

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Die purinerge Regulation der Mitochondrienaktivität in unstimulierten CD4⁺-T-Lymphozyten und deren potentielle Bedeutung für die T-Zellsuppression in der Sepsis

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

Vorgelegt von
Stephan Ledderose
aus
München

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Briegel

Mitberichterstatter: PD Dr. Christian P. Schneider
PD Dr. Johannes Tschöp
Dr. Dirk Baumjohann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Wolfgang Junger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 02. 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Definition und Stadien der Sepsis	8
1.2. CD4 ⁺ -T-Zell-Aktivierung	10
1.3. Purinerge Signaltransduktion	11
1.3.1. Autokrine purinerge Signaltransduktion in T-Zellen	13
1.3.2. Amplifizierung des TCR/CD28-Signals durch das Zusammenspiel von Mitochondrien und purinerger Signaltransduktion	14
2. Fragestellung	17
3. Material	18
3.1. Reagenzien	18
3.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe	18
3.1.2. Antikörper	18
3.1.3. Antagonisten, Agonisten, Inhibitoren	18
3.1.4. Reagenzien für die Herstellung von Puffern und Medien	19
3.1.5. Sonstige Reagenzien	19
3.2. Verbrauchsmaterial	20
3.3. Geräte	20
3.4. Software	20
4. Methodik	21
4.1. Zellen und Zellkultur	21
4.1.1. Kultivierung von Jurkat-Zellen	21
4.1.2. Patienten und gesunde Probanden	21
4.1.3. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMCs)	23
4.1.4. Separation humaner Leukozyten	23
4.2. Durchflusszytometrische Messungen	23

4.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	24
4.2.2. Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen	24
4.3. Bestimmung der mitochondrialen Aktivität	27
4.3.1. Messung der Mitochondrien-assoziierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	27
4.3.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)	27
4.4. Charakterisierung des Einflusses purinerge Rezeptoren auf die basale mitochondriale Aktivität unstimulierter CD4 ⁺ -T-Zellen	28
4.4.1. Behandlung mit P2X- und P2Y-Inhibitoren	28
4.4.2. Behandlung mit Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten	28
4.5. Messung der mitochondrialen ROS-Produktion mit dem Fluoreszenzmikroskop	30
4.6. Vergleich von septischen und gesunden CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	30
4.6.1. Bestimmung der basalen Mitochondrienaktivität	30
4.6.2. Messung von intrazellulärem Calcium mit Fluo-4 AM	30
4.6.3. Bestimmung von intrazellulärem ATP mit dem Luciferin-Luciferase-Assay	31
4.7. Statistische Auswertung	32
5. Ergebnisse	33
5.1. Einfluss von P2-Rezeptoren auf die basale mitochondriale Aktivität unstimulierter CD4 ⁺ -T-Zellen	33
5.1.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch unspezifische P2-Rezeptorblockade - Fluoreszenzmikroskopische Messung	33
5.1.2. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch unspezifische P2-Rezeptorblockade - Durchflusszytometrische Messung	34
5.2. Regulation der basalen mitochondrialen Aktivität durch P2X-Rezeptoren	39
5.2.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch P2X1-Rezeptorblockade	39
5.2.2. Unabhängigkeit der basalen mitochondrialen Aktivität von P2X4-Rezeptorstimulation	42

5.2.3. Einfluss von P2X7-Rezeptoren auf die basale Mitochondrienaktivität	43
5.3. Regulation der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y11 und P2Y12	44
5.3.1. Negative Regulation der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y11-Rezeptoren	44
5.3.2. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y12	45
5.4. Suppression der basalen mitochondrialen Aktivität durch Adenosin	47
5.4.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch Stimulation des A2A-Rezeptors	47
5.4.2. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch Blockade des A2A-Rezeptors	49
5.4.3. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch Inhibition der Proteinkinase A	50
5.5. Beeinträchtigungen von basaler Mitochondrienaktivität und Calcium-Signaling in CD4 ⁺ -T-Zellen von Sepsispatienten	52
5.5.1. Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität	52
5.5.2. Beeinträchtigung der Calcium-Antwort auf Stimulation	54
6. Diskussion	56
6.1. Regulation der basalen mitochondrialen Aktivität durch purinerge Signaltransduktion	56
6.1.1. Stimulation der basalen Mitochondrienaktivität über die Purinorezeptoren P2X1, P2X7 und P2Y12	56
6.1.1.1. Einfluss von P2X1, P2X4 und P2X7	56
6.1.1.2. Einfluss von P2Y12	57
6.1.2. Suppression über die Purinorezeptoren P2Y11 und A2A	58
6.1.2.1. Einfluss von P2Y11	58
6.1.2.2. Einfluss von Adenosin	59
6.2. Unterschiede zwischen Jurkat-T-Lymphozyten und primären CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	60
6.3. Mögliche Bedeutung der Regulation der mitochondrialen ATP-Produktion in unstimulierten CD4 ⁺ -T-Zellen durch basal aktivierte Purinorezeptoren	61

6.4. Bedeutung des basalen autokrinen purinergen Regelkreises für die CD4 ⁺ -T-Zellfunktion in der Sepsis	64
6.5. Mögliche Faktoren, durch die die basale purinerge Signaltransduktion gestört werden kann	66
6.5.1. ATP als negativer Immunmodulator	66
6.5.2. Adenosin als negativer Immunmodulator	67
6.6. Ausblick	68
7. Zusammenfassung	70
8. Literaturverzeichnis	72
9. Abkürzungen	84
10. Veröffentlichungen	86
11. Danksagung	87

1. Einleitung

1.1. Definition und Stadien der Sepsis

Die Therapie der Sepsis stellt eine der größten Herausforderungen für die moderne Intensivmedizin dar. Trotz intensiver Forschung und verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die Letalität der Sepsis über die letzten Jahre fast unverändert hoch geblieben [1-3]. Pro Jahr erkranken in Deutschland etwa 110 von 100.000 Einwohnern. Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung ist in Zukunft weiterhin mit einer steigenden Inzidenz zu rechnen [4-6].

Die Definition der Sepsis wurde 2016 neu überarbeitet und grundsätzlich vereinfacht. Die Sepsis ist als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, die infolge einer dysregulierten Immunantwort auf eine mutmaßliche oder nachgewiesene Infektion entsteht. Eine relevante Organdysfunktion liegt dabei vor, wenn der SOFA-Score (s. Tab. 1) um ≥ 2 Punkte ansteigt. Die Maximalform der Sepsis ist der Septische Schock (Sepsis mit Erforderlichkeit einer Katecholamintherapie bei Hypotonie trotz adäquater Volumengabe und ein Serum-Laktat > 2 mmol/L), bei dessen Nachweis die Krankenhaussterblichkeit bei über 40 % liegt [7].

Tabelle 1. SOFA-Score (Sepsis-related organ failure assessment-Score (nach [8])).

	Parameter	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.
Lungenfunktion	P_aO_2/FiO_2	<400	<300	<200 (Beatmung)	<100 (Beatmung)
Blutbild	Thrombozyten (1000/mm ³)	<150	<100	<50	<20
Leberfunktion	Bilirubin (mg/dL)	1,2–1,9	2,0–5,9	6–11,9	≥ 12
Kreislauf	MAD (\pm Katecholamine)	<70	KD niedrig	KD mittel	KD hoch
ZNS	GCS	13–14	10–12	6–9	<6
Nierenfunktion	Kreatinin (mg/dL)	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 bzw. Oligurie	≥ 5 bzw. Anurie

PaO_2 , arterieller Sauerstoffpartialdruck; FiO_2 , inspiratorische O_2 -Fraktion; MAD, mittlerer arterieller Druck; GCS, Glasgow Coma Scale; KD, Katecholamindosis

Das klinische Bild der Sepsis entsteht durch eine komplexe Dysregulation von pro- und antiinflammatorischen Immunmechanismen. Häufigster Auslöser ist dabei eine bakterielle pulmonale Infektion, gefolgt von abdominellen Infektionen und urogenitalen Infektionen [6, 9, 10]. Die Frühphase der Sepsis ist durch eine Hyperinflammation (*systemic inflammatory response syndrome - SIRS*) gekennzeichnet, in deren Verlauf es zu schweren Schädigungen von körpereigenem Gewebe kommen kann. Auf die massive proinflammatorische Reaktion folgt physiologischerweise die Aktivierung antiinflammatorischer Mechanismen. Fällt diese kompensatorische Gegenregulation jedoch unverhältnismäßig stark aus, kann sie im weiteren Verlauf der Sepsis Ursache für eine ausgeprägte Suppression der zellvermittelten Immunantwort sein (*compensatory antiinflammatory response syndrome - CARS*) und so das Auftreten von Sekundär- und Superinfektionen begünstigen [10-14].

Diese sogenannte "Phase der Immunparalyse" zeichnet sich unter anderem durch eine ausgeprägte Apoptose vieler Immunzell-Typen und eine schwere T-Zellsuppression aus [15, 16]. Besonders schwerwiegend ist dabei die Dysfunktion von CD4⁺-T-Lymphozyten, die eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungsvorgängen spielen [17].

CD4⁺-T-Helferzellen beeinflussen sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort und sind essentiell für die Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen sowie die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses [18-20]. In der immunparalytischen Phase der Sepsis können CD4⁺-T-Zellen ihre wichtigen Funktionen jedoch nicht mehr ausüben. Vielmehr befinden sie sich in einer Anergie-ähnlichen Starre und einem Zustand der Erschöpfung (*T cell exhaustion* [21]), was eine suffiziente Aktivierung des adaptiven Immunsystems verhindert und eine erfolgreiche Bekämpfung der Infektion unmöglich macht [21-24].

Die Therapie der Sepsis stützt sich mit Ausnahme der chirurgischen Herdsanierung und der antimikrobiellen Therapie immer noch überwiegend auf supportive Maßnahmen. Mehrere neu entwickelte Therapieverfahren konnten sich in klinischen Studien nicht bewähren [23, 25-36]. Dabei zielten die meisten dieser Ansätze auf eine Eindämmung der Hyperinflammation in der akuten Phase der Sepsis ab. Unter anderem kamen in unterschiedlichen Studien Hydrokortison [28], Toll-like-Rezeptor-4-Antagonisten [31], rekombinantes Protein C [26, 27, 30], Anti-Endotoxin-Antikörper

[36], Anti-Zytokin-Antikörper [33, 35] oder Zytokin-Rezeptor-Antagonisten [34] zum Einsatz, allerdings konnte letztlich für keine dieser Substanzen ein sicherer, signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden.

Dank einiger Fortschritte in der supportiven intensivmedizinischen Therapie ist die Letalität in der akuten Phase der Sepsis mittlerweile zwar gesunken; die meisten Patienten sterben heutzutage jedoch in der sich anschließenden, oft monatelangen Phase der Immunparalyse an den Folgen opportunistischer und nosokomialer Infektionen. Die Ausprägung der Immunsuppression scheint also für den Verlauf der Sepsis und das Überleben der Patienten von größerer Bedeutung zu sein als das akute Stadium der Hyperinflammation [37-39].

Vor diesem Hintergrund stellt die pharmakologische Beeinflussung der CD4⁺-T-Zellsuppression einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Strategien in der Sepsistherapie dar [23, 40, 41]. Allerdings ist hierfür ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen essentiell.

1.2. CD4⁺-T-Zell-Aktivierung

Entscheidend für die Generierung einer effektiven zellvermittelten Immunantwort ist die Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten. Die dafür nötigen Signale werden von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) vermittelt. Exogene Antigene (z.B. Bakterien) werden von Makrophagen und anderen APCs phagozytiert und intrazellulär prozessiert. Einzelne Peptidfragmente werden anschließend an MHC (*major histocompatibility complex*) -Klasse-II-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche exprimiert. Der Komplex aus MHC-Klasse-II-Molekülen und Peptidfragment kann von CD4⁺-T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor (TCR) und das damit assoziierte CD4-Molekül erkannt werden. Dabei kommt es zwischen APC und T-Zelle zur Ausbildung der sogenannten "Immunologischen Synapse", an der noch weitere Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle beteiligt sind [42, 43]. Wichtige Vertreter sind unter anderem die CD3-Molekülgruppe, die für die Signaltransduktion nach Kontakt mit antigenbeladenen MHC-Molekülen unerlässlich ist, sowie CD28, dessen Interaktion mit den APC-Molekülen CD80/CD86 ein wichtiges kostimulatorisches Signal für die Initiation der T-Zellaktivierung und -proliferation darstellt [44].

T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen mit hoher Sensitivität und Selektivität [45]. Die limitierte Anzahl an TCRs und Antigenen an der Immunologischen Synapse macht es dabei notwendig, dass das relativ schwache TCR/CD28-Signal durch verschiedene Amplifikationsmechanismen verstärkt wird, um eine adäquate T-Zell-Aktivierung zu erreichen [46, 47]. Eine wichtige Rolle kommt hierbei der purinergen Signaltransduktion zu [48, 49].

1.3. Purinerge Signaltransduktion

Der Begriff der Purinergen Signaltransduktion (*Purinergic Signaling*) beschreibt die extrazelluläre Signalübertragung durch Purin- und Pyrimidin-Nukleotide bzw. -Nukleoside, die an sogenannte Purinorezeptoren binden. Die kontrollierte Freisetzung von ATP aus intakten Zellen zur Signalübermittlung wurde im Jahr 1970 von Geoffrey Burnstock zum ersten Mal an Neuronen beobachtet [50]. Mittlerweile konnte das Konzept der purinergen Signaltransduktion auf fast alle menschlichen Zellen übertragen werden. *Purinergic Signaling* ist heutzutage als grundlegende, ubiquitäre Form der interzellulären Kommunikation anerkannt und spielt eine wichtige Rolle für die Funktion und Regulation diverser Organsysteme (z.B. zentrales und peripheres Nervensystem, kardiovaskuläres, respiratorisches, gastrointestinales, urogenitales, hämatologisches, muskuloskelettales System, Immunsystem) [51, 52].

ATP kann physiologischerweise durch verschiedene Mechanismen in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Zu diesen Mechanismen zählen vesikuläre Exozytose, spannungsgesteuerte oder mechanosensitive Ionenkanäle, Pannexin-Kanäle und Connexin-Hemichannels [53]. Im Extrazellulärraum erfolgt durch Ektonukleotidasen die schrittweise Hydrolyse von ATP zu ADP, AMP und Adenosin [54].

Der autokrin oder parakrin kommunizierte Effekt der als Transmitter fungierenden Purine wird über verschiedene Purinorezeptoren vermittelt. Je nach involviertem Rezeptor kommt es zu einer Verstärkung, Inhibition oder Modulation von bestimmten zellulären Vorgängen [55]. Bisher sind 19 purinerge Rezeptoren bekannt, die aufgrund ihrer pharmakologischen und strukturellen Eigenschaften in drei große Gruppen eingeteilt werden: Die P2X-, P2Y- und P1-Rezeptoren [56].

P2X-Rezeptoren sind ATP-abhängige Ionenkanäle, die den Einstrom von extrazellulären Kationen wie Ca^{2+} ermöglichen. Innerhalb der P2X-Rezeptorgruppe werden 7 Typen unterschieden (P2X1-7) [57-59].

P2Y-Rezeptoren sind Rezeptoren, die an inhibitorische (G_i), Phospholipase C-abhängige (G_q) oder cAMP-regulierende G-Proteine (G_s) gekoppelt sind. Die Gruppe der P2Y-Rezeptoren besteht aus acht Rezeptoren (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 und P2Y14) mit unterschiedlichen Liganden (ATP, ADP, UTP, UDP) [60].

Auch P1-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, der zugehörige Ligand ist Adenosin. Es werden vier P1- oder Adenosin-Rezeptoren unterschieden (A1, A2A, A2B, A3). A1- und A3-Adenosinrezeptoren sind an ein G_i -Protein gekoppelt und hemmen die Adenylatzyklase, die die Bildung des intrazellulären Botenstoff cAMP aus ATP katalysiert. A2A- und A2B-Rezeptoren stimulieren über ein G_s -Protein die Adenylatzyklase [61].

