

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Untersuchung der Einflüsse auf die Regulation des
Zelloberflächenmoleküles CD40L**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jutta Rehklaue

aus

München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter

Prof. Dr. M. Hallek

Mitberichterstatter

Priv. Doz. Dr. H. Engelmann

Prof. Dr. G. Enders

Prof. Dr. B. Engelmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter

Dr. R. Buhmann

Dekan

Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung

05.06.2003

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der CLL	7
1.2 Zellbiologische Ansätze zur Behandlung der CLL	7
1.3 Die Bedeutung von CD40	10
1.4 Die Bedeutung von CD40L	11
2. Fragestellung	12
3. Material	13
3.1 Materialien	13
3.2 Substanzen	13
3.2.1 Zellkultur und Labor	13
3.2.2 Antikörper	15
3.2.3 Lösungen für Proteinassay und Western Blot	16
3.2.4 ELISA.....	18
3.3 Geräte.....	18
3.4 Zellen	19
4. Methoden.....	20
4.1 Kultivierung der Zellen.....	20
4.2 Einfrieren der Zellen.....	20
4.3 Auftauen der Zellen	21
4.4 Isolation von lymphozytären Zellen aus peripherem Blut.....	21
4.5 Isolation von T-Zellen aus lymphozytären Zellen durch MACS-Separation.....	21
4.6 Durchflußzytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Zellen (FACS).....	23
4.7 FACS-Panel	23
4.8 Bestimmung des benötigten CD40:CD40L-Verhältnisses	24
4.9 Zeitkinetik der CD40L-Herunterregulation	24
4.10 Bestimmung der Interaktionsart.....	25
4.11 Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin	25
4.12 Trennung von NIH3T3 CD40L- und LP ₁ -Zellen durch Magnetic Cell Sorting (MACS).....	26
4.13 Ablösung von löslichem CD40 mit einer milden Säure (Säurewash)	27
4.14 Inkubation mit Matrixmetalloproteinaseinhibitor KB8301	27

4.15 ELISA der Überstände.....	28
4.16 Intrazelluläre FACS-Messung	28
4.17 Lyse der Zellen	28
4.17.1 Allgemeines zur Lyse der Zellen.....	28
4.17.2 Herstellung des Zellysates.....	29
4.17.3 Proteinassay der Zellysate	29
4.18 SDS-PAGE und Westernblot	30
4.18.1 Allgemeines zur SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	30
4.18.2 Herstellen der Polyacrylamidgele	30
4.18.2.1 Trenngel	30
4.18.2.2 Sammelgel.....	31
4.18.2.3 Laden und Starten des Gels.....	31
4.18.2.4 Transfer (Westernblot).....	31
4.18.2.5 Blocken der Membran.....	32
4.18.2.6 Antikörper-Inkubation	32
4.18.2.7 Entwicklung der Blots.....	32
4.19 ELISA der Zellysate	33
4.20 Koinkubation mit Endozytoseinhibitoren.....	33
5. Ergebnisse	34
5.1 Untersuchungen zur Herabregulation von CD40L	34
5.1.1 Untersuchung der CD40L-Kinetik auf NIH3T3 CD40L	34
5.1.1.1 CD40L-Herabregulation auf NIH3T3 CD40L nach Koinku- bation mit LP ₁ -Zellen	34
5.1.1.2 Bestimmung des benötigten CD40:CD40L-Verhältnisses	35
5.1.1.3 Zeitkinetik der CD40L-Herabregulation.....	36
5.1.1.4 Bestimmung der Interaktionsart.....	36
5.1.2 Untersuchung der CD40L-Kinetik auf T-Zellen	37
5.1.2.1 Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin	37
5.2 Untersuchungen zur Art der Herabregulation von CD40L.....	38
5.2.1 Fehlender Nachweis von CD40L durch Haftung von LP ₁ CD40 an NIH3T3 CD40L	39
5.2.1.1 Separation der Zellen durch MACS.....	39

5.2.2 Fehlender Nachweis von CD40L durch Bindung von löslichem CD40 (sCD40).....	40
5.2.2.1 Nachweis von sCD40 durch Waschen mit einer milden Säure ..	41
5.2.3 Fehlender Nachweis von CD40L durch Abspaltung von sCD40L	42
5.2.3.1 Inhibition von Matrixmetalloproteinasen	42
5.2.3.2 ELISA der Zellüberstände	43
5.2.4 Fehlender Nachweis von CD40L durch Endozytose	44
5.2.4.1 Intrazelluläre FACS-Messung	45
5.2.4.2 Western Blot der Zellysate.....	46
5.2.4.3 ELISA von Zellysaten.....	46
5.2.4.4 Endozytosehemmung durch Lectine.....	47
6. Diskussion	49
6.1 Verwendete Methoden.....	49
6.2 Immundefekte bei der CLL.....	49
6.3 Immunabwehr bei gesunden Menschen.....	49
6.4 Mögliche Ursachen des Immundefektes bei CLL-Patienten	50
6.5 Kinetik der CD40L-Herabregulation	51
6.6 Diskussion der Ursachen der CD40L-Herunterregulation.....	51
6.7 Konsequenzen der CD40L-Herabregulation	53
6.8 Ausblick auf therapeutische Möglichkeiten	54
7. Zusammenfassung.....	56
8. Literaturverzeichnis.....	57
Danksagung.....	66
Lebenslauf.....	67

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der CLL

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist mit einer Inzidenz von 3/100.000 Einwohnern die häufigste Leukämie des Erwachsenenalters in der westlichen Hemisphäre und betrifft vorwiegend ältere Patienten, die im Median 70 Jahre alt sind [1, 2]. Das Risiko, an einer CLL zu erkranken nimmt mit steigendem Lebensalter zu, wobei die Ätiologie noch weitgehend unklar ist. Es wird sowohl ein Einfluß von Umwelt- als auch genetischen Faktoren diskutiert, deren Rolle aber noch nicht exakt definiert ist. Kinder von CLL-Patienten haben ein im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhtes Risiko, an einer CLL oder einer anderen lymphatischen Neoplasie zu erkranken [3]. Pathogenetisch und morphologisch wird die CLL den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) niedriger Malignität zugeordnet, wobei mehr als 90% der Fälle der B-Zellreihe zugehörig sind [4, 5].

Bei der CLL handelt es sich um eine lymphoproliferative Erkrankung mit klonaler Expansion morphologisch reifer, immunologisch inkompetenter Lymphozyten, als deren mögliche Ursprungszelle sowohl naive B-Zellen als auch Gedächtnis-B-Zellen in Frage kommen. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich immunophänotypisch in der Expression des Oberflächenantigens CD38 [6]. Allerdings ist die Proliferationsrate des malignen Zellklons gering und daher nicht alleine für die Akkumulation der CLL-Zellen verantwortlich. Die wesentliche Ursache der Akkumulation dürfte in der Fehlregulation apoptotischer Signale liegen, deren genaue Natur nicht geklärt ist. Mögliche Mechanismen sind die Hypomethylierung der Promotorregion des bcl2-Gens, die zur Überexpression des bcl2-Proteins führt, sowie Mutationen des ATM-Gens [7] oder des p53-Gens [8]. CLL-Zellen können weitere genomische Aberrationen erwerben, die zu einem Voranschreiten der Erkrankung führen. Die für den ersten Schritt der malignen Transformation verantwortlichen Mutationen sind unbekannt.

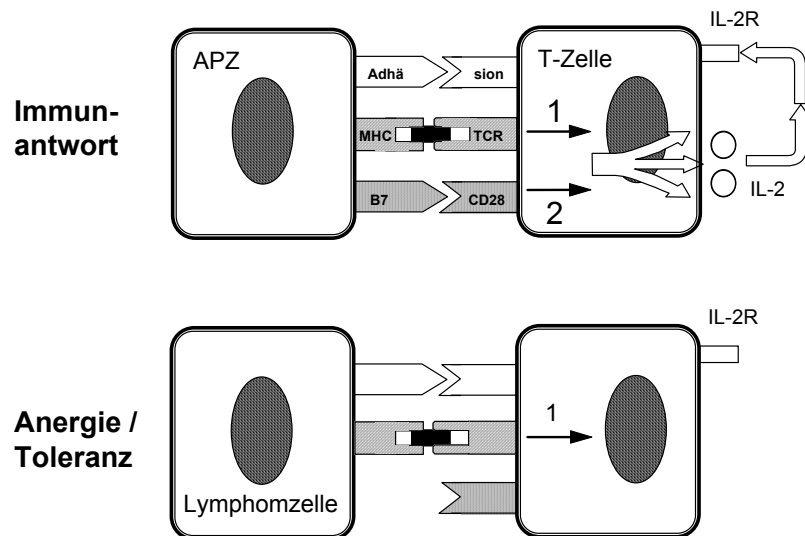
Anfangs ist die CLL meist unauffällig, führt aber im fortgeschrittenen Stadium, trotz intensiver konventioneller Therapiemaßnahmen, rasch zum Tode. Viele Patienten leiden unter einem Antikörpermangelsyndrom mit den dabei typischen Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze [9-11]. Die mittlere Überlebenszeit variiert abhängig vom Stadium zum Diagnosezeitpunkt zwischen zwei und mehr als zehn Jahren.

1.2 Zellbiologische Ansätze zur Behandlung der CLL

Obwohl das therapeutische Spektrum in den letzten zehn Jahren z.B. durch die Einführung der Purinanaloga erheblich erweitert wurde und dadurch gute partielle oder komplette

Remissionen erzielt werden konnten, entwickeln sich ähnlich wie bei anderen niedrigmalignen NHL regelhaft Rezidive. Als Ursache dafür wird das Fortbestehen einer minimalen Resterkrankung nach Standardtherapie angesehen [12]. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der CLL und zur Interaktion der Leukämiezellen mit Zellen des Immunsystems legen die Entwicklung neuer, adjuvanter Behandlungskonzepte nahe, die auf eine Beseitigung der minimalen Resterkrankung abzielen. Derzeitiger Schwerpunkt vieler experimenteller Ansätze ist die Induktion einer zellulären Antitumorantwort, basierend auf der Verstärkung der Immunogenität der Tumorzellen [13]. Für die Induktion einer zellulären Immunantwort sind grundsätzlich drei unterschiedliche Interaktionen zwischen T-Zelle und Antigenpräsentierender Zelle (APZ) notwendig: Adhäsion, Antigenpräsentation und Kostimulation (Abbildung 1.1)

Abbildung 1.1:



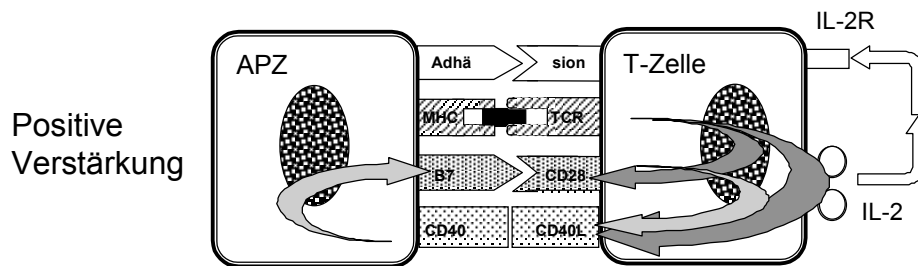
Die An- oder Abwesenheit der kostimulatorisch wirkenden Signale entscheidet über den Ausgang der T-Zellantwort. Die Anwesenheit von B7 während der antigenspezifischen Interaktion zwischen der Antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und der T-Zelle führt zu produktiver Immunantwort, die Abwesenheit führt zur Anergie oder Toleranzentwicklung.

Die Adhäsion vermittelt den zunächst unspezifischen Zell-Zell-Kontakt über membranständige Adhäsionsmoleküle zwischen der T-Zelle und der APZ. Komplementäre Anordnung, variierende Expression und unterschiedliche Verteilung dieser Moleküle auf der jeweiligen Zelloberfläche steuern und kontrollieren die Bindungsreaktion. Die Spezifität der T-Zell-Antwort wird durch die Präsentation des Antigens auf den MHC-Molekülen der APZ und dessen Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) vermittelt. Adhäsion und Antigenerkennung alleine reichen aber nicht aus, um naive T-Zellen zu aktivieren [14, 15]. Es

sind zusätzliche kostimulatorische Signale notwendig, um eine T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Die Kostimulation ist weder Antigen-spezifisch noch MHC-abhängig; sie kann über bestimmte Oberflächenmoleküle der APZ vermittelt werden. Herausragende Bedeutung kommt den kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie zu, welche auf T-Zellen an ihren Rezeptor CD28 binden und so T-Zellen aktivieren. Während die alleinige Antigenerkennung durch den TZR ohne Kostimulation zu Anergie- und Toleranzentwicklung führt, bewirkt die gleichzeitige Bindung von B7 an CD28 eine aktive T-Zell-Antwort. Der wichtigste Parameter für die Induktion einer lymphomspezifischen Immunantwort ist das Vorhandensein von Tumor-spezifischen Antigenen [16]. Obwohl Lymphome im Idiotyp über mindestens ein Tumor-spezifisches Antigen verfügen, entziehen sie sich in der Regel einer immunologischen Kontrolle und zeigen positives Wachstum. In einer Vielzahl von NHL werden Tumor-infiltrierende Zellen gefunden, die allerdings keine signifikante Zytotoxizität gegenüber den Lymphomzellen vermitteln [17]. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, warum T-Zellen nicht in der Lage sind, eine ausreichende Immunantwort gegenüber den Lymphomzellen zu generieren. Zum Beispiel könnten Lymphomzellen einer Erkennung durch T-Zellen entgehen, da sie sich in einem anderen Kompartiment lymphatischer Organe befinden und es für die T-Zellen nicht möglich ist, dorthin zu gelangen [18]. Auch könnten Lymphomzellen Oberflächenmoleküle und lösliche Faktoren exprimieren, die eine suffiziente T-Zell-Antwort verhindern [19-21]. Eine andere Möglichkeit der T-Zell-Ignoranz gegenüber Lymphomzellen besteht in einer mangelnden Expression sogenannter Tumorantigene [22]. Aber selbst wenn die Lymphomzellen Tumorantigene exprimieren, könnte eine mangelnde oder nicht ausreichende Expression kostimulatorischer Moleküle trotzdem zu einer Anergie der T-Zellen führen [14, 23-30]. Weiter konnte sogar gezeigt werden, daß die Anwesenheit von B-Zellen während der Initiationsphase möglicherweise zu einer unzureichenden zellulären wie auch zu einer nicht-protaktiven humoralen Antwort führte [31]. Für CLL-Zellen konnte gezeigt werden, daß diese in der Lage sind, die Interaktion von aktivierten T-Zellen mit normalen B-Zellen *in vitro* zu hemmen [32]. Die Zugabe normaler B-Zellen oder eine steigende Anzahl von CLL-Zellen führt zu einer dosisabhängigen Inhibition der T-Zell vermittelten B-Zell Stimulation.

Die Aktivierung von ruhenden B-Zellen wird über die Interaktion der Oberflächenmoleküle CD40 und CD40-Ligand (CD40L) vermittelt. Durch die Stimulation des CD40-Rezeptors auf B-Zellen durch CD40L auf T-Zellen kommt es zur Expression von B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) sowie weiterer Adhäsionsmoleküle (Abbildung 2).

Abbildung 1.2:



Die CD40-CD40L Interaktion induziert die Expression von B7-1 und B7-2 auf der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ). Dies führt zu einer positiven Verstärkung der T-Zell-Antwort.

CD40 wird von gesunden und malignen B-Zellen exprimiert, CD40L in der Regel von aktivierten CD4⁺ T-Zellen [33, 34]. T-Zellen von CLL-Patienten sind jedoch nicht in der Lage, nach CD3-Ligation CD40L zu exprimieren [35]. Zugabe von CLL Zellen zu T-Zellen gesunder Spender führte zu einer raschen Herabregulation von CD40L. Dies und die Tatsache, daß CLL-Patienten an einer Immundefizienz ähnlich der bei Personen mit einem Defekt im CD40L Gen leiden, führt zu der Annahme, daß CD40-CD40L eine Schlüsselrolle in der T-Zell B-Zell-Aktivierung zu spielen scheinen.

1.3 Die Bedeutung von CD40

Bei CD40 handelt es sich um ein 45- bis 50-kDa Typ I Integralmembranprotein aus 277 Aminosäuren, das humane CD40 Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 20 nachgewiesen [36]. CD40 gehört ebenso wie der TNF-Rezeptor, CD30, CD27, Fas und OX-40 zur TNF-Rezeptor-Familie [37] und wird konstitutionell unter anderem auf B-Zellen, dendritischen Zellen [38], Thymusepithelien [39] und Endothelzellen [40, 41] exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß auch humane dendritische Langerhanszellen (DC) eine hohe CD40-Expression aufweisen. Eine Stimulation der Zellen mit CD40L exprimierenden Fibroblasten führt zu einer Reifung der Zellen hinsichtlich dendritischer Morphologie, einer hohen Expression von MHC Klasse II und einer Aufregulation von CD25, CD58, B7-1 und B7-2. Zusätzlich konnte eine Sekretion von TNF- α , IL-8 und MIP-1 α erreicht werden [42]. Letztere beiden Moleküle besitzen chemotaktische Wirkungen, CD40 mag auf diesem Wege zur Lymphozyteneinwanderung in Gebiete, in denen aktivierte DC lokalisiert sind, beitragen. Sowohl auf kortikalen und medullären Epithelzellen als auch auf interdigitierenden Thymuszellen und B-Zellen ist CD40 nachweisbar. In Versuchen gewonnene Erkenntnisse deuten darauf hin, daß kostimulatorische Moleküle, besonders CD40L, in die Selektion von T-Zellen im Thymus involviert sind [39]. Auf humanen Endothelzellen wird CD40 konstitutiv

exprimiert [40], bei einer Entzündung nimmt die CD40-Expression auf Endothelzellen zu [41].

1.4 Die Bedeutung von CD40L

Bei CD40L handelt es sich um ein 32-33 kDa Typ I Transmembranprotein aus 261 Aminosäuren, das humane CD40L Gen wurde auf dem langen Arm des X-Chromosomes lokalisiert [43]. CD40L (gp 39, TBAM, TRAP) gehört ebenso wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{LT}\alpha$, $\text{LT}\beta$, Fas-Ligand, CD30L, CD27L und 4-1BBL zur TNF-Familie [37]. CD40L wird auf aktivierten, nicht aber auf ruhenden T-Zellen exprimiert. Die CD40L-Expression kann auf TH_0 -, TH_1 - und TH_2 -Zellen induziert werden und ist vorwiegend auf CD4^+ -Zellen vorhanden [44]; allerdings exprimiert auch eine kleine Population von CD8^+ -T-Zellen CD40L [45]. Ebenso auf Mastzellen und basophilen Zellen konnte CD40L nachgewiesen werden [46]. Es wirkt dabei induzierend auf die IgE Synthese. CD40L scheint auch eine Rolle in der Entstehung von allergischen Reaktionen zu spielen. Eosinophile Zellen zeigen eine CD40L-Expression nach pharmakologischer Stimulation; in funktionellen Assays konnte durch aktivierte eosinophile Zellen in der Gegenwart von IL-4 eine B-Zell Proliferation ausgelöst werden [47]. Interessanterweise zeigte ein Patient mit einer Hypereosinophilie eine hohe konstitutive CD40L-Expression. Auch konnte eine CD40L-Expression auf NK-Zellen [48], Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen [49] und Thrombozyten [50] nachgewiesen werden.

2. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der immunologischen Schlüsselrolle der Interaktion der Moleküle CD40/CD40L war es Ziel dieser Arbeit, die Einflüsse auf die Regulation von CD40L näher zu charakterisieren.

3. Material

3.1 Materialien

Amersham, Braunschweig:

ECL-Filme (Emissions-Chemolumineszenz-Lösung)

Falcon, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich:

6-, 12-, 24- und 48-well Platten beschichtet

96-well Platten mit geradem, V-förmigem Boden

Zellfilter

FACS-Röhrchen

Nunc, Wiesbaden:

Gewebekulturflaschen ohne Filter 75 cm²

Transwellplatten

Sarstedt, Nümbrecht:

Gewebekulturflaschen mit Filter 75 cm² und 175 cm²

Serologische Pipetten 5ml, 10ml und 25ml

Tubes 15ml und 50ml

Schleicher & Schüll, Dassel:

PVDF-Membran

Blotting Papier (Whatman 3MM-Papierstücke)

3.2 Substanzen

3.2.1 Zellkultur und Labor

Amersham, Braunschweig:

Detektionssystem ECL

An der Grub, Österreich:

FIX + PERM[®]

Bio Whittaker, Walkersville USA:

Humanserum

Biorad, München:

Biorad-Proteinassay

APS (Ammoniumperoxidisulfat)

Glycin

SDS

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)

Tris (Ethylthiomethan)

Boehringer, Mannheim:

Matrixmetalloproteinaseinhibitor KB8301

Braun, Melsungen:

Heparin-Natrium 25000 IE / 5ml

Life Technologies, Karlsruhe:

AIMV Medium

Merck Eurolab GmbH Ismaning:

HCl

Pan Biotech GmbH, Aidenbach:

DPBS (Dulbecco's Phosphatgepuffered Lösung)

Penicillin / Streptomycin

Geneticin (G418)

Seromed Biochrom AG, Berlin:

basal Iscove Medium

Fetales Kälber Serum (FCS)

L-Glutamin

Trypsin

Sigma Aldrich Chemie, Steinheim:

Aprotinin
Cytochalasin B
DMSO (Dimethylsulfoxid)
Leupeptin
Trypanblau
NaVO₄
PMSF(Phenylmethanesulfonyl Fluorid)
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)
Ionomycin
Hygromycin B

3.2.2 Antikörper

Immunotech:

IgG₁ FITC (Mouse IgG₁ κ Klon 679.1Mc7)
CD3 FITC (Klon UCHT1)
MHCII FITC (Klon B8.12.2)

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach:

Pan T-Zell Isolations Kit
HLA-DR MicroBeads

Pharmingen Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg:

IgG₁ FITC (Mouse IgG₁ κ, Klon MOPC-21)
IgG₁ PE (Mouse IgG₁ κ, Klon MOPC-21)
CD40 FITC (Klon 5C3)
CD40L FITC (Klon TRAP1)
CD40L PE (Klon TRAP1)

Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA:

CD40L-Antikörper (Klon TRAP1)

3.2.3 Lösungen für Proteinassay und Western Blot

Standard Lysispuffer:

NP 40	0,5%
EDTA	1mM
Tris-Cl pH 7,4	50mM
Natriumfluorid	1mM
NaCl	150mM
Glyzerin	15%

Pro Milliliter Lysispuffer wurden außerdem folgende Reagentien zugefügt:

PMSF	10µl	→ Proteaseninhibitor
NaVO ₄	10µl	→ Tyrosin-Phosphatasen-Inhibitor
Aprotinin	5µl	→ Proteaseninhibitor
Leupeptin	2µl	→ Proteaseninhibitor

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid:

Eine Flasche 40% Acrylamid/Bisacrylamid 37:1 (Sigma) in 96ml dH₂O lösen

APS 10%:

10%-ige Lösung von APS in dH₂O, die aliquotiert und bei -20°C gelagert wird.

4x Tris-Cl/SDS pH 8,8:

dH ₂ O	300ml
Tris	91g
SDS	2g
mit HCl pH 8,8 einstellen	
dH ₂ O	ad. 500ml
→ mit 0,45µm Filter filtrieren	

Trenngel 10%:

30% Acrylamid/	20ml
0,8% Bisacrylamid	
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	15ml
dH ₂ O	25ml
TEMED	40µl
APS 10%	200µl

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8:

dH ₂ O	40ml
Tris	6,05g
SDS	0,4g
mit HCl pH 6,8 einstellen	
dH ₂ O	ad. 100ml
→ mit 0,45µm Filter filtrieren	

Sammelgel:

30% Acrylamid/	6,5ml
0,8% Bisacrylamid	
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5ml
dH ₂ O	30,5ml
TEMED	50µl
APS 10%	250µl

2x Probenpuffer:

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5ml
SDS 10%	20ml
β-ME	2ml
Glycerin	20ml
Bromphenolblau	1mg
dH ₂ O	45,5ml

Low-Range-Marker:

<u>Protein</u>	<u>kD</u>
Phosphorylase B	112
BSA	84
Ovalbumin	53,2
Carbon-Anhydrase	34,9
STI	28,7
Lysozym	20,5

5x Elektrophoresepuffer:

Tris	15,1g
Glycin	72g
SDS	5g
dH ₂ O	ad. 1000ml

→ nach 1:5 Verdünnung automatisch pH 8,3 !

Transferpuffer:

Tris	24,22g
Glycin	115,3g
Methanol	600ml
dH ₂ O	ad. 8000ml

10x TBS:

1M Tris-Cl pH 8	100ml
5M NaCl	300ml
dH ₂ O	ad. 1000ml

1x TBS:

Verdünnung von 10x TBS mit dH₂O im Verhältnis 1:10

Blocking-Solution für ECL:

MP	2g
1x TBS	ad. 40ml

3.2.4 ELISA

Bender MedSystems, Wien:

sCD40L ELISA Kit

3.3 Geräte

Biorad, München:

Geltransferkammer

Brand, Wertheim:

Zählkammern

Coulter Electronics, Kempen:

Epics XL-MCL Facs-Gerät

Cryoson, Schöllkrippen:

Flüssigstickstofftank

Eppendorf, Hamburg:

Zentrifuge 4517C

Zentrifuge 1540

Heraeus, Osterode/Harz:

Sterilbank HA 2448 GS

Hettich Zentrifugen:

Rotanta 46R

Labotec, Göttingen:

Inkubator

Mettler, Gießen:

Feinwaage P 1210

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach:

VarioMACS

LS⁺/VS⁺ Selektionssäulen

Scientific Plastics, Großbritannien:

Blockthermostat

HLC Vortex Genie 2

Zeiss, Oberkochen:

Mikroskop

3.4 Zellen

LP₁: Humanes multiples Myelom (DSM ACC 41) [51] ohne (LP₁0) oder mit (LP₁CD40) Transfektion von CD40

NIH3T3: ATCC No. CCL-2.3K, die mit CD40L transfiziert wurden (NIH3T3 CD40L)

4. Methoden

4.1 Kultivierung der Zellen

LP₁-Zellen: Kultivierung in basal Iscoves Medium mit 10% FCS, 500 IU Penicillin/ml, 0,5 mg Streptomycin und 0,8 mg/ml Hygromycin B

NIH3T3-Zellen: Kultivierung in basal Iscoves Medium mit 10% FCS, 500 IU Penicillin/ml, 0,5 mg Streptomycin und 0.2mg/ml G418

T-Zellen: Kultivierung in AIMV Medium mit 5% Humanserum, 500 IU Penicillin/ml und 0,5 mg Streptomycin

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle drei Tage wurden die Zellen 1:2 bis 1:4 mit frischem Medium verdünnt, oder es wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden die Zellen 10min bei 1100rpm abzentrifugiert, und dann in dem gleichen oder einem größeren Medienvolumen resuspendiert.

4.2 Einfrieren der Zellen

Beim Einfrieren und Auftauen sollte besonders auf absolute Sterilität geachtet werden, da der ganze Vorgang die Zellen einem recht hohen Streß aussetzt. Von Zeit zu Zeit wurden verschiedene Zellpassagen eingefroren. Dies hat den Vorteil, daß man immer einen Vorrat hat falls die Zellen einmal kontaminiert werden, oder sich ihre Eigenschaften in Kultur verändern. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen auf eine Zellzahl von etwa 10⁶/ml hochgezogen. Aus 170ml einer solchen Kultur erhält man ca. 6 Einfrierröhrchen mit je 1,7ml Zellsuspension. Die Zellen wurden 10min bei 1500rpm und 4°C abzentrifugiert, und dann in 10ml Einfrierlösung (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert. Je 1,7ml dieser Zellsuspension wurden unter der Sterilbank auf sterile 2ml Einfrierröhrchen verteilt und auf Eis gehalten. Bevor das Einfriermedium zupipettiert wurde, war die computergesteuerte Einfriermaschine schon eingeschaltet und vorgekühlt. Dadurch wurde die Zeit verkürzt, die die Zellen im ungefrorenen Zustand mit DMSO in Kontakt waren. Die Einfriermaschine wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und lief in einem gesonderten Lymphozyten-Einfrierprogramm. Nach Ablauf des Programms wurden die Zellen entnommen und sofort in Flüssigstickstoff gelagert. In einem gesonderten Einfrierordner wurden Zellart, Datum und der genaue Lagerort festgehalten.

4.3 Auftauen der Zellen

Ein Einfrierröhrchen wurde unter fließendem, lauwarmen Wasser solange angetaut, bis nur noch ein kleiner Eisrest übrig blieb. Um das DMSO zu entfernen wurde die Zellsuspension in einem 15ml Falconröhrchen mit PBS versetzt, leicht geschüttelt, und 10min bei 1500rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 15ml Medium resuspendiert. Vor der Durchführung von Versuchen mit solchen frisch aufgetauten Zellen wurden diese erst einmal für zwei Wochen in Kultur gehalten.

4.4 Isolation von lymphozytären Zellen aus peripherem Blut

Die heparinisierten Blutproben (von gesunden Spendern bzw. B-CLL-Patienten) wurden 1:1 mit DPBS verdünnt, auf Ficoll-Hypaque überschichtet und bei 4°C und 2000g in der Zentrifuge für 30min zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase (= Leukozyten) vorsichtig abgenommen, mit DPBS zweimal gewaschen und abzentrifugiert. Da dendritische Zellen im Gegensatz zu Lymphozyten in Gewebezellkulturflaschen nach ca. 4 Stunden adhäreren, wurde das Pellet nach dem Waschen über Nacht in 50ml Medium und 100µl Heparin in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die im Medium schwimmenden Lymphozyten nach Bedarf entsprechend weiterverwendet.

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung wurde 1ml aus der Zellkultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Aus diesem wurden 50µl entnommen und mit 50µl 0,5% Trypanblau-Lösung gut gemischt. Von dieser Mischung wurden etwa 30µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop nach folgendem Schema: in allen vier Großquadranten der Zählkammer wurden sowohl die vitalen, weißen Zellen, als auch die letalen, blauen Zellen ausgezählt. Von den Zellen die auf den Rändern der Großquadrate liegen, wurden nur die gezählt, die auf dem linken- bzw. oberen Rand liegen. Aus der Zahl der ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor läßt sich die Zellzahl berechnen.

*Zellzahl: Anzahl der lebenden Zellen * Verdünnungsfaktor * 10⁴ = Zellzahl pro ml*

4.5 Isolation von T-Zellen aus lymphozytären Zellen durch MACS-Separation

Um aus dem lymphozytären Gemisch T-Zellen zu isolieren, gibt es verschiedene Verfahren. Eine einfache Möglichkeit bietet die von Miltenyi-Biotech kommerziell angebotene Methode des „Magnetic Cell Sorting“, kurz MACS (Abbildung 4.1). Dabei werden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, der mit einem kleinen Metallkügelchen, den sog.

Beads fusioniert ist und über eine positive Selektionssäule, in der sich ein Magnet befindet, herausgefiltert.

Abbildung 4.1:

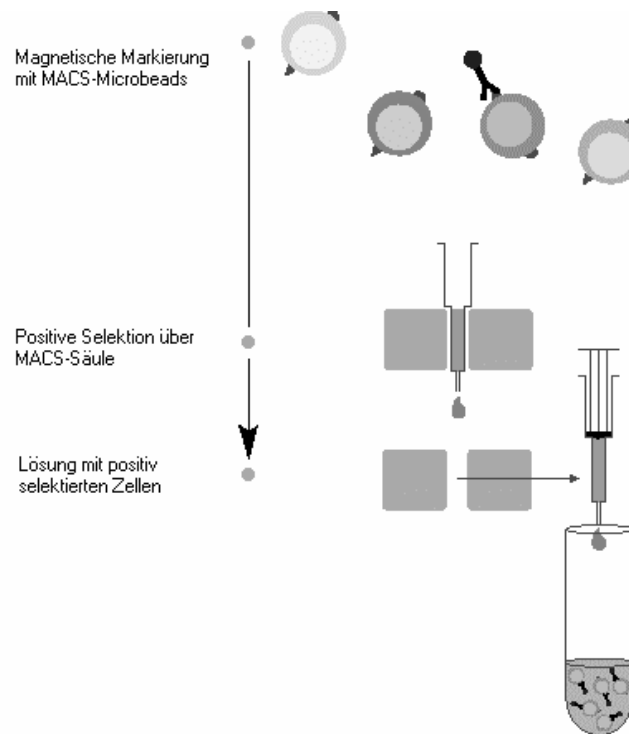


Abbildung 4.1: Prinzipien des Magnetic Cell Sorting

Für die T-Zell Isolation wurde der Pan T-Zell Isolationskit von Miltenyi-Biotech verwendet. Die Zellen wurden gewaschen und in 500µl DPBS pro 10^8 Zellen resuspendiert. Pro 10^8 Zellen wurden 20µl Hapten-Antibody Cocktail zugegeben, gut durchgemischt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach nochmaligem Waschen und Resuspendieren wurden 20µl Anti-Hapten Antibody pro 10^8 Zellen zugegeben, gut durchgemischt und im Kühlschrank bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit DPBS gewaschen, das Pellet in 5ml DPBS gelöst, über ein Zellsieb gefiltert und auf die zuvor zweimalig mit DPBS gespülten LS⁺/VS⁺ Säulen im VarioMACS gegeben. Dabei blieben alle Zellen bis auf die T-Zellen in der Säule hängen, diese konnte man am unteren Ende der Säule in einem Falcon sammeln und weiterverwenden.

4.6 Durchflußzytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Zellen (FACS)

Durchflußzytometrische Messungen bieten unter anderem die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit Antigene auf und in Zellen zu messen.

Die Zellen werden mit farbmarkierten Antikörpern gegen das gesuchte Antigen inkubiert und durchlaufen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl. Die Lichtphotonen, die von den Zellen nach Laserkontakt emittiert und gestreut werden, werden durch verschiedene Filter und Spiegel in die einzelnen Wellenlängen getrennt und von Detektoren in analoge Signale, proportional zur Menge des einfallenden Lichtes, umgewandelt. Diese analogen Signale werden wiederum in digitale Signale bzw. Nummern umgewandelt und sind unter anderem gesammelt in Histogrammen darstellbar.

Als Vorbereitung auf die FACS-Messung wurden die Zellen in speziellen Röhrchen bei 1100rpm für 3 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die entsprechenden Antikörper zu dem Zellpellet zugegeben. Dabei wurden etwa 4µl Antikörper pro $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Nach 15min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, in 0,5ml DPBS resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

4.7 FACS-Panel

Panel 1:

IgG ₁ FITC	IgG ₁ PE
CD3 FITC	CD40L PE

Panel 2:

IgG ₁ FITC
CD40 FITC

Panel 3:

IgG ₁ PE
CD40L PE

Panel 4:

IgG ₁ FITC	IgG ₁ PE
MHC II FITC	CD40L PE

Panel 5:

IgG ₁ FITC	IgG ₁ PE
CD40L FITC	CD40L PE

4.8 Bestimmung des benötigten CD40:CD40L-Verhältnisses

Es wurden NIH3T3 CD40L in unterschiedlichen Verhältnissen mit LP₁0 bzw. LP₁CD40 koinkubiert, nachdem mit Panel 2 und 3 die Expression der Oberflächenantigene auf den NIH3T3- und LP₁-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt wurde. Die Zellen wurden in basal Iscove Medium in einer beschichteten 12-well Platte im Brutschrank koinkubiert.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

Verhältnis NIH3T3 : LP₁0

100:1	10:1	1:1	1:10

Verhältnis NIH3T3 : LP₁CD40

100:1	10:1	1:1	1:10

Nach 18h wurde mit Panel 3 die CD40L-Expression auf den NIH3T3 CD40L durchflußzytometrisch bestimmt.

4.9 Zeitkinetik der CD40L-Herunterregulation

Die Dauer von regulatorischen Vorgängen in der Zelle unterscheiden sich zum Teil erheblich. Um die Zeitdauer der CD40L-Herabregulation besser einschätzen zu können, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Wie üblich wurden bei beiden Zellarten mit Panel 2 bzw. 3 ihre Ausgangsexpression durchflußzytometrisch bestimmt. Die NIH3T3 CD40L wurden im Verhältnis 1:1 mit den LP₁0 bzw. LP₁CD40 in basal Iscove gemischt, in die wells einer beschichteten 12-well Platte gegeben ($1 \cdot 10^6$ Zellen gesamt pro well) und im Brutschrank inkubiert. Zu den definierten Zeitpunkten wurden die Zellen durch Trypsinierung wieder entfernt und durchflußzytometrisch ihre CD40L-Expression durch Panel 3 bestimmt.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

NIH3T3 CD40L + LP₁0

0,5h	1h	1,5h	2,0h
2,5h			

NIH3T3 CD40L + LP₁CD40

0,5h	1h	1,5h	2,0h
2,5h			

4.10 Bestimmung der Interaktionsart

Die Signalübertragung von Zellen untereinander erfolgt *in vivo* und *in vitro* sowohl über kontaktabhängige (z.B. Rezeptor-Ligand) als auch über kontaktunabhängige (z.B. Zytokine) Prozesse. Um zu zeigen, daß für eine Verminderung der CD40L-Expression Zell-Zell-Kontakt benötigt wird, wurden die Zellen in einem Transwell inkubiert. Dabei handelt es sich um ein spezielles well, das durch eine semipermeable Membran (der Porendurchmesser beträgt 0,4µm) in zwei Kompartimente getrennt wird. In das eine Kompartiment gibt man die NIH3T3 CD40L, in das andere die LP₁CD40. Die Zellen befinden sich im selben Medium, es ist aber kein Kontakt, nur ein Austausch von Molekülen kleiner als 0,4µm möglich. Für diesen Versuch wurden NIH3T3 CD40L-, LP₁0- und LP₁CD40 verwendet. Die durchflußzytometrische Statusbestimmung der NIH3T3-Zellen erfolgte durch Panel 3 und der LP₁-Zellen durch Panel 2. Die NIH3T3 CD40L wurden in eine 6-well Platte gegeben (1*10⁶/well, 2ml Medium) und einige Stunden im Brutschrank belassen, bis sie adhären wuchsen. Dann wurden die LP₁0 bzw. LP₁CD40 über ein Transwell zugegeben (1*10⁶ Zellen/well, 1ml Medium) und zusammen mit den NIH3T3 CD40L im Brutschrank inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen wiederum getrennt und mit Panel 2 bzw. Panel 3 die Expression von CD40 bzw. CD40L durchflußzytometrisch bestimmt.

