69-Expressionsstärke wird nach etwa 20 bis 24 Stunden erreicht (siehe auch Kapitel 1.3 „Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten“). Ein weiterer Aktivierungsmarker ist CD25 (die α -Kette des IL-2 Rezeptors).

Um den Einfluss von Hypoxie auf den Aktivierungszustand von CD3/CD28- aktivierten T-Zellen zu untersuchen, wurde der Anteil der CD69- und CD25- tragenden Zellen an der Gesamtpopulation nach 20 Stunden Inkubation unter Normoxie und Hypoxie durchflußzytometrisch gemessen. Im Vorwärts- /Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) konnte

gleichzeitig die charakteristische Größenzunahme der aktivierten Zellen dargestellt werden.

Die CD3/CD28- Aktivierung führte nach der 20- stündigen Inkubation sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zur charakteristischen Zunahme der T-Zellgröße (Blastogenese) (**Abbildung 12**).

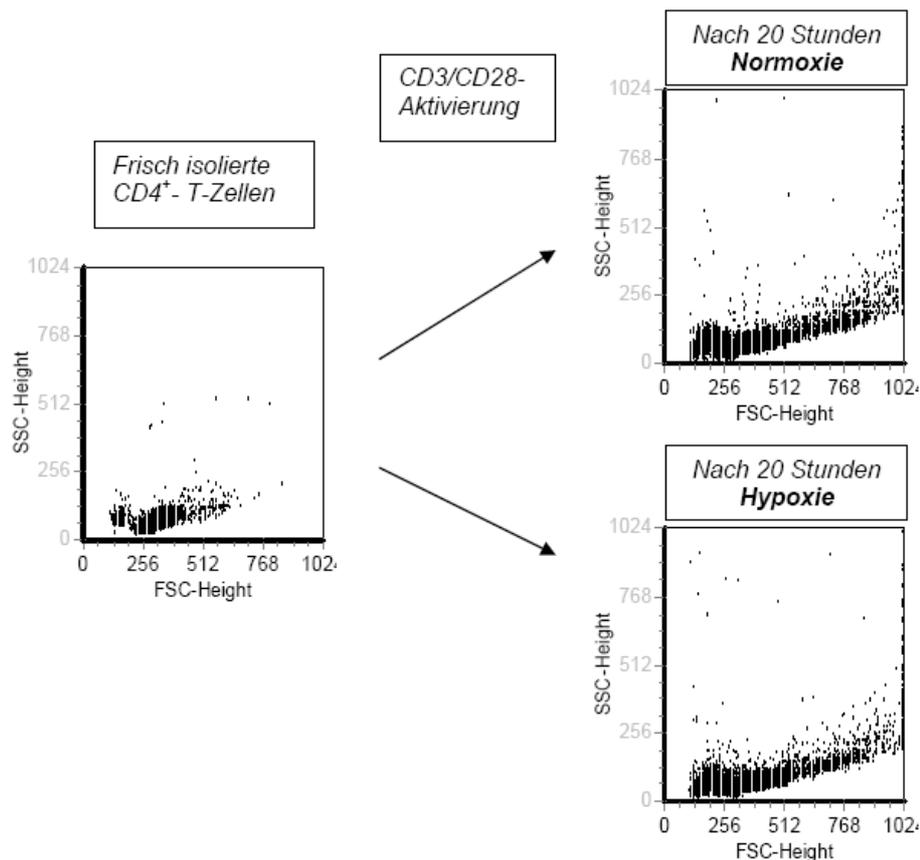
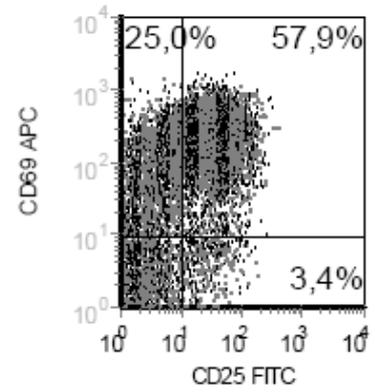
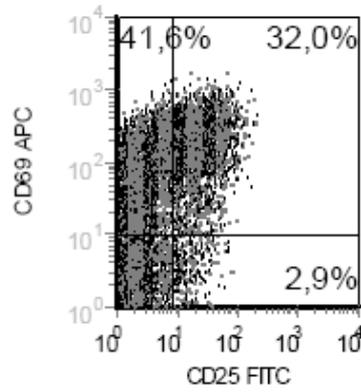
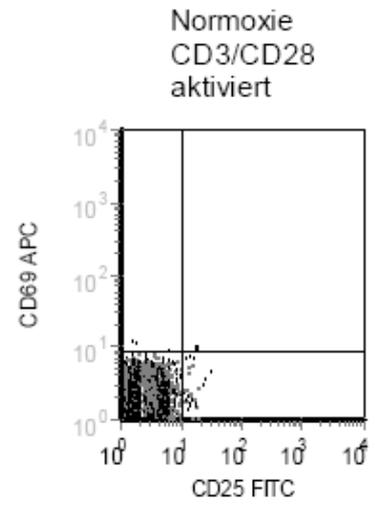
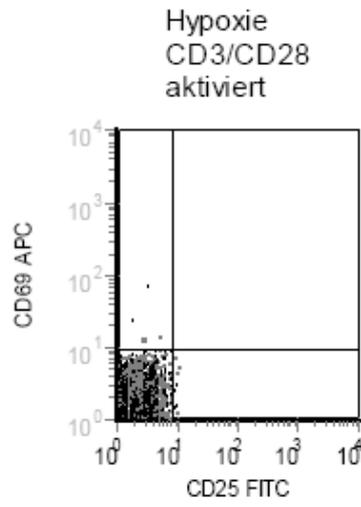


Abbildung 12: Größenzunahme der CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten nach 20 Stunden Inkubation unter Normoxie (Dotplot rechts oben) und Hypoxie (Dotplot rechts unten) durchflußzytometrisch gemessen im Vorwärts- /Seitwärtsstreulicht FSC/SSC, repräsentativ für alle durchgeführten Versuche.

In **Abbildung 13** ist, repräsentativ für einen von sechs Versuchen, die Messung des prozentualen Anteils der CD25- und CD69- exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen dargestellt. Nur bei CD3/CD28- aktivierten T-Zellen zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine deutliche Zunahme des Anteils Aktivierungsmarker- positiver Zellen an der Gesamtpopulation, während bei unstimulierten T-Lymphozyten keine Zunahme beobachtet wurde.

Isotypen-Kontrollen:



Isotypen-Kontrollen:

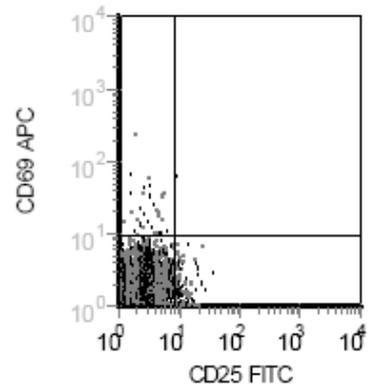
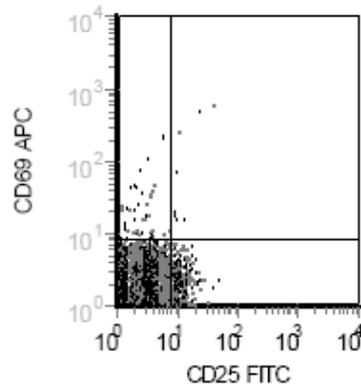
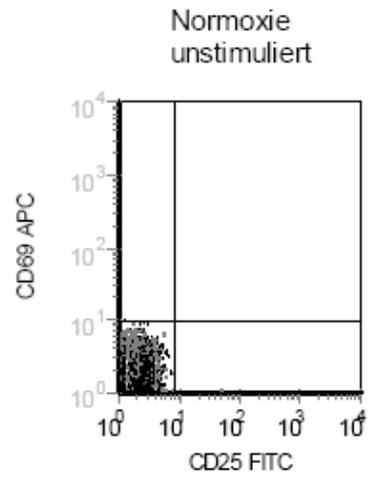
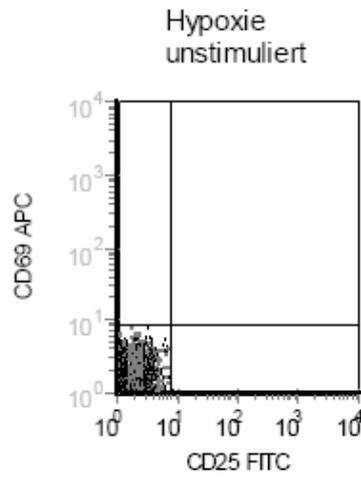


Abbildung 13 (vorherige Seite): Durchflußzytometrische Messung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 bei CD3/CD28- aktivierten und unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie. Die Dotplots in der 1. und 3. Reihe zeigen die Isotypkontrollen der Antikörper gegen CD69 (Ordinate) und CD25 (Abszisse) für CD3/CD28- aktivierte und unstimulierte CD4⁺- T-Lymphozyten. Die Dotplots in der 2. und 4. Reihe zeigen die Messungen mit den Antikörpern gegen CD69 APC (Ordinate) und CD25 FITC (Abszisse) für CD3/CD28- aktivierte und unstimulierte CD4⁺- T-Lymphozyten. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse der unter Hypoxie inkubierten, auf der rechten Seite die Ergebnisse der unter Normoxie inkubierten Zellen dargestellt. Gezeigt wird das Ergebnis eines Experiments von insgesamt sechs unabhängigen Versuchen.

Die genauen prozentualen Anteile der Aktivierungsmarker- Expression können der **Abbildung 13** entnommen werden.

Um den Einfluss der Hypoxie auf die Aktivierungsstärke zu quantifizieren, wurde der durchschnittliche Anteil der

- CD69⁺- Zellen
- CD25⁺- Zellen
- CD69⁺/CD25⁺- Zellen
- CD25⁺/CD69⁻- Zellen
- CD69⁺/CD25⁻- Zellen

bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie (schwarze Säule) und Hypoxie (weiße Säulen) in sechs Versuchen bestimmt (**Abbildung 14**).

Bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten zeigt sich unter Hypoxie eine Abnahme des Anteils CD25⁺- Zellen, während der Anteil CD69⁺- Zellen im Vergleich zur Normoxie unverändert ist.

Nach sechs Versuchen zeigte sich im Vergleich von der Normoxie- zur Hypoxie- Inkubation keine signifikante Änderung des durchschnittlichen Anteils von CD69⁺- T-Zellen. Durchschnittlich waren unter Normoxie 68,77% ± 6,92 SEM und unter Hypoxie 66,78% ± 4,18 SEM der Zellen CD69⁺ (**Abbildung 14**). Dagegen nahm der Anteil CD25⁺- T-Lymphozyten von 43,27% ± 6,09 SEM unter Normoxie auf 32,15% ± 2,10 SEM unter Hypoxie ab (**Abbildung 14**). Weiterhin zeigte sich sowohl eine Abnahme der CD69/CD25-doppelt positiven Zellen von 39,17% ± 6,41 SEM auf 28,95% ± 2,55 SEM (**Abbildung 14**) als auch der ausschließlich CD25⁺- Zellen von 4,1% ± 0,59 SEM auf 3,2% ± 0,70 SEM (CD25⁺/CD69⁻; **Abbildung 14**). Hieraus ergibt sich zwangsläufig, dass unter Hypoxie der relative Anteil an rein CD69⁺- T-Lymphozyten (CD69⁺/CD25⁻) größer war als unter Normoxie (37,83% ± 4,52 SEM und 29,60% ± 3,83 SEM;

Abbildung 14). Die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben zeigte nur für die rein CD69⁺- T-Lymphozyten (CD69⁺/CD25⁻) eine statistische Signifikanz (n=6; p=0,0313).

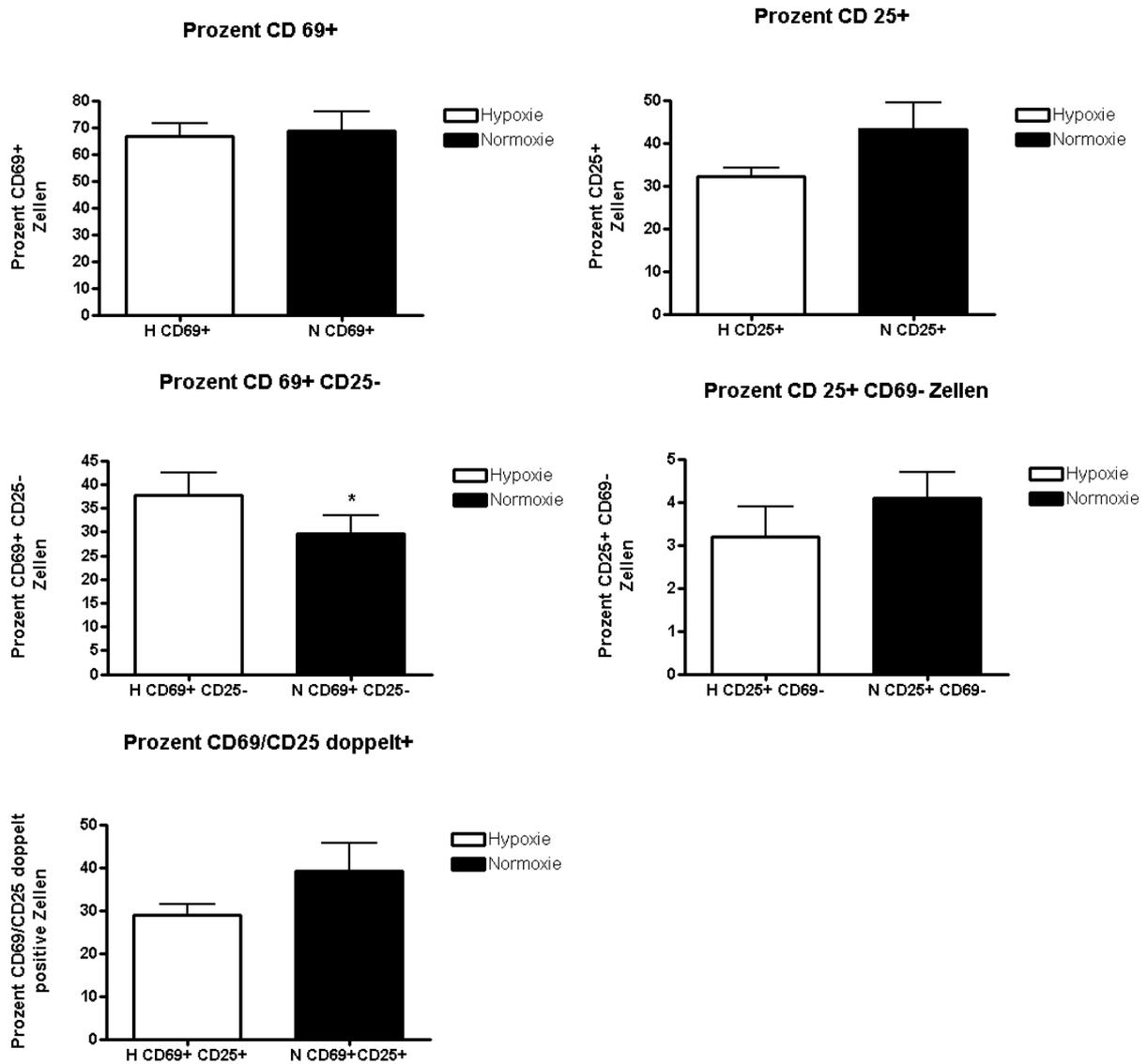


Abbildung 14: Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf den prozentualen Anteil von CD69⁺, CD25⁺, CD69⁺/CD25⁻, CD25⁺/CD69⁻ und CD69/CD25 doppelt positiven Zellen bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtpopulation. Die weißen Säulen zeigen die Ergebnisse unter Hypoxie, die schwarzen Säulen die Ergebnisse unter Normoxie. Dargestellt ist das Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen. Der statistische Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie erfolgte mit dem Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben. Signifikante Unterschiede sind durch ein * gekennzeichnet. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt sind die Ergebnisse von sechs unabhängigen Versuchen. CD69⁺/CD25⁻: * p=0,0313

Bei der Bestimmung des Anteils der Aktivierungsmarker- tragenden T-Zellen wurde nicht berücksichtigt, wie stark die Oberflächenmoleküle CD69 und CD25 jeweils auf den Zellen exprimiert wurden. Die **Abbildung 15** zeigt beispielhaft für ein Experiment die

Messungen der Aktivierungsmarkerfrequenz, d.h. die Expressionsstärke von CD69 und CD25 auf jeder einzelnen Zelle.