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Komponenten der purinergen Signaltransduktion.

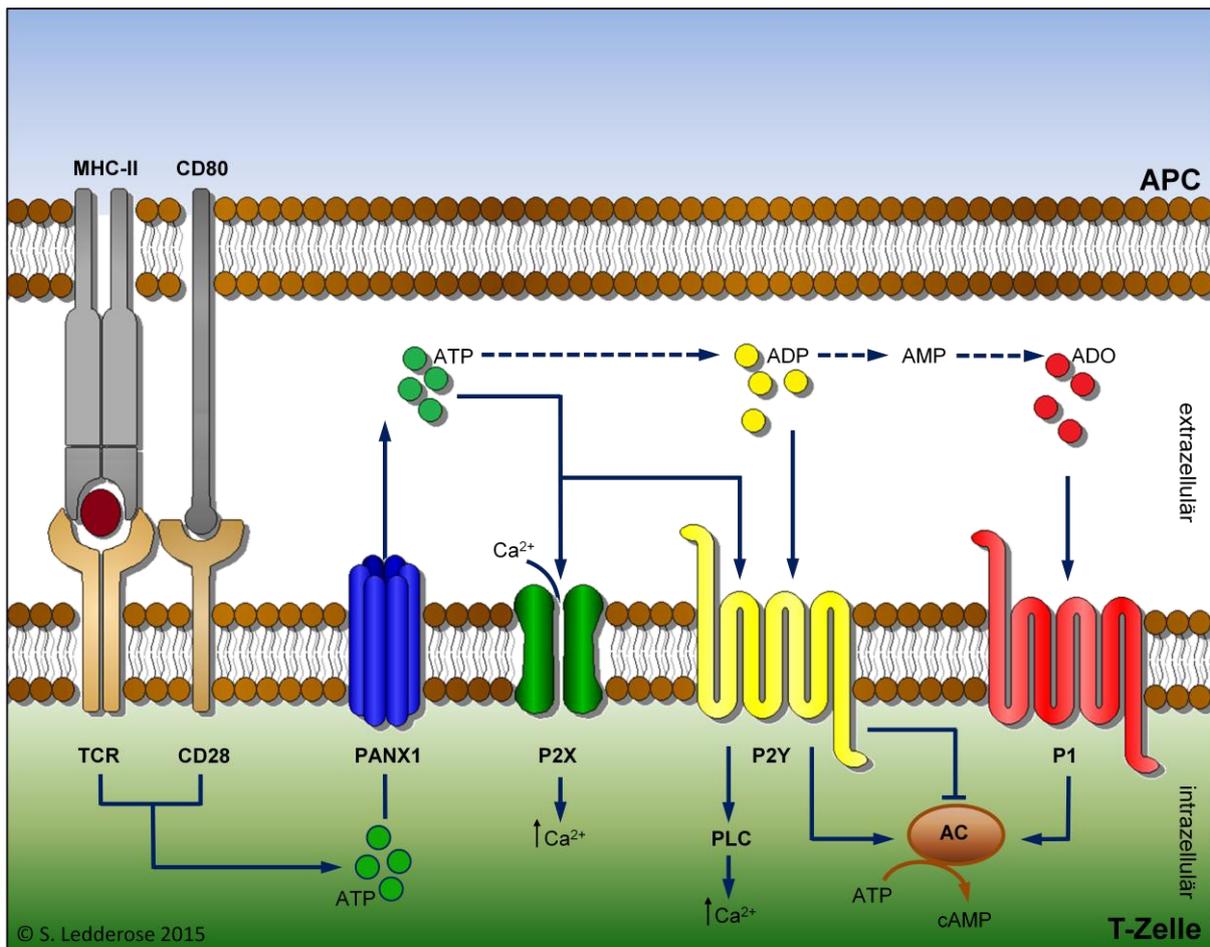


Abbildung 1. Schlüsselkomponenten der purinergen Signalübertragung. Nach der Zellaktivierung (z.B. T-Zellaktivierung durch TCR/CD28-Stimulation) kommt es zur Freisetzung von ATP durch verschiedene Mechanismen (z.B. Pannexin-1-Kanäle, PANX1). ATP wird im Extrazellularraum durch Ektonukleotidasen zu ADP, AMP und Adenosin (ADO) abgebaut, die bestimmte Purinorezeptoren stimulieren: ATP ist Ligand an P2X- und P2Y-Rezeptoren, ADP bindet an P2Y-Rezeptoren, Adenosin an P1-Rezeptoren. APC, antigenpräsentierende Zelle; AC, Adenylatzyklase; PLC, Phospholipase C. Abbildung modifiziert nach [48].

1.3.1. Autokrine purinerge Signaltransduktion in T-Zellen

Die autokrine purinerge Signalübertragung spielt eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen [48, 49, 62-64]. T-Zellen exprimieren die purinergen Rezeptoren P2X1, P2X4, P2X5 und P2X7, die P2Y-Rezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12 und P2Y13 sowie die P1-Rezeptoren A2A, A2B und A3 [48, 65-67]. Auf eine Stimulation des T-Zellrezeptors reagieren T-Zellen mit der Freisetzung von ATP in den Extrazellularraum. Neben der Freisetzung über vesikuläre Exozytose [68] wurden Pannexin-1-Kanäle als ein Hauptmechanismus identifiziert, über den T-Zellen ATP freisetzen [49, 63]. Das freigesetzte ATP vermittelt seine autokrine Wirkung vor allem über die zellmembranständigen

Purinorezeptoren P2X1, P2X4 und P2X7, wobei P2X1 und P2X4 nach der TCR-Stimulation zusammen mit PANX1 zur Immunologischen Synapse translozieren [49, 63]. Eine Aktivierung der P2X-Rezeptoren durch ATP hat den Einstrom von extrazellulären Calciumionen ins Zellinnere zur Folge. Damit wird eine Signalamplifikation des TCR/CD28-Signals erreicht, die für eine suffiziente Aktivierung von T-Zelleffektorfunktionen wie der IL-2-Produktion notwendig ist [49, 64]. Im Folgenden soll dieser Zusammenhang genauer beschrieben werden.

1.3.2. Amplifizierung des TCR/CD28-Signals durch das Zusammenspiel von Mitochondrien und purinergem Signaltransduktion

Das für die purinerge Signalverstärkung benötigte ATP wird in T-Zellen hauptsächlich über die Atmungskette in Mitochondrien gebildet, die nach TCR-Stimulation direkt zur Immunologischen Synapse wandern und dort akkumulieren [69, 70]. Neueste Ergebnisse zeigen, dass es dabei zwischen Mitochondrien und purinergem Signaltransduktion zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus kommt:

Die Interaktion des TCR mit seinem spezifischen Antigen führt zur Freisetzung von ATP über Pannexin-1 Kanäle in den Extrazellularraum und bewirkt dort über die autokrine Aktivierung von P2X-Rezeptoren einen Einstrom von Calcium ins Zellinnere [49, 63, 69]. Dadurch kommt es auch zu einer gesteigerten Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien, was wiederum durch die Aktivierung der Pyruvat-, α -Ketoglutarat-, und Isocitratdehydrogenase zu einer gesteigerten mitochondrialen ATP-Produktion und Freisetzung von ATP führt [71, 72]. Diese positive Rückkopplung reguliert die Aktivität der Mitochondrien und trägt gleichzeitig zu einer anhaltend Erhöhung des zytosolischen Calciums bei, was die Voraussetzung für nachfolgende Reaktionen wie die Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und in der Folge IL-2-Produktion und Zellproliferation ist [73, 74]. Die in den Mitochondrien als Nebenprodukt der ATP-Synthese anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fungieren als *second messenger* und werden ebenfalls für die NFAT-Aktivierung benötigt [75, 76].

Durch diese verstärkenden Mechanismen ist es möglich, dass das schwache Signal von nur wenigen antigen-stimulierten TCR/CD28-Komplexen ausreicht, um eine wirkungsvolle T-Zellantwort zu provozieren [63, 69]. Die Mitochondrien sind damit nicht nur die "Kraftwerke der Zelle", sondern auch die zentrale Schaltstelle bei der

Unstimulierte T-Lymphozyten setzen ebenfalls kontinuierlich ATP in Konzentrationen frei, die theoretisch für eine autokrine Stimulation von Purinorezeptoren ausreichend sind [77, 78]. Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob autokrines *Purinergic Signaling* in ruhenden T-Zellen zur Regulation der Mitochondrienaktivität beiträgt bzw. welche Rezeptoren daran beteiligt sind.

In der immunsuppressiven Phase der Sepsis zeigen fast alle T-Zellsubtypen eine verminderte Aktivierbarkeit [79]. Eine Störung im Zusammenspiel zwischen einer basalen autokrinen purinergen Signalübertragung und den Mitochondrien könnte eine mögliche Ursache für diese generalisierte T-Zellparalyse sein. Hauptziel dieser Studie war es daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen purinenger Signalübertragung und mitochondrialer Aktivität in unstimulierten CD4⁺-T-Lymphozyten zu untersuchen.

2. Fragestellung

Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- 1) Wird die mitochondriale Aktivität von unstimulierten CD4⁺-T-Zellen durch autokrine purinerge Signalübertragung beeinflusst?
- 2) Lässt sich ein möglicherweise unter 1) gefundener Zusammenhang genauer charakterisieren?
 - Welche Purinorezeptoren sind involviert?
 - Wie beeinflussen die einzelnen Purinorezeptoren die basale Mitochondrienaktivität?
- 3) Könnte eine Störung in der basalen purinergen Signalübertragung zu einer verminderten Aktivierbarkeit von T-Zellen in der Sepsis beitragen?

3. Material

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden folgende Materialien verwendet:

3.1. Reagenzien

3.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe

Fluo-4 AM	Molecular Probes, Grand Island, NY, USA
TMRE	Molecular Probes, Grand Island, NY, USA
DHR123	Molecular Probes, Grand Island, NY, USA

3.1.2. Antikörper

mouse-antihuman-anti-CD3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
mouse-antihuman-anti-CD28	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
mouse-antihuman-anti-CD4-APC	Biolegend, San Diego, CA, USA
goat-antimouse-IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.3. Antagonisten, Agonisten, Inhibitoren

Suramin	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
NF023	Tocris, Ballwin, MO, USA
5-BDBD	Tocris, Ballwin, MO, USA
A438079	Tocris, Ballwin, MO, USA
Clopidogrel	Tocris, Ballwin, MO, USA
NF157	Tocris, Ballwin, MO, USA
H89	Tocris, Ballwin, MO, USA
CGS21860	Tocris, Ballwin, MO, USA
PSB0777	Tocris, Ballwin, MO, USA

CSC Tocris, Ballwin, MO, USA

3.1.4. Reagenzien für die Herstellung von Puffern und Medien

RPMI-1640 ATCC, Manassas, VA, USA

complete RPMI:

10 % Fetales Rinderserum Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

100 µg/ml Streptomycin Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

100 U/ml Penicillin Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

RPMI-1640 ohne Phenolrot Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

HBSS Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Ficoll-Paque Plus GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA

FACS Flow BD Biosciences, San Jose, CA, USA

HyClone™ Water, Cell Culture Grade GE Healthcare Life Sciences, South Logan, UT, USA

3.1.5. Sonstige Reagenzien

A23187 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Perchlorsäure (PCA) Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

K₂PO₄ Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

ATP Determination Kit (A22066) Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

Humanes Fibronectin Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.2. Verbrauchsmaterial

Nunc Lab-tek II chambered coverglass (8-well Platte mit Glasboden) Nunc Lab-Tek, Rochester, NY, USA

Safe-Lock Eppendorf Tubes 1,5 ml Eppendorf, Danvers, MA, USA

5 ml-Falcon-Röhrchen BD Biosciences, San Jose, CA, USA

3.3. Geräte

FACSCalibur BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Leica DMI6000B Mikroskop Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Leica DFC365 FX Kamera Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Leica EFW DAPI/FITC/TRITC/CY5 Filter-Set (# 11532564) Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Mikroskoptischinkubator mit Temperaturkontrolle Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA

Mikrozentrifuge, Centrifuge 5414 Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Luminoskan Labsystems, Helsinki, Finnland

3.4. Software

BD Cellquest Pro BD Biosciences, San Jose, CA, USA

FlowJo 4.8 FlowJo LLC, Ashland, OR, USA

LeicaLAS Imaging Software Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Luminoskan Ascent Software 2.6 Thermo Labsystems Inc., Beverly, MA, USA

ImageJ NIH, Bethesda, MD, USA

SigmaPlot 11.0 SYSTAT Software, San Jose, CA, USA

4. Methodik

4.1. Zellen und Zellkultur

4.1.1. Kultivierung von Jurkat-Zellen

Die menschliche T-Zelllinie Jurkat (Klon E6-1) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von 10%-hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bei 37°C und 5% CO₂ im CO₂-Inkubator. Die Zellzahl wurde im Bereich von 1 - 5 x 10⁵ Zellen/ml konstant gehalten.

4.1.2. Patienten und gesunde Probanden

In diese Studie wurden 8 Patienten des Department of Emergency Medicine des Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC, Boston, MA, USA) mit den klinischen Diagnosen "Sepsis", "schwere Sepsis" oder "septischer Schock" eingeschlossen. Da die experimentelle Phase der vorliegenden Arbeit im Jahr 2014 begann, richtete sich die Diagnosestellung nach den Kriterien der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz von 1992 (s. Tabelle 2). Die Blutabnahme erfolgte 72 Stunden nach Diagnosestellung. Patienten, die jünger als 18 Jahre waren, schwanger waren oder immunsuppressive Medikamente erhielten, wurden von der Studie ausgeschlossen. In Tabelle 3 findet sich eine nähere Charakterisierung der Patienten. Für die Kontrollmessungen wurde Blut von freiwilligen, gesunden Spendern verwendet.

Die Studie wurde mit Genehmigung des *Institutional Review Board* des BIDMC durchgeführt. Alle gesunden Probanden und alle Patienten oder deren nächste Angehörige wurden eingehend aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Tabelle 2. Diagnosekriterien und Stadieneinteilung der Sepsis (nach [80]).

1. Klinischer oder mikrobiologischer Nachweis einer Infektion
2. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (mind. 2 Kriterien) - Fieber (> 38°C) oder Hypothermie (< 36°C) - Leukozytose (> 12000/mm ³), Leukopenie (< 4000/mm ³) oder Linksverschiebung mit > 10% unreifen neutrophilen Granulozyten - Tachykardie (HF > 90/min) - Tachypnoe (AF > 20/min) oder Hyperventilation (PaCO ₂ ≤ 32 mmHg)
3. Akute Organdysfunktion
4. Arterielle Hypotension (RR syst. < 90 mmHg bzw. MAD < 70 mmHg) oder notwendiger Vasopressoreinsatz
Differenzierung nach Schweregraden: Sepsis: Kriterien 1 und 2 Schwere Sepsis: Kriterien 1, 2 und 3 Septischer Schock: Kriterien 1 und 2 sowie 4 für mindestens 1 h

HF, Herzfrequenz; AF, Atemfrequenz; PaCO₂, arterieller Kohlendioxidpartialdruck; RR, Blutdruck; MAD, mittlerer arterieller Druck

Tabelle 3. Demographische Charakteristik der eingeschlossenen Patienten.