4.11 Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin

Die Expression von CD40L auf naiven T-Zellen kann durch verschiedene Methoden bewirkt werden. Eine Möglichkeit stellt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit einem Antikörper dar. Dabei handelt es sich allerdings um eine relativ aufwendige und teure Methode. Eine wesentlich einfachere und billigere Methode stellt die Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin dar [52]. PMA ist ein Phorbolster, das unter anderem als starker NO-Promotor, Proteinkinase-C-Aktivator, starker Tumor-Promoter bei Mäusen und T-Zell-Aktivator verwendet wird. Das Polyether Antibiotikum Ionomycin wird von *Streptomyces globatus*

produziert, ist in der Lage, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen und führt somit zu einer CD40L-Expression auf T-Zellen [53].

Um die Bedingungen für eine bestmögliche CD40L-Expression auf T-Zellen zu ermitteln, wurde PMA (10ng/ml Zellsuspension) und Ionomycin (1 μ g/ml Zellsuspension) alleine und in Kombination zu den T-Zellen zugegeben.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

	1h	2h	4h	6h	12h	24h	48h
0							
PMA							
Ionomycin							
PMA + Ionomycin							

Nach den definierten Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen, bei 300g abzentrifugiert, und die CD40L-Expression auf der Oberfläche mit Panel 1 gemessen. Für die weiteren Versuche mit LP₁-Zellen wurden die T-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin gewaschen, die CD40L-Expression mit Panel 1 kontrolliert und die restlichen T-Zellen im Verhältnis 1:1 mit LP₁0 bzw. LP₁CD40 für 1h inkubiert. Anschließend wurde die CD40L-Expression durchflußzytometrisch mit Panel 1 bestimmt.

4.12 Trennung von NIH3T3 CD40L- und LP₁-Zellen durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Durch diese Methode können HLA-DR positive LP₁-Zellen von HLA-DR negativen NIH3T3 CD40L getrennt werden. Dadurch können anschließend durchflußzytometrisch die LP₁- und NIH3T3-Zellen alleine gemessen werden und eine CD40L-Blockade durch Zell-Zell-Kontakt ausgeschlossen werden.

Für MACS Separation werden die LP₁-Zellen mit magnetischen HLA-DR MicroBeads markiert und in einer Säule separiert, die sich in einem magnetischen Feld eines MACS-Separators befindet. Die magnetisch markierten HLA-DR positiven LP₁-Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten HLA-DR negativen NIH3T3 CD40L durchlaufen. Für diesen Versuch werden NIH3T3 CD40L und LP₁0 bzw. LP₁CD40 auf ihre Oberflächenexpression mit Panel 3 bzw. 2 gefacst. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 in einer 6-well Platte zusammen über 2h inkubiert (2*10⁶ Zellen pro well), durch Trypsinierung aus der Platte wieder entfernt und auf ihre CD40L-Expression mit

Panel 3 durchflußzytometrisch gemessen. Für die MACS Separation wurden die Zellen (NIH3T3 + LP₁0, NIH3T3 + LP₁CD40) gewaschen, der Überstand abpipettiert und das Pellet in 80µl DPBS resuspendiert. Pro 10⁷ Zellen wurden 20µl MACS HLA-DR MicroBeads zugegeben, gut gemischt und bei 6°-12°C für 15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen, bei 300g für 10 Minuten abzentrifugiert und in 500µl DPBS resuspendiert. Die Separationssäulen wurden in den Vario MACS Separator gegeben, zweimal mit DPBS gespült und die Zellen darüber gegeben. Die negativen Zellen werden in einem Falcon aufgefangen, die Säulen aus dem Separator genommen und die positiven Zellen nach Durchspülen in einem anderen Falcon aufgefangen. Anschließend wurde durchflußzytometrisch auf den LP₁-Zellen die CD40-Expression (Panel 2) und auf den NIH3T3-Zellen die CD40L-Expression (Panel 3) gemessen.

4.13 Ablösung von löslichem CD40 mit einer milden Säure (Säurewash)

Um möglichen löslichen CD40 (sCD40), der von LP₁CD40 abgespalten wurde und an CD40L bindet, von den NIH3T3 CD40L zu waschen, wurden die Zellen nach 24h Koinkubation von NIH3T3 CD40L + LP₁0 bzw. CD40 mit einer milden Säure (pH 4,1) für 2 Minuten gewaschen. Die Säure wurde aus DPBS hergestellt, das so lange mit HCl titriert wurde, bis ein pH von 4,1 erreicht wurde. Vor und nach der Inkubation und nach dem Säurewash wurden die Zellen mit Panel 2 und 3 auf die Oberflächenexpression von CD40L und CD40 durchflußzytometrisch gemessen

4.14 Inkubation mit Matrixmetalloproteinaseinhibitor KB8301

Um die mögliche Abspaltung von CD40L auf NIH3T3 CD40L durch Matrixmetalloproteinasen nachzuweisen, wurden die NIH3T3- und LP₁-Zellen zusammen mit dem Matrixmetalloproteinaseinhibitor KB8301 inkubiert, der die Abspaltung von FasL, der wie CD40L zur selben Proteinfamilie gehört, auf T-Zellen verhindert [54]. Vor Versuchsbeginn wurde durch Panel 3 der Status der NIH3T3 CD40L durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden alleine, mit 2µl DMSO oder 2µl KB8301 in DMSO gelöst in einer 6-well Platte inkubiert (1*10⁶ Zellen/well). Nach 24h wurden die Zellen durch Trypsinierung wieder entfernt, ihre CD40L-Expression durchflußzytometrisch durch Panel 3 bestimmt und mit LP₁0 bzw. LP₁CD40 im Verhältnis 1:1 in einer 6-well Platte für 1h koinkubiert. Anschließend wurde durch Panel 3 durchflußzytometrisch die CD40L-Expression gemessen.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

NIH3T3 CD40L + LP ₁ 0	NIH3T3 CD40L + LP ₁ 0 + DMSO	NIH3T3 CD40L + LP ₁ 0 + KB8301
NIH3T3 CD40L + LP ₁ CD40	NIH3T3 CD40L + LP ₁ CD40 + DMSO	NIH3T3 CD40L + LP ₁ CD40 + KB8301

4.15 ELISA der Überstände

Bei einem ELISA (enzyme-linked immuno assay) handelt es sich um einen sogenannten heterogenen Enzym-Immunoassay, bei dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper an eine Trägersubstanz (z.B. Zellulose, Polystyrol) gebunden vorliegen. An die nach Inkubation mit der Probe gebildeten Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugefügte Enzym-markierte Anti-Antikörper an (sog. Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden. Um eine quantitative Messung von löslichem CD40L im Überstand durchführen zu können, wurde ein kommerzieller sCD40L-ELISA der Firma Bender MedSystems verwendet. Die Durchführung fand gemäß des Herstellerprotokolles statt.

4.16 Intrazelluläre FACS-Messung

Eine Möglichkeit des intrazellulären Nachweises besteht in der Behandlung der Zellen nach Inkubation mit FIX + PERM[®] der Firma An der Grub. Bei diesem Verfahren ist es möglich, parallel CD40L auf und in der Zelle zu messen. Für die Messung der CD40L-Expression auf der Zelloberfläche wurde ein FITC markierter CD40L Antikörper verwendet, für die intrazelluläre CD40L Messung ein PE markierter CD40L Antikörper. Die Durchführung fand gemäß des Herstellerprotokolles statt, die CD40L-Expression wurde mit Panel 5 gemessen.

4.17 Lyse der Zellen

4.17.1 Allgemeines zur Lyse der Zellen

Die Zusammensetzung des Lysispuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung, und sollten je nach Fragestellung immer optimiert werden. Will

man beispielsweise Protein-Protein Interaktionen nachweisen, kann ein milderer Lysispuffer von Vorteil sein, dabei muß man jedoch immer den Nachteil der geringeren Stringenz in Kauf nehmen. Unter stringenteren Bedingungen werden zwar Membranproteine besser löslich gemacht, aber assoziierte Proteine lösen sich eventuell voneinander. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysispuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. Digitonin ist ein sehr mildes Detergens, auch Brij 97 und CHAPS können von Vorteil sein falls nach Assoziationen gesucht wird; NP40 ist dagegen ein etwas stärkeres Detergens, kann aber in geringeren Konzentrationen verwendet werden und macht auch Membranproteine gut löslich. Die Funktionen der anderen Komponenten sind: Glycerin → Gefrierschutz, EDTA → Komplexierung von Mg^{2+} und Mn^{2+} und damit Inhibierung von Kinasen, Natriumfluorid → Serin -und Threonin-Phosphataseinhibitor, Phenylphosphat → Phosphataseinhibitor, NaCl → Osmolarität und Tris-Cl → pH-Puffer. Die zusätzliche Zugabe von adäquaten Inhibitoren ist absolut zwingend notwendig. Abschließend ist zu sagen, daß alle Zellysate auf Eis gehalten werden müssen, um Proteine und Proteinkomplexe zu schützen (Proteolyse, Dissoziation).

4.17.2 Herstellung des Zellysates

Das Zellpellet wurde zweimal mit DPBS gewaschen und bei 200g 5 Minuten abzentrifugiert. Nachdem das Pellet getrocknet worden war, wurde die entsprechende Menge Lysepuffer zugegeben und die Mischung 20 Minuten bei 4°C auf dem Rollinkubator mit 6rpm inkubiert. Die zugegebene Menge des eisgekühlten Lysispuffers war genau so bemessen, daß jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10µl Puffer lysiert wurden. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 15min bei 4°C und 14000rpm von unlöslichen Anteilen wie, größeren Membranteilen und nukleären Bestandteilen getrennt. In dem klaren Lysat sollten sich jetzt nur noch die zytosolischen und membranären Zellproteine befinden. Anschließend wurden die Lysate weiterverwendet oder bei -20°C aliquotiert eingefroren.

4.17.3 Proteinassay der Zellysate

Pro Probe wurden 0.2 ml Biorad-Proteinassay 1:5 mit dH₂O verdünnt. In jede Meßküvette wurden 18µl dH₂O und 2µl Lysat zugegeben, als Leerwert wurde 2µl Lysepuffer verwendet. Anschließend wurden je 1ml verdünntes Biorad-Proteinassay zupipettiert und der Extinktionswert im Photometer bei 595 nm gemessen.

Die Konzentration der Protein wurde mit folgender Formel berechnet:

Extinktionswert * 10 = Konzentration Protein µg/µl

4.18 SDS-PAGE und Westernblot

4.18.1 Allgemeines zur SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht d.h. durch Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einer konstanten Rate (1SDS/2AS) so an Proteine, daß die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird. Zusätzlich wurde die Technik der *disc*-Elektrophorese (*discontinuous* pH) angewandt. Hierbei wird mit zwei unterschiedlichen Gelen bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgt ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hat zur Folge, daß die Banden schärfer begrenzt sind und besser aufgetrennt werden. Der Laufpuffer enthält Glycin, das bei pH 8,3 im Gleichgewicht mit Glycinat vorliegt. Beim Einschalten des Stroms wandern die Laufpufferionen in das Sammelgel ein, wo ein pH von 6,8 vorliegt. Daraus folgt, daß Glycin quantitativ in die Zwitterionenform übergeht und so solange immobilisiert wird bis der pH-Wert durch den Laufpuffer wieder angehoben wird. Durch diese Immobilisierung entsteht ein Ladungsträgerdefizit und somit ein hoher Widerstand, der nach $E = I * R$ durch ein starkes lokales elektrisches Feld E ausgeglichen wird. In diesem Feld werden die durch SDS anionischen Proteine beschleunigt. Da das Sammelgel wesentlich großporiger als das Trenngel ist, laufen die Proteine an der Grenzschicht auf und werden dann im Trenngel bei pH 8,8 sauberer aufgetrennt.

4.18.2 Herstellen der Polyacrylamidgele

4.18.2.1 Trenngel

Zwei Glasplatten (für 20 x 20cm große Gele) wurden mit 70% Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen in dem Gelständer fixiert. Der Boden wurde dabei durch einen Dichtungsgummi und zusätzlich einem Parafilm[®]-Streifen abgedichtet. Das Trenngel wurde blasenfrei angemischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagrecht gehaltenen Glasplatten laufen gelassen. Der Zwischenraum wurde bis etwa 4cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf dieselbe Weise mit etwas Wasser überschichtet und für etwa 4h oder auch über Nacht im Kühlraum zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

4.18.2.2 Sammelgel

Die Wasserschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgegossen. Nach zweimaligen Ausspülen mit Sammelgel wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt. Dann wurde ein vorher mit 70% Ethanol gereinigter Kamm (10 oder 15 Zähne) so eingesteckt, daß keine Blasen entstanden. Nach etwa 30min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt.

4.18.2.3 Laden und Starten des Gels

60µl der Lysate wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5min auf 100°C erhitzt. Die Marker wurden 1:1 mit dH₂O und 2x Probenpuffer verdünnt. Es wurden 100µl der Proben bzw. 90µl der Low-Range-Marker geladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei 4°C im Kühlraum statt. Nachdem beide Kammern der Elektrophoresebox mit 5x Elektrophoresepuffer gefüllt waren, wurde der Strom eingeschaltet. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 120-150V und 9-13mA.

4.18.2.4 Transfer (Westernblot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine werden diese zur weiteren Handhabung auf eine PVDF-Membran transferiert. Dabei macht man sich wiederum die Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld zu Nutze. Wenn die blaue Farbmarker-Bande in etwa 2-0,5cm vom unteren Rand der Glasplatten entfernt war, wurden diese entfernt. Mit einem Skalpell wurden die Teile des Gels, in denen keine Proteine mehr sind (Sammelgel, Ränder), abgeschnitten. Dann wurde das Gel in eine Transferkassette überführt. Dazu wurde zunächst eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Methanol geschwenkt mit dH₂O gespült und 10min in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden 2 Schwämme und 4 Whatman 3MM-Papierstücke der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. In der Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei (ausrollen mit Pipette) aufeinandergelegt: Schwamm, 2x Whatman, Gel, PVDF-Membran, 2x Whatman, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, daß die Membran auf der Seite der Anode (⊕) war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4°C (Kühlraum) und 200V/450mA.

4.18.2.5 Blocken der Membran

Da Antikörper auch unspezifisch an Kunststoffe binden können, ist es notwendig alle Stellen der Membran an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem „inerten“ Protein zu blockieren. Nach 4h Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei RT für 1h in einer Plastikschiene mit Blocking-Solution geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1x TBS gespült und zweimal für 10min in 1x TBS geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution wegzuwaschen.

4.18.2.6 Antikörper-Inkubation

Die meisten der verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung benutzt, wobei immer 25ml der Antikörperlösungen eingesetzt wurden. Die sekundären Antikörper wurden in 1:3000 Verdünnungen (20ml) eingesetzt. Die Membran wurde über Nacht bei leichtem Schütteln mit 25ml der primären Antikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran mit 1x TBS einmal gespült und dreimal für 10min auf dem Schüttler gewaschen. Die Inkubation und das Waschen der sekundären Antikörper erfolgten analog zum primären Antikörper, jedoch betrug die Inkubationszeit nur eine Stunde.

4.18.2.7 Entwicklung der Blots

Die Detektion bei Western Blots beruht auf dem Einsatz von sekundären Antikörpern, die mit Enzymen gekoppelt sind und dadurch Substrate so umsetzen können, daß ein Farbstoff entsteht, oder Licht emittiert wird. Die sekundären Antikörper sind Anti-Spezies spezifisch und können so an die Fc-Teile der Antigen spezifischen primären Antikörper binden. Die ECL-Lösungen wurden 1:1 gemischt (7+7ml für eine etwa 14x14cm große Membran). In der Dunkelkammer wurde die Membran mit einem Papiertuch gut getrocknet und in einer eigenen Plastikschiene mit der Detektionslösung übergossen, dabei wurde darauf geachtet, daß die Membran komplett bedeckt war. Nach genau einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und auf ein mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt (Proteinseite nach oben!). Das Ganze wurde mit einer Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für 2-60 Sekunden mit einem speziellen Detektions-Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Folienstift übertragen.

4.19 ELISA der Zellysate

Mit dem schon vorher erwähnten ELISA wurde die CD40L-Konzentration in den Zellysaten bestimmt. Vor der Herstellung der Lysate wurden die Zellen wieder alleine bzw. zusammen inkubiert. Für jeweils 500µl Lysat wurden $5,5 \cdot 10^6$ Zellen gesamt eingesetzt. 100µl Lysat wurden mit 100µl Sample Buffer vermischt.

4.20 Koinkubation mit Endozytoseinhibitoren

Eine erfolgreiche Inhibition der CD40L-Herabregulation auf T-Zellen durch den Endozytosehemmer Cytochalasin B wurde bereits mehrfach beschrieben [35, 55]. Dabei handelt es sich um ein Pilzmetabolit, das die Polymerisation von Actin und somit Endozytose inhibiert [56-62]. Zusätzlich verwendeten wir Brefeldin A, ebenso einen Pilzmetabolit, der intrazelluläre Transportprozesse hemmt [63]. Die Zellen (NIH3T3 CD40L oder mit PMA und Ionomycin stimulierte T-Zellen) wurden für 1h mit Cytochalasin B und Brefeldin A stimuliert. Die Grundkonzentrationen betragen bei Cytochalasin B 10µM/ml und bei Brefeldin A 10µg/ml.

Bei den Titrationsversuchen mit diesen Substanzen wurde die zwei- fünf- und zehnfache Konzentration verwendet.

Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit 300g abzentrifugiert, bei einem Teil mit Panel 1 (T-Zellen) bzw. 3 (NIH3T3 CD40L) die CD40L-Expression durchflußzytometrisch gemessen und die restlichen Zellen mit den LP₁-Zellen zusammen inkubiert.

Nach 1h wurde wiederum die CD40L-Expression auf den Zellen bestimmt.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Herabregulation von CD40L

Mit der folgenden Versuchsreihe sollte die Abhängigkeit und Kinetik der CD40L-Herabregulation ermittelt werden. Dafür wurden als Modellsystem mit CD40L transfizierte NIH3T3- und mit CD40 transfizierte und nicht transfizierte LP₁-Zellen verwendet. Außerdem sollte ermittelt werden, auf welche Art und Weise CD40L herunterreguliert wird bzw. warum er nach CD40 Kontakt durchflußzytometrisch nicht mehr nachweisbar ist.

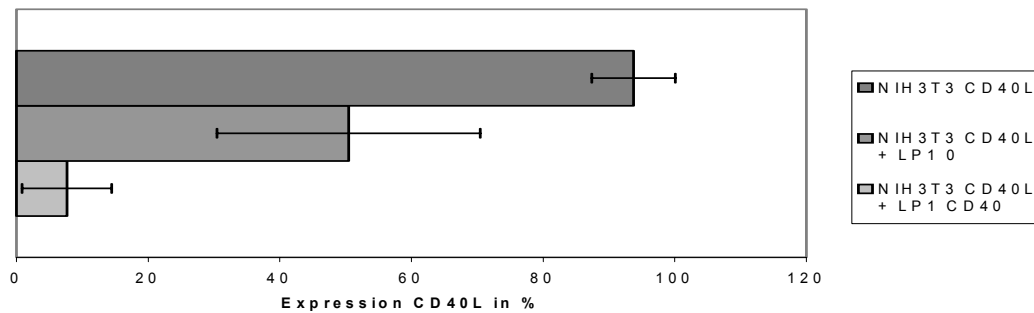
5.1.1 Untersuchung der CD40L-Kinetik auf NIH3T3 CD40L

5.1.1.1 CD40L-Herabregulation auf NIH3T3 CD40L nach Koinkubation mit LP₁-Zellen

Die Untersuchung von zellkinetischen Vorgängen in einem artefiziellen System stellt immer eine gewissen Schwierigkeit dar. Als erstes ist es wichtig herauszufinden, ob der Vorgang, den man in diesem System untersuchen möchte, überhaupt auch dort funktioniert. Um zeigen zu können, daß CD40L auf transfizierten Zellen nach CD40 Kontakt herabreguliert wird, inkubierten wir NIH3T3 CD40L mit LP₁0 und LP₁CD40. Es wurden insgesamt 18 Messungen durchgeführt, die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, die Koinkubationszeit dauerte zwischen 60 Minuten und 27 Stunden an. Die durchschnittliche CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L vor Koinkubation betrug 93,7% (Standardabweichung = 6,37), nach Koinkubation mit LP₁0 50,5% (Standardabweichung = 20,00) und mit LP₁CD40 7,6% (Standardabweichung = 6,81). Die Messung der CD40L-Expression nach Koinkubation erfolgte ohne Entfernung der LP₁-Zellen aus der Probe, womit sich die relative CD40L-Verminderung bei NIH3T3 CD40L + LP₁0 erklären läßt.

Die Koinkubation von NIH3T3 CD40L mit LP₁CD40 führt zu einer deutlichen Herabregulation von CD40L im Vergleich zu einer Koinkubation mit nicht transfizierten LP₁0, bei der sich die CD40L-Expression nicht verändert (Abbildung 5.1)

Abbildung 5.1: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L vor und nach Inkubation mit LP₁0 bzw. LP₁CD40

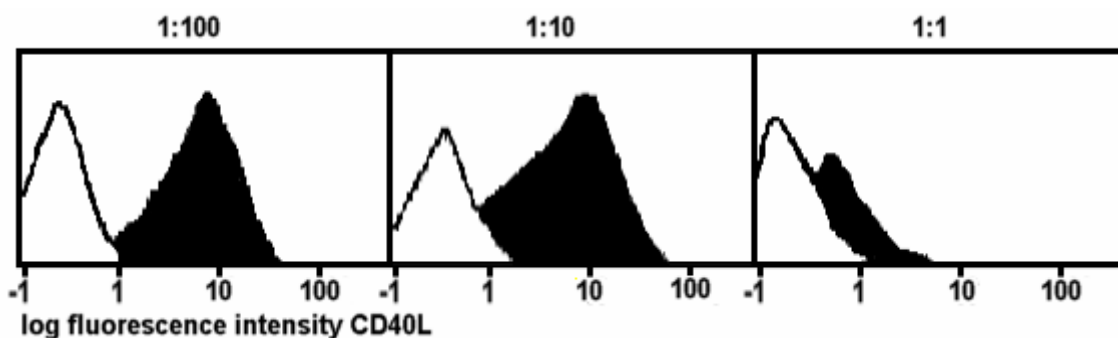


Nach Koinkubation mit LP₁CD40 kommt es zu einer deutlichen Herabregulation von CD40L im Vergleich zu Koinkubation mit LP₁0; dargestellt ist der durchschnittliche Wert mit Standardabweichung von 18 Messungen

5.1.1.2 Bestimmung des benötigten CD40:CD40L-Verhältnisses

Eine Herabregulation von Oberflächenantigenen auf Zellen kann nur suffizient ablaufen, wenn eine ausreichende Menge des auslösenden Agens zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall kommt es nicht zur gewünschten Reaktion. Um das für eine vollständige Herabregulation von CD40L benötigte Verhältnis von NIH3T3 CD40L zu LP₁CD40 zu bestimmen, inkubierten wir die Zellen in den Verhältnissen 100:1, 10:1 und 1:1 miteinander. Die anschließende FACS-Messung zeigt eine deutliche CD40L-Verminderung erst ab einem Verhältnis der Zellen zueinander von 1:1. Bei einem geringeren Anteil von LP₁CD40 (10:1, 100:1) kommt es zu keiner Verminderung der CD40L-Expression auf den NIH3T3 CD40L (Abbildung 5.2). Aus diesem Grund verwendeten wir für die weiteren Versuche ein Zellverhältnis von 1:1.

Abbildung 5.2: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L nach Koinkubation mit LP₁CD40 in unterschiedlichen Verhältnissen

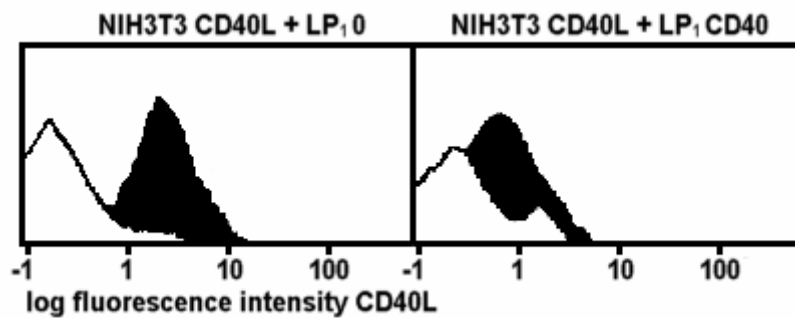


Erst ab einem Verhältnis der NIH3T3 CD40L zu LP₁CD40 von 1:1 kommt es zu einer vollständigen CD40L Herabregulation. Ein geringerer Anteil von LP₁CD40 führt zu keiner CD40L Verminderung.

5.1.1.3 Zeitkinetik der CD40L-Herabregulation

Die Dauer von regulatorischen Vorgängen in der Zelle unterscheiden sich zum Teil erheblich. Um die Dauer der CD40L-Herabregulation besser einschätzen zu können, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Bereits nach 30-60 Minuten zeigte sich eine deutliche Verminderung der CD40L-Expression, wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist.

Abbildung 5.3: CD40L Expression auf NIH3T3 CD40L nach 30-minütiger Koinkubation mit LP₁0 bzw. LP₁CD40

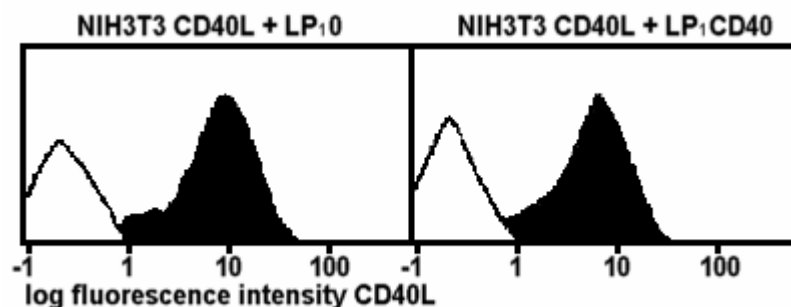


Schon nach einer Koinkubationszeit von 30 Minuten der NIH3T3 CD40L mit LP₁CD40 kommt es zu einer deutlichen CD40L-Herabregulation (rechts), nicht aber nach Koinkubation mit LP₁0 (links)

5.1.1.4 Bestimmung der Interaktionsart

Die Signalübertragung von Zellen untereinander erfolgt in vivo und in vitro sowohl über kontaktabhängige (z.B. Rezeptor-Ligand) als auch kontakunabhängige (z.B. Zytokine) Prozesse. Um zu zeigen, daß für eine Verminderung der CD40L-Expression Zell-Zell-Kontakt benötigt wird, wurden die Zellen in einer Transwell Platte inkubiert. Nach 24 Stunden zeigt sich bei Inkubation der NIH3T3 CD40L sowohl mit LP₁0 als auch mit LP₁CD40 keine CD40L-Expressionsverminderung (siehe Abbildung 5.4)

Abbildung 5.4: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L nach Koinkubation mit LP₁0 bzw. LP₁CD40 in einer Transwell Platte



Koinkubation der Zellen in einer Transwell Platte führt zu keiner CD40L-Herabregulation

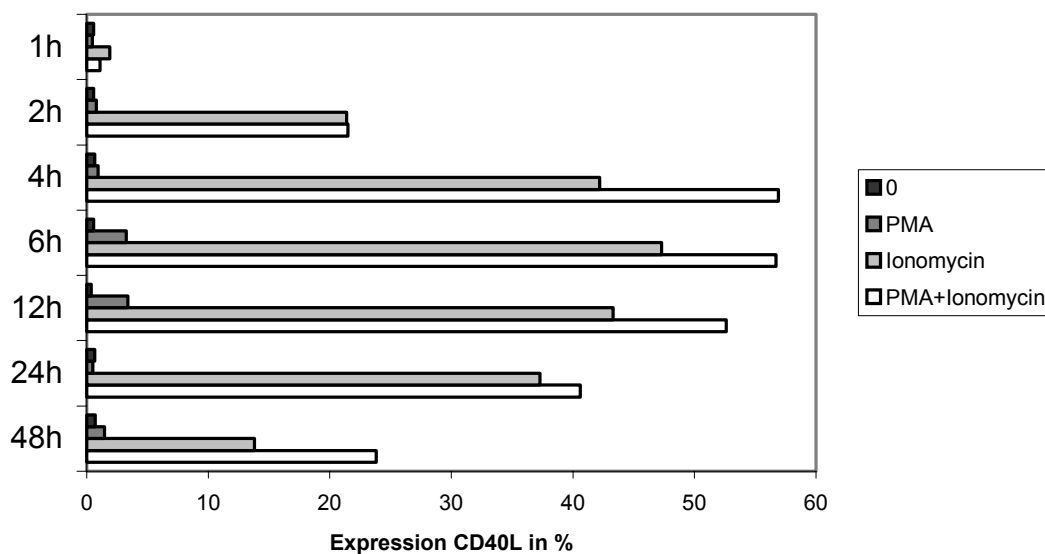
5.1.2 Untersuchung der CD40L-Kinetik auf T-Zellen

5.1.2.1 Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin

Bei CD40L-Expression auf T-Zellen handelt es sich im Gegensatz zur konstitutiven Expression auf NIH3T3 CD40L um einen transienten Vorgang. Normalerweise regulieren T-Zellen CD40L nur nach T-Zell-Rezeptor (TZR) Aktivierung herauf, allerdings läßt sich eine transiente CD40L-Expression auf T-Zellen auch durch die Zugabe von PMA und Ionomycin hervorrufen. Um die Bedingungen für eine bestmögliche CD40L-Expression zu ermitteln, wurde PMA (10ng/ml Zellsuspension) und Ionomycin (1µg/ml Zellsuspension) alleine und in Kombination zu den T-Zellen zugegeben und die CD40L-Expression nach definierten Zeitpunkten durchflußzytometrisch bestimmt.

Die gleichzeitige Gabe beider Substanzen zeigt die höchste CD40L-Aufregulation, das Maximum der CD40L-Expression findet sich bei 4-6h, nach 24h kommt es langsam wieder zu einer Expressionsverminderung (Abbildung 5.5).

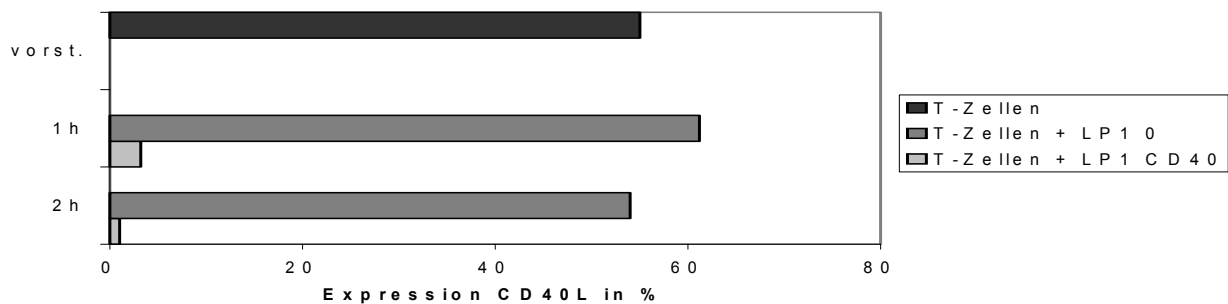
Abbildung 5.5: CD40L-Expression zu definierten Zeitpunkten auf T-Zellen mit und ohne Zugabe von PMA und Ionomycin



Eine gleichzeitige Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin führt zur höchsten CD40L-Expression

Um zu zeigen, daß CD40L auch auf T-Zellen, die vorher mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, durch Koinkubation mit LP₁CD40 herabreguliert wird, inkubierten wir aktivierte T-Zellen mit LP₁0 bzw. LP₁CD40. Bereits nach 1 Stunde führten LP₁CD40, nicht aber LP₁0, bei den T-Zellen zu einer deutlichen Herabregulation von CD40L (Abbildung 5.6).

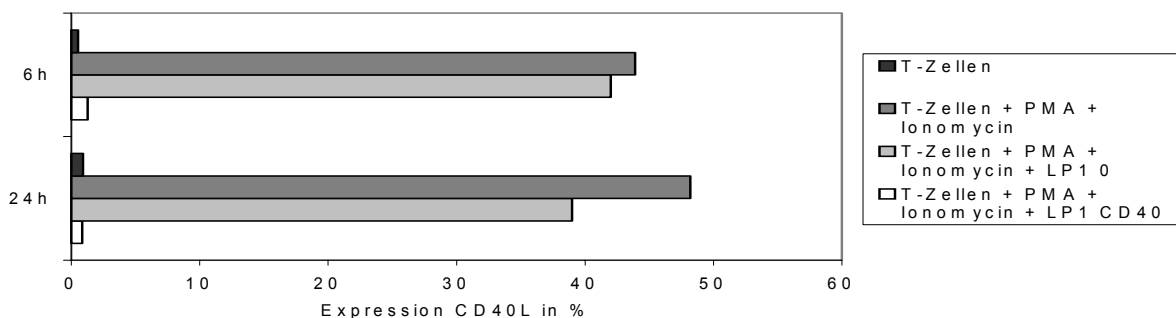
Abbildung 5.6: CD40L-Expression auf aktivierten T-Zellen nach Zugabe von LP₁0 bzw. LP₁CD40



Koinkubation von mit PMA und Ionomycin vorbehandelten T-Zellen mit LP₁CD40 führt zu einer raschen CD40L-Herabregulation, nicht aber Koinkubation mit LP₁0

Eine gleichzeitige T-Zell-Stimulation mit PMA/Ionomycin und LP₁0 bzw. LP₁CD40 zeigt eine Aufregulation von CD40L bei Zugabe von LP₁0, nicht aber bei LP₁CD40 (Abbildung 5.7).

Abbildung 5.7: CD40L-Expression auf T-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA/Ionomycin und LP₁0 bzw. LP₁CD40.