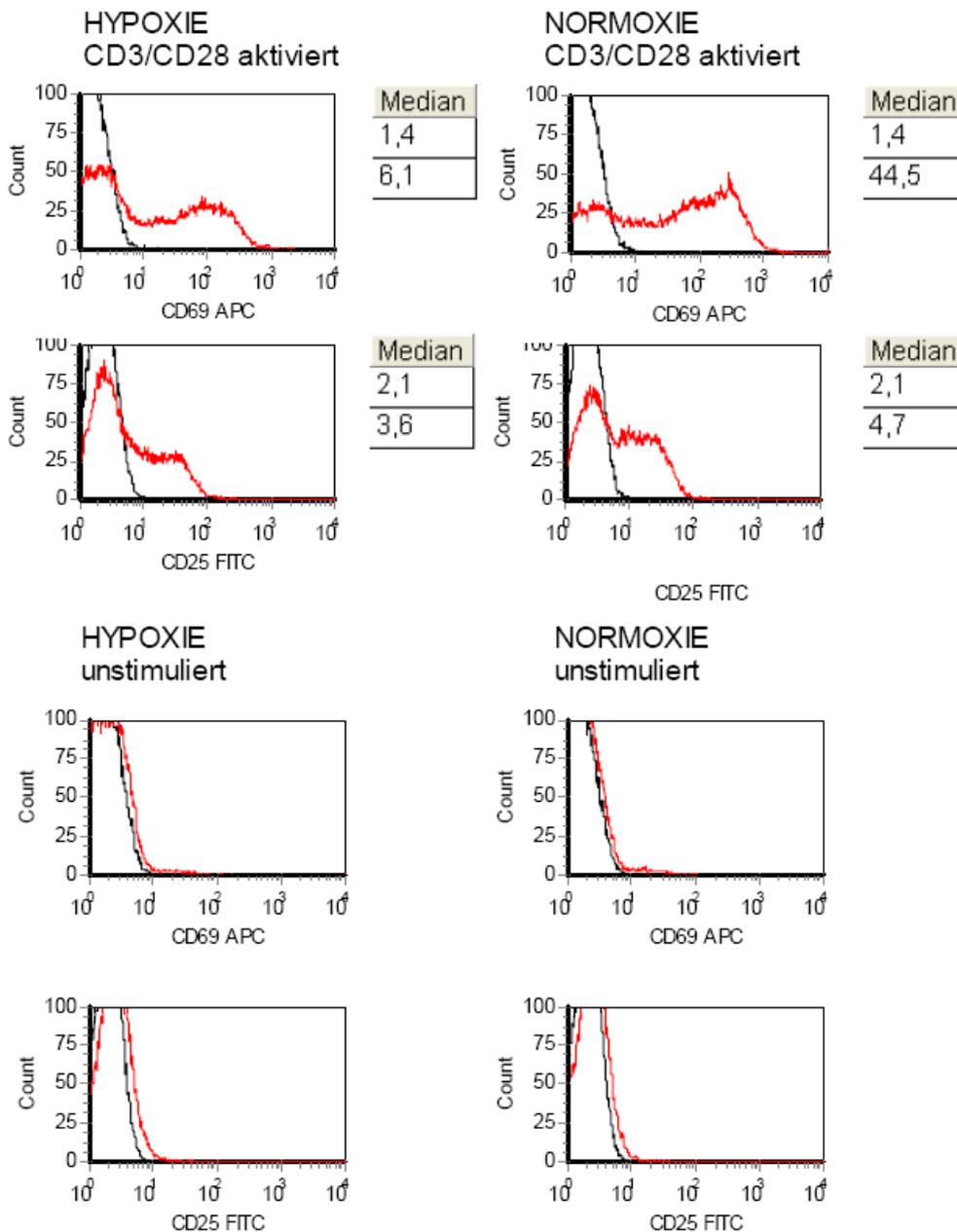


Abbildung 15: Durchflußzytometrische Messung der Frequenz von CD69 und CD25 bei CD3/CD28-aktivierten und unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie. Der schwarze Graph zeigt die Messung der Isotypkontrollen, der rote Graph die Messung mit den Antikörpern gegen CD69 APC (1. und 3. Reihe) oder CD25 FITC (2. und 4. Reihe). Der obere Wert neben der Abbildung zeigt den Median der Fluoreszenzintensität (MFI) für die Isotypkontrolle, der untere Wert den MFI für die Messung mit den intakten Antikörpern gegen CD69 und CD25. Die ersten beiden Reihen zeigen die Ergebnisse der CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten, die 3. und 4. Reihe die Ergebnisse der unstimulierten Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments repräsentativ für sechs unabhängige Versuche.

Bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten wurde keine wesentliche Steigerung der CD69- und CD25- Frequenz festgestellt. Im Gegensatz dazu, führte die CD3/CD28- Aktivierung sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer Zunahme der Frequenz der Aktivierungsmarker (roter Graph). Zur Bestimmung des Einflusses der Hypoxie auf die Expressionsstärke von CD69 und CD25 wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt (**Abbildung 16**).

*Die CD3/CD28- Aktivierung der T-Zellen führt unter Hypoxie zu einer geringeren Expressionstärke der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 als unter Normoxie, gemessen als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) (**Abbildung 16**).*

Zur Auswertung des Einflusses der Hypoxie auf die Expressionsstärke der Aktivierungsmarker wurde die mediane Fluoreszenzaktivität (MFI) bestimmt. Unter Hypoxie wurde bei CD3/CD28- aktivierten T-Zellen eine geringere MFI von CD69 und CD25 beobachtet als unter Normoxie (**Abbildung 16**). Die MFI für CD69 sank von durchschnittlich $66,42 \pm 25,10$ SEM unter Normoxie auf $38,82 \pm 8,58$ SEM (n=6; p=0,563) unter Hypoxie, die MFI für CD25 von $7,15 \pm 3,19$ SEM unter Normoxie auf $2,30 \pm 0,38$ SEM unter Hypoxie (n=6; p=0,313) (**Abbildung 16**). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

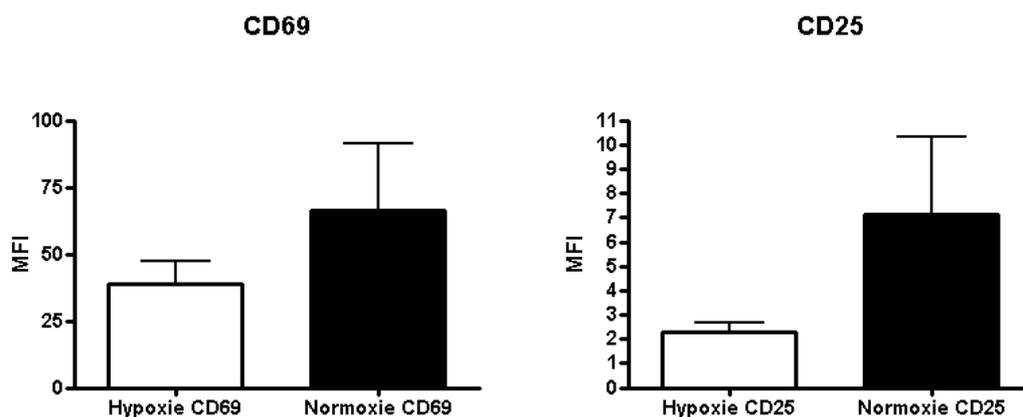


Abbildung 16: Median der Fluoreszenzintensität (MFI) von CD69 und CD25 bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie (weiße Säulen) und Normoxie (schwarze Säulen). Der statistische Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie erfolgte mit einem zweiseitigen Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben und zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das durchschnittliche Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen.

4.1.8 Zusammenfassung

Bei unter Hypoxie inkubierten CD3/CD28- aktivierten T-Zellen ist der Anteil der CD25⁺- Zellen geringer als unter Normoxie. Der Anteil der CD69⁺- T-Lymphozyten bleibt unverändert. Gleichzeitig kann unter Hypoxie eine Abnahme der MFI für die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 festgestellt werden.

4.2 Zweiter Teil der Ergebnisse

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die HIF-1 α - mRNA- und Proteinexpression und die mRNA- Expression ausgewählter HIF-1- Zielgene bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T- Lymphozyten unter Hypoxie untersucht.

4.2.1 Einfluss von Dexamethason und RU486 auf die Vitalität der CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie

Um auszuschließen, dass Hypoxie, CD3/CD28- Aktivierung, Dexamethason bzw. RU486 die Vitalität der Zellen beeinflussen, wurde nach 20 Stunden Inkubation der prozentuale Anteil an überlebenden Zellen in jeder Probe gemessen. Dabei wurden die Faktoren sowohl einzeln, als auch in den möglichen Kombinationen bestimmt. Untersuchungen zum Einfluss von Dexamethason auf unstimulierte T-Lymphozyten waren nicht Teil dieser Arbeit, weshalb auch nicht der Einfluss von Dexamethason auf die Vitalität von unstimulierten T-Lymphozyten ermittelt wurde. Zur Messung der Vitalität wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Nach der Inkubation waren bei allen gemessenen Proben immer mehr als 98% der Zellen PI- negativ (lebend).

4.2.2 Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1 α - mRNA- Expression

Die Bestimmung der mRNA- Expression erfolgte mittels Real- Time- PCR. Gemessen wurde die relative Änderung der mRNA- Expression nach Behandlung mit Dexamethason, bzw. Dexamethason und RU486 bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T- Lymphozyten unter Hypoxie. Die folgende Gleichung wurde für die Auswertung der Daten angewandt:

$$\text{Einfluss von Dexamethason* auf die mRNA-Expression unter Hypoxie} = \frac{\text{mRNA- Expression bei Dexamethasonbehandlung unter Hypoxie}}{\text{mRNA- Expression un behandelter Zellen unter Hypoxie}}$$

* Bei den Versuchen mit RU486 muss Dexamethason in der Gleichung entsprechend durch „Dexamethason und RU486“ ersetzt werden.

Ein Wert von 1 in den folgenden Abbildungen zeigt, dass die mRNA- Expression unter Dexamethason – bezogen auf unbehandelte Zellen - unverändert war. Ein Wert von z.B. 2 beschreibt eine Verdopplung und ein Wert von z.B. 0,5 eine Halbierung der mRNA- Expression unter Dexamethason.

Die statistische Auswertung der folgenden Abbildungen erfolgte mit dem Einparametrischen T-Test für verbundene Stichproben.

Der Hypoxie induzierte Faktor- 1 α (HIF-1 α)

Die Behandlung der CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten mit Dexamethason führt unter Hypoxie zu keiner signifikanten Änderung der HIF-1 α - mRNA- Expression.

Die **Abbildung 17** zeigt den Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1 α - mRNA- Expression bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie. Die Behandlung mit 10⁻⁵M Dexamethason führte zu keiner signifikanten Änderung der HIF-1 α - mRNA- Expression (n=5; p=0,420). Dexamethason 10⁻⁸M bewirkte einen durchschnittlichen Anstieg der HIF-1 α - mRNA- Expression um den Faktor 1,73 \pm 0,65 SEM. Diese Veränderung war statistisch nicht signifikant (n=4; p=0,346).

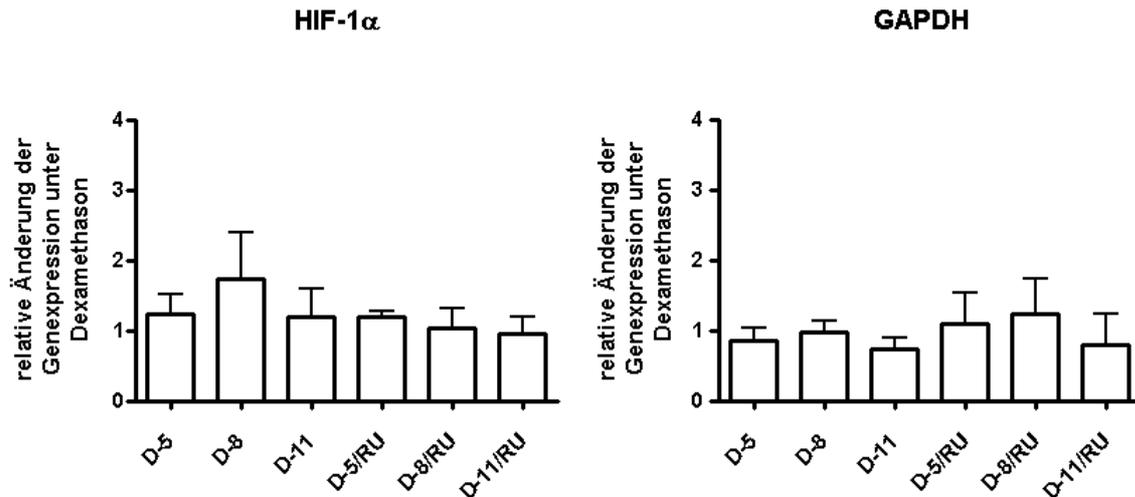


Abbildung 17: Einfluss der Behandlung mit 10^{-5} M, 10^{-8} M, 10^{-11} M Dexamethason (D-5, D-8, D-11) oder Dexamethason und RU486 10^{-6} M (D-5/RU, D-8/RU, D-11/RU) auf die mRNA- Expression des Hypoxie induzierten Faktors- 1 α (HIF-1 α) und des Glykolyseenzym Glyceraldehyd- 3- Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) relativ zu CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Die statistische Auswertung mit dem Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1 zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen für D-5 und vier unabhängige Versuche für die übrigen Konditionen.

Auch in der Dexamethasonkonzentration 10^{-11} M oder bei Zugabe des Steroidrezeptorblockers RU486 zeigte sich keine signifikante Änderung der mRNA- Expression relativ zu unbehandelten Zellen (**Abbildung 17**).

4.2.3 Einfluss von Dexamethason und RU486 auf die HIF-1 α - Proteinexpression bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie bzw. Hypoxie

Dexamethason führt unter Hypoxie bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten zu einer dosisabhängigen Reduktion der HIF-1 α - Proteinexpression. Der Steroidrezeptorblocker RU486 antagonisiert diesen Effekt vollständig.

HIF-1 α konnte nur unter Hypoxie nachgewiesen werden, während es unter Normoxie nicht detektiert wurde (**Abbildung 18**). Die Zugabe von Dexamethason führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der HIF-1 α - Proteinexpression. Dabei war unter der höchsten Dexamethasonkonzentration (10^{-5} M) der stärkste Abschwächungseffekt auf die HIF-1 α - Proteinexpression unter Hypoxie zu beobachten. Auch in der tausendfach geringeren Dosierung von 10^{-8} M konnte man noch einen Abschwächungseffekt

erkennen (**Abbildung 18**). In einer Konzentration von 10^{-11} M zeigte Dexamethason schließlich keinen erkennbaren Effekt auf die HIF-1 α - Proteinexpression (**Abbildung 18**). Um zu überprüfen, ob die Wirkung von Dexamethason über den Glukokortikoidrezeptor (GCR) vermittelt wurde, erfolgte die Zugabe des unspezifischen Steroidrezeptorantagonisten RU486 (RU). RU486 antagonisierte nicht nur die Wirkung von Dexamethason in allen Dosierungen, es konnte darüberhinaus eine starke Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression beobachtet werden (**Abbildung 18**). Zur Kontrolle wurden alle unter Hypoxie durchgeführten Versuche auch unter Normoxie mit Zellen des gleichen Spenders durchgeführt. Hierbei konnte HIF-1 α weder bei Zugabe von Dexamethason noch von RU486 detektiert werden. (**Abbildung 18**).