#	Alter (Jahre)	Geschlecht	Temperatur (°C)	Sepsis-Stadium	APACHE II	SOFA Score	Verstorben Ja/Nein
1	51	W	39,3	Septischer Schock	17	5	Nein
2	53	M	36,4	Septischer Schock	17	6	Nein
3	71	W	36,6	Septischer Schock	32	8	Ja
4	78	M	37,5	Sepsis	12	0	Nein
5	74	M	36,6	Septischer Schock	20	5	Nein
6	41	W	37,1	Schwere Sepsis	5	3	Nein
7	79	M	36,6	Schwere Sepsis	17	5	Nein
8	39	M	37,3	Schwere Sepsis	6	1	Nein

M, männlich; W, weiblich; SOFA Score, Sequential Organ Failure Assessment Score; APACHE II, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II

4.1.3. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*)

PBMCs wurden aus heparinisiertem, venösem Vollblut von gesunden und septischen Probanden isoliert. Dafür wurde 1 ml Blut im Verhältnis 1:1 mit RPMI-1640 Medium verdünnt. Diese Mischung wurde anschließend in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden auf 2 ml Ficoll-Paque Plus geschichtet und 30 min zentrifugiert (400 x g, Raumtemperatur). Dabei separierten sich die verschiedenen Zelltypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Während sich Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens ansammelten, verblieben die PBMCs an der Grenze zwischen Ficoll- und Plasmaphase. Nach der Zentrifugation wurde der PBMC-Ring nach Abhebung der ganz oben befindlichen Plasmaschicht abpipettiert, dreimal mit RPMI-1640 Medium gewaschen (300 x g, 10 min) und in RPMI-1640 Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde manuell mit einem Hämozytometer bestimmt und auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

4.1.4. Separation humaner Leukozyten

Für die Gewinnung von leukozytenreichem Plasma (LRP) wurden gesunden, freiwilligen Probanden oder Patienten, auf die die oben genannten Kriterien zutrafen, 3-5 ml Blut durch Punktion der Vena cubitalis abgenommen und mit Heparin (10 I.E./ml) antikoaguliert. Unmittelbar anschließend wurden 3 ml Vollblut auf 3 ml Ficoll-Paque Plus (Dichte: 1077 g/l) geschichtet und für 20 – 35 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach spontaner Sedimentation der Erythrozyten über den diskontinuierlichen Dichtegradienten konnten die oberen 0,6 ml des leukozytenreichen Überstands abpipettiert werden. Das so gewonnene leukozytenreiche Plasma (LRP) wurde direkt anschließend für die weitere Verarbeitung im Verhältnis 1:10 in Hanks' buffered salt solution (HBSS) suspendiert, und für 20 min bei 37 °C im vibrationsgeschützten Wasserbad inkubiert.

4.2. Durchflusszytometrische Messungen

Die Messungen der Mitochondrienfunktion und zytosolische Ca^{2+} -Messungen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt, weshalb hier kurz auf die allgemeinen Aspekte der durchflusszytometrischen Experimente eingegangen werden soll.

4.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Registrierung und Analyse diverser biochemischer und physikalischer Eigenschaften von Einzelzellen. Hierfür werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert und einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geleitet. Das beim Kontakt mit dem Laserstrahl entstehende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Detektoren aufgefangen und ausgewertet. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird dabei axial zum einfallenden Laserstrahl detektiert und hängt überwiegend vom Zellvolumen ab. Das rechtwinklig zum Laserstrahl registrierte Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) wird hingegen hauptsächlich von der intrazellulären Granularität sowie der Größe und Struktur des Zellkerns beeinflusst. Ebenfalls orthogonal zum Laserstrahl wird das Fluoreszenzlicht aufgenommen, das durch Lichtfilter, sogenannte Fluoreszenzkanäle (FL1, FL2, FL3, FL4) in bestimmte Farbbereiche zerlegt wird. So ergibt sich für jede einzelne Zelle eine charakteristische Kombination aus optischen Signalen, die anschließend am Computer dargestellt und ausgewertet werden können. Da sich die einzelnen Leukozytensubpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) in Größe und Granularität und damit auch in ihrem Signalmuster unterscheiden, können sie im SSC/FSC-Diagramm differenziert werden [81, 82]. Für alle durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwendet. Für jede Zelle wurde Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie die jeweilige Fluoreszenz bestimmt. Die Messung von FSC und SSC erfolgte mit linearer Verstärkung, die Fluoreszenzintensitäten wurden logarithmisch verstärkt aufgenommen.

4.2.2. Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen

Die FSC/SSC-Zweiparameterdarstellung ermöglichte bei Experimenten mit leukozytenreichem Plasma (LRP) die Identifizierung der Lymphozyten als mittelgroße Zellen mit niedriger Granularität (Abb. 3 A). Die Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen wurde durch Antikörperfärbung identifiziert. Hierfür wurden die Zellen für 10 min mit monoklonalen Anti-CD4-APC-Antikörpern (1:1000) inkubiert. Im FL4/SSC Dotplot konnten anschließend die Zellen mit positiver Anti-CD4-Färbung von der Gesamtzahl der Lymphozyten abgeteilt und für die weitere Auswertung mit einem Auswertefenster (Gate) markiert werden (Abb. 3 B).

Für die Auswertung der Messungen mit Jurkat-Zellen wurde ein Gate auf die Hauptpopulation gelegt (Abb. 3 C).

Für die so ausgewählten Zellpopulationen wurde anschließend die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten des jeweiligen Farbstoffs als Histogramm dargestellt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt.

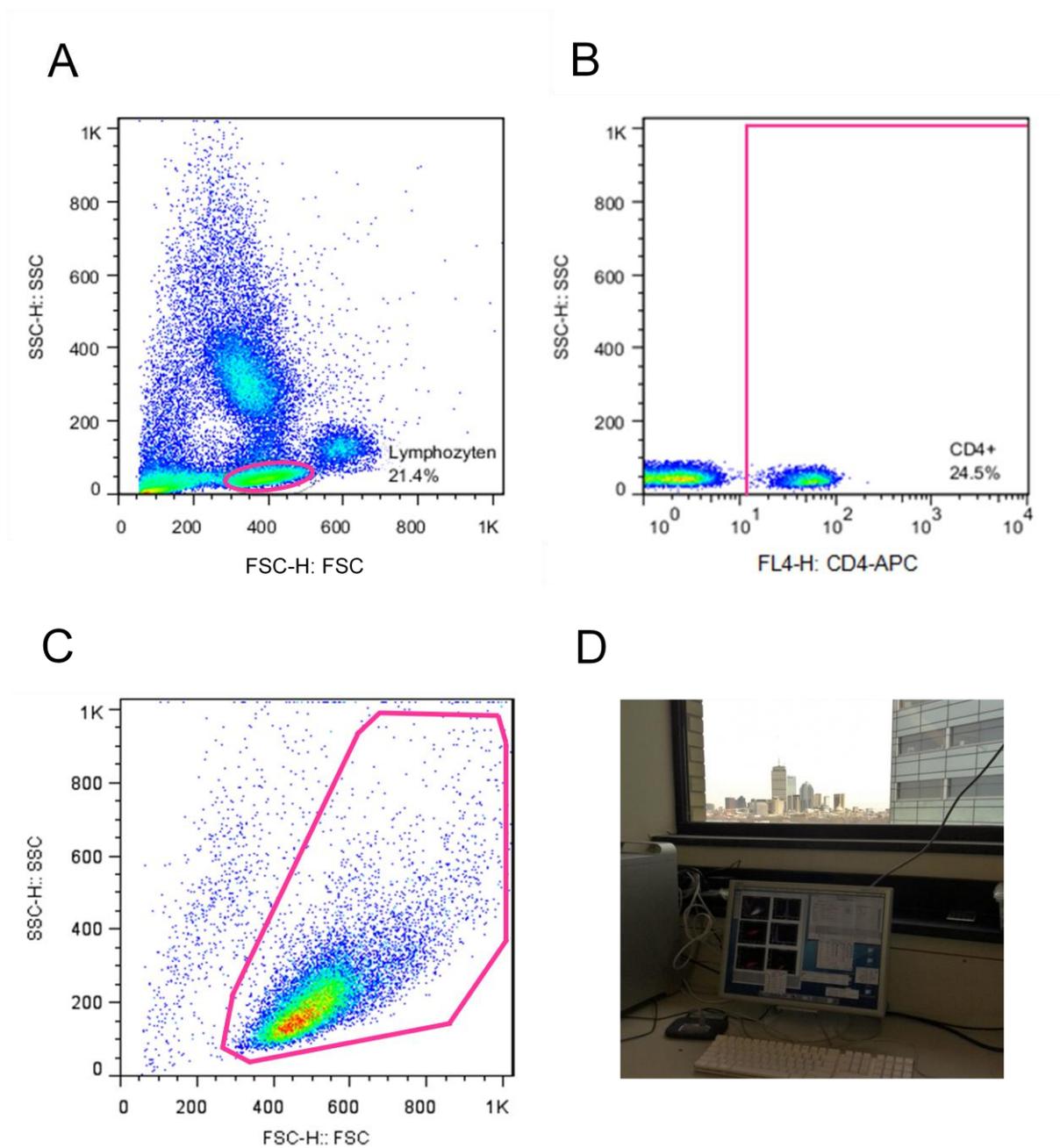


Abbildung 3. Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen. (A) Darstellung aller Zellen im FSC/SSC-Dotplot. Identifizierung und Gating der Lymphozytensubpopulation anhand von Größe und Granularität. (B) Darstellung der in (A) markierten Lymphozytenpopulation in FL4/SSC-Zweiparameterdarstellung. Das farbige Gate umschließt die mittels Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung identifizierte CD4⁺-Lymphozyten. (C) Auswertefenster um die Jurkat-T-Zellen-Hauptpopulation. Bei allen Abbildungen handelt es sich um repräsentative Beispiele. (D) FACS-Messungen in Boston.

4.3. Bestimmung der mitochondrialen Aktivität

Um eine unkontrollierte ATP-Freisetzung durch mechanische Stimulation oder thermischen Stress auszuschließen, erfolgten alle Inkubationsschritte im vibrationsgeschützten und temperaturkontrollierten Wasserbad bei 37°C.

4.3.1. Messung der Mitochondrien-assoziierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Unter dem Begriff ROS (*reactive oxygen species*) werden reaktive Formen des Sauerstoffs wie Hyperoxidanion und H₂O₂ zusammengefasst. In T-Zellen fallen ROS unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran an [83]. Die Bildung von mitochondrialen ROS kann mittels des Indikators Dihydrorhodamin-123 (DHR123) gemessen werden [84]. DHR123 ist eine nicht fluoreszierende, ungeladene Substanz, die frei durch die Zellmembran diffundiert und nach Aufnahme in die Zelle von reaktiven Sauerstoffspezies zum grün fluoreszierenden, nur schlecht membrangängigen Rhodamin-123 oxidiert wird. Da mit gesteigerter ATP-Produktion mehr ROS und damit auch mehr Rhodamin-123 gebildet wird, kann die Rhodamin-123-Fluoreszenzintensität als indirektes Maß für die Mitochondrienaktivität und mitochondriale ATP-Produktion angesehen werden [85, 86]. Die Rhodamin-123-Fluoreszenz wird im FL1-Kanal des Durchflusszytometers gemessen.

Für die Messung der basalen mitochondrialen ATP-Produktion mittels Rhodamin-123 wurden Jurkat-Zellen oder leukozytenreiches Plasma von septischen bzw. gesunden Probanden mit DHR123 (Jurkat-Zellen: 10 µM, LRP: 45 µM) für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Konversion von DHR123 zu Rhodamin-123 zu stoppen, wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit auf Eis überführt und dort bis zum Abschluss der durchflusszytometrischen Analyse gelagert.

4.3.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)

$\Delta\psi_m$ ist der Unterschied im elektrischen Potential über der inneren Mitochondrienmembran, das für die Aufrechterhaltung des für die ATP-Produktion notwendigen Protonengradienten wichtig ist. Veränderungen im Membranpotential der Mitochondrien können mittels Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) gemessen werden. TMRE ist ein kationischer, rot-orange fluoreszierender Farbstoff, der sich in

den negativ geladenen Mitochondrien proportional zu $\Delta\psi_m$ anreichert. Sinkt $\Delta\psi_m$ z.B. aufgrund einer mitochondrialen Schädigung oder einer verringerten Mitochondrienaktivität, akkumuliert auch weniger TMRE. Die daraus resultierende schwächere Fluoreszenzintensität kann mit dem Durchflusszytometer über den FL2-Kanal detektiert werden [87].

Jurkat-T-Zellen sowie LRP von septischen Patienten oder gesunden Freiwilligen wurden für 15 min mit TMRE (Jurkat-Zellen: 30 nM; LRP: 100 nM) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte sofort die durchflusszytometrische Messung.

4.4. Charakterisierung des Einflusses purinerger Rezeptoren auf die basale mitochondriale Aktivität unstimulierter CD4⁺-T-Zellen

4.4.1. Behandlung mit P2X- und P2Y-Inhibitoren

Der Effekt einer Inhibition von P2-Purinorezeptoren auf die mitochondriale Aktivität wurde an Jurkat-T-Zellen und primären CD4⁺-T-Zellen untersucht. Jurkat-Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 /ml für 20 min bei 37°C im vibrationsgeschützten Wasserbad inkubiert. LRP wurde im Verhältnis 1:10 mit HBSS verdünnt, mit Anti-CD4-APC-Antikörpern in einer Konzentration von 1:1000 gefärbt und für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der P2X/P2Y-Antagonisten (s. Tab. 4) in den jeweils angegebenen Konzentrationen. In jeder Versuchsreihe wurden unbehandelte Proben als Negativkontrollen mitgeführt.

Nach weiteren 15 min Inkubationszeit wurde - wie unter Punkt 4.3.1. und 4.3.2. beschrieben - als Fluoreszenzfarbstoff DHR123 oder TMRE zugegeben. Nach 15 min erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Das Endvolumen pro Ansatz betrug in den Experimenten mit Jurkat-Zellen 220 μ l, in den Messungen mit primären T-Zellen 200 μ l. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über das experimentelle Vorgehen. Eine Aufzählung der verwendeten Reagenzien findet sich in Tabelle 5.

4.4.2. Behandlung mit Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten

Der Effekt einer Stimulation oder Inhibition von A2A-Rezeptoren auf die basale Mitochondrienaktivität wurde analog zu 4.4.1. untersucht. Das Vorgehen ist in Tabelle 4 dargestellt. Eine Aufzählung der verwendeten Reagenzien findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 4. Inkubationsschema zur Bestimmung der basalen mitochondrialen Aktivität von CD4⁺-T-Lymphozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Purinorezeptoren.

		Inkubation		Inkubation	Zugabe von	Inkubation		
Jurkat-T-Zellen	5x10 ⁵ /ml	37°C	Zugabe von Inhibitoren, Agonisten oder Medium (Kontrolle)	37°C	DHR: 10 µM TMRE: 30 nM	37°C	Überführung und Lagerung auf Eis	F A C S
LRP	1:10 in HBSS; Anti-CD4-APC-AK (1:1000)	isolation table 20 min		isolation table 15 min	DHR: 45 µM TMRE: 100 nM	isolation table 15 min		

LRP, leukozytenreiches Plasma; AK, Antikörper; isolation table, vibrationsgeschütztes Wasserbad

Tabelle 5. Verwendete Antagonisten/Agonisten

Antagonist/Agonist	Beschreibung
Suramin	unspezifischer P2-Rezeptorantagonist
NF023	P2X1-Rezeptorantagonist
5-BDBD	P2X4-Rezeptorantagonist
A438079	P2X7-Rezeptorantagonist
NF157	P2X1-/P2Y11-Rezeptorantagonist
NF340	P2Y11-Rezeptorantagonist
Clopidogrel	P2Y12-Rezeptorantagonist
CGS21680	A2A-Rezeptoragonist
PSB0777	A2A-Rezeptoragonist
CSC	A2A-Rezeptorantagonist
H89	PKA-Inhibitor

4.5. Messung der mitochondrialen ROS-Produktion mit dem Fluoreszenzmikroskop

8-well-Platten mit Glasboden (Nunc Lab-Tek II chambered coverglass) wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit humanem Fibronectin (40 µg/ml) beschichtet und anschließend dreimal mit HBSS gewaschen. Jurkatzellen (4×10^5 /ml) wurden in die *wells* gegeben und für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden daraufhin vorsichtig mit RPMI-Medium ohne Phenolrot gewaschen. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 200 µM Suramin behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung durch 20-minütige Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DHR123 (10 µM). Die DHR123-Fluoreszenz wurde mit einem inversen Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filtersets (EFW Excitation FITC-Filter-Set; BP: 490/20 nm; dichroic mirror 505 nm; EFW Emission: 525/36 nm) analysiert. Hellfeld- bzw. Fluoreszenzbilder wurden mit einer Leica DFC365 FX-Kamera durch ein 100x Öl-Immersionsobjektiv (NA 1.4) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ (NIH). Der Einsatz eines Mikroskoptischinkubators garantierte eine konstante Temperatur von 37°C während des gesamten Experiments.