Gleichzeitige Inkubation von T-Zellen mit PMA/Ionomycin und LP₁0 führt zu einer CD40L-Expression, nicht aber mit LP₁CD40

5.2 Untersuchungen zur Art der Herabregulation von CD40L

Mit den nachfolgenden Versuchen wollten wir den Weg der CD40L-Herabregulation untersuchen. Wir stellten folgende Hypothesen auf, die den fehlenden Nachweis von CD40L begründen könnten:

Fehlender Nachweis von CD40L durch:

Haftung von LP₁CD40 an NIH3T3 CD40L

sCD40

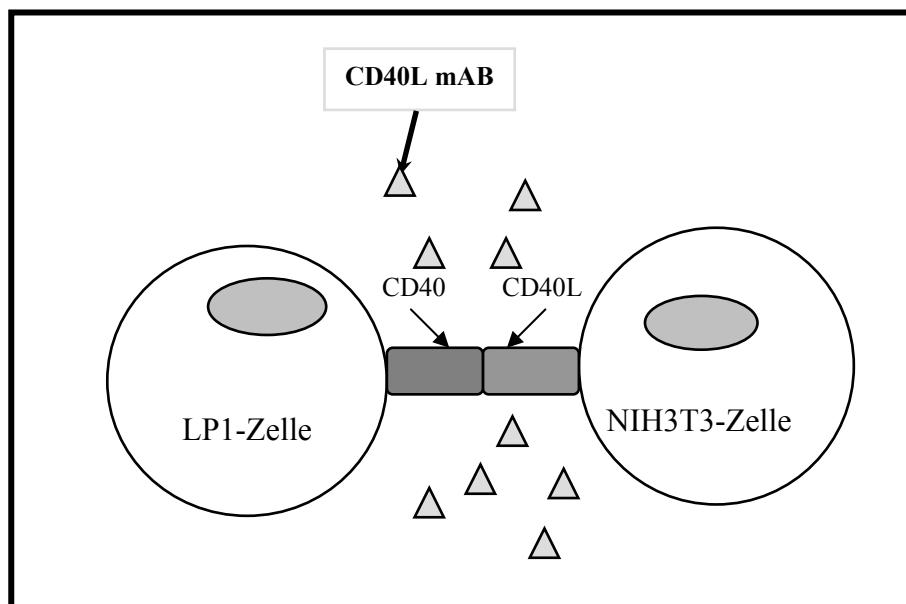
Abspaltung von sCD40L

Endozytose

5.2.1 Fehlender Nachweis von CD40L durch Haftung von LP₁CD40 an NIH3T3 CD40L

Eine Möglichkeit des fehlenden Nachweises von CD40L nach Kontakt mit LP₁CD40 ist eine Adhärenz der NIH3T3 CD40L- und LP₁CD40. Durch Bindung von CD40 an CD40L könnte der anti-CD40L-Antikörper nicht an CD40L binden und CD40L wäre somit durchflußzytometrisch nicht nachweisbar (Abbildung 5.8)

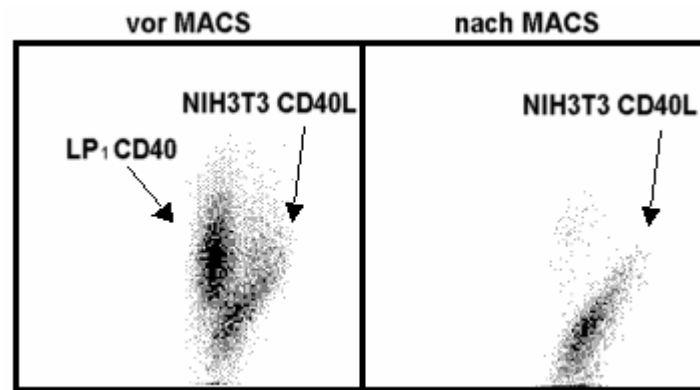
Abbildung 5.8: Fehlender Nachweis von CD40L durch Zell-Zell-Kontakt (schematische Zeichnung)



5.2.1.1 Separation der Zellen durch MACS

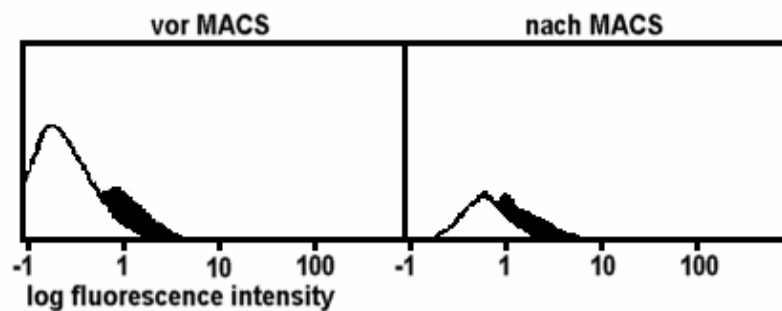
Um eine Blockade durch Zell-Zell-Kontakt auszuschließen, müssen die Zellen getrennt und anschließend die CD40L-Expression bestimmt werden. Nach Koinkubation und CD40L-Bestimmung wurden die Zellen durch MACS-Separation voneinander getrennt. Die nachfolgende FACS-Messung bestätigt die vollständige Trennung der NIH3T3 CD40L von den LP₁CD40 (Abbildung 5.9) und zeigt weiterhin eine verminderte CD40L-Expression, wie in Abbildung 5.10 zu sehen ist.

Abbildung 5.9: NIH3T3 CD40L alleine und NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 vor und nach MACS-Separation



Durch die MACS-Separation gelingt eine fast vollständige Trennung von NIH3T3 CD40L und LP₁CD40

Abbildung 5.10: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L vor und nach MACS-Separation

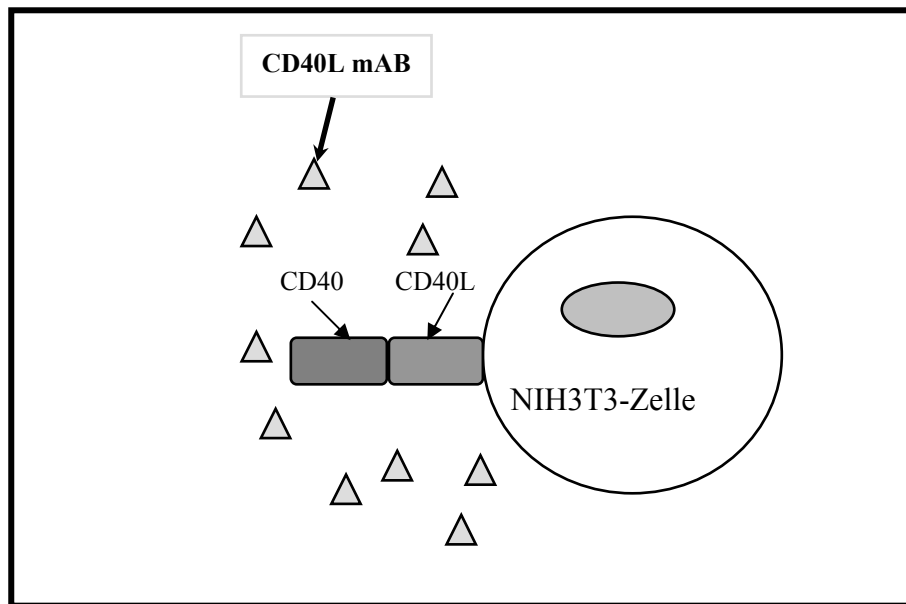


Auch nach der Trennung der NIH3T3 CD40L von den LP₁CD40 ist CD40L weiterhin nicht nachweisbar

5.2.2 Fehlender Nachweis von CD40L durch Bindung von löslichem CD40 (sCD40)

Eine Verminderung der CD40L-Expression könnte auch durch eine Abspaltung mit nachfolgender Bindung von CD40 an CD40L sein. Dadurch wäre eine Bindung des anti-CD40L-AK und eine durchflußzytometrische Darstellung von CD40L nicht möglich (Abbildung 5.11).

Abbildung 5.11: Fehlender Nachweis von CD40L durch Bindung von sCD40 (schematische Zeichnung)

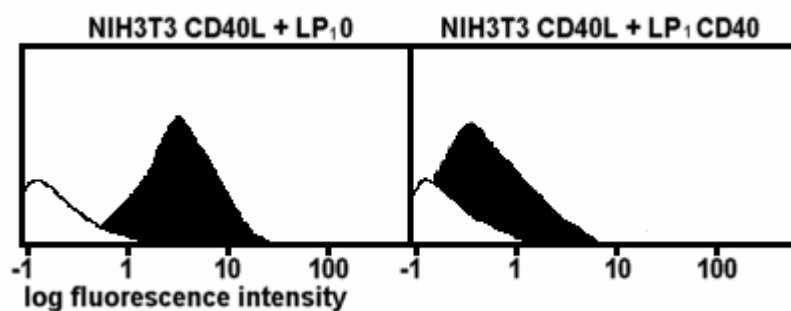


5.2.2.1 Nachweis von sCD40 durch Waschen mit einer milden Säure

Eine Möglichkeit, potentiellen sCD40 wieder von CD40L zu entfernen besteht darin, die Zellen mit einer milden Säure (PBS, pH 4,1) zu waschen. Dadurch würde sich CD40 wieder von CD40L lösen und ein durchflußzytometrischer Nachweis wäre möglich.

Nach Koinkubation wuschen wir die Zellen für 3 Minuten mit der milden Säure. Nach anschließender Abzentrifugation und Inkubation mit dem FACS-Antikörper zeigt sich durchflußzytometrisch weiterhin eine geringere CD40L-Expression bei Inkubation mit LP₁CD40 (19,3%) als mit LP₁0 (75,3%), wie in Abbildung 5.12 zu sehen ist.

Abbildung 5.12: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L nach Inkubation mit LP₁0 oder LP₁CD40 und Waschen mit einer milden Säure (PBS, pH 4,1)

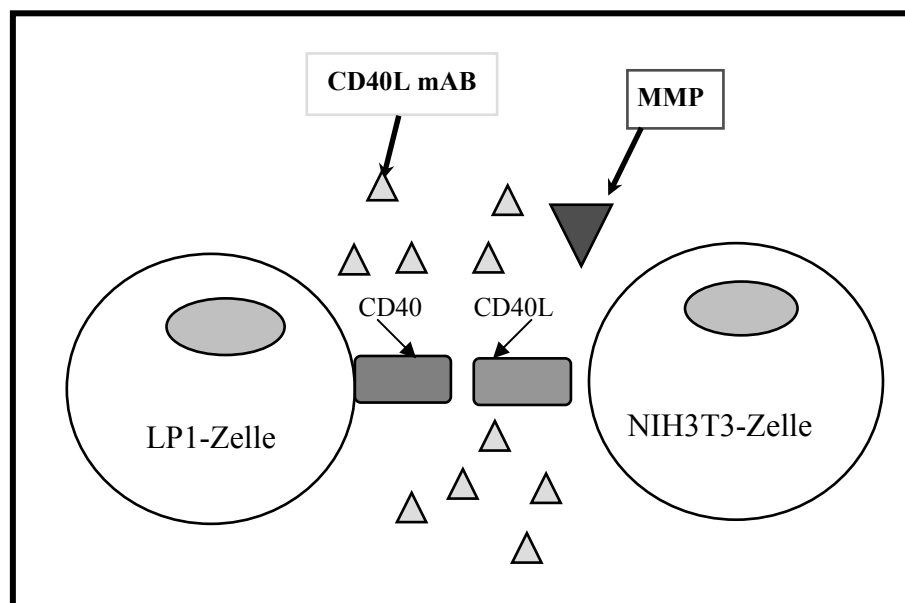


Auch nach Waschen mit einer milden Säure besteht weiterhin eine Verminderung der CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L

5.2.3 Fehlender Nachweis von CD40L durch Abspaltung von sCD40L

Fas-L und TNF α , die wie auch CD40L zur TNF-Familie gehören, werden auf Zellen als Transmembranproteine synthetisiert und proteolytisch durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) abgespalten [64-66]. Bei diesen handelt es sich um Zinkenzyme, die von Zellen auf bestimmte Signale hin sezerniert werden. Sie spielen eine große Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Arthritis, Parodontose, Osteoporose und einiger Tumoren. T-Zellen exprimieren Stromelysin-2, ein Mitglied der MMP-Familie, nach Stimulation mit Proteinkinase C oder Calcium Ionophore. Eine durch CD40 modulierte Produktion von MMP auf Fibroblasten [67], Endothelzellen [68] und Monozyten [69] wurde ebenfalls beschrieben. Eine dritte Möglichkeit des fehlenden CD40L-Nachweises könnte somit auch in einer CD40L-Abspaltung von der Zelloberfläche nach CD40 Kontakt durch MMP liegen (Abbildung 5.13). Der lösliche CD40L (sCD40L) könnte dann im Überstand nachweisbar sein.

Abbildung 5.13: Fehlender Nachweis von CD40L durch Abspaltung von der Zelloberfläche (schematische Zeichnung)

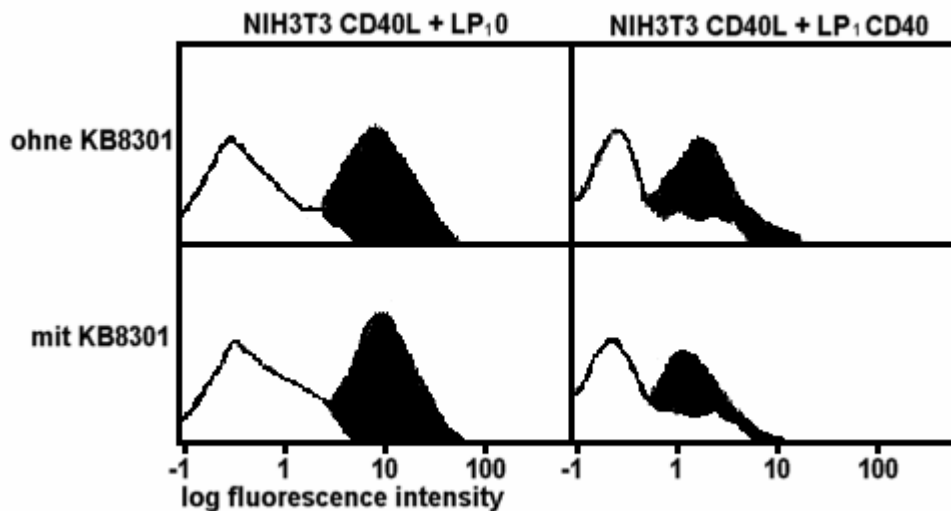


5.2.3.1 Inhibition von Matrixmetalloproteinasen

Um eine mögliche Abspaltung von CD40L durch Matrixmetalloproteinasen zu zeigen, inkubierten wir die Zellen mit und ohne Zugabe des Metalloproteinaseinhibitors KB8301. Dabei wurden die NIH3T3 CD40L für 24h mit dem Inhibitor alleine und nach einem Mediumwechsel für etwa 60 Minuten mit den LP₁0 bzw. LP₁CD40 zusammen inkubiert. Vorversuche zeigten keinen Einfluß von KB8301 auf NIH3T3 CD40L alleine. Trotz

Inkubation mit dem Inhibitor kam es auch weiterhin zu einer deutlichen CD40L Verminderung nach Inkubation mit LP₁CD40 (2,88%) im Vergleich zur Inkubation mit LP₁0 (74,8%) (Abbildung 5.14).

Abbildung 5.14: CD40L-Expression ohne und mit Proteinaseinhibitor (KB8301)



Koinkubation von NIH3T3 CD40L und LP₁CD40 mit KB8301 führt zu keiner Hemmung der CD40L-Herabregulation

5.2.3.2 ELISA der Zellüberstände

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von löslichem CD40L bietet ein ELISA. Wir entschieden uns für die Verwendung eines ELISA für sCD40L, der von der Firma Bender MedSystems kommerziell angeboten wird.

Wir verwendeten Überstände mit genau definierten Zellzahlen:

NIH3T3 mock ($1 \cdot 10^6$ /ml)

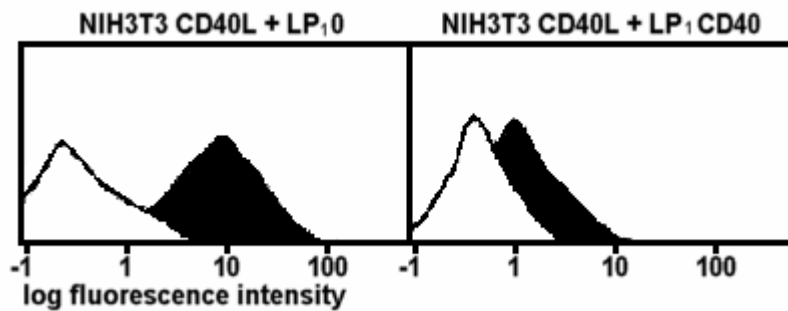
NIH3T3 CD40L ($1 \cdot 10^6$ /ml)

NIH3T3 CD40L + LP₁0 (gesamt $2 \cdot 10^6$ /ml)

NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 (gesamt $2 \cdot 10^6$ /ml).

Die Zellen wurden für 24h inkubiert, auf ihre CD40L-Expression gefacst (Abbildung 5.15) und der Überstand für den ELISA verwendet.

Abbildung 5.15: CD40L-Expression auf NIH3T3 CD40L nach Inkubation mit LP₁-Zellen

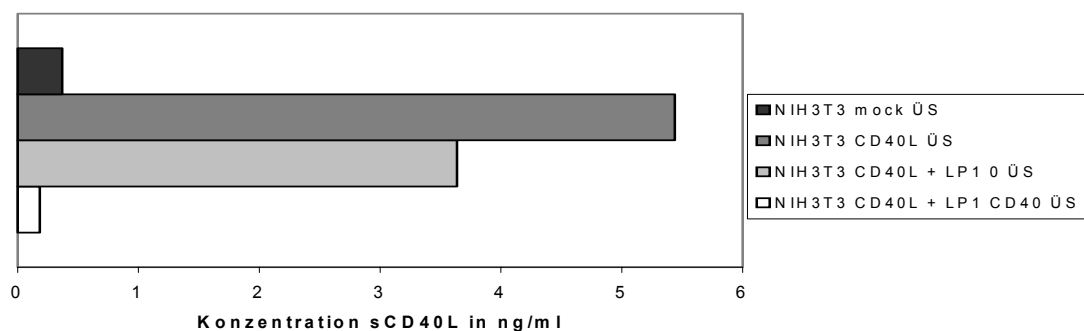


Nach Koinkubation mit LP₁CD40 zeigt sich eine deutliche Verminderung der CD40L-Expression

Für den ELISA vermischten wir jeweils 80µl Überstand mit 120µl Sample Buffer. Der ELISA wurde nach den Empfehlungen der vertreibenden Firma durchgeführt.

Die höchste Konzentration von sCD40L im Überstand fand sich bei NIH3T3 CD40L alleine (5,439 ng/ml) gefolgt von NIH3T3 CD40L + LP₁0 (4,286 ng/ml) (Abbildung 5.16). NIH3T3 mock und NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 zeigten sehr niedrige Konzentrationen von 0,661 bzw. 1,053 ng/ml

Abbildung 5.16: Im Überstand gemessene Konzentrationen von sCD40L

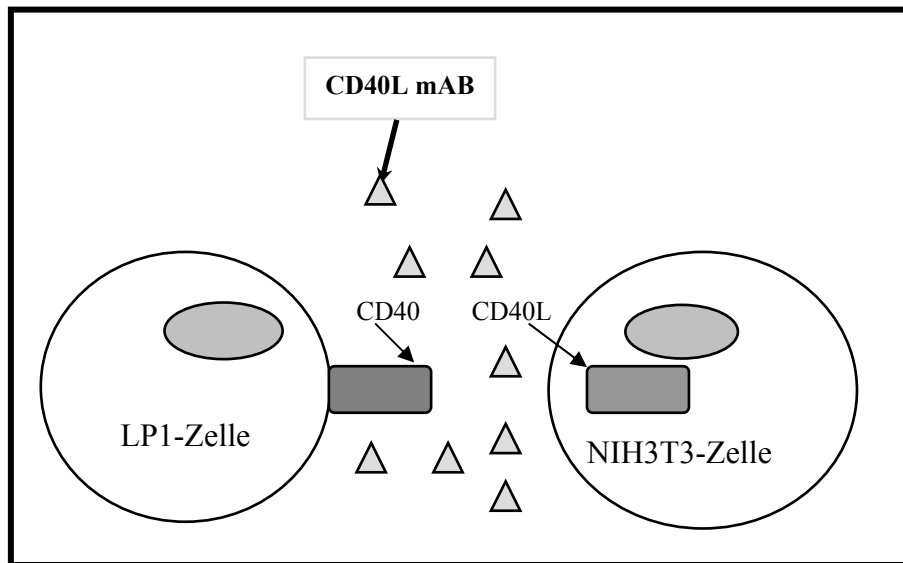


sCD40L kann sowohl in den Überständen von NIH3T3 CD40L alleine als auch nach Inkubation mit LP₁0 nachgewiesen werden, nicht aber nach Koinkubation mit LP₁CD40

5.2.4 Fehlender Nachweis von CD40L durch Endozytose

Die Herabregulation vieler Oberflächenmoleküle erfolgt durch Endozytose nach Ligandkontakt, dies stellt auch eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von CD40L dar.