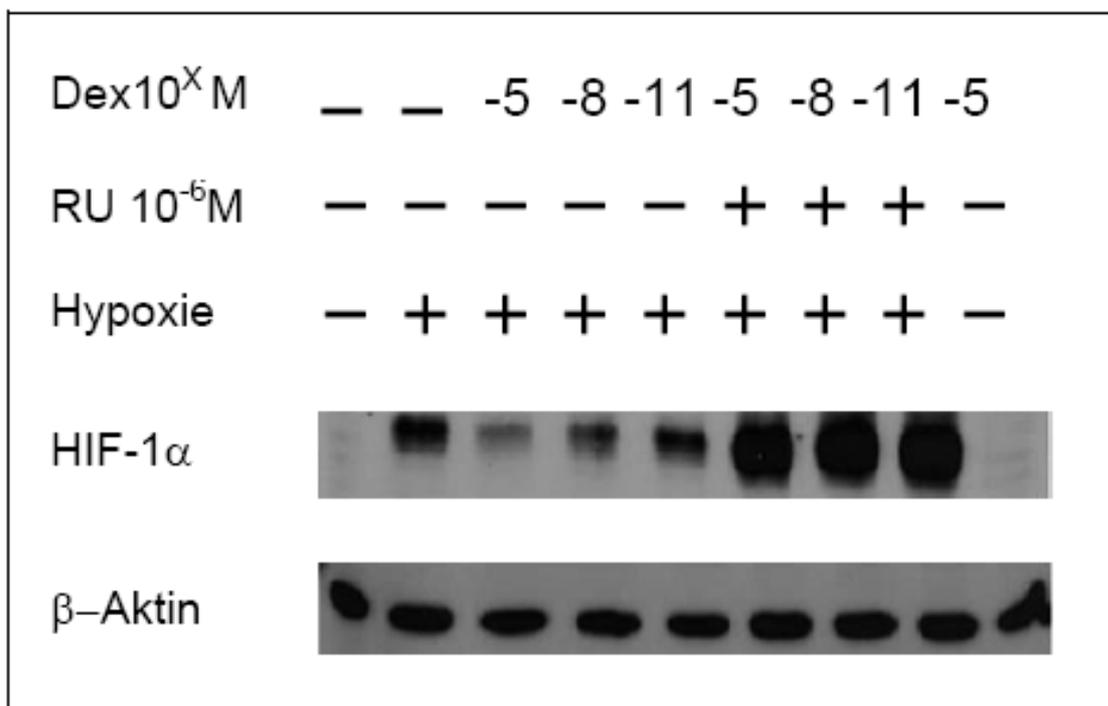


Abbildung 18: Westernblot zum Nachweis der HIF-1 α - Proteinexpression. Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Dexamethasonkonzentrationen (Dex) auf die Expression von HIF-1 α . An antagonisiert wurde der Effekt durch RU486 (RU). Die HIF-1 α - Banden von links nach rechts: 1. Ohne Dex (-), ohne RU (-), Normoxie (-) 2. Ohne Dex (-), ohne RU, Hypoxie (+) 3.-5. 10^{-5} M Dexamethason (-5) bis 10^{-11} M (-11), ohne RU (-), Hypoxie (+) 6.-8. Dex 10^{-5} M (-5) bis 10^{-11} M (-11), mit RU 10^{-6} M (+), Hypoxie (+) 9. Dex 10^{-5} M, ohne RU (-), Normoxie (-). Die Ladungskontrolle erfolgte mit β -Aktin. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments repräsentativ für sechs Versuche.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1 α - mRNA- und Proteinexpression

Die Untersuchungen zeigen, dass

- Dexamethason bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie zu einer Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression führt.
- RU486 den Dexamethasoneneffekt antagonisiert und darüber hinaus eine Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression bewirkt.
- die durch Dexamethason unter Hypoxie beobachtete Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression nicht auf einer gehemmten HIF-1 α - mRNA- Expression beruht.

Als nächstes wurde der Einfluss von Dexamethason auf die Regulation von ausgewählten HIF-1- Zielgenen bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie untersucht. Das Ziel war es, folgende Frage zu beantworten:

- Wie beeinflusst Dexamethason die mRNA- Expression ausgewählter HIF-1- Zielgene bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie? Führt die, unter Hypoxie bei Dexamethason- behandelten Zellen, beobachtete Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression auch zu einer entsprechenden Abnahme der mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen?

4.2.5 Einfluss von Dexamethason auf die mRNA- Expression von HIF-1 Zielgenen

Nachfolgend werden die Ergebnisse zum Einfluss von Dexamethason auf die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene GAPDH, PBEF, MIF und CXCR4 dargestellt.

Das Glykolyseenzym Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)

Die Behandlung der CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten mit Dexamethason führt unter Hypoxie zu keiner signifikanten Änderung der GAPDH- mRNA- Expression.

Unter dem Einfluss von 10⁻⁵M Dexamethason zeigte sich unter Hypoxie keine signifikante Änderung der GAPDH- mRNA- Expression (n=5; p=0,453) von CD3/CD28 aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten unter Hypoxie. Auch geringere Dexamethason- konzentrationen von 10⁻⁸M und 10⁻¹¹M bzw. Dexamethason und 10⁻⁶M RU486 führten zu keiner signifikanten Änderungen der GAPDH- mRNA- Expression (**Abbildung 17**).

Das Adipokin pre B-cell enhancing factor (PBEF) und das Zytokin macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Dexamethason führt bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie zu keiner signifikanten Änderung der mRNA- Expression von PBEF und MIF.

Wie bei dem zuvor untersuchten HIF-1- Zielgen hatte Dexamethason in der Dosierung 10^{-5} M keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA- Expression von PBEF (n=5; p=0,569) und MIF (n=5; p=0,505) bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie (**Abbildung 19**). 10^{-8} M Dexamethason führte bei beiden Genen zu einer geringen Hochregulation der mRNA- Expression (PBEF: $1,425 \pm 0,457$ SEM; MIF: $1,748 \pm 0,647$ SEM). Die Veränderungen waren statistisch aber nicht signifikant (PBEF: n=4; p=0,421; MIF: n=4; p=0,331). Auch 10^{-11} M Dexamethason oder die Kombination aus Dexamethason und RU486 bewirkte keine signifikante Änderung der mRNA- Expression.

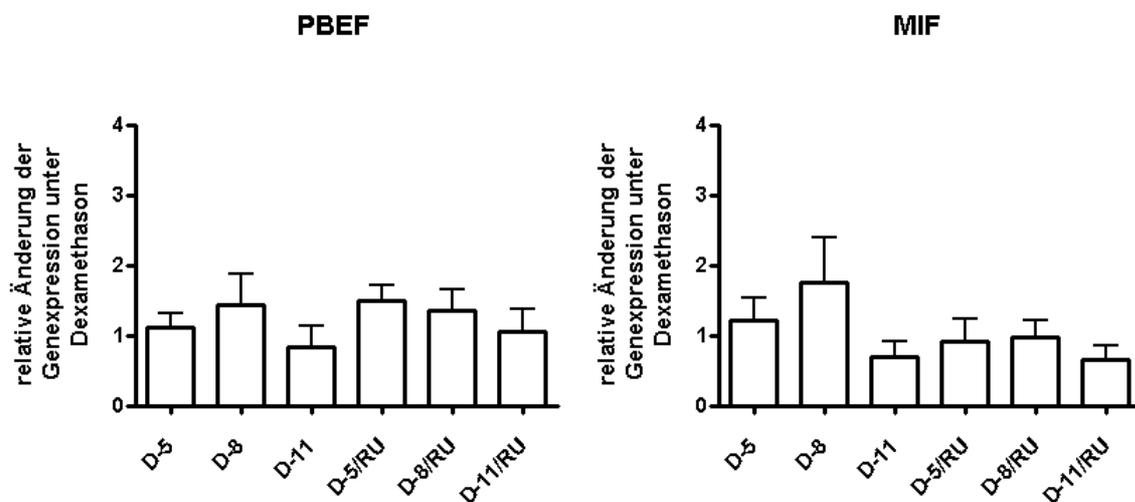


Abbildung 19: Einfluss der Behandlung mit 10^{-5} M, 10^{-8} M, 10^{-11} M Dexamethason (D-5, D-8, D-11) oder Dexamethason und RU486 10^{-6} M (D-5/RU, D-8/RU, D-11/RU) auf die mRNA- Expression des Adipokins *pre B-cell colony enhancing factor* (PBEF, Visfatin) und des Zytokins *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), relativ zu unbehandelten CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Die statistische Auswertung mit dem Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1 zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das Ergebnis von fünf unabhängigen Versuchen für D-5 und vier unabhängige Versuche für die übrigen Konditionen.

In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse zeigte sich im Gegensatz zu dem deutlich inhibierenden Effekt von 10^{-5} M und 10^{-8} M Dexamethason auf die HIF-1 α -

Proteinexpression (**Abbildung 18**) bei den anschließenden Untersuchungen keine wesentliche Änderung der mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene GAPDH, PBEF und MIF unter Dexamethasonbehandlung.

Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)

Unter dem Einfluss von Dexamethason kommt es bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie zu einer dosisabhängigen Steigerung der CXCR4- mRNA- Expression.

Dexamethason regulierte dosisabhängig die CXCR4- mRNA- Expression hoch. In der höchsten Konzentration von 10^{-5} M Dexamethason zeigte sich ein $3,58 (\pm 0,69 \text{ SEM})$ -facher, signifikanter Anstieg der mRNA- Expression ($n=5$; $p_1=0,0198$) (**Abbildung 20**). Auch in einer Konzentration von 10^{-8} M Dexamethason konnte eine $2,69$ - fache ($\pm 0,16 \text{ SEM}$), signifikante Zunahme der mRNA- Expression ($n=4$; $p_2=0,0018$) gemessen werden. In einer tausendfach geringeren Dosierung war dagegen keine signifikante Änderung der mRNA- Expression im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen festzustellen. Die Blockade des Glukokortikoidrezeptors (GCR) durch RU486 antagonisierte die Wirkung von Dexamethason vollständig, und es zeigte sich sogar eine Abnahme der mRNA- Expression. Diese war umso stärker, je weniger Dexamethason gleichzeitig zugegeben wurde. Die Kombination aus Dexamethason 10^{-5} M oder 10^{-8} M und RU486 führte durchschnittlich zu einer Verringerung der mRNA- Expression um den Faktor $0,51 \pm 0,21 \text{ SEM}$ und $0,44 \pm 0,14 \text{ SEM}$ (**Abbildung 20**). Bei gleichzeitiger Gabe von 10^{-11} M Dexamethason und RU486 nahm die mRNA- Expression sogar noch weiter ab (Faktor $0,19 \pm 0,05 \text{ SEM}$). Die Abnahme der mRNA- Expression bei der kombinierten Gabe von RU486 und Dexamethason 10^{-8} M oder 10^{-11} M war statistisch signifikant ($n=4$; $p_3=0,0276$, $p_4=0,0005$).

CXCR4

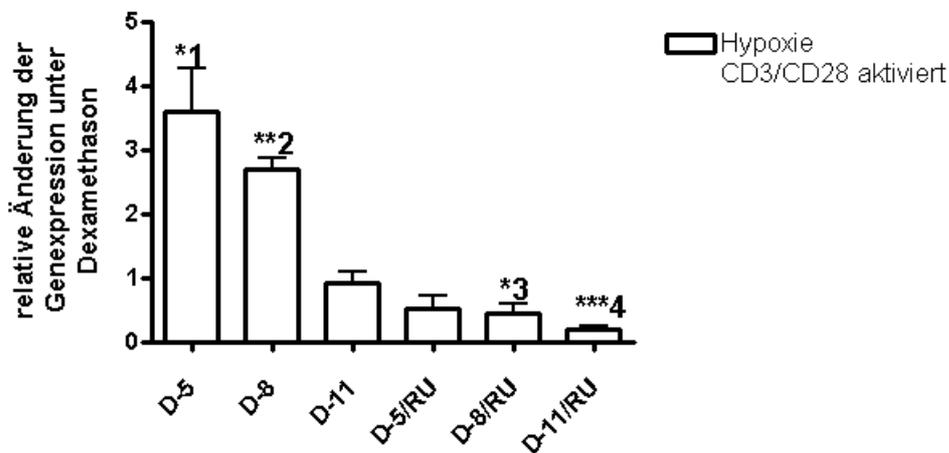


Abbildung 20: Einfluss von Dexamethason 10^{-5} M, 10^{-8} M, 10^{-11} M (D-5, D-8, D-11) bzw. Dexamethason und RU486 10^{-6} M (D-5/RU, D-8/RU, D-11/RU) auf die mRNA- Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 bei CD3/CD28- aktivierten $CD4^{+}$ - T-Lymphozyten unter Hypoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das Ergebnis von fünf unabhängigen Versuchen bei D-5, vier unabhängigen Versuchen bei D-8, D-11, D-8/RU und D-11/RU und drei unabhängigen Versuchen bei D-5/RU.

CXCR4: *1 $p=0,0198$, **2 $p=0,0018$, *3 $p=0,0276$, ***4 $p=0,0005$

4.2.6 Zusammenfassung

Zusammengefasst zeigt sich, dass Dexamethason in höheren Dosierungen bei CD3/CD28- aktivierten $CD4^{+}$ - T-Zellen zu einer Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression führt (**Abbildung 18**). Die Erwartung, dass diese Abnahme von HIF-1 α auch zu einer schwächeren Expression der untersuchten HIF-1- Zielgene führen würde, bestätigte sich nicht. Bei vier von fünf untersuchten HIF-1- Zielgenen konnte keine signifikante Änderung der mRNA- Expression festgestellt werden, was auch durch die Zugabe von RU486 nicht geändert wurde (**Abbildung 17** und **Abbildung 19**). Beim HIF-1- Zielgen CXCR4 bewirkte Dexamethason sogar eine dosisabhängigen Steigerung der mRNA- Expression. Dieser Effekt war durch RU486 vollständig antagonisierbar (**Abbildung 20**).

Wieso führt Dexamethason unter Hypoxie zu einer Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression, aber unter den gleichen Bedingungen zu keiner entsprechend schwächeren HIF-1- Zielgenexpression?

Zur Beantwortung dieser Frage muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Dexamethason die Regulation der HIF-1- Zielgenexpression auf verschiedenen Wegen beeinflusst: Erstens indirekt über die Regulation der HIF-1 α - Proteinexpression und zweitens direkt über eine Glukokortikoidrezeptor- vermittelte Transkriptionsänderung, unabhängig vom Transkriptionsfaktor HIF-1. Eventuell führt ersterer Mechanismus zu einer indirekten Herunterregulation, während der zweite Mechanismus direkt die HIF-1- Zielgenexpression hochreguliert. Je nach Überwiegen einer der beiden Mechanismen, wäre eine Regulation der HIF-1- Zielgenexpression in jede Richtung denkbar. Um dieser Frage nachzugehen, muss ein Mechanismus möglichst isoliert betrachtet werden. Die zuvor dargestellten Versuche wurden deshalb noch einmal unter *normoxischen* Bedingungen durchgeführt. Hierdurch konnte der direkte Einfluss von Dexamethason auf die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene unter Ausschaltung des Faktors HIF-1 α untersucht werden. Für die Versuche wurden Zellen der selben Spender wie in den vorhergehenden Experimenten verwendet.

Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)

Wie unter Hypoxie führt die Behandlung der CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten mit Dexamethason auch unter Normoxie zu einer dosisabhängigen Steigerung der mRNA- Expression von CXCR4.