4.6. Vergleich von septischen und gesunden CD4⁺-T-Lymphozyten

4.6.1. Bestimmung der basalen Mitochondrienaktivität

Die Messung der basalen mitochondrialen Aktivität von CD4⁺-T-Zellen erfolgte wie unter 4.3. beschrieben durch Inkubation von Sepsis- bzw. Kontroll-LRP mit DHR123 oder TMRE und die anschließende Analyse mit dem Durchflusszytometer (s. 4.2.2.).

4.6.2. Messung von intrazellulärem Calcium mit Fluo-4 AM

Fluo-4 Acetoxymethylester (Fluo-4 AM) ist ein grün fluoreszierender Calcium-Indikator, mit dem sich relative Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration bestimmen lassen. Die AM-Ester-Form verhindert eine Bindung von Ca²⁺ und sorgt für eine hohe Zellmembrangängigkeit. Im Intrazellularraum spalten Esterasen die Esterbindung, sodass der Farbstoff die Zelle einerseits nicht mehr verlassen kann, andererseits die Bindung von Ca²⁺ möglich wird. Bei Bindung von Ca²⁺ steigt die Fluoreszenzemission des Farbstoffs. Der

entstehende Intensitätsunterschied kann durchflusszytometrisch im FL1-Kanal detektiert und quantifiziert werden [88].

Das aus dem heparinisierten Vollblut von septischen Patienten oder gesunden Kontroll-Probanden gewonnene LRP wurde für 40 min bei 37 °C mit Fluo-4 AM (5 µM) geladen. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte in einer insgesamt fünfminütigen Echtzeitmessung die durchflusszytometrische Bestimmung der Fluo-4 AM - Fluoreszenzintensität als Maß für die Calcium-Antwort nach Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28-Antikörpern (0.5 µg/ml, Zugabe unmittelbar vor Beginn der Messung) und Cross-linking durch anti-Maus-IgG-Antikörpern (1:1000, Zugabe nach 30 Sekunden). Als Kontrolle für das maximale Fluoreszenzsignal wurde 1 min vor Ende der Messung das Kalzium-Ionophor A23187 (50 µM) zugegeben. Das Endvolumen betrug pro Ansatz 400 µl.

4.6.3. Bestimmung von intrazellulärem ATP mit dem Luciferin-Luciferase-Assay

Mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Assays kann die ATP-Konzentration in Zelllysaten oder Zellkulturüberständen durch Messung der Biolumineszenz bestimmt werden. Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin zum Licht-emittierenden Biolumineszenz-Produkt Oxyluciferin unter der Verwendung von ATP als Co-Substrat. Die Intensität der entstehenden Biolumineszenz ist dabei direkt proportional zur ATP-Konzentration in der Probe.

PBMCs wurden unmittelbar nach ihrer Isolierung (s. 4.1.3.) auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen in 200 µl RPMI-1640 Medium eingestellt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben wurden anschließend auf Eis aufgetaut und zur Proteindenaturierung sofort mit 0.4 M PCA (Perchlorsäure) versetzt, um eine ATP-Hydrolyse durch Ektonukleotidasen zu verhindern. Anschließend erfolgte das Aufbrechen der Zellen mit einem Ultraschall-Homogenisator (10 Pulse, für jeweils 1 s). Das Zelllysate wurde anschließend für 10 min bei 16000 x g und 0 °C zentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden zur PCA-Neutralisierung mit 400 mM K_2HPO_4 (Dikaliumhydrogenphosphat) vermischt und nochmals zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 0 °C). 2 µl des Überstands wurden im Verhältnis 1:100 mit gereinigtem Zell-Kultur-Wasser verdünnt und sofort mit dem ATP Determination KIT (Invitrogen Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers analysiert. Die ATP-Konzentration

in den Proben wurde mit Hilfe einer ATP-Standard-Kurve bestimmt. Die Umrechnung in mM pro Zelle erfolgte unter Annahme eines Zellvolumens von 190 fl [89].

4.7. Statistische Auswertung

Sofern nicht anders vermerkt, sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, standard deviation) von $n \geq 3$ Experimenten angegeben. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem T-Test für verbundene und unverbundene Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

5. Ergebnisse

T-Zellen reagieren auf die Präsentation ihres spezifischen Antigens durch eine antigenpräsentierende Zelle mit der Bildung einer immunologischen Synapse und der Freisetzung von ATP in den synaptischen Spalt [48, 49, 63, 64]. Das ATP wird hauptsächlich über die mitochondriale Atmungskette gebildet und spielt eine tragende Rolle bei der Regulation der T-Zelleffektorfunktionen durch autokrine purinerge Signaltransduktion, die auch die mitochondriale Aktivität im Sinne eines positiven Feedbacks weiter erhöht [69, 76]. Ruhende, unstimulierte Lymphozyten setzen ebenfalls kontinuierlich ATP frei [77]. Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob autokrines *Purinergic Signaling* auch bei unstimulierten T-Zellen zur Regulation der Mitochondrienaktivität beiträgt bzw. welche Rezeptoren daran beteiligt sind.

5.1. Einfluss von P2-Rezeptoren auf die basale mitochondriale Aktivität unstimulierter CD4⁺-T-Zellen

Um eine mögliche Beeinflussung der basalen mitochondrialen Aktivität durch purinerge Signalübertragung am P2X- bzw. P2Y-Rezeptor zu testen, wurden unstimulierte CD4⁺-T-Zellen und Jurkat-T-Zellen mit P2-Purinorezeptor-Antagonisten behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Mitochondrienaktivität mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe DHR123 oder TMRE.

5.1.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch unspezifische P2-Rezeptorblockade - Fluoreszenzmikroskopische Messung

Um zu verifizieren, dass DHR123 überwiegend die Mitochondrien anfärbt, wurden Jurkat-Zellen mit DHR123 inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei zeigte sich eine mitochondrientypische Anfärbung (Abb. 4 A). Eine Behandlung mit dem unspezifischen P2-Rezeptorantagonisten Suramin führte zu einer deutlichen Verringerung des Fluoreszenzsignals in Mitochondrien und zu einer Abnahme der Hintergrundfluoreszenz bei mikroskopisch weiterhin intakten Zellstrukturen, was auf eine verringerte Rhodamin123-Bildung und -Freisetzung schließen lässt (Abb. 4 A und B). Insgesamt reduzierte sich die mit der Mikroskopkamera als Grauwert detektierte Fluoreszenzintensität in den mit Suramin behandelten Zellen um 47% ($p < 0,001$).

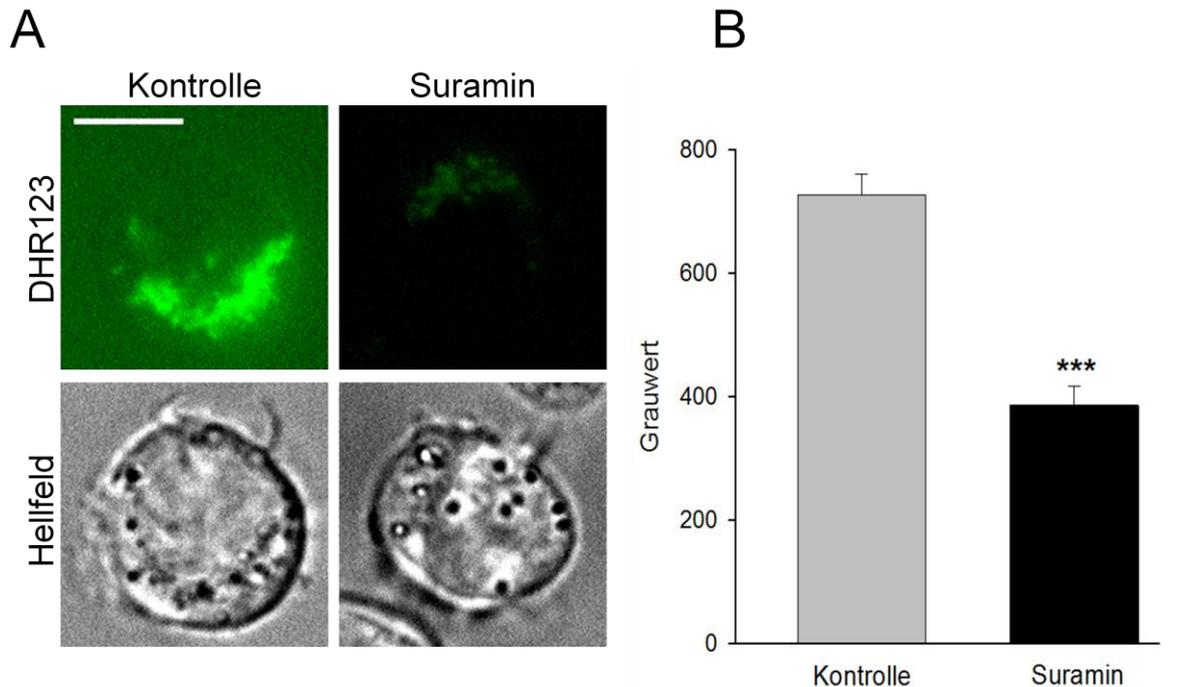


Abbildung 4. Eine Blockade der P2-Rezeptoren mit Suramin verringert die basale ROS-Produktion in Jurkat-T-Zellen. (A) Jurkat-T-Zellen wurden für 15 min mit 200 μ M Suramin behandelt oder unter Kontrollbedingungen inkubiert. Die mitochondriale ROS-Produktion wurde mit DHR123 gemessen und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Fluoreszenz- bzw. Hellfeld-Bilder nach 20 min Inkubation mit DHR123. Deutlich zu erkennen ist die kräftige Anfärbung der Mitochondrien sowie die stark verminderte Rhodamin123-Bildung (Mitochondrien) und -Freisetzung (Hintergrund) in den mit Suramin behandelten Zellen. (B) Statistische Auswertung der Mikroskopbilder. Dargestellt sind die durchschnittlichen Grauwerte von n=20 (Kontrolle) bzw. n=18 Zellen (Suramin) \pm SD; ***p<0.001.

5.1.2. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch unspezifische P2-Rezeptorblockade - Durchflusszytometrische Messung

In Übereinstimmung mit den unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachteten Ergebnissen zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Messung sowohl in primären CD4⁺-Zellen als auch in Jurkat-T-Zellen eine deutliche Reduktion der mitochondrialen Aktivität nach unspezifischer Inhibierung der P2-Rezeptoren mit 200 μ M Suramin. Dabei führte die Inkubation mit Suramin nicht zu einer Änderung von Größe und Granularität der Zellen, was in der FSC/SSC-Darstellung überprüft wurde (Abb. 5 A - D). Von den mit Suramin behandelten primären CD4⁺ T-Zellen wiesen nur 13,3% eine so hohe basale Mitochondrienaktivität auf, wie sie in 86,2 % der unbehandelten Kontrollzellen zu finden war (Abb. 5 E). Ein ähnliches Bild ergab sich mit Jurkat-Zellen. Hier zeigten etwa 84,6 % der unbehandelten gegenüber 16,8 % der mit Suramin inkubierten Zellen eine hohe Mitochondrienaktivität (Abb. 5 F).

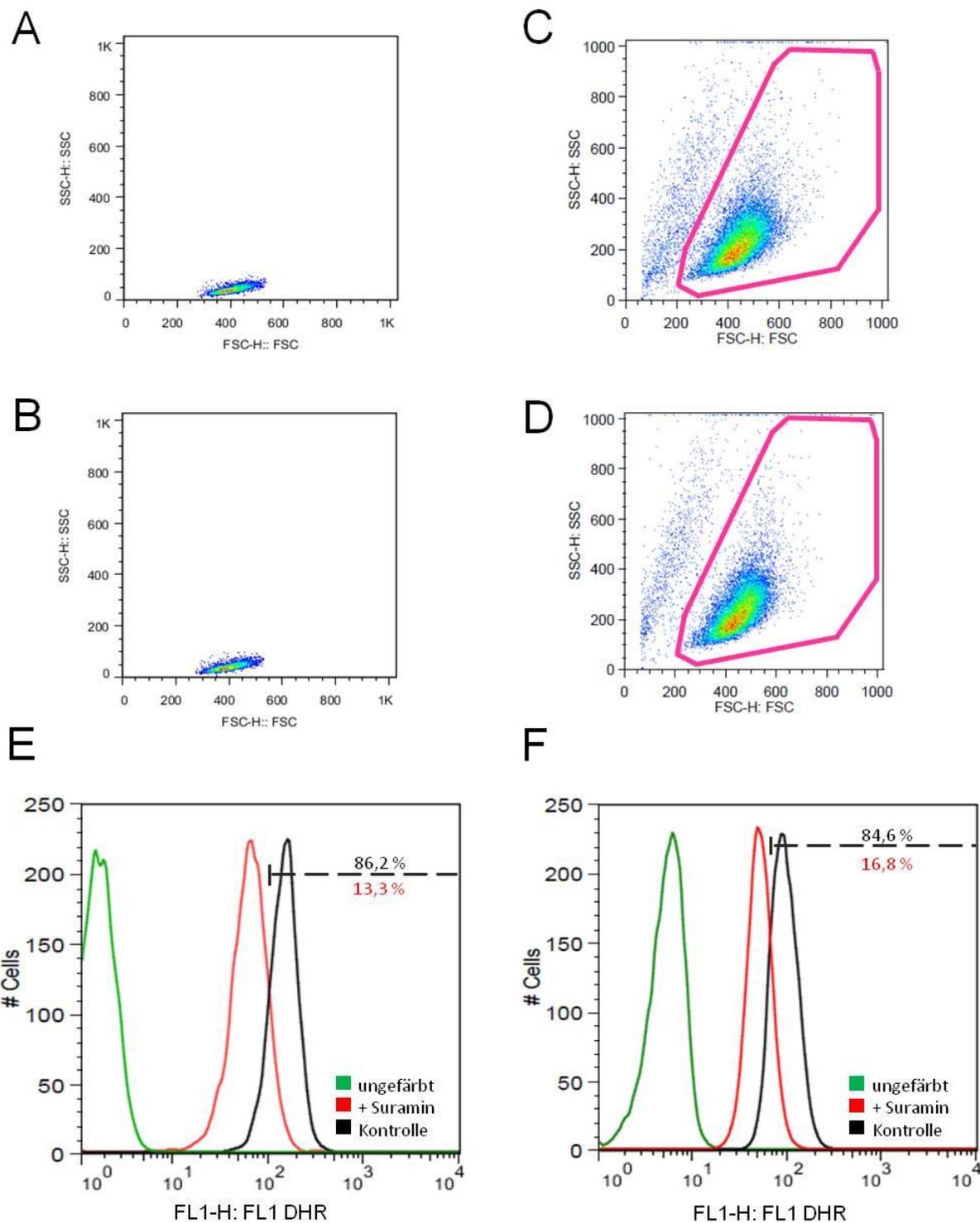


Abbildung 5. Einfluss einer Antagonisierung von P2-Rezeptoren mit Suramin auf die mitochondriale Aktivität von primären CD4⁺-T-Zellen und Jurkat-T-Zellen. (A - D) Repräsentative FSC/SSC-Diagramme von primären CD4⁺-Zellen (A, B) oder Jurkat Zellen (C, D), die unbehandelt belassen (A, C) oder für 15 min mit 200 μ M Suramin inkubiert wurden (B, D). (E,F) Histogrammdarstellung der DHR-Fluoreszenz in primären CD4⁺-Zellen (E) und Jurkat-Zellen (F). Die Gating-Strategie zur Identifikation von Zellen mit hoher basaler Mitochondrienaktivität ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die jeweilige Anzahl von Zellen in diesem Gate (schwarz: Kontrolle, rot: +Suramin). Der grüne Graph repräsentiert die Autofluoreszenz von ungefärbten Zellen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob in unstimulierten T-Zellen eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Suraminkonzentration und Reduktion der basalen mitochondrialen Aktivität vorliegt. Hierfür wurden die Zellen mit Suramin in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert, mit DHR123 oder TMRE gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Inkubation mit Suramin verringerte die mitochondriale ROS-Produktion in primären CD4⁺-Zellen konzentrationsabhängig um bis zu 50 % ($p < 0,001$; Abb. 6 A und C). Das mit TMRE quantifizierte mitochondriale Membranpotential nahm durch 200 μ M Suramin um 39 % ab ($p < 0,001$; Abb. 6 B und D).