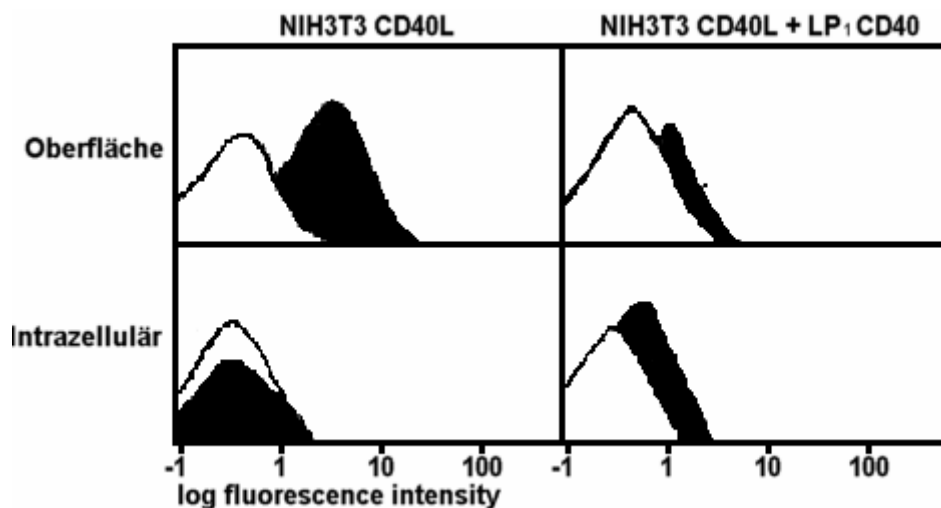
Abbildung 5.17: Fehlender Nachweis von CD40L durch Endozytose (schematische Zeichnung)



5.2.4.1 Intrazelluläre FACS-Messung

Eine Möglichkeit des intrazellulären Nachweises besteht in der Behandlung der Zellen nach Inkubation mit FIX + PERM[®] der Firma An der Grub. Bei diesem Verfahren ist es möglich, parallel CD40L auf und in der Zelle zu messen. Dabei werden die Zellen nach Inkubation zuerst mit einem FITC markierten CD40L-AK inkubiert, danach fixiert, permeabilisiert und anschließend mit einem PE markierten CD40L-AK inkubiert. Sowohl bei NIH3T3 CD40L alleine als auch bei NIH3T3 CD40L, die mit LP₁CD40 inkubiert worden waren, konnte kein intrazellulärer CD40L nachgewiesen werden (Abbildung 5.17).

Abbildung 5.18: Durchflußzytometrische CD40L-Bestimmung nach Behandlung mit FIX + PERM[®]



Nach Behandlung mit FIX + PERM[®] läßt sich intrazellulär kein CD40L nachweisen

5.2.4.2 Western Blot der Zellysate

Ein weiteres Verfahren des intrazellulären Nachweises von CD40L stellt die Herstellung von Zellysaten nach Inkubation und anschließende Proteinauftrennung mit Markierung von CD40L durch Western Blot dar. Mit diesem Verfahren ist es allerdings nicht möglich, eine Konzentrationsbestimmung durchzuführen. Zellysate wurden aus verschiedenen Ansätzen hergestellt, wobei jeweils die gleiche Anzahl Zellen vorher alleine oder in Kombination inkubiert wurden. Die CD40L-Expression wurde vor Herstellung durchflußzytometrisch bestimmt und zeigte die bereits beschriebenen üblichen Werte, wobei auf LP₁-Zellen kein CD40L nachgewiesen werden konnte.

Folgende Ansätze wurden verwendet:

NIH3T3 mock alleine (*Bande 1*)

NIH3T3 CD40L alleine (*Bande 2*)

LP₁0 alleine (*Bande 3*)

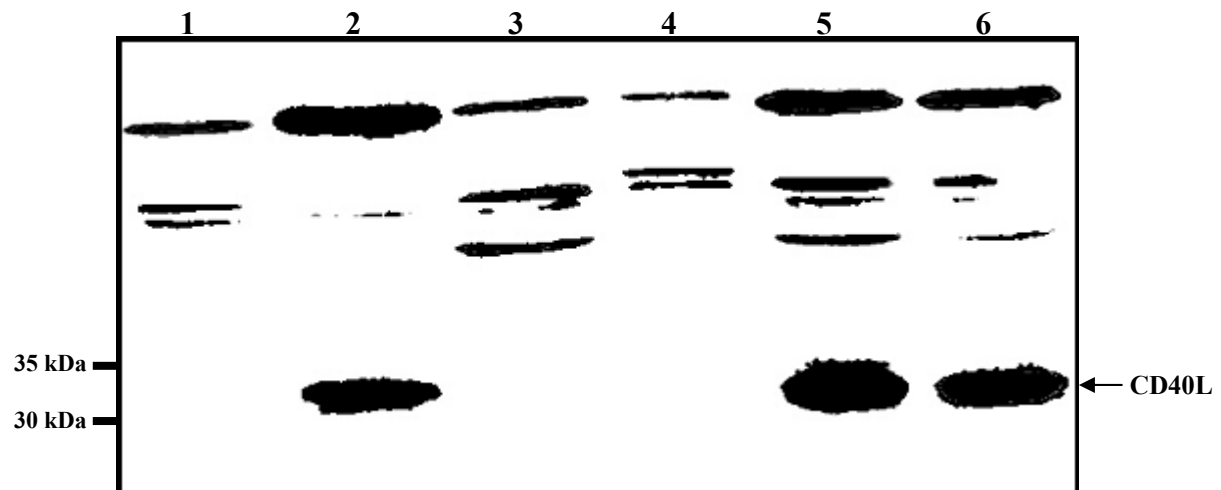
LP₁CD40 alleine (*Bande 4*)

NIH3T3 CD40L + LP₁0 (*Bande 5*)

NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 (*Bande 6*)

Für die Markierung von CD40L wurde ein für Western Blots geeigneter kommerzieller goat anti-CD40L-AK verwendet. Bei NIH3T3 CD40L alleine, NIH3T3 CD40L + LP₁0 und NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 konnte CD40L nachgewiesen werden, wie Abbildung 5.18 zeigt.

Abbildung 5.19: Western Blot der Zellysate



In den Banden 2, 5 und 6 zeigt sich CD40L, nicht aber in den Banden 1, 3 und 4

5.2.4.3 ELISA von Zellysaten

Um die Ergebnisse des Western-Blot zu validieren, wurde mit dem schon vorher erwähnten ELISA einmalig die CD40L-Konzentration in den Zellysaten bestimmt. Vor der Herstellung

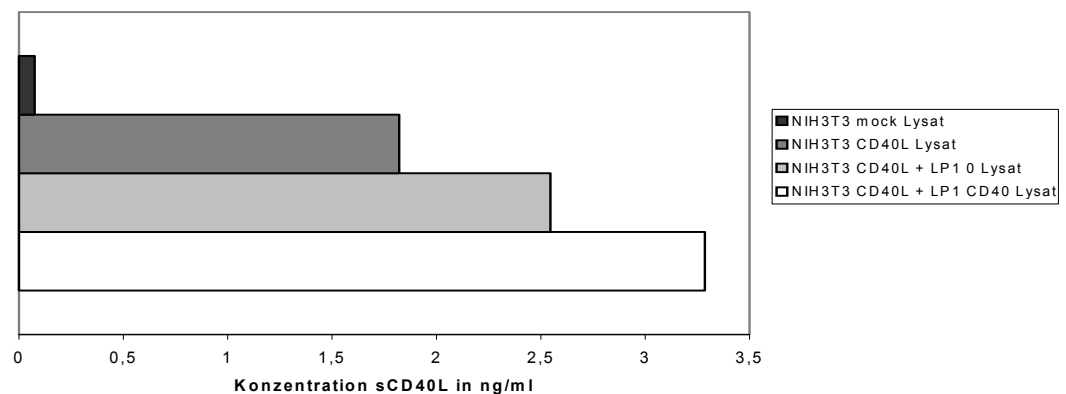
der Lysate wurden die Zellen wieder alleine bzw. zusammen inkubiert. Für jeweils 500µl Lysat wurden $5,5 \cdot 10^6$ Zellen gesamt eingesetzt. 100µl Lysat wurden mit 100µl Sample Buffer vermischt.

In den Lysaten konnten folgende CD40L-Konzentrationen gemessen werden:

NIH3T3 mock	0,149 ng/ml
NIH3T3 CD40L	3,644 ng/ml
NIH3T3 CD40L + LP ₁ 0	2,547 ng/ml
NIH3T3 CD40L + LP ₁ CD40	3,286 ng/ml

Da bei den Ansätzen NIH3T3 mock und CD40L alleine die doppelte Anzahl Zellen für das Lysat eingesetzt wurden, müssen für einen Vergleich die Konzentration halbiert werden (Abbildung 5.19).

Abbildung 5.20: Bestimmung der intrazellulären CD40L-Konzentration durch ELISA



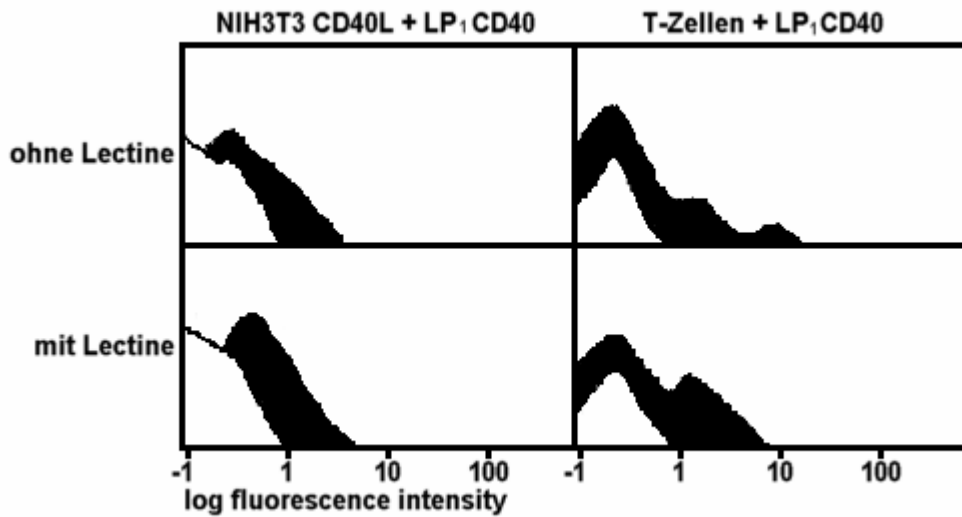
Nach Koinkubation mit LP₁CD40 findet sich im Zellysat eine höhere Konzentration sCD40L (3,286 ng/ml) als nach alleiniger (1,822 ng/ml) Inkubation oder mit LP₁0 (2,547 ng/ml)

5.2.4.4 Endozytosehemmung durch Lectine

Bei den Lectinen Cytochalasin B und Brefeldin A handelt es sich um Substanzen, die in intrazelluläre Transportprozesse eingreifen. Sie werden auch zur Endozytosehemmung verwendet. Wir gaben sowohl zu NIH3T3 CD40L als auch zu mit PMA und Ionomycin stimulierten T-Zellen diese beiden Substanzen alleine und in Kombination zu, wobei folgende Grundkonzentrationen verwendet wurden: Cytochalasin B: 10µM/ml, Brefeldin A: 10µg/ml Bei den T-Zellen wurde nur die einfache Konzentration verwendet, bei NIH3T3 CD40L wurden zusätzlich Versuche mit der zwei-, fünf- und zehnfachen Konzentration durchgeführt. Nach 1-stündiger Koinkubation mit den LP₁CD40 zeigte sich sowohl bei NIH3T3 CD40L als auch bei den T-Zellen mit und ohne Lectine eine deutliche CD40L-Verminderung. Dieses Ergebnis stellte sich in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar

(Abbildung 5.20). Diese beiden Substanzen scheinen somit keinen hemmenden Einfluß auf die Herabregulation von CD40L nach CD40-Kontakt zu haben, auch eine Erhöhung der Konzentration um das 10-fache führt nicht zum gewünschten Ergebnis.

Abbildung 5.21: Inkubation mit Lectinen in einfacher Konzentration



Zugabe von Cytochalasin B und Brefeldin A führt zu keiner Hemmung der CD40L-Herabregulation

6. Diskussion

6.1 Verwendete Methoden

Ziel der Arbeit war es, die T-zelluläre Immunantwort im Kontext der B-CLL näher zu charakterisieren, um darauf aufbauend neue immunologische Therapieansätze für die Behandlung dieser Erkrankung zu entwickeln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch ein artifizielles Zellsystem das komplexe System der T-Zell Interaktion mit den B-CLL Zellen zu vereinfachen und auf die Schlüsselmoleküle der T-zellulären Regulation (CD40/CD40L) zu reduzieren. Dieses Vorgehen erleichterte nicht nur die Materialbeschaffung, sondern erlaubte vielmehr auch eine MHC- und aktivierungsunabhängige Untersuchung der Interaktion von Rezeptor und Ligand der entsprechenden Interaktionspartner. Die Endpunkte der Zell-Zell-Interaktion, d.h. die Auf- und Abregulation von Rezeptor und Ligand wurden zunächst durchflußzytometrisch ermittelt sowie durch entsprechend weiterführende Nachweisverfahren ergänzt und vertieft (vgl. Material- und Methodenteil).

6.2 Immundefekte bei der CLL

Bei Patienten, die an einer CLL erkrankt sind, beobachtet man neben zahlreichen Organmanifestationen auch Funktionsstörungen des Immunsystems, die im Verlauf der Krankheit eine zentrale Rolle spielen. Diese Defekte äußern sich einerseits in einer erhöhten Anzahl von Infekten bedingt durch mangelnde Bildung spezifischer Antikörper, die entscheidend die Morbidität und Mortalität von CLL-Patienten beeinflussen [9, 10]. Andererseits kommt es zu verschiedenartigen Autoimmunphänomenen wie autoimmunhämolytische Anämie (AIHA), idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), reine aplastische Anämie (pure red cell aplasia (PRCA)), paraneoplastischen Pemphigus, periphere Neuropathie und membranöse Glomerulonephritis, als deren Ursache polyklonale Autoantikörper vermutet werden [70-74]. Doch wodurch entstehen solche Immundefekte bei CLL-Patienten?

6.3 Immunabwehr bei gesunden Menschen

Bei gesunden Menschen gliedert sich die Immunabwehr in eine nichtadaptive und adaptive Reaktion. Die nichtadaptive angeborene Immunabwehr besteht bei einer Infektion aus Aktivierung des Komplementsystemes und Phagozytose der Erreger durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Diese Art der Immunabwehr bietet einen gewissen Schutz vor Krankheitserregern, ruft aber keine anhaltende Immunität hervor. Entgeht die Infektion den

angeborenen Abwehrmechanismen und wird eine bestimmte Antigenmenge überschritten, kommt es zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Antigen-präsentierende Zellen (APZ), z.B. dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen nehmen die Antigene auf, bauen sie im Zellinneren ab, präsentieren sie als Peptid-MHC-II-Komplex auf der Zelloberfläche und wandern in die T-Zell-Zone von Lymphknoten. Native T-Zellen, die durch die lymphatischen Organe kreisen, erkennen die Peptid:MHC-II-Komplexe, beenden ihre Wanderung und interagieren mit den APZ. Bindung an den Peptid:MHC-II-Komplex bewirkt die Bildung kostimulatorischer Moleküle auf beiden Zellen, die letztendlich zu Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt. $CD4^+$ -T-Zellen entwickeln sich zu T-Helferzellen, die u.a. an der humoralen Immunantwort beteiligt sind, $CD8^+$ -T-Zellen zu T-Killerzellen, die bei der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. B-Zellen, die ebenso zu APZ gehören und die Antigene auf die gleiche Weise präsentieren, wandern im Lymphknoten aus den Venolen durch die T-Zell-Zone hindurch in die B-Zell-Zone. Werden sie allerdings von den T-Helfer-Zellen als antigenspezifische Zellen erkannt, erfolgt die Aktivierung der B-Zelle über die Interaktion der Oberflächenmoleküle CD40 und CD40L mit daraus resultierender Expression von B7-1 und B7-2 sowie weiterer Adhäsionsmoleküle auf der B-Zelle (siehe Einleitung). Dieser Vorgang führt letztendlich zu Proliferation und Differenzierung der B-Zelle mit Bildung der sogenannten Keimzentren [42, 75, 76].

6.4 Mögliche Ursachen des Immundefektes bei CLL-Patienten

Die im Immunsystem von CLL-Patienten vorliegende Störung könnte durch einen Fehler in jedem einzelnen der beschriebenen Aktivierungsschritte bedingt sein. Unter anderem wurden Defekte im Komplementsystem [77], Veränderungen des MHC-Klasse-II Moleküles [78], Störungen der Granulozytenfunktion [79], T-Zell-Defekte [80] und die Bildung von immunsuppressiven Faktoren durch CLL-Zellen [81] diskutiert. Die nur sehr geringe Präsentation von B7-1 und B7-2 auf CLL-Zellen [30] und die fehlende CD40L-Expression der T-Zellen dieser Patienten [35] weisen auf eine zentrale Rolle der CD40-CD40L Interaktion im Rahmen der Störung des Immunsystems von an CLL Erkrankten hin. Wie bereits in der Einleitung erwähnt scheint diese Interaktion auch eine zentrale Rolle in der fehlenden Generierung einer Antitumorantwort zu spielen. Als Ursache für den Mangel an CD40L ist ein Fehler in der Signalübermittlung via T-Zell-Rezeptor denkbar, wogegen aber eine Expression von CD40L mRNA in der T-Zelle nach CD3-Ligation, identisch mit der bei gesunden Personen, spricht [35]. Eine weitere Möglichkeit stellt eine Herabregulation von CD40L nach Koinkubation mit CLL-Zellen dar. Dafür spricht, daß CLL-Zellen, sind sie in

deutlicher Überzahl, bei Koinkubation mit T-Zellen in der Lage sind, zuvor auf T-Zellen exprimierten CD40L rasch herabzuregulieren [35], wogegen Vorbehandlung der CLL-Zellen mit einem blockierenden CD40-Antikörper zu keiner CD40L-Verminderung führt [76].