Die **Abbildung 21** zeigt den Einfluss von Dexamethason auf CD3/CD28- aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten unter *Normoxie*. Genau wie unter *Hypoxie* (**Abbildung 20**) regulierte Dexamethason unter *Normoxie* die CXCR4- mRNA- Expression dosisabhängig hoch (**Abbildung 21**). Die Gabe des Steroidrezeptorblockers RU486 antagonisierte diesen Effekt vollständig. In einer Konzentration von 10⁻⁵M Dexamethason zeigte sich eine signifikante Zunahme der mRNA- Expression um den Faktor 3,36 \pm 0,52 SEM relativ zu unbehandelten Zellen (n=5; p1=0,0109). In einer Dexamethasondosis von 10⁻⁸M zeigte sich unter Normoxie ein 2.98 (\pm 0,79 SEM)- facher Anstieg. Dieser war tendenziell signifikant (n=4; p2=0,0867). In der tausendfach geringeren Konzentration von Dexamethason 10⁻¹¹M war kein meßbarer Effekt mehr nachweisbar (**Abbildung 21**). Die Kombination aus Dexamethason und RU486 führte auch unter Normoxie zur vollständigen Antagonisierung der Dexamethasonwirkung. Im Gegensatz zu den Ergebnisse unter Hypoxie zeigte sich aber keine signifikante

Abschwächung der CXCR4- mRNA- Expression durch die kombinierte Gabe von Dexamethason und RU486 (**Abbildung 21**).

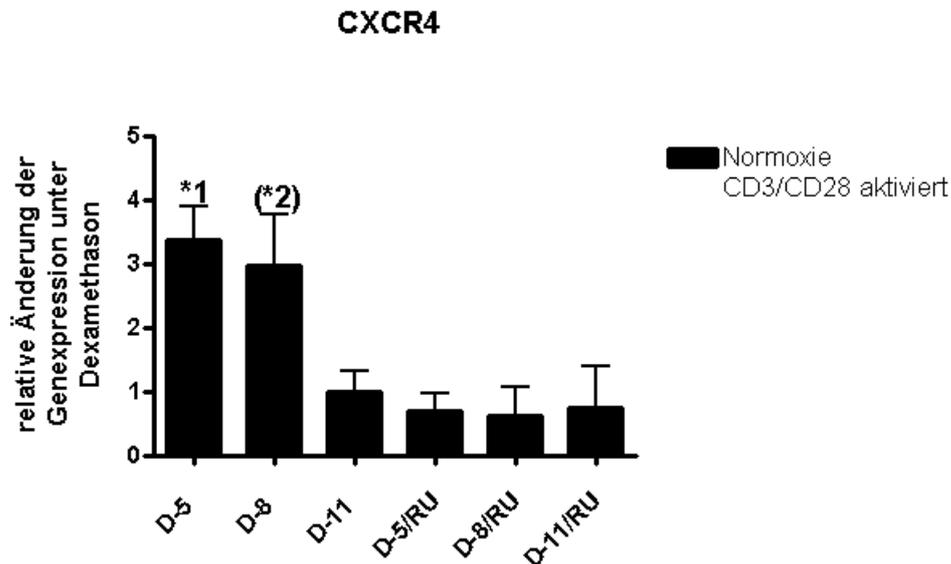


Abbildung 21: Einfluss von Dexamethason 10^{-5} M, 10^{-8} M, 10^{-11} M (D-5, D-8, D-11), bzw. Dexamethason und RU486 10^{-6} M (D-5/RU, D-8/RU, D-11/RU) auf die mRNA- Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 bei CD3/CD28- aktivierten $CD4^{+}$ - T-Lymphozyten unter Normoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das Ergebnis von fünf unabhängigen Versuchen bei D-5, vier unabhängigen Versuchen bei D-8, D-11, D-8/RU und drei unabhängigen Versuchen bei D-5/RU und D-11/RU.

CXCR4: *1 $p=0,0109$, (*2) $p=0,0867$

Bereits im ersten Teil der Ergebnisse wurde gezeigt, dass Hypoxie bei CD3/CD28-aktivierten $CD4^{+}$ - T-Lymphozyten zu einer Steigerung der CXCR4- mRNA- Expression führt (**Abbildung 11**). Die Behandlung von CD3/CD28- aktivierten $CD4^{+}$ - T-Lymphozyten mit Dexamethason bewirkt sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie eine Zunahme der CXCR4- mRNA- Expression (**Abbildung 20** und **Abbildung 21**). Dies bedeutet, dass eine Kombination aus Dexamethason und Hypoxie synergistisch die mRNA- Expression von CXCR4 hochregulieren kann. Die **Abbildung 22** verdeutlicht diesen Zusammenhang.

Dexamethason 10^{-5} M führte zu einem signifikanten Anstieg der CXCR4- mRNA- Expression um den Faktor $3,36 \pm 0,53$ SEM ($n=5$; $p=0,0109$) und Hypoxie um den Faktor $2,68 \pm 0,9$ SEM. Eine Kombination von Dexamethason und Hypoxie regulierte die CXCR4- mRNA- Expression synergistisch um den Faktor $9,7 \pm 3,91$ SEM

hoch. Der Einfluss der Kombination von Dexamethason und Hypoxie war tendenziell signifikant (n=5; p2=0,0902).

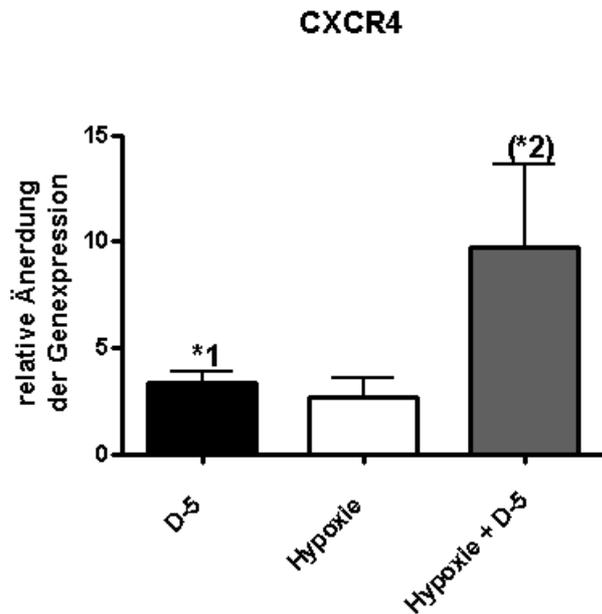


Abbildung 22: Einfluss von Dexamethason 10^{-5} M (D-5, schwarze Säule), Hypoxie (weiße Säule) und der Kombination von Dexamethason und Hypoxie (graue Säule) auf die mRNA- Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 relativ zu unbehandelten, CD3/CD28- aktivierten $CD4^{+}$ - T-Lymphozyten unter Normoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Statistisch signifikante Änderungen sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung erfolgte durch den Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das Ergebnis von fünf unabhängigen Versuchen.
CXCR4: *1 ($p1=0,0109$), (*2) ($p2=0,0902$).

Auch für die HIF-1 Zielgene HIF-1 α , GAPDH, PBEF und MIF wurde der Einfluss von Dexamethason auf die mRNA- Expression unter Normoxie untersucht. Wie unter Hypoxie bewirkte Dexamethason auch unter Normoxie keine oder nur geringe Änderungen der mRNA- Expression der genannten HIF-1- Zielgene (**Abbildung 23**). Lediglich beim HIF-1- Zielgen GAPDH wurde eine starke Änderung der mRNA- Expression um den Faktor $3,97 \pm 3,17$ SEM bei kombinierter Gabe von 10^{-11} M Dexamethason und 10^{-6} M RU486 beobachtet. Diese Änderung der GAPDH- mRNA- Expression beruhte auf der starken Reaktion der T-Zellen von einem Blutspender, so dass die Veränderung statistisch nicht signifikant war (n=4; p=0,417).

Eingangs wurde die Frage gestellt, wieso Dexamethason unter Hypoxie zu einer Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression führt, aber gleichzeitig keine entsprechende

Abschwächung der mRNA- Expression der untersuchten HIF-1- Zielgene bewirkt. Es wurde die Hypothese geäußert, dass Dexamethason möglicherweise direkt, d.h. unabhängig von HIF-1 die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene regulieren könnte. Die soeben dargestellten Experimente zeigen, dass Dexamethason nur die mRNA- Expression des HIF-1- Zielgens CXCR4 direkt beeinflusst. Die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene HIF-1 α , GAPDH, PBEF und MIF wird dagegen nicht durch Dexamethason reguliert. Die eingangs gestellte Frage kann deshalb im Augenblick nicht beantwortet werden.

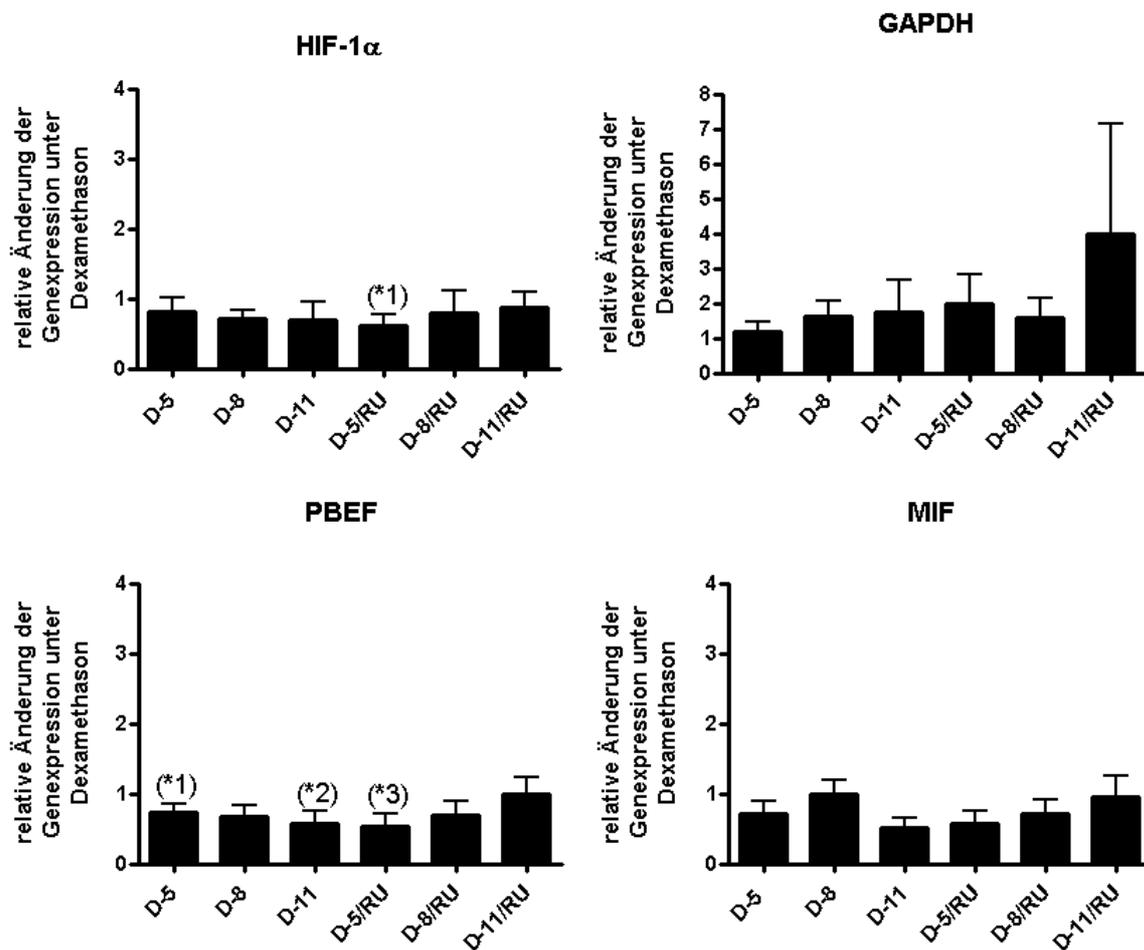


Abbildung 23: Einfluss von Dexamethason 10^{-5} M, 10^{-8} M, 10^{-11} M (D-5, D-8, D-11) bzw. Dexamethason und RU486 10^{-6} M (D-5/RU, D-8/RU, D-11/RU) auf die mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene HIF-1 α , GAPDH, PBEF und MIF bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Normoxie. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Aktin (ACTB). Statistik: Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, (*) zeigt eine statistische Tendenz an ($p < 0,1$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Ein- parametrischen T-Test für verbundene Stichproben gegen 1. Die Balken zeigen den SEM. Dargestellt ist das Ergebnis von fünf unabhängigen Versuchen für D-5 und vier unabhängigen Versuchen für die übrigen Konditionen.

HIF-1 α : (*1) $p=0,0947$

PBEF: (*1) $p=0,0821$, (*2) $p=0,0995$, (*3) $p=0,0877$

5 Diskussion

In der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) kommt den CD4⁺- T-Lymphozyten eine entscheidende Bedeutung zu. Sie bilden die Schnittstelle zwischen dem *angeborenen* und dem *erworbenen antigenspezifischen Immunsystem* und sind eine der Hauptpopulationen im entzündlich veränderten Synovium von RA- Patienten [14]. Ein Großteil der CD4⁺- T-Lymphozyten, die das Gelenk infiltrieren, exprimiert Aktivierungsmarker wie CD69 [59]. Dies weist darauf hin, dass die Zellen im Rahmen der Erkrankung aktiviert wurden [14]. Im chronisch entzündeten Gewebe der RA sind die aktivierten T-Lymphozyten zudem Hypoxie ausgesetzt, und diese hypoxischen Bedingungen führen zur Stabilisierung des Hypoxie- induzierten- Faktors- 1 α (HIF-1 α) [27]. Welche Interaktionen zwischen der CD3/CD28- Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten und dem Einflussfaktor Hypoxie bestehen, war bis dato nicht bekannt. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, wie sich Hypoxie und CD3/CD28- Aktivierungssignalkaskade in CD4⁺- T-Lymphozyten gegenseitig beeinflussen. Zu den wirksamsten Medikamenten zur Behandlung der RA gehören synthetisch hergestellte Glukokortikoide, weshalb trotz der zahlreichen Nebenwirkungen zwischen 56% und 68% der RA-Patienten mehr oder weniger kontinuierlich damit behandelt werden müssen [52]. Trotz der weit verbreiteten Anwendung ist bis heute nicht bekannt, welchen Einfluss das Glukokortikoid Dexamethason auf die Adaptationsprozesse von aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten an hypoxische Umgebungsbedingungen hat. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass Dexamethason eine Verminderung der HIF-1 α - Proteinexpression bewirkt und somit an der Regulation des wahrscheinlich wichtigsten Faktors der Hypoxie- Signalkaskade direkt beteiligt ist.

5.1 Einfluss der CD3/CD28- Aktivierung auf die Regulation von HIF-1 α und HIF-1- Zielgenen in CD4⁺- T-Lymphozyten

Werden frisch isolierte, unstimulierte CD4⁺- T-Lymphozyten für 20 Stunden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert, kann das Protein HIF-1 α mittels Westernblot nachgewiesen werden, während es unter normoxischen Bedingungen nicht stabilisiert wird (**Abbildung 9**). Gleichzeitig zeigt sich unter Hypoxie auch eine Zunahme der mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen (**Abbildung 10** und **Abbildung 11**). Dies entspricht den Erwartungen, da das Protein HIF-1 α zusammen mit der zweiten

Untereinheit HIF-1 β den Transkriptionsfaktor HIF-1 bildet, der zur Hochregulation der HIF-1- Zielgen- Transkription führt [12] (**Abbildung 3**).

Werden die CD4⁺- T-Lymphozyten durch Anti- CD3- und Anti- CD28- Antikörper aktiviert, kann unter Hypoxie eine drastische Steigerung der HIF-1 α - Proteinexpression mittels Westernblot festgestellt werden, während HIF-1 α unter Normoxie auch bei CD3/CD28- aktivierten T-Zellen nicht detektiert werden kann (**Abbildung 9**). Aufgrund der gesteigerten HIF-1 α - Proteinexpression bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten, wäre auch eine höhere mRNA- Expression der HIF-1- Zielgene im Vergleich zu unstimulierten T-Lymphozyten zu erwarten.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch nicht dieses Ergebnis. In Abhängigkeit vom untersuchten HIF-1- Zielgen war der Anstieg der mRNA- Expression unter Hypoxie bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten entweder genauso stark oder sogar schwächer als bei den unstimulierten T-Lymphozyten unter Hypoxie (**Abbildung 10** und **Abbildung 11**). Wie kann dieses Ergebnis erklärt werden?

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse des Westernblot fällt bei den CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie neben der quantitativen Zunahme von HIF-1 α auch eine qualitative Veränderung der HIF-1 α - Bande, nämlich eine Verbreiterung der Bande in den niedermolekularen Bereich auf (**Abbildung 9**).