In Jurkat-T-Zellen zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Das mitochondriale Membranpotential erreichte seinen niedrigsten Wert bei einer Suramin-Konzentration von 200 μ M ($p < 0,001$; Abb. 7 B und D). Der maximal-suppressive Effekt auf die DHR123-Fluoreszenz wurde ebenfalls mit einer Suramin-Konzentration von 200 μ M erreicht. Das DHR123-Signal entsprach hier etwa 53 % des Signals der Kontrolle ($p < 0,001$; Abb. 7 A und C). Dieses Ergebnis befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem fluoreszenzmikroskopisch bestimmten Wert.

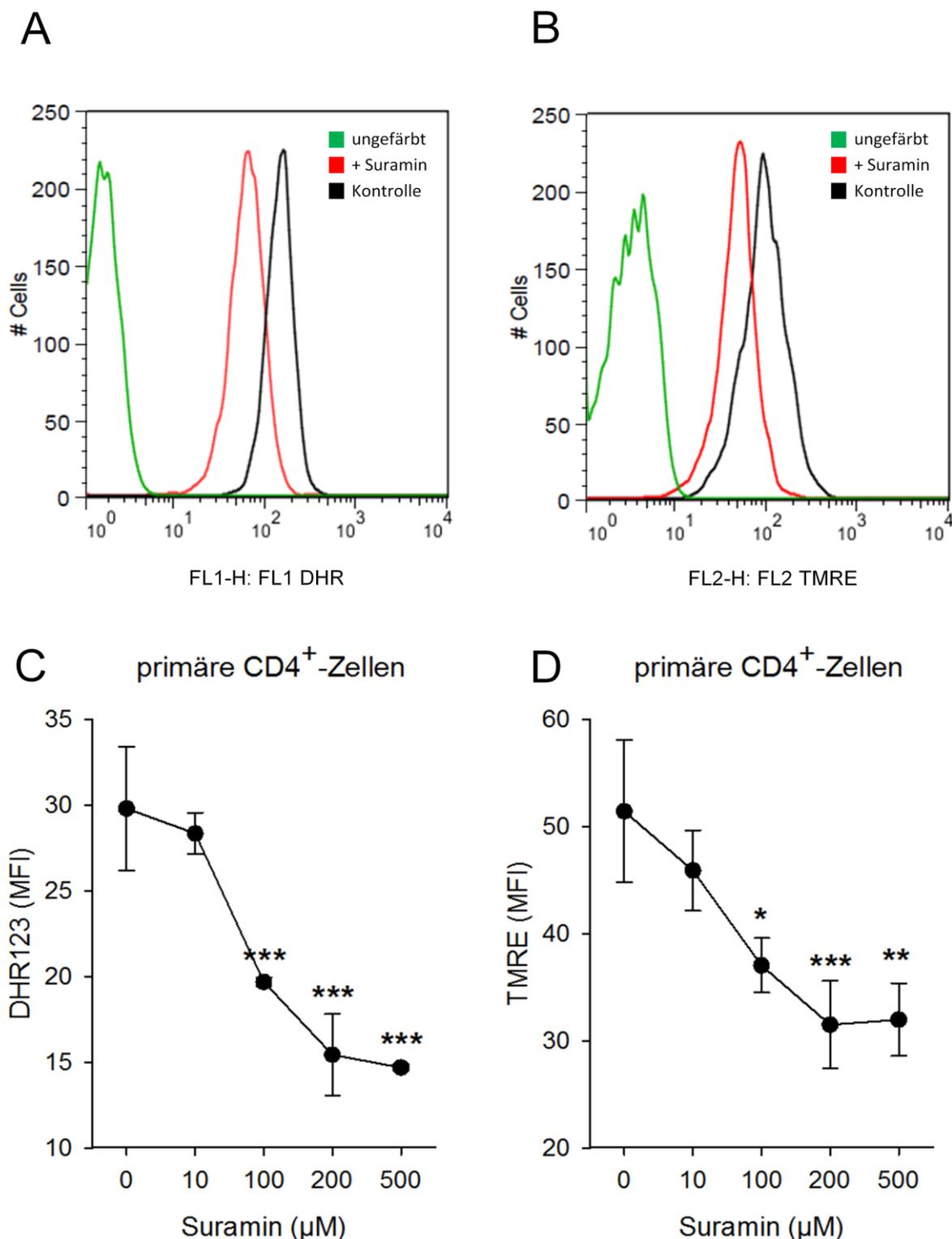


Abbildung 6. Einfluss einer Antagonisierung von P2-Rezeptoren mit Suramin auf die mitochondriale Aktivität unstimulierter, primärer CD4⁺-T-Zellen. (A,B) Repräsentative Histogramme von CD4⁺-Zellen, die mit Suramin behandelt (rot) oder unbehandelt belassen wurden (schwarz, Kontrolle) und mit DHR123 (A) oder TMRE (B) gefärbt wurden. Der grüne Graph repräsentiert jeweils die Eigenfluoreszenz von ungefärbten Zellen. (C,D) CD4⁺-Zellen wurden für 15 min mit Suramin in den angegebenen Konzentrationen behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Die mitochondriale ROS-Produktion (C) oder das mitochondriale Membranpotential (D) wurden mit DHR123 (C) oder TMRE (D) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SD von n=3-6 Experimenten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Kontrolle; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

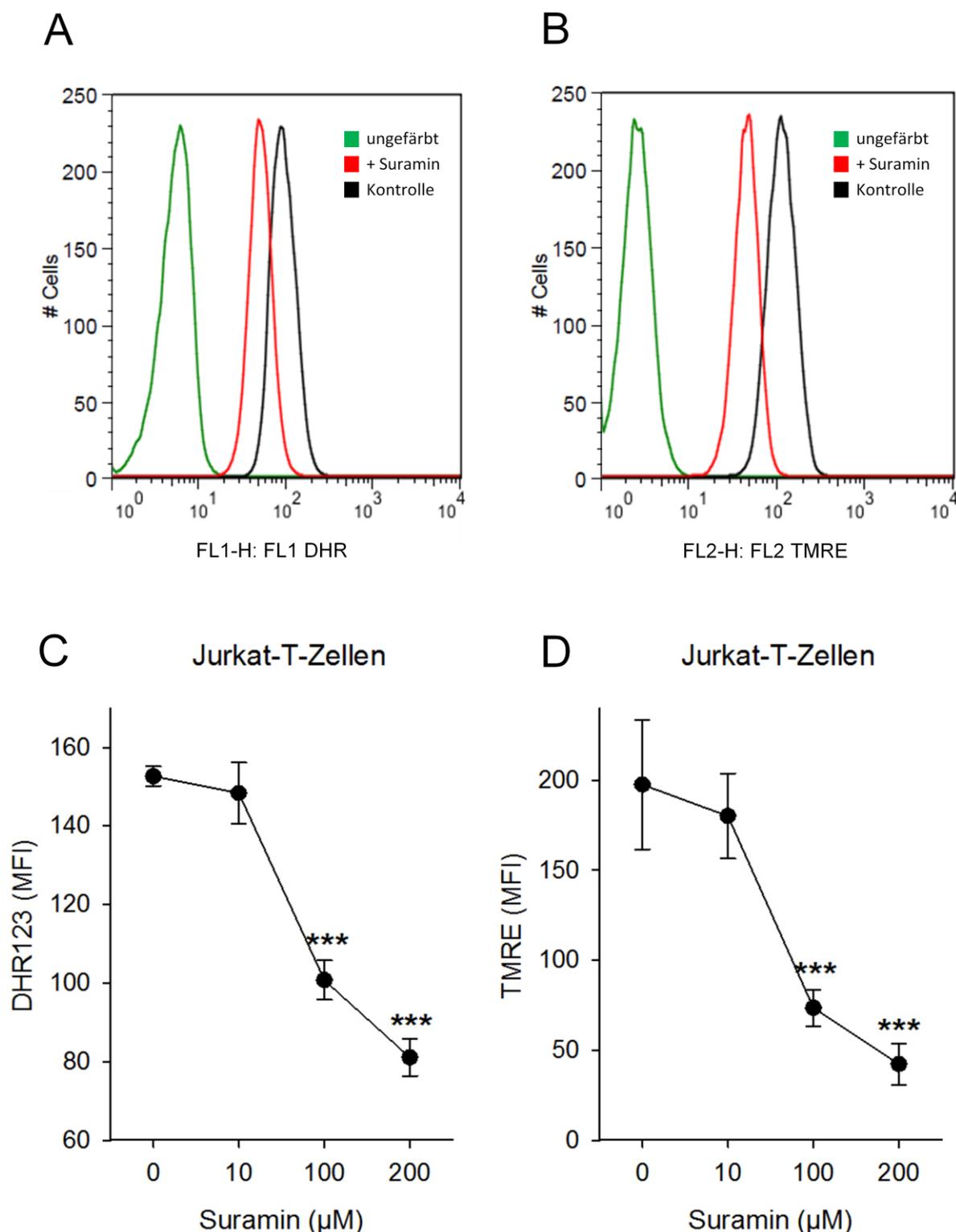


Abbildung 7. Einfluss einer Antagonisierung von P2-Rezeptoren mit Suramin auf die mitochondriale Aktivität unstimulierter Jurkat-T-Zellen. (A,B) Repräsentative Histogramme von Jurkat-Zellen, die mit Suramin behandelt wurden (rot) oder unbehandelt belassen wurden (schwarz, Kontrolle) und mit DHR123 (A) oder TMRE (B) gefärbt wurden. Der grüne Graph repräsentiert jeweils die Eigenfluoreszenz von ungefärbten Zellen. (C,D) Jurkat-T-Zellen wurden für 15 min mit 0 - 200 μ M Suramin inkubiert und für 15 min mit DHR123 (C) oder TMRE (D) gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion (C) bzw. das mitochondriale Membranpotential (D) wurden mit dem Durchflusszytometer detektiert. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten. ***p<0,001 vs. Kontrolle; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.2. Regulation der basalen mitochondrialen Aktivität durch P2X-Rezeptoren

Die autokrine Signalwirkung des freigesetzten ATPs wird in T-Zellen vor allem über die purinergen ATP-Rezeptoren P2X1, P2X4 und P2X7 vermittelt [48, 49, 63]. Da es sich bei Suramin um einen unspezifischen P2-Rezeptorantagonisten handelt, wurde im Folgenden genauer der spezifische Einfluss der einzelnen P2X-Rezeptoren auf die basale Mitochondrienaktivität von unstimulierten T-Zellen untersucht.

5.2.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch P2X1-Rezeptorblockade

Durch eine Antagonisierung des P2X1-Rezeptors mit dem kompetitiven Inhibitor NF023 wurde die mitochondriale ROS- bzw. ATP-Produktion von primären CD4⁺-Zellen supprimiert. Der beobachtete Hemmeffekt zeigte dabei eine Abhängigkeit von der verwendeten NF023-Konzentration. Bei einer Maximalkonzentration von 20 µM NF023 reduzierte sich das DHR123-Signal um 28 % ($p < 0,01$; Abb. 8 A).

In den Experimenten mit Jurkat-T-Zellen bestätigte sich dieses Ergebnis, jedoch wirkte sich die Inhibition des P2X1-Rezeptors erst ab einer NF023-Konzentration von 10 µM auf die basale mitochondriale Aktivität der Zellen aus. Diese Konzentration führte zu einer Verringerung der DHR123-Fluoreszenz um 14 % ($p < 0,001$). Gleichzeitig war damit der Maximaleffekt erreicht, eine Konzentrationssteigerung auf 20 µM zeigte keine höhere Hemmwirkung (13 %, $p < 0,05$; Abb. 8 B).

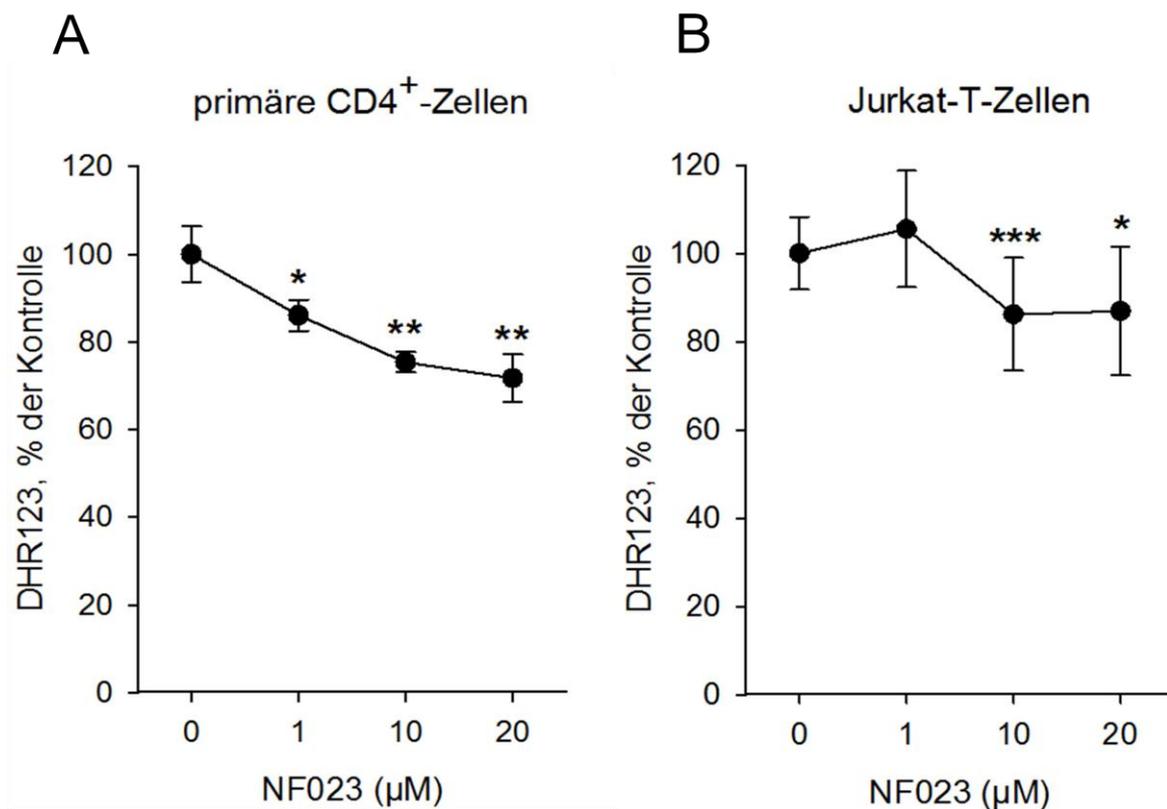


Abbildung 8. Einfluss einer Antagonisierung des P2X1-Rezeptors mit NF023 auf die basale mitochondriale Aktivität unstimulierter T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit NF023 behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde im FACS gemessen. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=3-10 Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 µM) Zellen entspricht. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Kontrolle. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem hochpotenten P2X1-Rezeptorantagonisten NF157 erzielt. Eine Behandlung mit NF157 führte bei primären CD4⁺-Zellen zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nahm die DHR123-Fluoreszenz in mit 20 μ M NF157 behandelten Proben um 37 % ab ($p < 0,001$; Abb. 9 A).