6.5 Kinetik der CD40L-Herabregulation

Um den Vorgang und die Ursache der CD40L-Herabregulation besser verstehen zu können, führten wir Untersuchungen an einem artifiziellen System durch. Diese zeigten, daß es nach Koinkubation der NIH3T3 CD40L mit LP₁CD40 zu einer deutlichen Verminderung der CD40L-Expression kam, während Koinkubation mit LP₁0 zwar ebenso zu einer Abnahme führte, die aber bei weitem nicht so ausgeprägt war. Im Rahmen der durchflußzytometrischen Bestimmung könnte es sich um eine Verringerung der CD40L-Expression durch den steigenden Anteil der LP₁-Zellen handeln. Die CD40L-Herabregulation könnte auch noch durch andere Faktoren beeinflusst werden, diese führen allerdings alleine zu keinem vollständigen CD40L-Rückgang sondern erst in Kombination mit CD40. Für eine relative Abnahme spricht, daß sich die CD40L-Expressionskurve bei Mischung von NIH3T3 CD40L mit LP₁-Zellen nicht wie bei einer Expressionsverminderung nach links verschiebt, sondern neben der positiven CD40L-Kurve eine zweite negative entsteht. Für einen deutlichen Rückgang ist ein bestimmtes Verhältnis CD40 zu CD40L notwendig, eine geringe Menge CD40 führt zu keiner Änderung. Koinkubation von NIH3T3 CD40L mit der gleichen Anzahl LP₁CD40 führt zu einer starken CD40L-Verminderung, nicht aber mit CLL-Zellen. Durchflußzytometrisch wiesen die LP₁CD40 eine höhere CD40-Expression als die CLL-Zellen auf, eine Beobachtung, die auch schon anderweitig beschrieben wurde [35]. Es handelt sich um einen schnell ablaufenden Vorgang, eine Verminderung der CD40L-Expression erfolgt bereits nach 30 Minuten und weniger, wie Untersuchungen zur Zeitkinetik der CD40L-Herabregulation zeigten. Nur wenn die Möglichkeit des Zellkontaktes zwischen NIH3T3 CD40L und LP₁CD40 gegeben ist tritt die Verminderung ein, bei getrennter Inkubation der Zellen in einer Transwellplatte konnte sie nicht nachgewiesen werden. CD40L wird sowohl auf NIH3T3 CD40L als auch auf aktivierten T-Zellen durch LP₁-Zellen herabzureguliert.

6.6 Diskussion der Ursachen der CD40L-Herunterregulation

Als Gründe für die verringerte Expression von CD40L nach Kontakt mit CD40 wurden folgende Hypothesen aufgestellt: fehlender Nachweis von CD40L durch Zell-Zell-Kontakt, löslichen CD40, Abspaltung von CD40L, Endozytose von CD40L.

Eine Blockade von CD40L durch Zell-Zell-Kontakt konnte mittels Trennung ausgeschlossen werden. Die Zellen konnten eindeutig durch MACS-Separation nach MHC II getrennt werden, es zeigte sich weiterhin eine verminderte CD40L-Expression.

Löslicher CD40, der eine Bindung mit CD40L eingeht und somit den CD40L-Antikörper hindert, an CD40L zu binden, konnte nicht nachgewiesen werden. Nach dem Waschen mit einer milden Säure (pH 4,1) zeigte sich auch weiterhin eine stark verringerte CD40L-Expression auf den NIH3T3 CD40L. Diese Möglichkeit, löslichen CD40, der an CD40L bindet, zu entfernen, wurde schon früher in der Fachliteratur erwähnt [35]. Auch wurde das Vorkommen von löslichem CD40 beschrieben, der teilweise in Überständen und an aktivierte T-Zellen gebunden nachgewiesen wurde [82]. Dies konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche allerdings nicht nachgewiesen werden, was eher nicht für das Vorhandensein von löslichem CD40 spricht.

Die Moleküle Fas Ligand und TNF α , die genauso wie CD40L zur TNF-Rezeptorfamilie gehören, werden von der Zelloberfläche abgespalten und sind in löslicher Form nachweisbar [83, 84]. Die Existenz löslichen CD40L (sCD40L) wurde inzwischen mehrfach beschrieben, auch konnte dessen biologische Aktivität gezeigt werden [85], dabei scheint membrangebundener und löslicher CD40L dieselben Effekte auf B-Zellen zu haben [86]. Löslicher CD40L wird intrazellulär gebildet und nach Aktivierung freigesetzt [87, 88]. Erhöhte Konzentrationen sCD40L fanden sich in Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses [89] und instabiler Angina pectoris [50], bei der eine mögliche Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose diskutiert wird. CLL-Patienten wiesen ebenfalls erhöhte Mengen sCD40L im Serum auf, das *in vitro* eine längere Überlebenszeit der CLL-Zellen und Resistenz gegenüber Fas Ligand und Fludarabin vermittelte [90]. CD40L-Abspaltung von der Zelloberfläche nach CD40-Kontakt wäre eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis. Fas Ligand und TNF α werden durch Metalloproteinasen (MMP), sog. Zinkenzyme, die bei einer Reihe von Zellen gefunden werden [91], von der T-Zelloberfläche abgespalten [64, 83]. Dieser Vorgang kann durch sog. Matrixmetalloproteinaseinhibitoren (MMPI) verhindert werden [64, 66, 83, 84]. Matrixmetalloproteinasen werden unter anderem auch von Endothelzellen und Monozyten freigesetzt, dabei spielt CD40L eine wichtige Rolle in der Induktion von MMP [67, 68]. Zugabe des MMPI KB8301 zu NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 führt zu keiner Inhibition der CD40L-Herabregulation. Die Durchführung eines ELISA erbrachte nur einen geringen Nachweis von sCD40L. Interessanterweise wird sCD40L von NIH3T3 CD40L alleine und in Koinkubation mit LP₁0 in den Überstand abgegeben, bei Koinkubation mit LP₁CD40 kommt es zu einer Hemmung der Abgabe von sCD40L.

Ursache für diese Hemmung der Abgabe von sCD40L in den Überstand könnte eine Endozytose des Oberflächenmoleküles sein. Findet kein CD40-CD40L Kontakt statt, wird sCD40L weiterhin in das Medium abgegeben. Intrazelluläre FACS Messungen zeigten sowohl bei NIH3T3 CD40L alleine als auch nach Koinkubation mit LP₁CD40 keine intrazelluläre Erhöhung von CD40L. Auch in NIH3T3 CD40L alleine konnte kein intrazellulärer CD40L nachgewiesen werden. Durch das Western Blot Verfahren, das eine sehr sensitive Nachweismethode darstellt, zeigte sich CD40L in den Zellysaten sowohl von NIH3T3 CD40L alleine als auch nach Koinkubation mit LP₁0 und LP₁CD40. Der quantitative Nachweis von intrazellulärem CD40L gelang durch einen ELISA. Dabei konnten wir eine Erhöhung der CD40L-Konzentration in den Lysaten der NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 im Vergleich zu NIH3T3 CD40L alleine oder mit LP₁0 feststellen. Die Ursache dafür könnte einerseits in einer Hemmung der Aufregulation liegen, andererseits auch in der Endozytose von CD40L. Eine Hemmung der Aufregulation wäre möglich, wenn NIH3T3 CD40L nur bei Aktivierung CD40L exprimieren, die in unseren Versuchen verwendeten Zellen zeigten aber eine konstitutive Expression. Auch weisen die Ergebnisse des oben erwähnten ELISA der Überstände auf eine Herabregulation durch Endozytose hin. Versuche einer Inhibierung der energieabhängigen und somit temperatursensitiven Endozytose durch Inkubation bei 4°C scheiterten an der Unverträglichkeit der Zellen gegenüber Paraformaldehyd, das zur Fixierung benötigt wird.

Eine erfolgreiche Inhibition der CD40L-Herabregulation auf T-Zellen durch den Endozytosehemmer Cytochalasin B wurde bereits mehrfach beschrieben [35, 55]. Dabei handelt es sich um ein Pilzmetabolit, das die Polymerisation von Actin und somit Endozytose inhibiert [56-62]. Zusätzlich verwendeten wir Brefeldin A, ebenso einen Pilzmetabolit, der intrazelluläre Transportprozesse hemmt [63]. Die Wirkung der Lectine bei nativen T-Zellen bestätigte sich dadurch, daß es trotz Zugabe von PMA und Ionomycin zu keiner CD40L-Aufregulation kam. Diese Beobachtung wurde auch anderweitig beschrieben [92]. Die einzelne oder kombinierte Zugabe der Endozytosehemmer Cytochalasin B und Brefeldin A sowohl zu NIH3T3 CD40L + LP₁CD40 als auch zu vorstimulierten T-Zellen + LP₁CD40 nach Protokoll in unterschiedlichen Konzentrationen zeigten allerdings keine Auswirkungen auf die Verminderung der CD40L-Expression.

6.7 Konsequenzen der CD40L-Herabregulation

Die Herabregulation von CD40L auf T-Zellen nach Kontakt mit B- bzw. CLL-Zellen verhindert eine effiziente Aufregulation kostimulatorischer Moleküle wie z.B. B7, das eine

wichtige Rolle in der T-Zell-Aktivierung und IL-2 abhängigen T-Zell-Antwort spielt [93]. In Abwesenheit dieser B7-vermittelten Kostimulation bleiben die T-Zellen anerg gegenüber weiterer Stimulation. In dieser durch CD40L-Herabregulation bedingten T-Zell-Anergie mag der Grund für eine fehlende Antitumorantwort gegenüber CLL-Zellen liegen.

6.8 Ausblick auf therapeutische Möglichkeiten

Eine Therapiemöglichkeit der CLL läge darin, diese Anergie zu überwinden. Dies könnte beispielsweise von Seiten der CLL-Zellen durch eine verstärkte CD40L-Stimulation mit daraus resultierender vermehrter Expression kostimulatorischer Moleküle geschehen [76]. CLL-Zellen können durch CD40 Aktivierung, z.B. durch CD40L transfizierten Feeder, vermehrt kostimulatorische Moleküle wie z.B. B7-1 und B7-2 exprimieren und sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren [94, 95]. Durch Stimulation mit Phytohämagglutininen wurde die Expression von B7-1 und B7-2 auf CLL-Zellen deutlich verlängert [96].

Ein Gentransfer von CD40L in CLL-Zellen kommt ebenfalls in Frage. CD40L transfizierte CLL-Zellen stimulieren *in vitro* nicht-transfizierte CLL-Zellen und bewirken eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle, wobei die Transfektion sowohl durch Adenovirus [97, 98] als auch durch Herpesvirus erfolgte [99]. Eine deutliche B7-Heraufregulation zeigten CLL-Zellen, die durch Transfektion in der Lage waren, CD40L und IL-2 zu exprimieren [100]. Behandlung von CLL-Patienten mit autologen CD40L transfizierten CLL-Zellen resultierte in einer deutlichen Zunahme der absoluten T-Zell-Zahl im Blut und einer Zunahme der Serumkonzentrationen von IL-12 und IFN γ [97]. Die Stimulation von normalen B-Zellen und CLL-Zellen mit CpG-Oligonukleotiden in Kombination mit IL-2 führte zu einer verlängerten Expression von B7-1 und B7-2 [101, 102]. Eine DNA-Vakzination mit Tetanustoxin-Fusionsproteinen befindet sich derzeit in Entwicklung [103].

Es bestünde auch die theoretische Möglichkeit, auf der T-Zellseite eine verstärkte CD40L-Expression hervorzurufen. Wie wir zeigen konnten, führt *in vitro* die Zugabe von PMA und Ionomycin durch Zunahme der intrazellulären Calcium Konzentration zu einer deutlichen CD40L-Heraufregulation [53]. Stimulation der T-Zellen mit IL-2 und IL-12 führt zu einer verlängerten Expression von CD40L, ebenso Stimulation von CD28 [93, 104, 105].

In Zusammenhang mit dieser Studie wäre ein möglicher Angriffspunkte in der Therapie der CLL eine effektive Verhinderung der CD40L-Herabregulation durch Endozytosehemmung. Durch welche Substanzen dies effektiv und verträglich möglich wäre, könnte Gegenstand weiterer Forschungen sein. Neben den Ansatzpunkten B- bzw. CLL- und T-Zelle eröffnen sich auch völlig neue Therapiemöglichkeiten. Beispielsweise zeigte die orale Gabe einer

Salmonella typhimurium Mutante, die mit CD40L transfiziert wurde, bei Mäusen einen deutlich verbesserten Schutz gegen CD40⁺ Lymphomzellen [106].

Stellt die Förderung und Verlängerung der CD40-CD40L Interaktion eine eventuelle Therapiemöglichkeit der CLL und anderer Lymphome dar, so ließe sich durch eine Blockade eben dieser Interaktion bei gewissen Krankheitsbildern ein therapeutischer Ansatz finden. Beispielsweise führt die Behandlung mit einem CD40L-AK zu einer Unterdrückung der Nierentransplantatabstoßung bei einem Primaten [107]. Ebenso verhinderte die Blockade der CD40-CD40L Interaktion die Entstehung einer *graft versus host* Reaktion nach Knochenmarkstransplantation [108, 109].

Die CD40-CD40L Interaktion steht im Mittelpunkt vieler Prozesse auf zellulärer Ebene, allen voran der B-Zell-T-Zell-Aktivierung und damit der Generierung einer effizienten Immunantwort. Bis heute sind nicht alle Einzelheiten und Konsequenzen der CD40-CD40L Interaktionen der verschiedenen Zelltypen geklärt. Aber das therapeutische Potential, das in der Beeinflussung dieser Prozesse steckt, wird mit jeder neuen Erkenntnis sichtbar und macht deutlich, daß die Gewinnung weiterer Erkenntnisse von hohem wissenschaftlichem Interesse sind und nicht zuletzt auch einen Fortschritt in der Bekämpfung verschiedener Erkrankungen, wie unter anderem auch der CLL, darstellen.

7. Zusammenfassung

Defekte im Immunsystem von CLL-Patienten stellen ein großes Problem im Krankheitsverlauf dar. Dies scheint durch eine Anergie der CLL-Zellen mit mangelnder Expression der B7-Moleküle bedingt zu sein. Normalerweise werden diese kostimulatorischen Moleküle durch Kontakt zwischen B- und T-Zelle via CD40-CD40L heraufreguliert. Da aber T-Zellen von CLL-Patienten kein oder nur sehr wenig CD40L-exprimieren, obwohl sie dazu in der Lage sind, scheint diese Interaktion eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Immundefektes bei der CLL zu spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflüsse auf die Regulation von CD40L näher zu charakterisieren. Untersuchungen an NIH3T3 CD40L-Zellen zeigten eine deutliche Herabregulation von CD40L nach bereits kurzer Inkubationszeit (30 min) mit LP₁CD40-Zellen, nicht aber bei LP₁0. Für eine Expressionsverminderung ist Zellkontakt und ein bestimmtes Zellverhältnis nötig, ansonsten bleibt eine Reaktion aus. Mit PMA und Ionomycin stimulierte T-Zellen zeigten ebenso eine rasche CD40L-Verminderung ähnlich wie bei NIH3T3 CD40L nach Kontakt mit LP₁CD40.

Vier Ursachen der CD40L-Herabregulation wurden postuliert:

- Ein fehlender Nachweis durch Zell-Zell-Kontakt konnte nach Trennung der beiden Populationen nicht bestätigt werden.
- Eine Blockade des Liganden durch von der LP₁-Zelle abgespaltenen löslichen CD40 kommt als Ursache des fehlenden Nachweises nicht in Frage.
- Das Vorkommen von löslichem CD40L konnte nur bedingt nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich im ELISA der Zellüberstände bei NIH3T3 CD40L alleine und in Koinkubation mit LP₁0 hohe Konzentrationen von CD40L, diese waren aber zusammen mit LP₁CD40 verschwindend gering. Auch zeigte die Verwendung eines Inhibitors keine Wirkung.
- Ein durch Endozytose herabregulierter CD40L ließ sich zwar durch intrazelluläre FACS-Messungen nicht nachweisen, auch zeigte der Einsatz von Endozytosehemmern keinen Erfolg. Allerdings war löslicher CD40L in Zellysaten vorhanden, wie Western Blot und ELISA zeigten.

In Zusammenschau aller Untersuchungsergebnisse und unter Berücksichtigung der methodisch bedingten Grenzen läßt sich die Vermutung anstellen, daß es sich bei der Verminderung von CD40L um Herabregulation durch Endozytose handelt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen könnten einen kleinen Teil zu der Entwicklung neuer Therapien für verschiedene Erkrankungen, wie u.a. auch die CLL, beitragen.

8. Literatur

1. Faguet, G., *Chronic lymphocytic leukemia: an updated review*. J Clin Oncol, 1994. 12: p. 1974-90.
2. Montserrat, E. and Rozman, C., *Chronic lymphocytic leukemia: present status*. Ann Oncol, 1995. 6(3): p. 219-35.
3. Yuille, M.R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D. and Houlston, R.S., *Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies*. Br J Haematol, 2000. 109(4): p. 794-9.
4. Emmerich B., Hallek M., *Chronische lymphatische Leukämie*, in *Kompendium Internistische Onkologie*, S. Verlag, Editor. 1999, Schmoll H.J., Höffken K., Possinger K.: Berlin. p. 208-242.
5. Rai KR, R.S., *Chronic lymphocytic leukemia*, in *Cancer Medicine*, F.I.E. Holland JF, Bast jr RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR, Editor. 1993, Lea & Febiger: Philadelphia.
6. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K. and Kolitz, J., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(6): p. 1840-7.
7. Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G.A., Dohner, H. and Lichter, P., *Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(2): p. 748-53.
8. Klein, A., Miera, O., Bauer, O., Golfier, S. and Schriever, F., *Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair*. Leukemia, 2000. 14(1): p. 40-6.
9. Molica, S., *Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment*. Leuk Lymphoma, 1994. 13(3-4): p. 203-14.
10. Morrison, V.A., *The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol, 1998. 25(1): p. 98-106.
11. Anaissie, E.J., Kontoyiannis, D.P., O'Brien, S., Kantarjian, H., Robertson, L., Lerner, S. and Keating, M.J., *Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine*. Ann Intern Med, 1998. 129(7): p. 559-66.
12. Provan, D., Bartlett-Pandite, L., Zwicky, C., Neuberg, D., Maddocks, A., Corradini, P., Soiffer, R., Ritz, J., Nadler, L.M. and Gribben, J.G., *Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation*. Blood, 1996. 88(6): p. 2228-35.
13. Hallek M, Buhmann.R., Doenecke A., Nolte A., Magerstaedt R., Wendtner C., Emmerich B., *Molekular- und Zellbiologische Strategien zur Entwicklung einer adjuvanten Lymphomtherapie*. Der Onkologe, 1997. 3: p. 548-556.