Im Jahre 1999 wurden von Gothie et al. zwei HIF-1 α - Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen der HIF-1 α - mRNA entstehen [38]. Diese HIF-1 α - Isoformen hatten eine Länge von 735 Aminosäuren (HIF-1 α ⁷³⁶; 94-103kDa) und 827 Aminosäuren (HIF-1 α ⁸²⁷; 104-116kDa) verglichen zum HIF-1 α - Wildtyp mit 826 Aminosäuren (104-116kDa). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten eine Verbreiterung der HIF-1 α - Bande in den niedermolekularen Bereich, d.h. es war im Bereich von etwa 100kDa eine Bande auszumachen (**Abbildung 9**). Von der Größe des Proteins zu urteilen, könnte es sich hierbei um die kürzere Isoform HIF-1 α ⁷³⁶ handeln. Welche Funktion hat die Isoform HIF-1 α ⁷³⁶?

Strukturell zeichnet sich HIF-1 α durch die Existenz zweier sauerstoffabhängiger Degradationsdomänen (ODDs, *oxygen dependent degradation domains*) sowie einer C-terminalen Aktivierungsdomäne (CTAD, *C-terminal activation domain*) und einer N-terminalen Aktivierungsdomäne (NTAD, *N-terminal activation domain*) aus. Bei der Isoform HIF-1 α ⁷³⁶ fehlt die CTAD [38]. Wie HIF-1 α bindet HIF-1 α ⁷³⁶ zusammen mit der zweiten Untereinheit HIF-1 β über die NTAD an den *hypoxia responsive elements* (HREs) der DNA, entfaltet durch das Fehlen der C-terminalen Aktivierungsdomäne

aber eine geringere Aktivität als der Transkriptionskomplex aus dem HIF-1 α - Wildtyp und HIF-1 β [38].

Angenommen, die in der vorliegenden Arbeit bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten beobachtete Verbreiterung der HIF-1 α - Bande wäre auf eine Zunahme der Isoform HIF-1 α ⁷³⁶ zurückzuführen, dann würde diese Isoform im Ringen mit dem HIF-1 α -Wildtyp um Bindungsplätze am konstitutiv exprimierten HIF-1 β zur vermehrten Bildung eines transkriptionell weniger aktiven Transkriptionskomplexes führen und hierdurch die mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen kompetitiv hemmen. Die Frage, warum CD3/CD28- aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten einerseits eine erhöhte Proteinexpression von HIF-1 α zeigten, aber dennoch keine entsprechende Steigerung der mRNA- Expression von HIF-1- Zielgenen zu beobachten war, könnte durch diese Hypothese beantwortet werden.

Auch Untersuchungen an murinen T-Lymphozyten sprechen für die Hypothese der aktivierungsinduzierten- Expression einer HIF-1 α - Isoform mit inhibitorischen Eigenschaften. Lukashev et al. stellten fest, dass die Aktivierung von T-Lymphozyten aus Mäusemilzen über CD3 oder die Mitogene PMA bzw. Ionomycin zur Hochregulation einer kürzeren HIF-1 α - Isoform führt, die im murinen System als HIF-1 α I.1 bezeichnet wird [39]. Murine CD4⁺- und CD8⁺- T-Lymphozyten, bei denen die HIF-1 α I.1- Isoform ausgeschaltet wurde, zeigten nach ihrer Aktivierung sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen eine deutlich stärkere Zytokinsekretion von IFN γ (Interferon- γ), TNF α (Tumor- Nekrosefaktor α) und den Interleukinen IL-2, IL-4 und IL-13 als die unveränderten T-Lymphozyten [60].

Auch wenn die eben beschriebenen Untersuchungen die Hypothese einer aktivierungsinduzierten HIF-1 α - Isoform stützen, müssen weitere mögliche Erklärungsmodelle in Betracht gezogen werden.

Untersuchungen von Gradin et al. zeigten, dass die C- terminale Aktivierungsdomäne (CTAD) von HIF-1 α phosphoryliert werden muss, damit wichtige Co- Aktivatoren wie CREB (*cAMP- response binding element binding protein*), CBP (*CREB- binding protein*) und p300 binden und hierdurch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 erhöhen können [61] (**Abbildung 3**).

Die bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie beobachtete Verbreiterung der HIF-1 α - Bande könnte demnach auch darauf beruhen, dass die Aktivierung zur vermehrten Dephosphorylierung von HIF-1 α führt, wobei das dephosphorylierte HIF-1 α eine Bande im Westernblot erzeugt, die etwa 12kDa kleiner

ist als die phosphorylierte Form [62]. Am dephosphorylierten HIF-1 α wiederum könnten die eben genannten Co- Aktivatoren nicht binden, so dass die transkriptionelle Aktivität des HIF-1 Transkriptionskomplexes reduziert wäre. Auch diese Hypothese würde erklären, warum sich bei den CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten trotz der erhöhten HIF-1 α - Proteinexpression keine entsprechende Steigerung der HIF-1- Zielgenexpression zeigte.

Um die zuvor erläuterten Hypothesen zu überprüfen, sind in Zukunft weitere Untersuchungen nötig. Folgende weiterführende Experimente wären denkbar:

Um der Frage nachzugehen, ob CD3/CD28- aktivierte CD4⁺- T-Lymphozyten vermehrt eine bestimmte HIF-1 α - Isoformen exprimieren, könnte mittels kompetitiver RT-PCR und unter Einsatz geeigneter Primer untersucht werden, ob, und gegebenenfalls auch welche, HIF-1 α - mRNA- Spleißvarianten in humanen CD4⁺- T-Lymphozyten exprimiert werden. Die Hypothese, dass die CD3/CD28- Aktivierung zu vermehrten Dephosphorylierung von HIF-1 α führt, könnte durch das folgende Experiment überprüft werden. Aus Proteinlysaten von nicht aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten, die Hypoxie ausgesetzt waren, könnte mithilfe eines HIF-1 α - Antikörpers HIF-1 α isoliert werden. Das isolierte HIF-1 α würde dann mit einer Phosphatase behandelt werden, wodurch es zur Dephosphorylierung käme. Sollte die oben genannte Hypothese zutreffen, müsste das dephosphorylierte HIF-1 α im Westernblot eine Bande ähnlich der von CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten erzeugen. Entsprechende Versuche wurden von Suzuki et al. an der humanen Mammacarcinom Zelllinie MCF-7 durchgeführt [63].

5.2 Einfluss der Hypoxie auf die Aktivierung von T- Lymphozyten

Die Aktivierung eines T- Lymphozyten führt zu einer Reihe von Signalereignissen, die letztlich die klonale Expansion der Zelle bewirken. Eines der wichtigsten Ereignisse nach der CD3/CD28- Aktivierung ist der intrazelluläre Einstrom von Kalzium (Ca²⁺). Hierdurch kommt es u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated t-cells*). Eine der wichtigsten Funktionen des Transkriptionsfaktors NFAT wiederum ist es, die Interleukin-2 (IL-2) Synthese zu fördern. Gleichzeitig werden vermehrt IL-2 Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert [64]. Der IL-2- Rezeptor besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ , wobei die α - Untereinheit auch als CD25 bezeichnet wird [15]. Das von den T-Lymphozyten sezernierte IL-2 bindet autokrin und parakrin am IL-2 Rezeptor und bewirkt die Synthese von Regulatorproteinen des

Zellzykluses wie z.B. von Zyklin D2 [65]. Zusammen mit anderen Regulatoren erreicht Zyklin D2 ein Fortschreiten von der G₁- Phase in die S- Phase (Synthesephase) des Zellzyklus [65, 66]. Die T- Zellen beginnen mit der Synthese von wichtigen Proteinen und der DNA- Replikation und nehmen hierdurch an Größe zu (Blastogenese). In der anschließenden M- Phase (Mitosephase) des Zellzyklus kommt es zur Kernteilung und klonalen Vermehrung und somit zur Zellproliferation [64].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die aktivierungsbedingte Größenzunahme von T-Lymphozyten auch unter hypoxischen Inkubationsbedingungen zu beobachten ist (**Abbildung 12**), d.h. initiale Schritte der Zellproliferation auch unter Sauerstoffmangel eingeleitet werden.

Um zu quantifizieren, ob Hypoxie die Aktivierungsstärke von T-Lymphozyten beeinflusst, wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 gemessen. Unter Hypoxie verringerte sich sowohl der Anteil an CD25⁺- T-Zellen (**Abbildung 14**) als auch die mittlere Expressionsstärke der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 (**Abbildung 16**) im Vergleich zur Normoxie, während der Anteil der CD69⁺- T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation durch Hypoxie nicht beeinflusst wurde (**Abbildung 14**).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Größenzunahme von aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie steht in einem scheinbaren Widerspruch zu Untersuchungen von Loeffler et al. [64] und Naldini et al. [67]. Diese stellten fest, dass die Proliferation von Immunzellen unter hypoxischen Umgebungsbedingungen drastisch eingeschränkt wird, was sich in einer Reduktion der Zellteilungen gegenüber normoxischen Bedingungen bemerkbar machte. Naldini et al. führten die eingeschränkte Proliferation unter Hypoxie auf eine Abnahme des Zyklus-Regulatorproteins Zyklin D2 zurück [67]. Wie können diese widersprüchlichen Ergebnisse erklärt werden?

Wie bereits erwähnt, wird die Synthese von Zyklin D2 u.a. über eine Signalkaskade des IL-2- Rezeptors eingeleitet [65, 66]. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte die von Naldini et al. beobachtete Abnahme der Zyklin D2- Synthese unter Sauerstoffmangel [67] durch die verminderte Expression der α - Untereinheit des Interleukin-2- Rezeptors (CD25) (**Abbildung 14** und **Abbildung 16**) und einer hierdurch gestörten IL-2 Signalkaskade bedingt sein. Ein solch eher langsamer Regulationsmechanismus würde auch erklären, warum es initial unter Hypoxie zu einer Größenzunahme der aktivierten T-Zellen kommt (**Abbildung 12**), im Verlauf aber dennoch die weitere Proliferation der Zellen gehemmt wird [67].

Auch andere Ebenen der Aktivierungssignalkaskade werden durch Hypoxie beeinflusst. Neumann et al. stellten fest, dass die vermehrte Stabilisierung von HIF-1 α durch Deletion des pVHL (*von Hippel-Lindau gene product*), welches unter Normoxie normalerweise die proteasomale Degradation von HIF-1 α einleitet (**Abbildung 3**), den Ca²⁺-Einstrom in aktivierte murine Thymozyten (Vorläufer der reifen T-Zellen) inhibiert [28]. Weiterhin wird unter Hypoxie die Expression spannungsabhängiger K⁺-Kanäle gehemmt und somit die Depolarisation der Zellmembran bewirkt [68, 69]. Auch hierdurch wird eine Abnahme des aktivierungsbedingten Ca²⁺-Einstrom in die T-Zellen erreicht. Die Folge sollte eine verminderte Aktivierung des Faktors NFAT und eine konsekutive Abnahme der IL-2-Sekretion sein. Eine solche Abnahme der IL-2-mRNA-Synthese von aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie ist von Zuckerberg et al. beschrieben worden [70]. Dennoch wird bei *in vitro* kultivierten T-Lymphozyten, die bei Sauerstoffmangel aktiviert wurden, vermehrt IL-2 im Überstand nachgewiesen [67]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Herunterregulation der α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) unter Hypoxie könnte auch zur Erklärung dieses Phänomens herangezogen werden. Da das Zytokin IL-2 nach Bindung am IL-2-Rezeptor internalisiert wird, sollte eine verminderte Expression des IL-2-Rezeptors auch zur Akkumulation von IL-2 im Überstand führen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Einfluss von Hypoxie auf die Expression von CD25 und CD69 könnten weiterhin ein für die RA typisches Phänomen erklären. Isoliert man CD4⁺-T-Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten, so sind diese durch eine starke Expression des Aktivierungsmarkers CD69 gekennzeichnet, während der Aktivierungsmarker CD25 nur schwach exprimiert wird [49, 59]. Die *in vitro*-Aktivierung dieser CD69⁺, aber CD25⁻ T-Zellen bewirkt eine nur schwache Proliferation der Zellen, weshalb sie auch als „frustrierter Phänotyp“ (*frustrated phenotype*) bezeichnet werden [21]. Die Ansammlung von CD69⁺/CD25⁻ T-Zellen des „frustrierten Phänotyps“ in der Synovia von RA-Patienten könnte nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit möglicherweise u.a. auf die dort herrschenden hypoxischen Umgebungsbedingungen zurückgeführt werden, da Hypoxie sowohl zu einer Herunterregulation der CD25-Expression beiträgt (**Abbildung 14** und **Abbildung 16**) und somit zu einer signifikanten Anreicherung von CD69⁺/CD25⁻ T-Zellen unter Hypoxie führt (**Abbildung 14**) als auch die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten inhibiert [64].

Da die Aktivierungsstärke und die Proliferation von T-Lymphozyten unter Hypoxie inhibiert werden, gehen viele Wissenschaftler inzwischen davon aus, dass hypoxische Umgebungsbedingungen zur Suppression der Immunfunktion von T-Zellen beitragen [1]. Thiel et al. untersuchten, ob dieser immunsuppressive Einfluss direkt durch Hypoxie oder vielmehr durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 verursacht wird [71]. Hierzu entwickelten sie Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen Deletion von HIF-1 α . In einem Sepsis-Modell zeigte sich bei diesen HIF-1 α -knock-out Mäusen eine deutlich verbesserte Überlebensrate und stärkere Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α gegenüber den Wildtyp-Mäusen.

Dennoch beschränkt sich die Bedeutung der Hypoxie und von HIF-1 α wahrscheinlich nicht auf die immunsuppressive Wirkung von T-Zell-Funktionen. Caldwell et al. führten *in vitro* Untersuchungen zur Entwicklung zytotoxischer T-Zellen (CTLs) unter Hypoxie durch. Diese Untersuchungen zeigten zwar einerseits, dass Hypoxie die Entwicklung der CTLs inhibiert, aber gleichzeitig auch eine Zunahme der Zytotoxizität jeder einzelnen zytotoxischen T-Zelle bewirkt [4]. Diese Untersuchungen machen deutlich, dass die Bedeutung der Hypoxie sehr differenziert betrachtet werden muss.

Neben der Proliferation und der Zytotoxizität kann Sauerstoffmangel auch das Überleben von T-Lymphozyten beeinflussen. Wie im Abschnitt 1.3 „Die Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten“ beschrieben wurde, führt eine unvollständige Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor-Komplex (CD3) ohne Co-Stimulation über CD28 entweder zur Anergie oder aber zum Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*) [15].

Makino et al. konnten in Untersuchungen von CD3-aktivierten T-Lymphozyten zeigen, dass signifikant mehr Zellen unter hypoxischen Bedingungen überleben als unter Normoxie. Die Unterschiede waren sowohl nach einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden als auch nach 72 Stunden statistisch signifikant. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass der Sauerstoffmangel zu einer Inhibition des AICD geführt hatte [27]. Es ist bekannt, dass die Regulation des AICD zur *Toleranz* der T-Zellen gegenüber körpereigenen Geweben beiträgt [15]. Möglicherweise haben die Untersuchungen von Makino et al. deshalb einen großen Stellenwert für das Verständnis der Pathogenese der RA. Denkbar wäre, dass die Hypoxie im chronisch-entzündeten Synovialgewebe zu einer Inhibition des AICD autoreaktiver T-Lymphozyten beitrüge und hierdurch die Aufrechterhaltung des Krankheitsprozesses herbeiführen könnte.

Die CD3/CD28-Aktivierung führt, im Gegensatz zur alleinigen CD3-Aktivierung, nicht

zum AICD. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass sich das Überleben von unstimulierten und CD3/CD28-aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten unter Hypoxie nicht ändert. Nach der 20-stündigen Inkubation waren sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie immer mehr als 98% der CD4⁺-T-Lymphozyten Propidiumjodid-negativ (lebend).