Die P2X1-Rezeptorblockade mit NF175 beeinträchtigte auch in Jurkat-T-Zellen die basale Mitochondrienaktivität. Analog zu primären CD4⁺-Zellen wurde in den Jurkat-T-Zellen, die mit der Höchstkonzentration von 20 μ M NF157 vorbehandelt worden waren, die niedrigste mitochondriale ROS-Produktion gemessen. Das DHR123-Signal betrug hier nur noch 42 % verglichen mit der 0 μ M-Kontrolle ($p < 0,01$; Abb. 9 B).

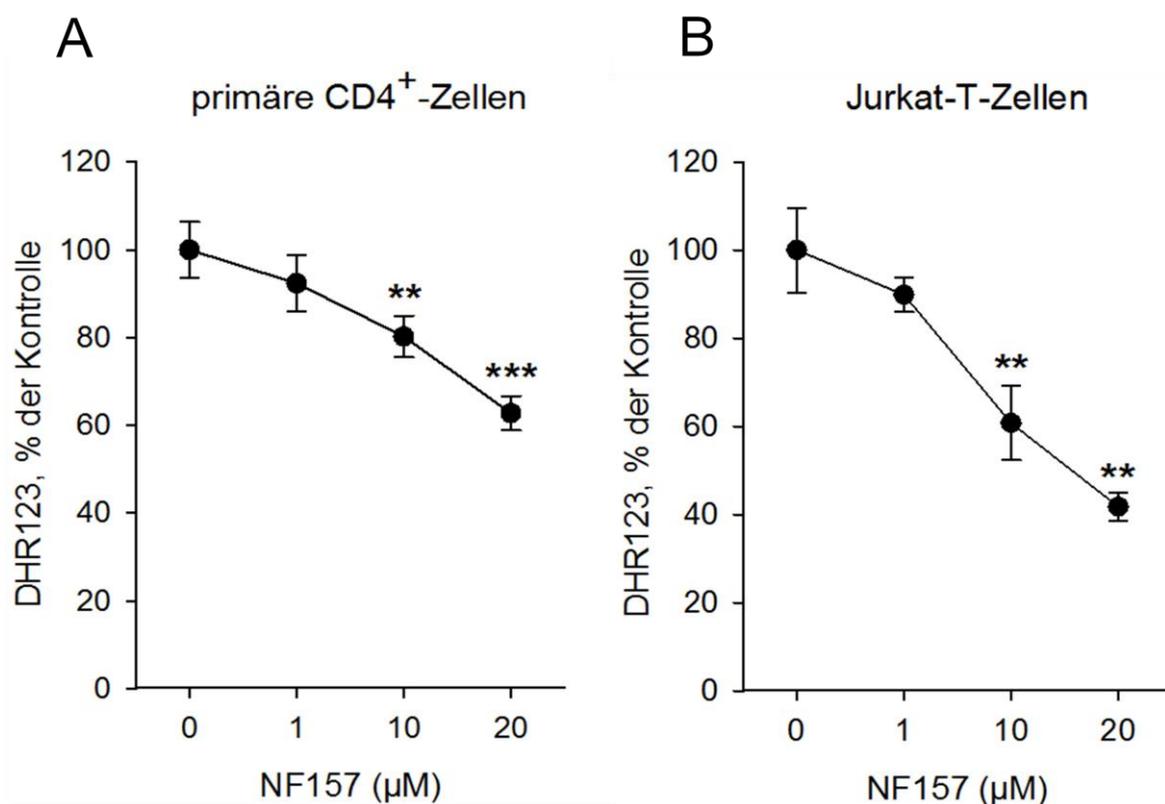


Abbildung 9. Einfluss einer Blockade des P2X1-Rezeptors mit NF157 auf die basale Mitochondrienaktivität unstimulierter T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit NF157 behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von $n=3-8$ Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 μ M) Zellen entspricht. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.2.2. Unabhängigkeit der basalen mitochondrialen Aktivität von P2X4-Rezeptorstimulation

Eine Antagonisierung des P2X4-Rezeptors mit 5-BDBD hatte weder in primären CD4⁺-Zellen noch in Jurkat-T-Zellen einen signifikanten Effekt auf die mit DHR123 gemessene Mitochondrienaktivität (Abb. 10 A und B).

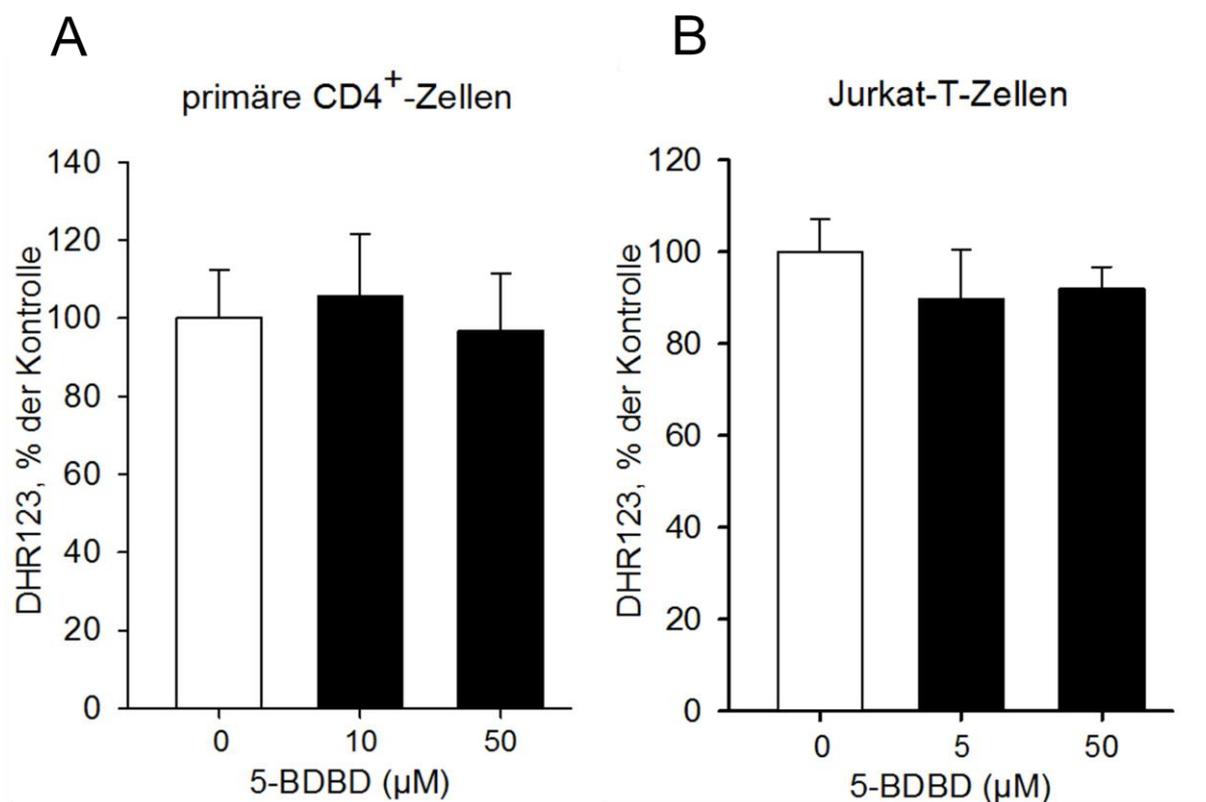


Abbildung 10. Einfluss einer Blockade des P2X4-Rezeptors mit 5-BDBD auf die basale Mitochondrienaktivität. CD4⁺-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit 5-BDBD behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SD von n=3-6 Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 μM) Zellen entspricht. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.2.3. Einfluss von P2X7-Rezeptoren auf die basale Mitochondrienaktivität

Primäre CD4⁺-Zellen, die mit dem spezifischen P2X7-Antagonisten A438079 in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM und 30 µM behandelt worden waren, unterschieden sich in ihrer mitochondrialen Basis-Aktivität nicht von unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 11 A).

Hingegen induzierte die P2X7-Blockade in Jurkat-T-Zellen konzentrationsabhängig eine Suppression der mitochondrialen Aktivität. Entsprechend wurde in Jurkat-Zellen, die mit 30 µM A438079 inkubiert worden waren, das niedrigste DHR123-Signal detektiert. Es entsprach 69 % der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,001$; Abb. 11 B).

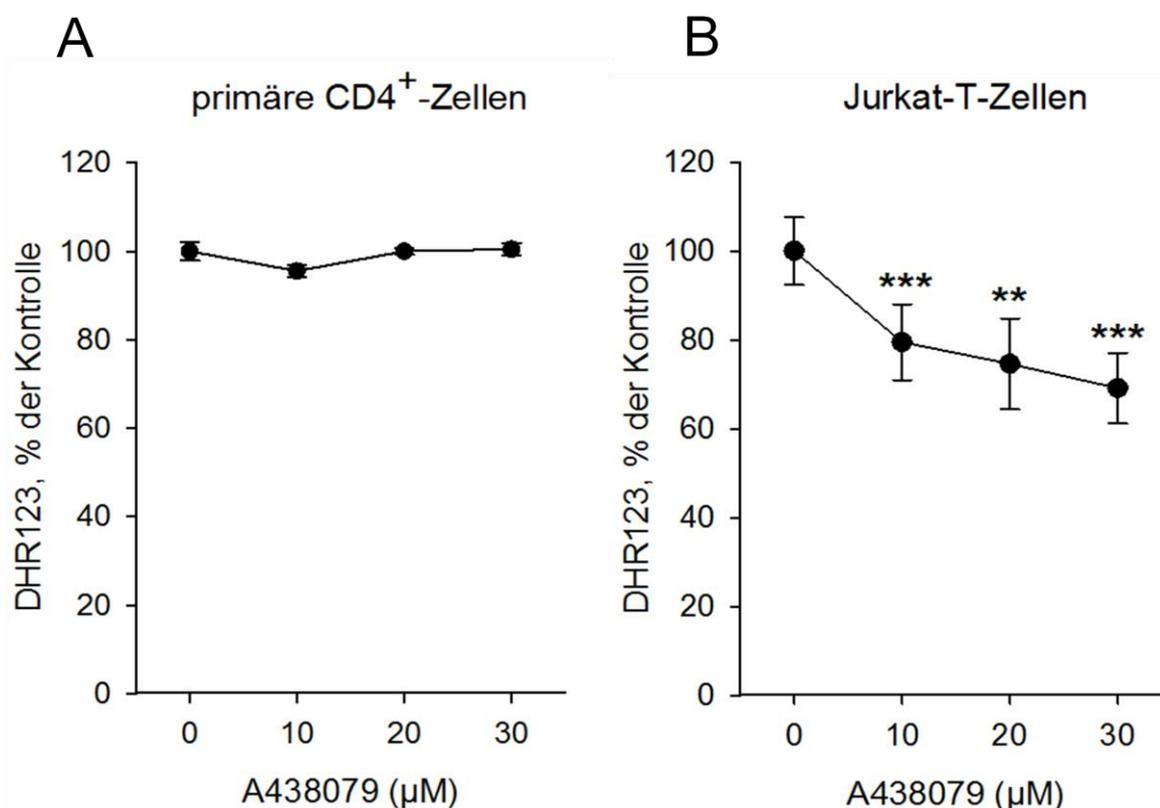


Abbildung 11. Einfluss einer Blockade des P2X7-Rezeptors mit A438079 auf die basale Mitochondrienaktivität. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit A438079 behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von $n=3-8$ Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 µM) Zellen entspricht. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.3. Regulation der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y11 und P2Y12

Im Folgenden wurde der spezifische Einfluss von P2Y11- und P2Y12-Rezeptoren auf die basale Mitochondrienaktivität von unstimulierten T-Zellen untersucht.

5.3.1. Negative Regulation der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y11-Rezeptoren

NF157 ist nicht nur ein potenter Inhibitor von P2X1-, sondern auch von P2Y11-Rezeptoren [90]. Um zu überprüfen, inwieweit der oben (5.2.1.) beschriebene Hemmeffekt in Zellen, die mit NF157 behandelt wurden, auf eine Blockade von P2Y11-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurden die Experimente mit dem spezifischen P2Y11-Antagonisten NF340 wiederholt.

Die Behandlung mit NF340 führte sowohl bei primären CD4⁺-Zellen als auch bei Jurkat-T-Zellen zu einer Steigerung der mitochondrialen ROS-Produktion. Während sich bei primären Zellen jedoch lediglich ein Trend zu einer gesteigerten mitochondrialen Aktivität zeigen ließ (Abb. 12 A), war die ROS-Produktion in Jurkat-T-Zellen deutlich und signifikant erhöht (Abb. 12 B). Von den verwendeten Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 20 µM zeigte sich bei 10 µM jeweils der stärkste Effekt. Die Mitochondrienaktivität unstimulierter primärer CD4⁺-Zellen nahm hier um 15 % zu. Die ROS-Produktion von Jurkat-T-Zellen erhöhte sich um 127 % (p<0,05).

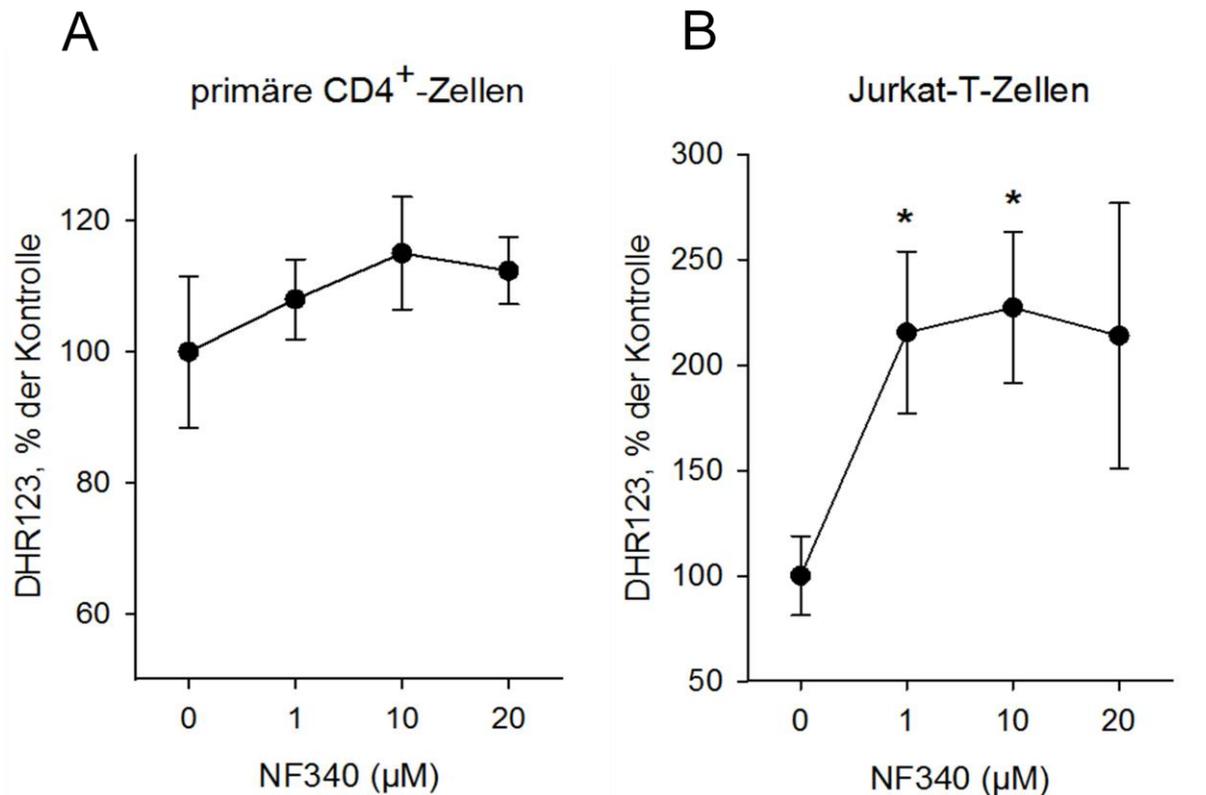


Abbildung 12. Einfluss einer Blockade des P2Y11-Rezeptors mit NF340 auf die basale Mitochondrienaktivität unstimulierter T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit NF340 behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 μ M) Zellen entspricht. *p<0,05. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.3.2. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch P2Y12

Freigesetztes ATP wird im Extrazellularraum durch Ektonukleotidasen zu ADP, AMP und Adenosin hydrolysiert [54, 91]. Im Folgenden wurde der Einfluss von ADP als Ligand am P2Y12-Rezeptor auf die mitochondriale Aktivität von ruhenden T-Zellen untersucht.