14. Guinan, E.C., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Freeman, G.J. and Nadler, L.M., *Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity*. Blood, 1994. 84(10): p. 3261-82.
15. June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. and Thompson, C.B., *The B7 and CD28 receptor families*. Immunol Today, 1994. 15(7): p. 321-31.
16. Pardoll, D., *Tumour antigens. A new look for the 1990s [news; comment]*. Nature, 1994. 369.
17. Bonnefoix, T., Claret, E., Piccinni, M.P., Jacob, M.C., Zheng, X.Q. and Sotto, J.J., *Impaired clonogenic potential of CD25 positive T cells in lymph nodes involved by B cell non-Hodgkin's lymphomas*. Immunol Lett, 1991. 27(2): p. 135-9.
18. Schultze, J.L., *Why do B cell lymphoma fail to elicit clinically sufficient T cell immune responses?* Leuk Lymphoma, 1999. 32(3-4): p. 223-36.
19. Blay, J.Y., Burdin, N., Rousset, F., Lenoir, G., Biron, P., Philip, T., Banchereau, J. and Favrot, M.C., *Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor*. Blood, 1993. 82(7): p. 2169-74.
20. Kopper, L., Ladanyi, A., Mihalik, R. and Nagy, P., *Loss of transforming growth factor beta 1 regulatory activity in human non Hodgkin lymphomas*. Anticancer Res, 1994. 14(1A): p. 119-22.
21. Bost, K.L., Bieligk, S.C. and Jaffe, B.M., *Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. Tumor-derived IL-10 as a possible mechanism for modulating the anti-tumor response*. J Immunol, 1995. 154(2): p. 718-29.
22. Chen, L., *Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion*. Immunol Today, 1998. 19(1): p. 27-30.
23. Schultze, J., Nadler, L.M. and Gribben, J.G., *B7-mediated costimulation and the immune response*. Blood Rev, 1996. 10(2): p. 111-27.
24. Levitsky, H.I., *Tumors derived from antigen presenting cells*. Semin Immunol, 1996. 8(5): p. 281-7.
25. Sotomayor, E.M., Borrello, I. and Levitsky, H.I., *Tolerance and cancer: a critical issue in tumor immunology*. Crit Rev Oncog, 1996. 7(5-6): p. 433-56.
26. Bogen, B., *Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma*. Eur J Immunol, 1996. 26(11): p. 2671-9.
27. Bogen, B., Dembic, Z. and Weiss, S., *Clonal deletion of specific thymocytes by an immunoglobulin idiotype*. Embo J, 1993. 12(1): p. 357-63.

28. Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., van Oostveen, J.W., Feltkamp, C.A. and Hekman, A., *Functional expression of adhesion receptors and costimulatory molecules by fresh and immortalized B-cell non-Hodgkin's lymphoma cells*. Blood, 1995. 85(10): p. 2802-12.
29. Shamash, J., Davies, D.C., Salam, A., Rohatiner, A.Z., Young, B.D. and Lister, T.A., *Induction of CD80 expression in low-grade B cell lymphoma-a potential immunotherapeutic target*. Leukemia, 1995. 9(8): p. 1349-52.
30. Dorfman, D.M., Schultze, J.L., Shahsafaei, A., Michalak, S., Gribben, J.G., Freeman, G.J., Pinkus, G.S. and Nadler, L.M., *In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation*. Blood, 1997. 90(11): p. 4297-306.
31. Qin, Z., Richter, G., Schuler, T., Ibe, S., Cao, X. and Blankenstein, T., *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*. Nat Med, 1998. 4(5): p. 627-30.
32. Kneitz, C., Goller, M., Wilhelm, M., Mehringer, C., Wohlleben, G., Schimpl, A. and Tony, H.P., *Inhibition of T cell/B cell interaction by B-CLL cells*. Leukemia, 1999. 13(1): p. 98-104.
33. Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J.E. and Noelle, R.J., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 591-617.
34. Van Kooten, C. and Banchereau, J., *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. 61: p. 1-77.
35. Cantwell, M., Hua, T., Pappas, J. and Kipps, T.J., *Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Med, 1997. 3(9): p. 984-9.
36. Lafage-Pochitaloff, M., Herman, P., Birg, F., Galizzi, J.P., Simonetti, J., Mannoni, P. and Banchereau, J., *Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2*. Leukemia, 1994. 8(7): p. 1172-5.
37. Smith, C.A., Farrah, T. and Goodwin, R.G., *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. 76(6): p. 959-62.
38. Schriever, F., Freedman, A.S., Freeman, G., Messner, E., Lee, G., Daley, J. and Nadler, L.M., *Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype*. J Exp Med, 1989. 169(6): p. 2043-58.
39. Galy, A.H. and Spits, H., *CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells*. J Immunol, 1992. 149(3): p. 775-82.
40. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C. and Pober, J.S., *CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(10): p. 4342-6.
41. Hollenbaugh, D., Mischel-Petty, N., Edwards, C.P., Simon, J.C., Denfeld, R.W., Kiener, P.A. and Aruffo, A., *Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells*. J Exp Med, 1995. 182(1): p. 33-40.

42. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. 180(4): p. 1263-72.
43. Graf, D., Korthauer, U., Mages, H.W., Senger, G. and Kroczeck, R.A., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. 22(12): p. 3191-4.
44. Lederman, S., Yellin, M.J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J.J. and Chess, L., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)*. J Exp Med, 1992. 175(4): p. 1091-101.
45. Lane, P., Traunecker, A., Hubele, S., Inui, S., Lanzavecchia, A. and Gray, D., *Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1992. 22(10): p. 2573-8.
46. Gauchat, J.F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J.P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores-Romo, L. and Thompson, J., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*. Nature, 1993. 365(6444): p. 340-3.
47. Gauchat, J.F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J.P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R. and Aldebert, D., *CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils*. Eur J Immunol, 1995. 25(3): p. 863-5.
48. Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K. and Zappacosta, S., *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*. J Exp Med, 1997. 185(12): p. 2053-60.
49. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G.K., Bourcier, T., Bonnefoy, J.Y., Pober, J.S. and Libby, P., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): p. 1931-6.
50. Aukrust, P., Muller, F., Ueland, T., Berget, T., Aaser, E., Brunsvig, A., Solum, N.O., Forfang, K., Froland, S.S. and Gullestad, L., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. Circulation, 1999. 100(6): p. 614-20.
51. Pegoraro, L., Malavasi, F., Bellone, G., Massaia, M., Boccadoro, M., Saglio, G., Guerrasio, A., Benetton, G., Lombardi, L. and Coda, R., *The human myeloma cell line LP-1: a versatile model in which to study early plasma-cell differentiation and c-myc activation*. Blood, 1989. 73(4): p. 1020-7.
52. Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J.A. and Noelle, R.J., *The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells*. J Immunol, 1993. 151(5): p. 2497-510.

53. Nusslein, H.G., Frosch, K.H., Woith, W., Lane, P., Kalden, J.R. and Manger, B., *Increase of intracellular calcium is the essential signal for the expression of CD40 ligand.* Eur J Immunol, 1996. 26(4): p. 846-50.
54. Hirohata, S., *Human Th1 responses driven by IL-12 are associated with enhanced expression of CD40 ligand.* Clin Exp Immunol, 1999. 115(1): p. 78-85.
55. Yellin, M.J., Sippel, K., Inghirami, G., Covey, L.R., Lee, J.J., Sinning, J., Clark, E.A., Chess, L. and Lederman, S., *CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function.* J Immunol, 1994. 152(2): p. 598-608.
56. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.* J Cell Biol, 1987. 105(4): p. 1473-8.
57. Flanagan, M.D. and Lin, S., *Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin.* J Biol Chem, 1980. 255(3): p. 835-8.
58. Hartwig, J.H. and Stossel, T.P., *Cytochalasin B and the structure of actin gels.* J Mol Biol, 1979. 134(3): p. 539-53.
59. Lin, S. and Spudich, J.A., *Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B. Cytochalasin B binding to red cell membrane in relation to glucose transport.* J Biol Chem, 1974. 249(18): p. 5778-83.
60. Lin, D.C., Tobin, K.D., Grumet, M. and Lin, S., *Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation.* J Cell Biol, 1980. 84(2): p. 455-60.
61. MacLean-Fletcher, S. and Pollard, T.D., *Mechanism of action of cytochalasin B on actin.* Cell, 1980. 20(2): p. 329-41.
62. Maruyama, K., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P., *Cytochalasin B and the structure of actin gels. II. Further evidence for the splitting of F-actin by cytochalasin B.* Biochim Biophys Acta, 1980. 626(2): p. 494-500.
63. Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. and Ikehara, Y., *Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.* J Biol Chem, 1986. 261(24): p. 11398-403.
64. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P. and Srinivasan, S., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.* Nature, 1997. 385(6618): p. 729-33.
65. Crowe, P.D., Walter, B.N., Mohler, K.M., Otten-Evans, C., Black, R.A. and Ware, C.F., *A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes.* J Exp Med, 1995. 181(3): p. 1205-10.
66. Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R. and Gordon, J.L., *Processing of*

- tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases*. Nature, 1994. 370(6490): p. 555-7.
67. Wassenaar, A., Verschoor, T., Kievits, F., Den Hartog, M.T., Kapsenberg, M.L., Everts, V. and Snijders, A., *CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts*. Clin Exp Immunol, 1999. 115(1): p. 161-7.
 68. Mach, F., Schonbeck, U., Fabunmi, R.P., Murphy, C., Atkinson, E., Bonnefoy, J.Y., Graber, P. and Libby, P., *T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation*. Am J Pathol, 1999. 154(1): p. 229-38.
 69. Malik, N., Greenfield, B.W., Wahl, A.F. and Kiener, P.A., *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases*. J Immunol, 1996. 156(10): p. 3952-60.
 70. Diehl, L.F. and Ketchum, L.H., *Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia*. Semin Oncol, 1998. 25(1): p. 80-97.
 71. Yahata, N., Kawanishi, Y., Okabe, S., Kimura, Y., Okada, T., Otani, M., Shimizu, T., Nakao, T. and Ohyashiki, K., *Membranous glomerulonephritis with nephrotic syndrome associated with chronic lymphocytic leukemia*. Am J Nephrol, 2000. 20(5): p. 402-7.
 72. Allen, C.M. and Camisa, C., *Paraneoplastic pemphigus: a review of the literature*. Oral Dis, 2000. 6(4): p. 208-14.
 73. Rivollier, C., Vaillant, L., Machet, M.C., Martin, L., Jan, V., Huttenberger, B., Joly, P. and Lorette, G., *[Paraneoplastic pemphigus: a pustular form during chronic lymphoid leukemia]*. Ann Dermatol Venereol, 2001. 128(5): p. 644-8.
 74. Andres, E., Vinzio, S., Maloisel, F., Carre, S., Perrin, A.E., Goichot, B. and Schlienger, J.L., *[Autoimmune peripheral neuropathies with anti-MAG antibodies and hematological disorders. Five cases]*. Ann Med Interne (Paris), 2001. 152(3): p. 147-51.
 75. Janeway CA. and Travers P., *Immunologie*. Spektrum Lehrbuch, 1997.
 76. Ranheim, E.A. and Kipps, T.J., *Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal*. J Exp Med, 1993. 177(4): p. 925-35.
 77. Schlesinger, M., Broman, I. and Lugassy, G., *The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives*. Leukemia, 1996. 10(9): p. 1509-13.
 78. Veenstra, H., Jacobs, P. and Dowdle, E.B., *Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia*. Cell Immunol, 1996. 171(1): p. 68-73.

79. Itala, M., Vainio, O. and Remes, K., *Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia*. Eur J Haematol, 1996. 57(1): p. 46-53.
80. Rezvany, M.R., Jeddi-Tehrani, M., Osterborg, A., Kimby, E., Wigzell, H. and Mellstedt, H., *Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset*. Blood, 1999. 94(3): p. 1063-9.
81. Aslakson, C.J., Lee, G., Boomer, J.S., Gilman-Sachs, A., Kucuk, O. and Beaman, K.D., *Expression of regeneration and tolerance factor on B cell chronic lymphocytic leukemias: a possible mechanism for escaping immune surveillance*. Am J Hematol, 1999. 61(1): p. 46-52.
82. van Kooten, C., Gaillard, C., Galizzi, J.P., Hermann, P., Fossiez, F., Banchereau, J. and Blanchard, D., *B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40*. Eur J Immunol, 1994. 24(4): p. 787-92.
83. Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H., *Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand*. J Exp Med, 1995. 182(6): p. 1777-83.
84. Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S. and Ohga, S., *Fas ligand in human serum*. Nat Med, 1996. 2(3): p. 317-22.
85. Mazzei, G.J., Edgerton, M.D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J.F., Bernard, A., Allet, B. and Bonnefoy, J.Y., *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. 270(13): p. 7025-8.
86. Pietravalle, F., Lecoanet-Henchoz, S., Aubry, J.P., Elson, G., Bonnefoy, J.Y. and Gauchat, J.F., *Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation*. Eur J Immunol, 1996. 26(3): p. 725-8.
87. Pietravalle, F., Lecoanet-Henchoz, S., Blasey, H., Aubry, J.P., Elson, G., Edgerton, M.D., Bonnefoy, J.Y. and Gauchat, J.F., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem, 1996. 271(11): p. 5965-7.
88. Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C. and Kroczyk, R.A., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. 25(6): p. 1749-54.
89. Vakkalanka, R.K., Woo, C., Kirou, K.A., Koshy, M., Berger, D. and Crow, M.K., *Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera*. Arthritis Rheum, 1999. 42(5): p. 871-81.
90. Younes, A., Snell, V., Consoli, U., Clodi, K., Zhao, S., Palmer, J.L., Thomas, E.K., Armitage, R.J. and Andreeff, M., *Elevated levels of biologically active soluble CD40*

- ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol, 1998. 100(1): p. 135-41.
91. Woessner, J.F., Jr., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.* Faseb J, 1991. 5(8): p. 2145-54.
 92. Strous, G.J., van Kerkhof, P., van Meer, G., Rijnboutt, S. and Stoorvogel, W., *Differential effects of brefeldin A on transport of secretory and lysosomal proteins.* J Biol Chem, 1993. 268(4): p. 2341-7.
 93. Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A., *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen.* Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 191-212.
 94. Buhmann, R., Nolte, A., Westhaus, D., Emmerich, B. and Hallek, M., *CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells.* Blood, 1999. 93(6): p. 1992-2002.
 95. Trentin, L., Perin, A., Siviero, M., Piazza, F., Facco, M., Gurrieri, C., Galvan, S., Adami, F., Agostini, C. and Pizzolo, G., *B7 costimulatory molecules from malignant cells in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders trigger t-cell proliferation.* Cancer, 2000. 89(6): p. 1259-68.
 96. Isakovic, K. and Lenert, G., *Reactivity of B leukemic lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia to PWM and PHA.* Blood Cells, 1987. 12(2): p. 355-64.
 97. Wierda, W.G., Cantwell, M.J., Woods, S.J., Rassenti, L.Z., Prussak, C.E. and Kipps, T.J., *CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2000. 96(9): p. 2917-24.
 98. Kato, K., Cantwell, M.J., Sharma, S. and Kipps, T.J., *Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells.* J Clin Invest, 1998. 101(5): p. 1133-41.
 99. Tolba, K.A., Bowers, W.J., Hilchey, S.P., Halterman, M.W., Howard, D.F., Giuliano, R.E., Federoff, H.J. and Rosenblatt, J.D., *Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2001. 98(2): p. 287-95.
 100. Takahashi, S., Rousseau, R.F., Yotnda, P., Mei, Z., Dotti, G., Rill, D., Hurwitz, R., Marini, F., Andreeff, M. and Brenner, M.K., *Autologous antileukemic immune response induced by chronic lymphocytic leukemia B cells expressing the CD40 ligand and interleukin 2 transgenes.* Hum Gene Ther, 2001. 12(6): p. 659-70.
 101. Decker, T., Schneller, F., Kronschnabl, M., Dechow, T., Lipford, G.B., Wagner, H. and Peschel, C., *Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype.* Exp Hematol, 2000. 28(5): p. 558-68.
 102. Decker, T., Schneller, F., Sparwasser, T., Tretter, T., Lipford, G.B., Wagner, H. and Peschel, C., *Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine*

- production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells.* Blood, 2000. 95(3): p. 999-1006.
103. Zhu, D., Rice, J., Savelyeva, N. and Stevenson, F.K., *DNA fusion vaccines against B-cell tumors.* Trends Mol Med, 2001. 7(12): p. 566-72.
 104. Skov, S., Bonyhadi, M., Odum, N. and Ledbetter, J.A., *IL-2 and IL-15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells.* J Immunol, 2000. 164(7): p. 3500-5.
 105. Johnson-Leger, C., Christensen, J. and Klaus, G.G., *CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells.* Int Immunol, 1998. 10(8): p. 1083-91.
 106. Urashima, M., Suzuki, H., Yuza, Y., Akiyama, M., Ohno, N. and Eto, Y., *An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium.* Blood, 2000. 95(4): p. 1258-63.
 107. Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L. and Patterson, N.B., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates [see comments].* Nat Med, 1999. 5(6): p. 686-93.
 108. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Buhlman, J., Xu, J., Flavell, R.A., Korngold, R., Noelle, R. and Vallera, D.A., *Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation.* J Immunol, 1997. 158(1): p. 29-39.
 109. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Noelle, R.J. and Vallera, D.A., *CD4(+) T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses.* J Clin Invest, 1998. 102(3): p. 473-82.

Danksagung

Prof. Dr. M. Hallek

danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und sein großes Interesse an diesem Thema

Dr. R. Buhmann

möchte ich ganz besonders für die gute Betreuung und Geduld danken. Ohne seine Unterstützung wäre die Erstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.

D. Westhaus

danke ich für die hervorragende technische Unterstützung

Allen Mitarbeitern

der Arbeitsgruppe Hallek danke ich für ihre fachliche Unterstützung und freundliche Aufnahme in ihr Labor

Meiner Familie und meinen Freunden

für die Hilfe und Unterstützung während meines Studiums

Lebenslauf

Persönliche Angaben

<i>Name</i>	Jutta Helga Rehkla
<i>Geburtsdatum</i>	06. August 1974
<i>Geburtsort</i>	München
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Eltern</i>	Ernst Rehkla, Beamter i. R. Anneliese Rehkla, geb. Impekoven, Industriekauffrau i. R.

Schulbildung

<i>1981-1985</i>	Besuch der Kerschensteiner Grundschule in Germering
<i>1985-1994</i>	Besuch des Karlsruhgymnasiums München-Pasing, humanistischer Ausbildungszweig (Latein, Englisch, Altgriechisch)
<i>1994</i>	Abitur

Universität

<i>1994</i>	Studium der Rechtswissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>1995 - 2002</i>	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München