5.3 Interaktionen zwischen der Glukokortikoid- und der Hypoxiesignalkaskade

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1 α -Proteinexpression und die mRNA-Expression von HIF-1-Zielgenen bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten unter Hypoxie untersucht. Dexamethason führte unter Hypoxie zu einer dosisabhängigen Reduktion der HIF-1 α -Proteinexpression von CD3/CD28-aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten. Auch bei unstimulierten CD4⁺-T-Lymphozyten war dieser dosisabhängige Dexamethasoneffekt unter Hypoxie in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beobachtet worden. In einer Dexamethasonkonzentration von 10⁻⁵M wurde der stärkste Inhibitionseffekt erzielt (**Abbildung 18**). Diese Untersuchungen sind klinisch relevant, da Konzentrationen im Bereich von 10⁻⁵M z.B. bei der intraartikulären Injektion von Glukokortikoiden ins entzündete Gelenk von RA-Patienten erreicht werden [52]. Auch eine deutlich geringere Dexamethasonkonzentration von 10⁻⁸M bewirkte noch einen Inhibitionseffekt auf die HIF-1 α -Proteinexpression, während bei einer Konzentration von 10⁻¹¹M im Westernblot keine Änderung mehr festgestellt werden konnte (**Abbildung 18**).

Die Gabe des unspezifischen Steroidrezeptorantagonisten RU486 führte zur vollständigen Antagonisierung der Dexamethasonwirkung, was darauf hinweist, dass der hemmende Effekt der Glukokortikoide auf die HIF-1 α -Proteinexpression über den Glukokortikoidrezeptor (GCR) vermittelt wird (**Abbildung 18**). Dieses Ergebnis ist deshalb interessant, da insbesondere bei hohen Glukokortikoidkonzentrationen in zunehmendem Maße auch unspezifische, d.h. vom GCR unabhängige Mechanismen zum Tragen kommen können [52] (**Abbildung 4**). Für die inhibitorische Wirkung von Dexamethason auf die HIF-1 α -Proteinexpression scheint diese unspezifische Wirkung der GC aber offensichtlich keine wesentliche Bedeutung zu besitzen.

Wie zuvor mehrfach erwähnt wurde, herrscht im entzündlich veränderten Gelenk von RA-Patienten Hypoxie [7]. Weiterhin ist das entzündliche Synovium durch infiltrierende

CD4⁺- T-Lymphozyten gekennzeichnet [72]. In der Regel führt die Behandlung von RA-Patienten mit Glukokortikoiden zu einem deutlichen Rückgang der Entzündungszeichen [52]. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre es vorstellbar, dass ein Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Dexamethason auf der Herunterregulation von HIF-1 α und der hierdurch gestörten Adaptation der CD4⁺- T-Lymphozyten an die hypoxischen Umgebungsbedingungen im entzündeten Gelenk beruhen könnte. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt sich die Frage, welche genauen Mechanismen für die inhibitorische Wirkung von Dexamethason auf die HIF-1 α -Proteinexpression in CD4⁺- T-Lymphozyten verantwortlich sind.

Derzeit existieren nur drei Arbeiten, in denen die Interaktionen zwischen der Glukokortikoid- und der Hypoxiesignalkaskade untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen ein sehr komplexes und heterogenes Bild der Wechselwirkungen zwischen der Glukokortikoid- und der Hypoxiesignalkaskade, je nachdem welche Zelltypen für die Experimente verwendet wurden. Diese drei Arbeiten werden nachfolgend vorgestellt.

In einem *Abstract* berichten Wagner et al. [73] von Experimenten an der humanen Hepatomzelllinie HepG2, in denen Dexamethason über den Glukokortikoidrezeptor (GCR) einen konzentrationsabhängigen Inhibitionseffekt auf die HIF-1 α -Proteinexpression zeigte. Unter dem Einfluss von Dexamethason wurde zudem eine funktionelle Abnahme der HIF-1- Aktivität mittels Reporter- Gen- Assay beobachtet. Weiterhin konnte durch Immunpräzipitations- Analysen eine direkte Protein- Protein-Interaktion zwischen dem GCR und HIF-1 α nachgewiesen werden [73].

Ein inhibitorischer Effekt von Dexamethason auf die Expression von HIF-1 α wird jedoch nicht in allen Zelltypen beobachtet. So bewirkte Dexamethason bei unter Hypoxie inkubierten HeLa- Zellen keine Änderung der HIF-1 α - Proteinexpression und führt sogar zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von HIF-1 an den *hypoxia responsive elements* (HREs) der DNA und einer vermehrten Expression von HIF-1- Zielgenen. Gleichzeitig blieb die GCR- Proteinexpression und Aktivität an den *glucocorticoid responsive elements* (GREs) unter den hypoxischen Bedingungen unverändert [74]. In humanen Nierenzellen (*human proximal tubular epithel cells; HK-2*) konnte - im Gegensatz zu den HeLa- Zellen - unter Hypoxie wiederum eine vermehrte mRNA- und Proteinexpression des GCR und eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des GCR an den GREs beobachtet werden. Der Einfluss von Dexamethason auf die HIF-1 α -Proteinexpression wurde bei diesen Versuchen nicht untersucht [75].

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Glukokortikoiden zu einem nicht unerheblichen Anteil auf Protein- Protein- Interaktionen zwischen dem aktivierten GCR und Transkriptionsfaktoren wie NFκB [76] oder AP-1 [55] beruht. Es wäre deshalb durchaus auch denkbar, dass eine direkte Protein- Protein- Interaktion zwischen HIF-1α und dem aktivierten GCR, wie sie bei HepG2- Zellen beschrieben wurde [73], einen verstärkten proteasomalen Abbau von HIF-1α in CD4⁺- T-Lymphozyten bewirken könnte. Allerdings erklärt diese Hypothese nicht, warum in bestimmten Zelltypen wie HeLa- Zellen dieser Mechanismus nicht zu funktionieren scheint [74]. Die Hypothese muss deshalb erweitert werden. Eine zur Zeit diskutierte Theorie ist, dass der aktivierte GCR und HIF-1α zusammen mit weiteren Co- Faktoren einen größeren Multiproteinkomplex bilden [74]. In Abhängigkeit von weiteren in jedem Zelltyp spezifisch vorhandenen und differentiell-regulierten Co- Faktoren dieses Multiproteinkomplexes, könnten unterschiedliche zelltypspezifische Regulationen erwartet werden. Für diese Hypothese spricht, dass wichtige Chelatoren wie z.B. die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 durch die Bildung von Multiproteinkomplexen, sowohl den GCR [52] als auch HIF-1α [12] stabilisieren. Hierdurch könnte erklärt werden warum Dexamethason bei CD4⁺- T-Lymphozyten (**Abbildung 18**) und HepG2- Zellen [73] zu einer Reduktion der HIF-1α- Proteinexpression führt, während sich in anderen Zelltypen wie z.B. HeLa- Zellen keine Änderung der HIF-1α- Proteinexpression zeigt [74]. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft notwendig, um die spezifischen Interaktionen zwischen Glukokortikoiden und HIF-1α besser zu verstehen. Interessant wäre z.B. herauszufinden, ob Hypoxie bzw. HIF-1α bei CD4⁺- T-Lymphozyten einen Einfluss auf die Regulation des GCR haben, wie es bei HK-2 Zellen festgestellt wurde [75] .

5.4 Interaktionen zwischen der Glukokortikoid- und CD3/CD28- Aktivierungssignalkaskade von T-Lymphozyten

Neben den Interaktionen von Dexamethason und der Hypoxiesignalkaskade, die im vorangehenden Abschnitt beschrieben wurden, können aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auch Rückschlüsse auf Wechselwirkungen zwischen Dexamethason und der CD3/CD28- Aktivierungssignalkaskade gezogen werden. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden wie Dexamethason insbesondere durch die Suppression von T-

Zellfunktionen hervorgerufen wird [77]. Insofern mag es verwundern, dass Dexamethason unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten weder die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie MIF und PBEF, noch die mRNA- Expression des für den Energiestoffwechsel der T-Zellen entscheidenden Glykolyseenzym GAPDH inhibierte (Normoxie: **Abbildung 23**; Hypoxie: **Abbildung 17** und **Abbildung 19**). Wie können diese Ergebnisse erklärt werden?

Untersuchungen von Nijhuis et al. zeigen, dass die IL-2- Sekretion und Proliferation von allein CD3- aktivierten T-Lymphozyten durch Dexamethason suffizient inhibiert wird, während die gleichzeitige CD28- Co- Stimulation der T-Zellen den inhibitorischen Effekt von Dexamethason erfolgreich antagonisiert [77]. Für eine vollständige Proliferationsblockade von allein CD3- aktivierten T-Lymphozyten genügen dabei schon Dexamethason- Konzentrationen von 10⁻⁸M [78]. In dieser Konzentration wird auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ und TNF α inhibiert [78]. Auf molekularer Ebene werden diese Effekte durch die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NFAT (*nuclear factor of activated t-cells*), AP-1 (*activator protein 1*) und NF κ B (*nuclear factor κ B*) erreicht [79]. Erfolgt zusätzlich zur CD3- Aktivierung eine CD28- Co- Stimulation der CD4⁺- T-Lymphozyten, zeigen selbst weit höhere Dexamethason- Konzentrationen keine wesentlichen inhibitorischen Eigenschaften mehr [78]. Dieser Einfluss der CD28- Co- Stimulation auf T-Lymphozyten hat den Begriff „partielle Glukokortikoidresistenz“ geprägt.

Die aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass Dexamethason weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen inhibitorischen Effekt auf die mRNA- Expression der untersuchten Gene bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten hatte, können demnach im Sinne der Hypothese einer partiellen Glukokortikoidresistenz der CD28- co- stimulierten T-Lymphozyten bewertet werden. Auf molekularer Ebene wird heute das Einschalten der MAPK/ERK- (*mitogen activated protein kinase/ extracellular signal regulated kinase, abgekürzt MEK*) Signalkaskade bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten für das Phänomen der partiellen Glukokortikoidresistenz verantwortlich gemacht [79].

Interaktionen zwischen der Aktivierung von T-Zellen und Glukokortikoiden haben auch bei der Regulation der Apoptose eine entscheidende Bedeutung. Wie im Abschnitt **1.3** „Die Aktivierung von CD4⁺- T-Lymphozyten“ erläutert wurde kann die CD3- Aktivierung von T-Lymphozyten – ohne ein co- stimulatorisches Signal – zum aktivierungs-

induzierten Zelltod (AICD) führen [15]. Werden CD3-aktivierte T-Lymphozyten jedoch mit Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-7} M behandelt, führt dies zu einer signifikanten Reduktion des AICD [80].

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hatte die Behandlung der CD3/CD28-aktivierten $CD4^+$ -T-Lymphozyten mit unterschiedlichen Dosen Dexamethason weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Unter allen genannten Bedingungen und bei allen untersuchten Dexamethason-Konzentrationen lag der Anteil Propidiumjodid- (PI) negativer (lebender) Zellen nach 20-stündiger Inkubation bei über 98% bezogen auf die Gesamtpopulation.

5.5 Bedeutung der Einflüsse von CD3/CD28-Aktivierung, Hypoxie und Dexamethason auf die untersuchten HIF-1 Zielgene

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der CD3/CD28-Aktivierung, der Hypoxie und von Dexamethason auf die Regulation der HIF-1-Zielgene HIF-1 α , GAPDH, GLUT-1, CXCR4, MIF und PBEF diskutiert.

5.5.1 Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 α (HIF-1 α)

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Unter Normoxie wird die Untereinheit HIF-1 α proteasomal degradiert (**Abbildung 3**), während die Untereinheit HIF-1 β unabhängig vom Oxygenierungsgrad der Zelle nachweisbar ist [12].

In der vorliegenden Arbeit wurde bei unstimulierten $CD4^+$ -T-Lymphozyten unter Hypoxie durchschnittlich etwa eine Verdoppelung der HIF-1 α -mRNA-Expression beobachtet (**Abbildung 8**). Gleichzeitig war nur bei unter Hypoxie inkubierten T-Zellen das Protein HIF-1 α nachweisbar (**Abbildung 9**). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bei unstimulierten $CD4^+$ -T-Lymphozyten eine duale Regulation des HIF-1 α -Proteinlevels erfolgt. Erstens auf *transkriptioneller* Ebene durch eine unter Hypoxie gesteigerte HIF-1 α -mRNA-Expression und zweitens auf *posttranslationaler* Ebene durch den proteasomalen Abbau des Proteins HIF-1 α unter Normoxie.

Die Aktivierung der $CD4^+$ -T-Lymphozyten mittels Antikörper gegen die Rezeptoren CD3 und CD28 führte in der vorliegenden Arbeit unter Hypoxie zu einer starken Zunahme

der HIF-1 α - Proteinexpression (**Abbildung 9**). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei unstimulierten T-Lymphozyten wurde aber bei den CD3/CD28- aktivierten T-Zellen unter Hypoxie keine Änderung der HIF-1 α - mRNA- Expression beobachtet (**Abbildung 8**). Aus diesen Beobachtungen leitet sich die Frage ab, über welchen Mechanismus die CD3/CD28- Aktivierung eine gesteigerte HIF-1 α - Proteinexpression unter Hypoxie erreicht.

Untersuchungen von Nakamura et al. geben hierzu weiteren Aufschluss. Hier wurde festgestellt, dass auch durch eine alleinige CD3- Aktivierung von CD3⁺- T-Lymphozyten eine Steigerung der HIF-1 α - Proteinexpression erreicht wird [26]. Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus ist höchstwahrscheinlich die Aktivierung der Phospho- Inositol- 3 Kinase/Akt (PI3K/Akt) -Signalkaskade, die wiederum zu einer Steigerung der *Translation* der HIF-1 α - mRNA in das Protein HIF-1 α führt. Ein Einfluss der CD3- Aktivierung auf die *Transkription* wurde hingegen nicht beobachtet [26].

Es ist bekannt, dass die CD3- Aktivierung mit gleichzeitiger Co- Stimulation über CD28 eine besonders starke Aktivierung des PI3K/Akt- Signaltransduktionsweges gewährleistet [81]. Und selbst eine alleinige Stimulation des CD28- Rezeptors soll die Aktivierung dieses Signalweges bewirken [16]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme der HIF-1 α - Proteinexpression bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie auf einer erhöhten *Translation* des Proteins beruht (**Abbildung 9**).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf einen sehr komplexen Regulationsmechanismus von HIF-1 α hin. Sowohl bei unstimulierten als auch bei aktivierten T-Lymphozyten scheint die *posttranslationale* Regulation, d.h. die proteasomale Degradation von HIF-1 α unter Normoxie bzw. Stabilisierung unter Hypoxie, von übergeordneter Bedeutung zu sein. Darüberhinaus erfolgt bei unstimulierten T-Lymphozyten auch eine *transkriptionelle* Regulation, da unter Hypoxie eine Zunahme der HIF-1 α - mRNA- Expression zu beobachten ist (**Abbildung 8**). Bei aktivierten T-Lymphozyten wird zusätzlich auch die *Translation* von HIF-1 α beeinflusst [26], was sich in einem erhöhten HIF-1 α - Proteinlevel (**Abbildung 9**) ohne Hochregulation der HIF-1 α - mRNA- Expression (**Abbildung 8**) widerspiegelt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bei mit Dexamethason behandelten CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie eine dosisabhängige Reduktion der HIF-1 α - Proteinexpression beobachtet (**Abbildung 18**). Dieser Effekt war durch den Steroidrezeptorantagonisten RU486 vollständig antagonisierbar (**Abbildung**

18). Dies beweist, dass der Reduktionseffekt über den aktivierten Glukokortikoidrezeptor und nicht über unspezifische Wirkungen von Dexamethason vermittelt wird (**Abbildung 4**).

In den folgenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei CD3/CD28-aktivierten T-Lymphozyten weder unter Normoxie (**Abbildung 23**) noch unter Hypoxie (**Abbildung 17**) eine Abnahme der HIF-1 α - mRNA- Expression unter dem Einfluss von Dexamethason. Hieraus kann man schließen, dass Dexamethason entweder über eine *Translationshemmung* oder den vermehrten Abbau von HIF-1 α (also *posttranslational*), nicht aber durch die Hemmung der *Transkription* eine Abnahme des HIF-1 α - Proteinlevels unter Hypoxie bewirkt.