In CD4⁺-Zellen wurde die mitochondriale ATP-Produktion durch den P2Y12-Rezeptorantagonisten Clopidogrel nicht beeinflusst. Es zeigte sich weder für niedrige noch für hohe Konzentrationen eine signifikante Änderung des DHR123-Signals (Abb. 13 A).

In Jurkat-T-Zellen führte hingegen schon eine Konzentration von 500 nM Clopidogrel zu einer um 15 % verminderten Rhodamin123-Bildung ($p < 0,05$). Der Maximaleffekt zeigte sich bei einer Clopidogrel-Konzentration von 20 μM und lag bei 22 % ($p < 0,05$; Abb. 13 B).

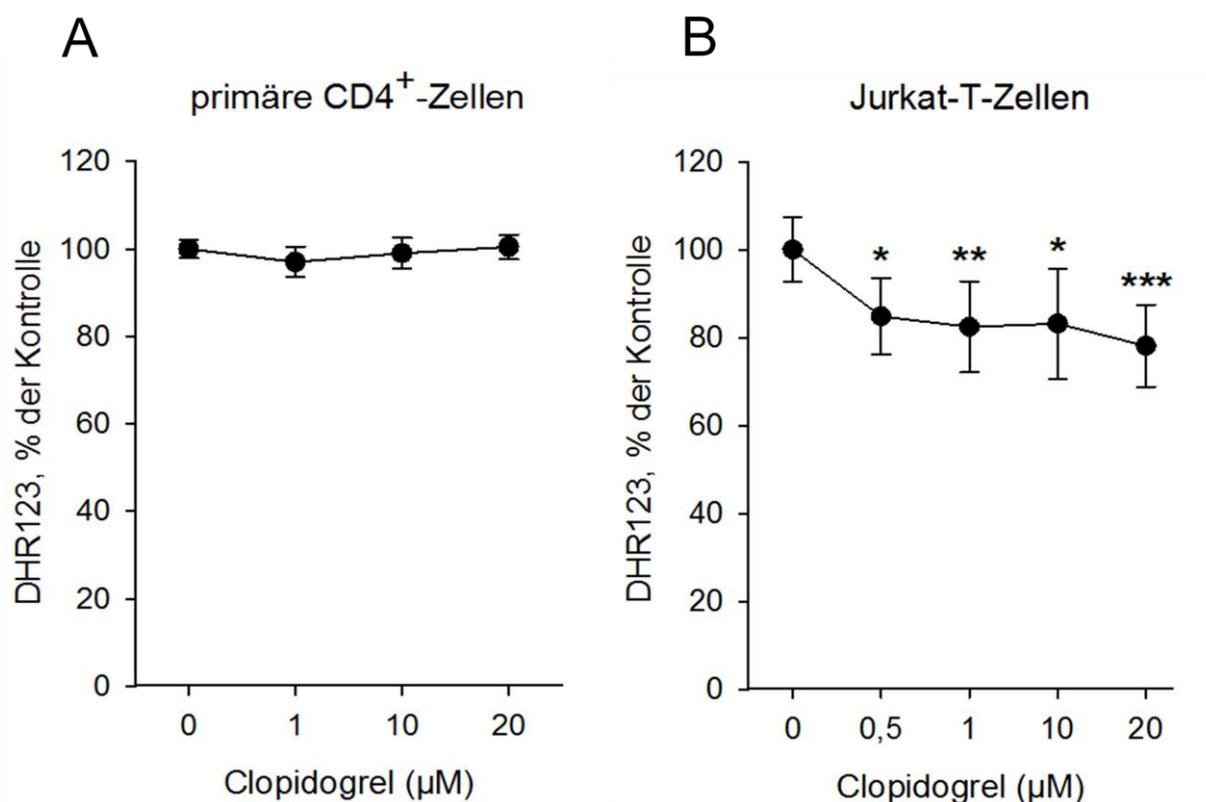


Abbildung 13. Einfluss einer Blockade des P2Y12-Rezeptors mit Clopidogrel auf die basale Mitochondrienaktivität. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit Clopidogrel behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von $n=3-6$ Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 μM) Zellen entspricht. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.4. Suppression der basalen mitochondrialen Aktivität durch Adenosin

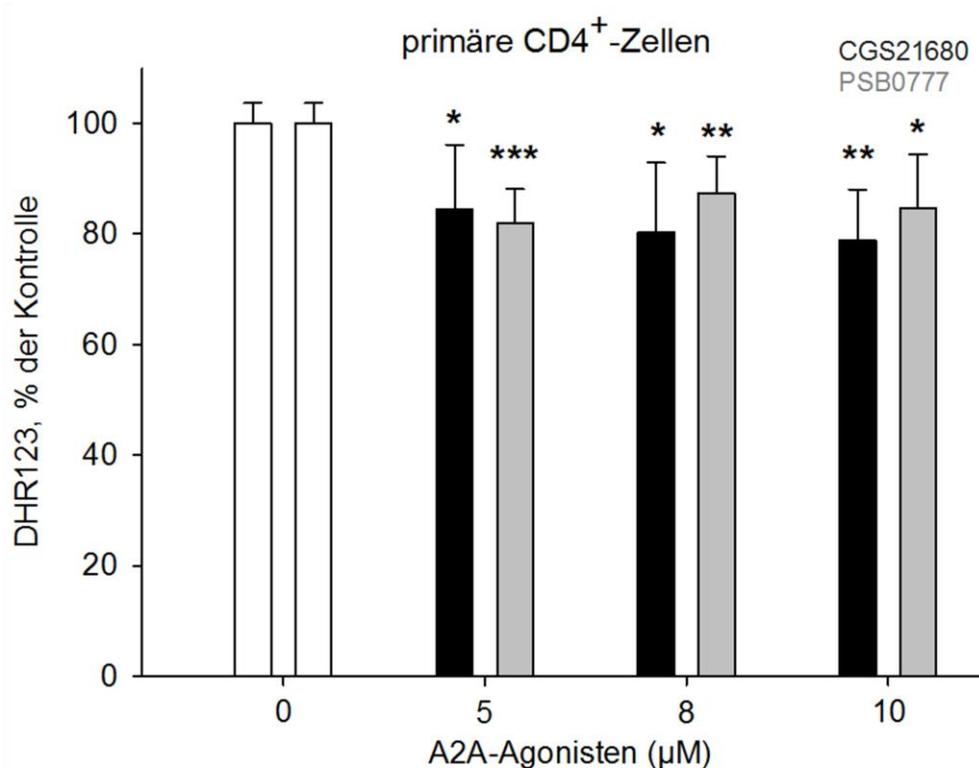
Die Wirkung von Adenosin wird in T-Zellen hauptsächlich über den A_{2A}-Rezeptor und die nachgeschaltete Signalübertragung via cAMP und die Proteinkinase A (PKA) vermittelt [92]. Um den Effekt von Adenosin auf die basale mitochondriale Aktivität zu untersuchen, wurden unstimulierte CD4⁺-T-Zellen daher mit A_{2A}-Agonisten und einem A_{2A}-Antagonisten behandelt. Der Einfluss der Adenosin-abhängigen Proteinkinase A auf die mitochondriale ROS-Produktion bzw. das mitochondriale Membranpotential wurde untersucht, indem die Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 inkubiert wurden. Die Bestimmung der Mitochondrienaktivität erfolgte anschließend durchflusszytometrisch mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe DHR123 oder TMRE.

5.4.1. Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität durch Stimulation des A_{2A}-Rezeptors

Eine Inkubation von unstimulierten CD4⁺-Zellen mit den A_{2A}-Rezeptoragonisten CGS21680 oder PSB0777 führte zu einer Abnahme der basalen Mitochondrienaktivität (Abb. 14 A). Dabei zeigte sich für beide Inhibitoren ein analoger Effekt. Für die verwendeten Konzentrationen (5 µM, 8 µM, 10 µM) konnte keine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden. Die A_{2A}-Agonisten reduzierten die durchflusszytometrisch bestimmte DHR123-Fluoreszenz um durchschnittlich 19 % (CGS21680) bzw. 15 % (PSB0777).

Auch Jurkat-T-Zellen, die mit CGS2180 oder PSB0777 behandelt wurden, wiesen eine signifikant supprimierte mitochondriale Aktivität auf (Abb. 14 B). Der Hemmeffekt trat wie bei den primären CD4⁺-Zellen ab einer Konzentration von 5 µM auf und zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit. Die mitochondriale ROS-Produktion von mit A_{2A}-Agonisten behandelten Zellen betrug im Schnitt 80 % (CGS21680) bzw. 73 % (PSB0777) von der ROS-Produktion unbehandelter Kontrollzellen.

A



B

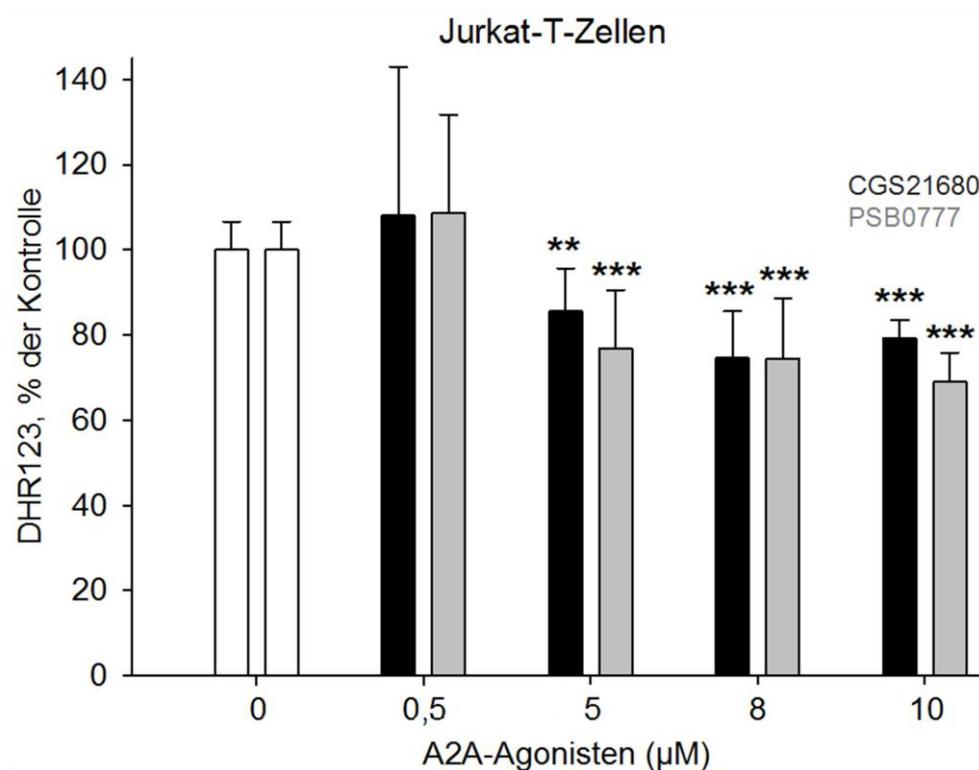


Abbildung 14. Einfluss der A2A-Agonisten CGS21680 und PSB0777 auf die basale Mitochondrienaktivität. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit CGS (schwarz) bzw. PSB (grau) behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und anschließend mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=6 Experimenten (dargestellt in % der Aktivität unbehandelter Zellen, s.o.). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Kontrolle.

5.4.2. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch Blockade des A2A-Rezeptors

Bei primären CD4⁺-Zellen führte eine Blockade des A2A-Rezeptors mit dem A2A-Antagonisten CSC zu einem Anstieg der basalen mitochondrialen Aktivität um 21 % ($p < 0,05$; Abb. 15 A).

Die basale Mitochondrienaktivität von Jurkat-T-Zellen ließ sich durch CSC hingegen nicht signifikant beeinflussen (Abb. 15 B).

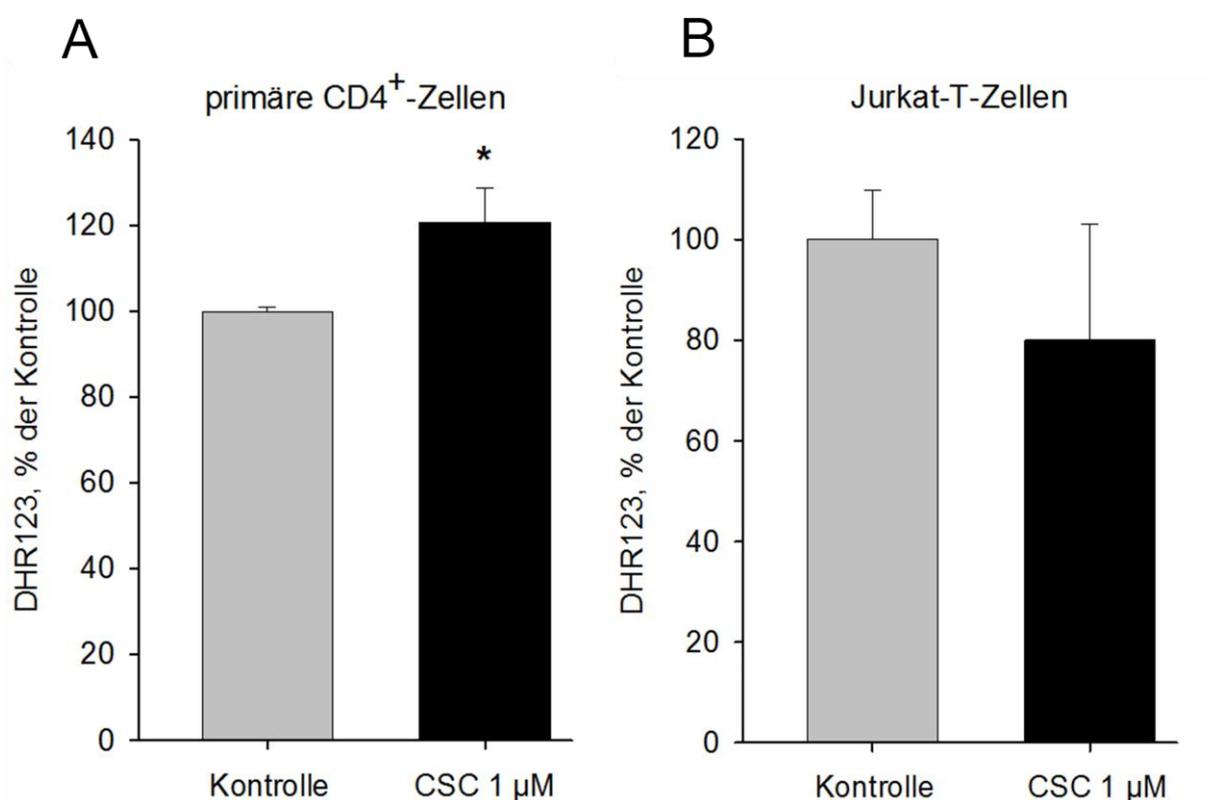


Abbildung 15. Einfluss des A2A-Antagonists CSC auf die basale Mitochondrienaktivität unstimulierter T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen (A) und Jurkat-T-Zellen (B) wurden für 15 min mit CSC behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle) und mit DHR123 gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion als Marker für die Mitochondrienaktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten und sind in % der Kontrollaktivität unbehandelter Zellen ausgedrückt, wobei 0% der ROS-Produktion Suramin-behandelter (200 μ M) Zellen entspricht. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.4.3. Steigerung der basalen Mitochondrienaktivität durch Inhibition der Proteinkinase A

Primäre CD4⁺-Zellen, die mit dem selektiven PKA-Inhibitor H89 behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere basale mitochondriale ROS-Produktion als die unbehandelten Kontrollen. H89 induzierte konzentrationsabhängig eine Zunahme der DHR123-Fluoreszenz um bis zu 33 % ($p < 0,01$; Abb. 16 A). Eine Inhibition der PKA wirkte sich ebenfalls konzentrationsabhängig auf das mitochondriale Membranpotential aus. In einer Konzentration von 10 μ M bewirkte H89 eine Steigerung des TMRE-Signals um das ca. 3,58-fache ($p < 0,01$; Abb. 16 B).