5.5.2 Das Glykolyseenzym GAPDH und der Glukosetransporter- 1 (GLUT-1)

Zur Gewährleistung eines funktionierenden Immunsystems müssen Immunzellen ihren Energiestoffwechsel an stark variierende Umgebungsbedingungen anpassen (**Abbildung 1**). So sind Krankheiten wie die RA oder Tumoren durch Hypoxie gekennzeichnet [7, 12]. Während die Energiegewinnung von T-Lymphozyten unter Normoxie hauptsächlich durch die *oxidative Phosphorylierung* in der mitochondrialen Atmungskette gewährleistet wird, ist dies unter Hypoxie nicht möglich. Die einzige Möglichkeit der Energiegewinnung unter Hypoxie ist die *Substratkettenphosphorylierung* in der anaeroben Glykolyse (**Abbildung 2**). Da bei der *Substratkettenphosphorylierung* pro Mol Glukose 15 Mal weniger ATP gewonnen wird als bei der vollständigen Oxidation der Glukose, steigt der zelluläre Glukosebedarf massiv an.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei CD4⁺- T-Lymphozyten der Einfluss von Hypoxie auf die mRNA- Expression des Glykolyseenzym Glyceraldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und den Glukosetransporter 1 (GLUT-1) gemessen. Bei unstimulierten T-Lymphozyten zeigte sich ein durchschnittlich etwa zehnfacher Anstieg der GLUT-1- und GAPDH- mRNA Expression (**Abbildung 10**). Diese Ergebnisse bestätigen, dass unstimulierte CD4⁺- T- Lymphozyten ihre Energieversorgung an Hypoxie anpassen, indem sie durch die Synthese von GLUT-1 die Glukoseaufnahmekapazität verbessern und den Glukoseumsatz in der Glykolyse durch die Induktion von Glykolyseenzymen wie GAPDH erhöhen. Diese Anpassungsvorgänge werden höchstwahrscheinlich durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 gewährleistet [1].

Im Rahmen der Immunabwehr werden CD4⁺- T-Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aktiviert. Die Aktivierung wiederum führt zu einer starken Größenzunahme (Blastogenese) und Proliferation der Zellen [22]. Hierdurch steigt der Energiebedarf der Zelle massiv an [22]. Um den Energiebedarf decken zu können, wird bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten auch unter Normoxie die Energiegewinnung über die Glykolyse massiv gesteigert [25]. D.h. auch bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten werden vermehrt Glukosetransporter und Glykolyseenzyme exprimiert. Welche Veränderungen des Energiemetabolismus bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie auftreten, wurde bisher nicht untersucht.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten unter Hypoxie die mRNA- Expression von GAPDH etwa dreifach und von GLUT-1 etwa zehnfach gesteigert werden (**Abbildung 10**). Hieraus lässt sich folgern, dass die durch die CD3/CD28- Aktivierung induzierten Änderungen des Glukose- bzw. Energiemetabolismus alleine nicht ausreichend sind, eine homöostatische Energieversorgung unter Hypoxie zu gewährleisten.

Die Anpassungsvorgänge von CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten an Hypoxie werden wahrscheinlich durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 gesteuert. Um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 im Energiemetabolismus von T-Lymphozyten aufzuklären, sind aber weitere Untersuchungen, z.B. an T-Lymphozyten mit einem selektiven knock-down von HIF-1 α , notwendig.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt Dexamethason auf die mRNA- Expression von GAPDH bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie hat. Unter beiden Bedingungen zeigte sich keine signifikante Änderung der GAPDH- mRNA- Expression unter dem Einfluss von Dexamethason (**Abbildung 23** und **Abbildung 17**). Dies deutet darauf hin, dass Dexamethason den Energiemetabolismus von CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten weder unter Normoxie noch unter Hypoxie beeinflusst. Die Ergebnisse könnten im Sinne einer „partiellen Glukokortikoidresistenz“ von CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten gedeutet werden (siehe Abschnitt **5.4**). Zum Beweis dieser Hypothese sind aber weitere Untersuchungen notwendig. Interessant wäre z.B. herauszufinden, welchen Einfluss Dexamethason auf den Energiestoffwechsel von unstimulierten oder allein CD3- aktivierten T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie hat.

5.5.3 Der Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4)

Auf der Suche nach Antigenen patrouillieren naive CD4⁺- T-Lymphozyten kontinuierlich vom peripheren Blutkreislauf und den Lymphwegen zu den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten, Milz), bis sie durch Präsentation ihres spezifischen Antigens aktiviert werden. Verschiedene Oberflächenmoleküle, darunter auch der Chemokinrezeptor CXCR4, sind für das *homing* der naiven T-Lymphozyten in die sekundären Lymphorgane verantwortlich. Endothelzellen in den sekundären Lymphorganen bilden vermehrt das Chemokin *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), das auch CXCL-12 genannt wird und lange als der einzige Ligand von CXCR4 galt [45]. Neueste Untersuchungen zeigen aber, dass auch das Zytokin *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) am Chemokinrezeptor CXCR4 bindet [48]. CD4⁺- T-Lymphozyten exprimieren CXCR4 sehr stark auf ihrer Oberfläche und bewegen sich chemotaktisch in Richtung von SDF-1- oder MIF- exprimierenden Zellen [48, 82]. Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Zytokine wie z.B. der von synovialen Stromazellen gebildete TGF- β (*Transforming growth factor- β*) [83], aber auch weitere noch nicht näher identifizierte Faktoren im Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten zu einer gesteigerten Expression von CXCR4 auf CD4⁺- T-Lymphozyten führen [49]. Gleichzeitig sezernieren Endothelzellen von Blut- und Lymphgefäßen SDF-1 [49] und Makrophagen sowie synoviale Fibroblasten im chronisch entzündeten Synovialgewebe verstärkt MIF [47], was zur Retention der CXCR4- exprimierenden CD4⁺- T-Lymphozyten im Synovialgewebe der RA- Patienten führt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass unter Hypoxie die CXCR4- mRNA- Expression - sowohl bei CD3/CD28- aktivierten als auch bei unstimulierten CD4⁺- T-Lymphozyten - durchschnittlich etwa dreifach gesteigert wird (**Abbildung 11**). Dies bedeutet, dass die hypoxischen Umgebungsbedingungen im Synovialgewebe von RA- Patienten mitverantwortlich dafür sein könnten, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 verstärkt auf CD4⁺- T-Lymphozyten exprimiert wird. Die erhöhte CXCR4- Expression wiederum könnte die Akkumulation und das Persistieren der T-Lymphozyten im Entzündungsgebiet fördern [49]. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Einflussfaktor Hypoxie nicht nur eine Begleiterscheinung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen darstellt, sondern vielmehr entscheidend den Krankheitsverlauf chronischer Entzündungen wie der RA beeinflusst.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass Dexamethason

eine dosisabhängige Steigerung der CXCR4- mRNA Expression bei CD3/CD28-aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten unter Normoxie und Hypoxie bewirkt (**Abbildung 20** und **Abbildung 21**).

Diese Wirkung von Dexamethason auf die Regulation von CXCR4 wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei *in vitro* Untersuchungen von unstimulierten T-Zellen festgestellt [84]. Auch *ex vivo* entnommene CD4⁺ T-Lymphozyten aus der vorderen Augenkammer von Patienten mit einer Uveitis, die topisch mit Dexamethason behandelten wurden, zeigten eine gesteigerte CXCR4- Expression [85]. Welcher molekulare Mechanismus ist hierfür verantwortlich?

Untersuchungen deuten darauf hin, dass Dexamethason die Bildung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) fördert. Zyklisches AMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A, die den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert, wodurch CREB wahrscheinlich zu einer Transaktivierung des CXCR4- Gens führt [85].

Welche Bedeutung hat der Wirkmechanismus von Dexamethason auf CD4⁺ T-Lymphozyten für die Pathogenese der RA?

Möglicherweise führt Dexamethason durch die Hochregulation von CXCR4 auf im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten zu einer vermehrten Retention in stark SDF-1-exprimierenden sekundären Lymphorganen und verhindert hierdurch die Migration weiterer T-Zellen ins Entzündungsgebiet. Die Beobachtung, dass bei Patienten mit einem erhöhten Glukokortikoidspiegel z.B. nach einer intravenösen Injektion von Dexamethason [86] oder physischen Stress [87] die Zahl der im Blut zirkulierenden Lymphozyten abnimmt, stützt diese Hypothese.

Auch unter *Hypoxie* bewirkt Dexamethason eine dosisabhängige Steigerung der CXCR4- mRNA- Expression (**Abbildung 20**). Dabei addieren sich offenbar die positiven Effekte von Hypoxie und Dexamethason auf die CXCR4- mRNA- Expression (**Abbildung 22**). Dieses Ergebnis ist deshalb erstaunlich, da CXCR4 zu den HIF-1-regulierten Genen gerechnet wird [12]. Insofern sollte eine Abnahme der HIF-1 α - Proteinexpression, wie sie bei der Behandlung mit Dexamethason unter Hypoxie zu beobachten ist (**Abbildung 9**), auch zu einer Abnahme der mRNA- Expression des HIF-1- Zielgens CXCR4 führen. Wie kann dieses Ergebnis erklärt werden?

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Regulation von CXCR4 bei CD4⁺ T-Lymphozyten unter Hypoxie nicht durch den Transkriptionsfaktor HIF-1, sondern z.B. durch HIF-2 oder HIF-3 erfolgt. HIF-1- knock- down Experimente, die zeigen können, ob CXCR4 in CD4⁺ T-Lymphozyten durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird,

werden in unserer Arbeitsgruppe derzeit durchgeführt.

Der Einfluss von Dexamethason auf die Expression von CXCR4 könnte auch bei anderen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen. So ist neben dem CD4-Rezeptor der Chemokinrezeptor CXCR4 einer der wichtigsten Co- Rezeptoren für das Eindringen vom HI-Virus (*human immunodeficient virus*) in die Wirtszelle. *In vitro* Studien zeigen, dass mit Dexamethason behandelte CD4⁺- T-Lymphozyten sehr anfällig für eine HIV- Infektion sind [84].

5.5.4 Das Zytokin Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Die Bedeutung des proinflammatorischen Zytokins *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) bei entzündlichen, aber auch malignen Erkrankungen ist durch viele Untersuchungen der letzten Jahre evident geworden [44]. Auch in der Pathogenese der RA scheint MIF eine Schlüsselfunktion zu besitzen. Untersuchungen des Serums und synovialer Biopsater von RA- Patienten zeigten erhöhte Konzentrationen von MIF [47]. Nach einer erfolgreichen Behandlung der RA- Patienten wurde ein signifikanter Rückgang der MIF- Konzentrationen beobachtet [47]. Die Behandlung einer bei Ratten adjuvant induzierteren Arthritis (AIA) mit monoklonalen Anti- MIF- Antikörpern führte zur Abschwächung von klinischen und histologischen Krankheitsparametern [47]. Diese und nachfolgende Untersuchungen weisen darauf hin, dass MIF an den meisten charakteristischen Veränderungen im entzündlichen Gelenk direkt oder indirekt beteiligt ist [47].

Eines der charakteristischen Merkmale chronischer Entzündungen und schnell wachsender Tumoren ist eine gestörte Blutversorgung, die zu Hypoxie im betroffenen Areal führt [47].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Hypoxie auf die MIF- mRNA- Expression von CD4⁺- T-Lymphozyten untersucht. Sowohl bei unstimulierten als auch bei CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten zeigte sich ein drei- bis vierfacher Anstieg der MIF- mRNA- Expression nach 20 Stunden Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 11**).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD4⁺- T-Lymphozyten im chronisch-entzündeten Gelenk von RA- Patienten unter dem Einfluss des dort herrschenden Sauerstoffmangels vermehrt das proinflammatorische Zytokin MIF synthetisieren und sezernieren. In den angrenzenden Zellen bindet MIF am Oberflächenrezeptor CD74

oder am Chemokinrezeptor CXCR4 [48] und induziert Prozesse, die eine Rekrutierung von Leukozyten ins Entzündungsgebiet, die Proliferation von synovialen Fibroblasten und die vermehrte Sekretion pro-inflammatorischer und das Gelenk destruierender Moleküle wie TNF α , IL-6 und Matrix- Metalloproteinasen (MMPs) bewirken [47]. Untersuchungen von Baugh et al. weisen darauf hin, dass die Regulation von MIF unter Hypoxie über den Transkriptionsfaktor HIF-1 vermittelt wird [44]. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Dexamethason auf die MIF- mRNA- Expression bei CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten untersucht. Weder unter Normoxie noch unter Hypoxie führte die Behandlung mit Dexamethason zu einer signifikanten Änderung der MIF- mRNA- Expression (**Abbildung 23** und **Abbildung 19**). Möglicherweise kann dieses Ergebnis wieder im Sinne einer „partiellen Glukokortikoidresistenz“ von CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten gedeutet werden (siehe Abschnitt **5.4**). Zur Klärung dieser Hypothese sind aber weitere Untersuchungen zum Einfluss von Dexamethason auf die MIF- mRNA- Expression von unstimulierten oder allein CD3- aktivierten CD4⁺- T-Lymphozyten notwendig.

5.5.5 Das Adipokin *pre- B cell colony enhancing factor* (PBEF)

Das Adipokin *pre- B cell colony- enhancing factor* (PBEF) ist ein multifunktionelles Protein, das intrazellulär als Enzym und extrazellulär als sezerniertes Zytokin wichtige Aufgaben erfüllt [51]. Untersuchungen der letzten Jahre deuten immer stärker auf eine entscheidende Bedeutung von PBEF in der Pathogenese der RA hin. Erhöhte Konzentrationen von PBEF wurden sowohl im Synovialgewebe von AIA- Mäusen [51] als auch in der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA- Patienten gemessen [46]. In jüngsten Untersuchungen wiesen Brentano et al. darüber hinaus nach, dass die PBEF- Konzentrationen im Serum und der Synovialflüssigkeit positiv mit der Entzündungs- und Krankheitsaktivität bei RA- Patienten korrelieren. Hierzu wurden neben PBEF auch die Serumkonzentrationen des C- reaktiven Proteins (CRP) und dem *Disease Activity Score* in 28 Gelenken (DAS28) bestimmt [88]. Der diagnostische Wert von PBEF als Biomarker für die Entzündungsaktivität bei RA- Patienten kann deshalb inzwischen als gesichert gelten. Zunehmend rückt PBEF aber auch als möglicher Angriffspunkt zur Behandlung von RA- Patienten in den Vordergrund. In synovialen Fibroblasten induziert PBEF die Synthese und Sekretion von IL-6 und Matrix- Metalloproteinasen (MMPs) [88]. IL-6 wiederum unterstützt die Proliferation der synovialen Fibroblasten und führt zu

Aktivierung von T-Lymphozyten, während die MMPs entscheidend zur Zerstörung des Gelenks beitragen [89]. In Monozyten führt PBEF zur Sekretion von TNF α und im Sinne eines positiven Feedbacks zur vermehrten Sekretion von PBEF [89]. Die Bedeutung von TNF α für die Pathogenese der RA ist seit Jahren bekannt, und der monoklonale TNF α - Antikörper Infliximab wird zur Behandlung von RA- Patienten mit Erfolg eingesetzt [89].

Sowohl synoviale Fibroblasten als auch Monozyten sind in der Lage, PBEF zu sezernieren [88]. Untersuchungen von Bae et al. an der Mamma- Carcinom- Zellelinie MCF7 zeigen, dass Hypoxie über den Transkriptionsfaktor HIF-1 die Expression von PBEF induziert [42]. Zur Regulation von PBEF in CD4⁺- T-Lymphozyten gab es bisher aber keine Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Hypoxie auf die PBEF- mRNA- Expression in CD4⁺- T-Lymphozyten untersucht. Bei unstimulierten T-Lymphozyten zeigte sich nach 20 Stunden Hypoxie ein etwa drei- bis vierfacher signifikanter Anstieg der PBEF- mRNA- Expression (**Abbildung 11**). Auch bei CD3/CD28- aktivierten T- Zellen nahm die PBEF- mRNA- Expression unter Hypoxie signifikant um etwa 50% zu (**Abbildung 11**). Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigen zudem, dass CD4⁺- T-Lymphozyten PBEF sezernieren können. Nach diesen Ergebnissen könnten CD4⁺- T-Lymphozyten in hypoxischen Arealen des entzündeten Gelenks von RA- Patienten vermehrt PBEF sezernieren. PBEF wiederum würde synoviale Fibroblasten und Monozyten zur Sekretion der proinflammatorischen Moleküle IL-6, TNF α , MMPs und auch PBEF anregen [88]. Diese Hypothese würde die besondere Bedeutung von CD4⁺- T-Lymphozyten und der Hypoxie in der Pathogenese der RA bestätigen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Dexamethason auf die PBEF- mRNA- Expression von CD3/CD28- aktivierten CD4⁺- T-Zellen untersucht. Unterschiedliche Konzentrationen Dexamethason führten aber weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu einer Veränderung der PBEF- mRNA- Expression (**Abbildung 19** und **Abbildung 23**). Genau wie beim HIF-1- Zielgen MIF könnte dieses Ergebnis im Sinne einer „partiellen Glukokortikoidresistenz“ von CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten gedeutet werden (siehe Abschnitt **5.4**).

6 Zusammenfassung mit Bezug auf die Rheumatoide Arthritis

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dem Einflussfaktor Hypoxie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA zukommt. Durch die Entstehung eines Circulus vitiosus könnte eine Chronifizierung der Entzündung gefördert werden.

Folgender Pathomechanismus wäre denkbar.

Wie im Abschnitt 1.2 „Nachweis von Hypoxie bei der RA“ erläutert wurde kommt es im Rahmen von chronischen Entzündungen durch verschiedene Mechanismen zur Ausbildung hypoxischer Areale. Der Sauerstoffmangel führt in den infiltrierenden CD4⁺-T-Lymphozyten - die eine der größten Populationen im zellulären Infiltrat des entzündlich veränderten Synoviums von RA- Patienten darstellen [14]- zu einer gesteigerten mRNA- Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie MIF und PBEF (**Abbildung 11**). Diese proinflammatorischen Zytokine wiederum fördern die Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses [46, 47, 51]. Gleichzeitig wird unter Hypoxie die mRNA- Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 erhöht (**Abbildung 11**), was zur vermehrten Retention und zum Persistieren der CD4⁺- T-Lymphozyten im Entzündungsgebiet führen könnte [45]. Alle beschriebenen Prozesse bewirken eine Verstärkung der Entzündungsreaktion [46, 47, 51], wodurch die Ausbildung von hypoxischen Arealen im entzündeten Gelenk weiter gefördert wird. Es entsteht ein Circulus vitiosus.

Die im Entzündungsgebiet herrschende Hypoxie führt in den CD4⁺- T-Lymphozyten zu der Hochregulation der HIF-1- Zielgene GAPDH und GLUT-1 (**Abbildung 10**). Eine Folge dieser Anpassungsvorgänge ist die gesteigerte *anaerobe Glykolyse*, die es den T-Lymphozyten wahrscheinlich ermöglicht, auch unter den sauerstoffarmen Bedingungen im chronisch- entzündeten Synovium von RA- Patienten den autoimmunen Entzündungsprozess aufrecht zu erhalten.

Als Masterregulator für die Adaptationsprozesse von T-Lymphozyten an Hypoxie wird im Augenblick der Transkriptionsfaktor HIF-1 angesehen [1]. Die Erkenntnis, dass Dexamethason eine Reduktion der HIF-1 α - Proteinexpression unter Hypoxie herbeiführt (**Abbildung 18**), könnte ein Hinweis darauf sein, dass Dexamethason die Adaptation von T-Lymphozyten an hypoxische Umgebungsbedingungen negativ beeinflusst und hierüber wenigstens teilweise zur Besserung der Symptome bei RA- Patienten beiträgt. Es bleiben jedoch Fragen offen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten

nicht zeigen, welche Bedeutung die Reduktion der HIF-1 α - Proteinexpression für die Funktionen von CD3/CD28- aktivierten T-Lymphozyten unter Hypoxie hat. Bei keinem der untersuchten HIF-1- Zielgene führte Dexamethason unter Hypoxie zur erwarteten Herunterregulation der mRNA- Expression (**Abbildung 17**, **Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Weitere Untersuchungen zur Klärung der Bedeutung von HIF-1 für die Funktionen von CD4⁺ T-Lymphozyten sind deshalb notwendig.

Auch phänotypische und funktionelle Veränderungen der CD4⁺- T-Lymphozyten im chronisch- entzündeten Synovium könnten auf die hypoxischen Umgebungsbedingungen zurückgeführt werden. So zeichnen sich die aus der Synovia von RA-Patienten isolierten CD4⁺- T-Lymphozyten durch die vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 aus, während der Aktivierungsmarker CD25 nur sehr schwach exprimiert wird [49, 59]. Da diese CD69⁺/CD25⁻-Zellen nur sehr schwer zur Proliferation angeregt werden können, werden sie auch als „frustrierter Phänotyp“ bezeichnet [21]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 bei CD3/CD28- aktivierten T-Zellen inhibiert wird und sich unter Hypoxie signifikant mehr CD69⁺/CD25⁻ T-Lymphozyten vom „frustrierten Phänotyp“ anreichern als unter Normoxie (**Abbildung 14**). Zusammen mit der Erkenntnis, dass auch die Proliferation von T-Lymphozyten unter Hypoxie drastisch inhibiert wird [64, 67], könnte die Entwicklung von T-Zellen des „frustrierten Phänotyps“ deshalb u.a. auf die hypoxischen Umgebungsbedingungen im Entzündungsgebiet von RA- Patienten zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bedeutung des Einflussfaktors Hypoxie in der Pathogenese von Erkrankungen wie der RA lange Zeit stark unterschätzt wurde. Die Erforschung der Adaptationsprozesse von Immunzellen an Hypoxie könnte daher in Zukunft einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung neuer Medikamente leisten.

Literaturverzeichnis

1. Sitkovsky, M. and D. Lukashev, *Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 712-21.
2. *Pschyrembel- Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag. **258. Auflage**.
3. Braun, R.D., et al., *Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2533-44.
4. Caldwell, C.C., et al., *Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6140-9.
5. Hockel, M., et al., *Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements*. Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6098-102.
6. Vaupel, P., F. Kallinowski, and P. Okunieff, *Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors*. Adv Exp Med Biol, 1990. **277**: p. 895-905.
7. Peters, C.L., et al., *The transcription factors hypoxia-inducible factor 1alpha and Ets-1 colocalize in the hypoxic synovium of inflamed joints in adjuvant-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(1): p. 291-6.
8. Lund-Olesen, K., *Oxygen tension in synovial fluids*. Arthritis Rheum, 1970. **13**(6): p. 769-76.
9. Falchuk, K.H., E.J. Goetzl, and J.P. Kulka, *Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis*. Am J Med, 1970. **49**(2): p. 223-31.
10. Treuhaft, P.S., M.R. Lewis, and D.J. McCarty, *A rapid method for evaluating the structure and function of the rheumatoid hand*. Arthritis Rheum, 1971. **14**(1): p. 75-86.
11. Etherington, P.J., et al., *VEGF release is associated with reduced oxygen tensions in experimental inflammatory arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(6): p. 799-805.
12. Gaber, T., et al., *Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do!* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(7): p. 971-80.
13. Taylor, P.C. and B. Sivakumar, *Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2005. **17**(3): p. 293-8.
14. Wagner, U. and H. Schulze-Koops, *[T-lymphocytes--do they control rheumatic immune responses?]*. Z Rheumatol, 2005. **64**(6): p. 377-82.
15. Janeway, *Lehrbuch Immunologie 5. Auflage*.
16. Frauwirth, K.A. and C.B. Thompson, *Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 295-9.
17. June, C.H., et al., *Role of the CD28 receptor in T-cell activation*. Immunol Today, 1990. **11**(6): p. 211-6.
18. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.

19. Watts, T.H. and M.A. DeBenedette, *T cell co-stimulatory molecules other than CD28*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(3): p. 286-93.
20. Liu, K., et al., *Augmentation in expression of activation-induced genes differentiates memory from naive CD4+ T cells and is a molecular mechanism for enhanced cellular response of memory CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7335-44.
21. Pitzalis, C., et al., *Expression of HLA-DR, DQ and DP antigens and interleukin-2 receptor on synovial fluid T lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis: evidence for "frustrated" activation*. *J Rheumatol*, 1987. **14**(4): p. 662-6.
22. Fox, C.J., P.S. Hammerman, and C.B. Thompson, *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(11): p. 844-52.
23. Papandreou, I., et al., *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 187-97.
24. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 177-85.
25. Frauwirth, K.A., et al., *The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism*. *Immunity*, 2002. **16**(6): p. 769-77.
26. Nakamura, H., et al., *TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7592-9.
27. Makino, Y., et al., *Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(12): p. 6534-40.
28. Neumann, A.K., et al., *Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(47): p. 17071-6.
29. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
30. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
31. Hellwig-Burgel, T., et al., *Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions*. *J Interferon Cytokine Res*, 2005. **25**(6): p. 297-310.
32. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. *Science*, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
33. Masson, N., et al., *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation*. *Embo J*, 2001. **20**(18): p. 5197-206.
34. Ivan, M., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. *Science*, 2001. **292**(5516): p. 464-8.

35. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
36. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
37. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
38. Gothie, E., et al., *Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6922-7.
39. Lukashev, D., et al., *Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48754-63.
40. Fandrey, J., T.A. Gorr, and M. Gassmann, *Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(4): p. 642-51.
41. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. Blood, 2005. **105**(2): p. 659-69.
42. Bae, S.K., et al., *Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1*. FEBS Lett, 2006. **580**(17): p. 4105-13.
43. Ietta, F., et al., *Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E272-80.
44. Baugh, J.A., et al., *Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(4): p. 895-903.
45. Nanki, T., et al., *Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6590-8.
46. Otero, M., et al., *Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(9): p. 1198-201.
47. Morand, E.F., M. Leech, and J. Bernhagen, *MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(5): p. 399-410.
48. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
49. Burman, A., et al., *A chemokine-dependent stromal induction mechanism for aberrant lymphocyte accumulation and compromised lymphatic return in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1693-700.
50. Matthys, P., et al., *AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4686-92.

51. Nowell, M.A., et al., *Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(7): p. 2084-95.
52. Buttgereit, F., et al., *Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(11): p. 3408-17.
53. Webster, J.I., L. Tonelli, and E.M. Sternberg, *Neuroendocrine regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 125-63.
54. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
55. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(4): p. 488-522.
56. Vacca, A., et al., *Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements*. *J Exp Med*, 1992. **175**(3): p. 637-46.
57. Cato, A.C., A. Nestl, and S. Mink, *Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways*. *Sci STKE*, 2002. **2002**(138): p. RE9.
58. Bartholome, B., et al., *Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis*. *Faseb J*, 2004. **18**(1): p. 70-80.
59. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(3): p. 136-40.
60. Lukashev, D., et al., *Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2006. **177**(8): p. 4962-5.
61. Gradin, K., et al., *The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(26): p. 23508-14.
62. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
63. Suzuki, H., A. Tomida, and T. Tsuruo, *Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia*. *Oncogene*, 2001. **20**(41): p. 5779-88.
64. Loeffler, D.A., P.L. Juneau, and S. Masserant, *Influence of tumour physico-chemical conditions on interleukin-2-stimulated lymphocyte proliferation*. *Br J Cancer*, 1992. **66**(4): p. 619-22.
65. White, P.C., et al., *Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes*. *Oncogene*, 2006. **25**(15): p. 2170-80.
66. Moon, J.J., et al., *A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(7): p. 5520-7.

67. Naldini, A. and F. Carraro, *Hypoxia modulates cyclin and cytokine expression and inhibits peripheral mononuclear cell proliferation*. J Cell Physiol, 1999. **181**(3): p. 448-54.
68. Robbins, J.R., et al., *Hypoxia modulates early events in T cell receptor-mediated activation in human T lymphocytes via Kv1.3 channels*. J Physiol, 2005. **564**(Pt 1): p. 131-43.
69. Conforti, L., et al., *Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 695-702.
70. Zuckerberg, A.L., L.I. Goldberg, and H.M. Lederman, *Effects of hypoxia on interleukin-2 mRNA expression by T lymphocytes*. Crit Care Med, 1994. **22**(2): p. 197-203.
71. Thiel, M., et al., *Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival*. PLoS ONE, 2007. **2**(9): p. e853.
72. Skapenko, A., et al., *The role of the T cell in autoimmune inflammation*. Arthritis Res Ther, 2005. **7 Suppl 2**: p. S4-14.
73. Wagner, A., *Normoxic induced hypoxia-inducible factor- 1a is negatively affected by glucocorticoids*. . Keystone Symposia, Biology of Hypoxia: The role of Oxygen sensing in development, normal function and disease. **Abstract no. 349**.
74. Kodama, T., et al., *Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33384-91.
75. Leonard, M.O., et al., *Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2250-7.
76. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways*. Endocr Rev, 1999. **20**(4): p. 435-59.
77. Nijhuis, E.W., et al., *Abrogation of the suppressive effects of dexamethasone by PKC activation or CD28 triggering*. Cell Immunol, 1994. **156**(2): p. 438-47.
78. Winiski, A., et al., *Inhibition of T-cell activation in vitro in human peripheral blood mononuclear cells by pimecrolimus and glucocorticosteroids and combinations thereof*. Exp Dermatol, 2007. **16**(8): p. 699-704.
79. Tsitoura, D.C. and P.B. Rothman, *Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells*. J Clin Invest, 2004. **113**(4): p. 619-27.
80. Baumann, S., et al., *Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer*. Blood, 2005. **106**(2): p. 617-25.
81. Kiefer, F., W.F. Vogel, and R. Arnold, *Signal transduction and co-stimulatory pathways*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 69-82.
82. Zhang, X., et al., *Tissue trafficking patterns of effector memory CD4+ T cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(12): p. 3839-49.

83. Buckley, C.D., et al., *Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3423-9.
84. Wang, J., et al., *IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(5): p. 642-9.
85. Curnow, S.J., et al., *Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 7154-61.
86. Symmons, D.P., et al., *Lymphopenia in rheumatoid arthritis*. J R Soc Med, 1989. **82**(8): p. 462-3.
87. Okutsu, M., et al., *Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(3): p. R591-9.
88. Brentano, F., et al., *Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 2829-39.
89. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 907-16.

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Buttgerit für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die immer vorhandene Hilfsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise und die aufbauenden Worte, wenn mal was nicht gelingen wollte.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Timo Gaber, Manuela Jakstadt und René Dziurla für meine Einarbeitung in die Laborarbeit, die großartige Unterstützung und die vielen Diskussionen, Anregungen und netten Gespräche. Ich werde Euch immer verbunden bleiben.

Dank natürlich auch an die weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe Buttgerit: Monique, Karolina, Cindy, Paula, Grit und Thomas für die freundliche Atmosphäre im Labor und die schöne Zeit. Es war sehr nett mit Euch zu arbeiten.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei der AG Riemekasten und der AG Lauster und insbesondere bei Juliane, Reinmar, Phillip, Stefan, Jens, Luzie, Miriam, Käthe und Mark, – ich bin Euch freundschaftlich verbunden.

Dank auch an alle Mitarbeiter und Wissenschaftler des DRFZ.

Besonderen Dank auch an meine geliebte Freundin Julia, meine wunderbare Familie, meine lieben Schwiegereltern, Pit, die Schwiegeromas und alle meine Freunde, die mich in der gesamten Zeit immer unterstützt und begleitet haben.

Zusätzlich noch ein Dankeschön an Timo Gaber, Julia und Hyun-Dong Chang fürs mühevollte Korrekturlesen.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidstattliche Erklärung

„Ich, Kerem Benjamin Erekul, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Wirkung von Dexamethason auf CD3/CD28-stimulierte CD4⁺- T-Zellen unter Sauerstoffmangel (Hypoxie)“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“