In Jurkat-T-Zellen war der Effekt von H89 auf die basale Mitochondrienaktivität geringer. Während die mitochondriale ROS-Produktion durch H89 nicht signifikant beeinflusst wurde (Abb. 16 C), erhöhte sich die TMRE-Fluoreszenz als Messwert für das mitochondriale Membranpotential im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um maximal 50% ($p < 0,05$; Abb. 16 D) und blieb damit deutlich unter dem Wert, der in primären CD4⁺-Zellen gemessen wurde.

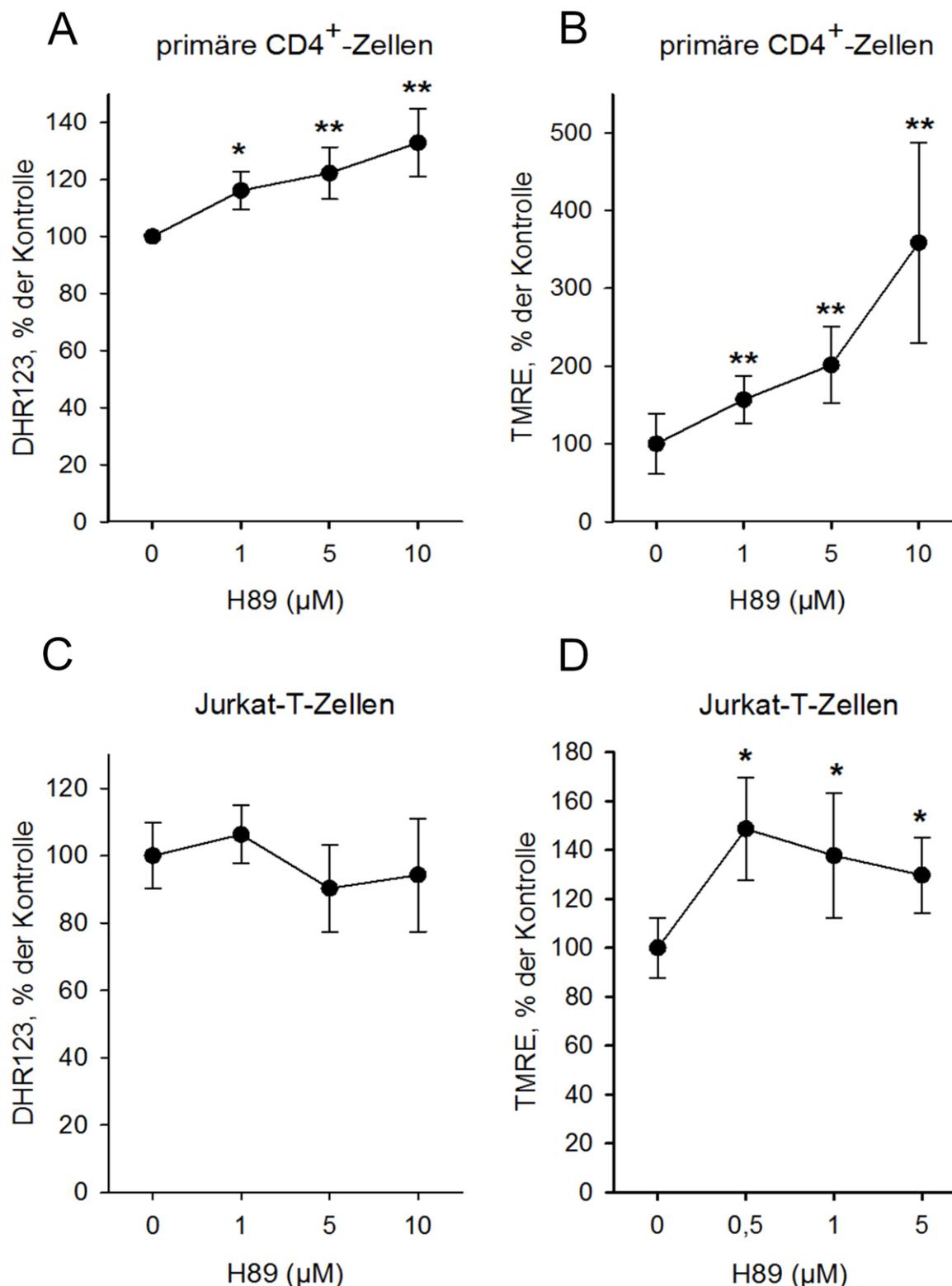


Abbildung 16. Einfluss einer Inhibition der Proteinkinase A mit H89 auf die mitochondriale Aktivität unstimulierter T-Zellen. (A,B) CD4⁺-T-Zellen wurden für 15 min mit H89 behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Die mitochondriale ROS-Produktion (A) oder das mitochondriale Membranpotential (B) wurden mit DHR123 (A) oder TMRE (B) durchflusszytometrisch bestimmt. (C,D) Jurkat-T-Zellen wurden für 15 min mit den angegebenen Konzentrationen H89 inkubiert und für 15 min mit DHR123 (C) oder TMRE (D) gefärbt. Die mitochondriale ROS-Produktion (C) bzw. das mitochondriale Membranpotential (D) wurden mit dem Durchflusszytometer detektiert. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von n=3-6 Experimenten (dargestellt in % der Aktivität unbehandelter Zellen). *p<0,05, **p<0,01 vs. Kontrolle; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

5.5. Beeinträchtigungen von basaler Mitochondrienaktivität und Calcium-Signaling in CD4⁺-T-Zellen von Sepsispatienten

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Störung des basalen Regelkreises aus autokriner purinergem Signaltransduktion, Calcium-Signal und mitochondrialer ATP- bzw. ROS-Produktion an der Ausbildung der T-Zellparalyse in der Sepsis beteiligt sein könnte. Hierfür wurde an CD4⁺-T-Lymphozyten von septischen Patienten neben der basalen mitochondrialen Aktivität auch die Calcium-Antwort auf Stimulation gemessen und mit Kontrollwerten gesunder Probanden verglichen. Zur Verwendung kamen hierbei die Fluoreszenzfarbstoffe DHR123, TMRE und Fluo-4 AM.

5.5.1. Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität

CD4⁺-T-Lymphozyten, die aus venösem Vollblut von septischen Patienten stammten, wiesen im Vergleich zu CD4⁺-T-Zellen aus dem Blut gesunder Kontrollprobanden eine stark verminderte mitochondriale Aktivität auf. Mitochondrien septischer T-Lymphozyten bildeten im Durchschnitt weniger reaktive Sauerstoffspezies, wie das signifikant niedrigere Rhodamin123-Floureszenzsignal zeigte ($p < 0,01$; Abb. 17 A und C) und wiesen ein deutlich reduziertes mitochondriales Membranpotential auf ($p < 0,001$; Abb. 17 B und D). Überdies war die intrazelluläre ATP-Konzentration in septischen PBMCs deutlich niedriger als in PBMCs aus dem Blut gesunder Kontrollprobanden (Abb. 18).

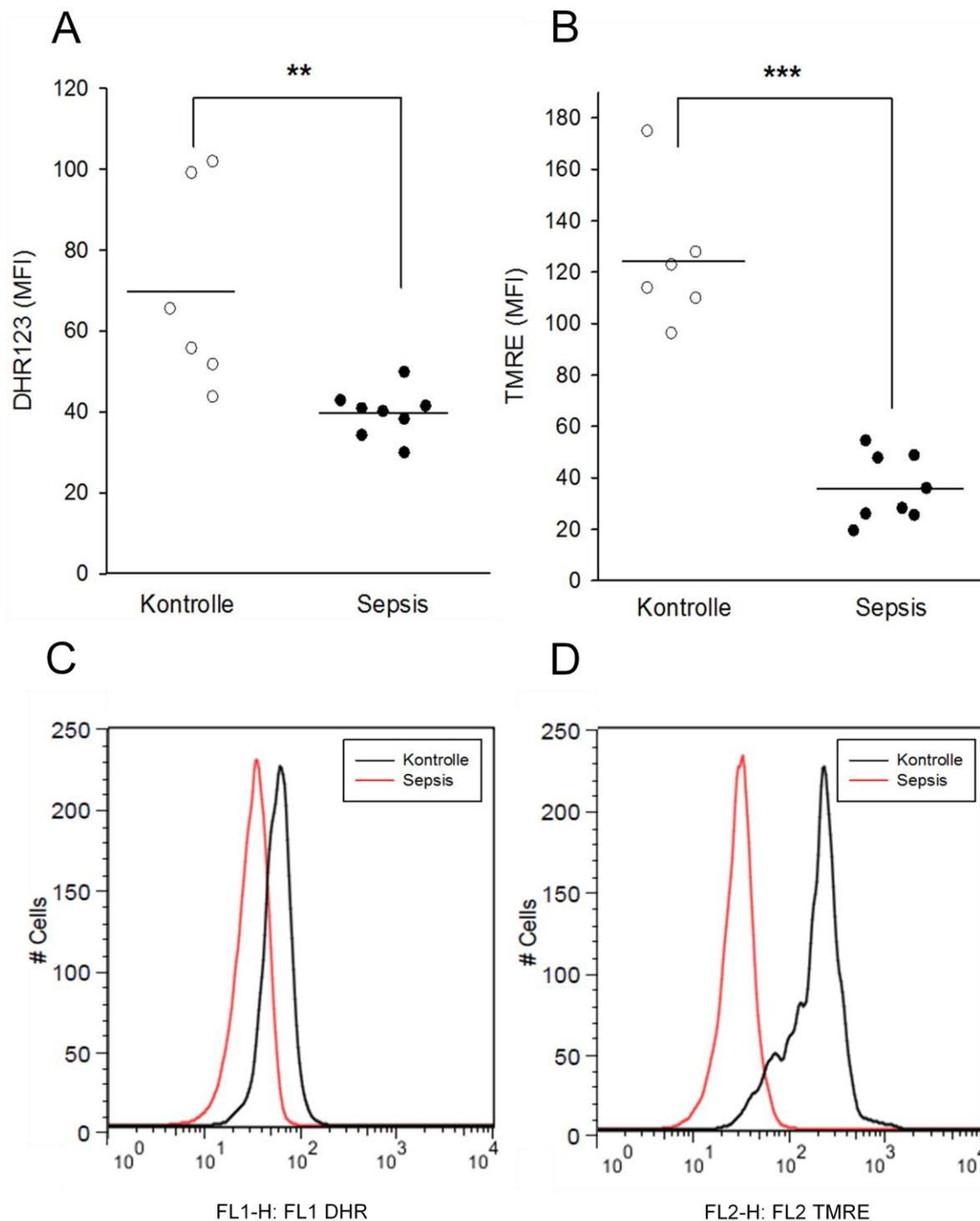


Abbildung 17. Vergleich von septischen und gesunden CD4⁺-T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer basalen mitochondrialen Aktivität. CD4⁺-T-Zellen von septischen Patienten (n=8) und gesunden Probanden (n=6) wurden für 15 min mit 45 μ M DHR123 (A, C) bzw. 100 nM TMRE (B, D) gefärbt. Als Marker für die mitochondriale Aktivität wurde die mitochondriale ROS-Produktion (A, C) bzw. das mitochondriale Membranpotential (B, D) durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Datenpunkt in A und B repräsentiert die Messung einer Kontrolle (weiß) oder eines Patienten (schwarz). (C,D) Repräsentative Histogrammdarstellungen der mittleren Fluoreszenzintensität von CD4⁺-T-Zellen von gesunden Probanden (schwarz) oder septischen Patienten (rot) für DHR123 (C) oder TMRE (D). Die Identifizierung von CD4⁺-T-Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Darstellung und Anti-CD4-APC-Antikörperfärbung. **p<0.01, ***p<0.001 vs. Kontrolle.

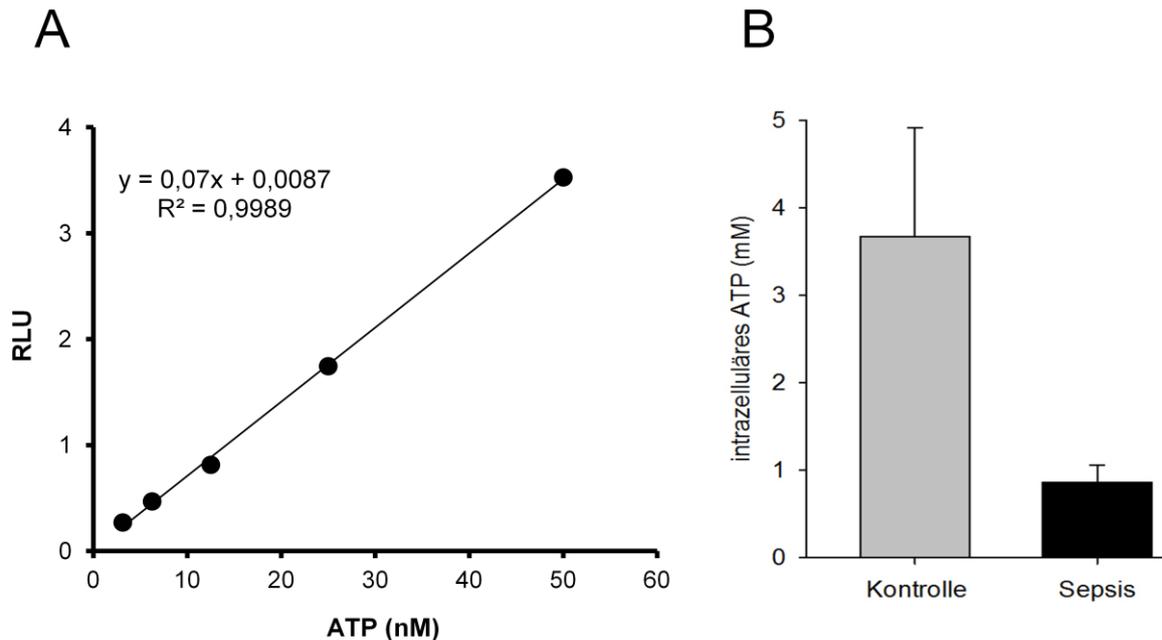


Abbildung 18. Vergleich von septischen und gesunden CD4⁺-T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer intrazellulären ATP-Konzentration. (A) Standardkurve für den Luciferin-Luciferase Assay. (B) Die intrazelluläre ATP-Konzentration von PBMCs, die aus dem Blut septischer und gesunder Probanden isoliert worden waren, wurde mit Hilfe eines Luciferin-Luciferase-Assays bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm SD von n=2 Experimenten.

5.5.2. Beeinträchtigung der Calcium-Antwort auf Stimulation

Die Calcium-Antwort auf Stimulation wurde mit dem Calcium-Marker Fluo-4 AM in einem Echtzeitexperiment über 5 min bestimmt (Abb. 19). Septische CD4⁺-T-Lymphozyten reagierten deutlich schwächer auf Stimulation als gesunde Kontrollzellen. Der stimulationsinduzierte Anstieg des zytosolischen Calciums begann in septischen CD4⁺-T-Zellen verzögert, verlief verlangsamt und erreichte signifikant niedrigere Maximalkonzentrationen. Während eine Stimulation durch CD3/CD28-Crosslinking in gesunden T-Zellen einen deutlich stärkeren Anstieg des zytosolischen Calciums als das Calcium-Ionophor A23187 provozierte, zeigte sich in septischen CD4⁺-T-Lymphozyten nach CD3/CD28-Stimulation ein nur wenig höheres oder sogar niedrigeres Fluo-4 AM-Signal als nach A23187-Zugabe.

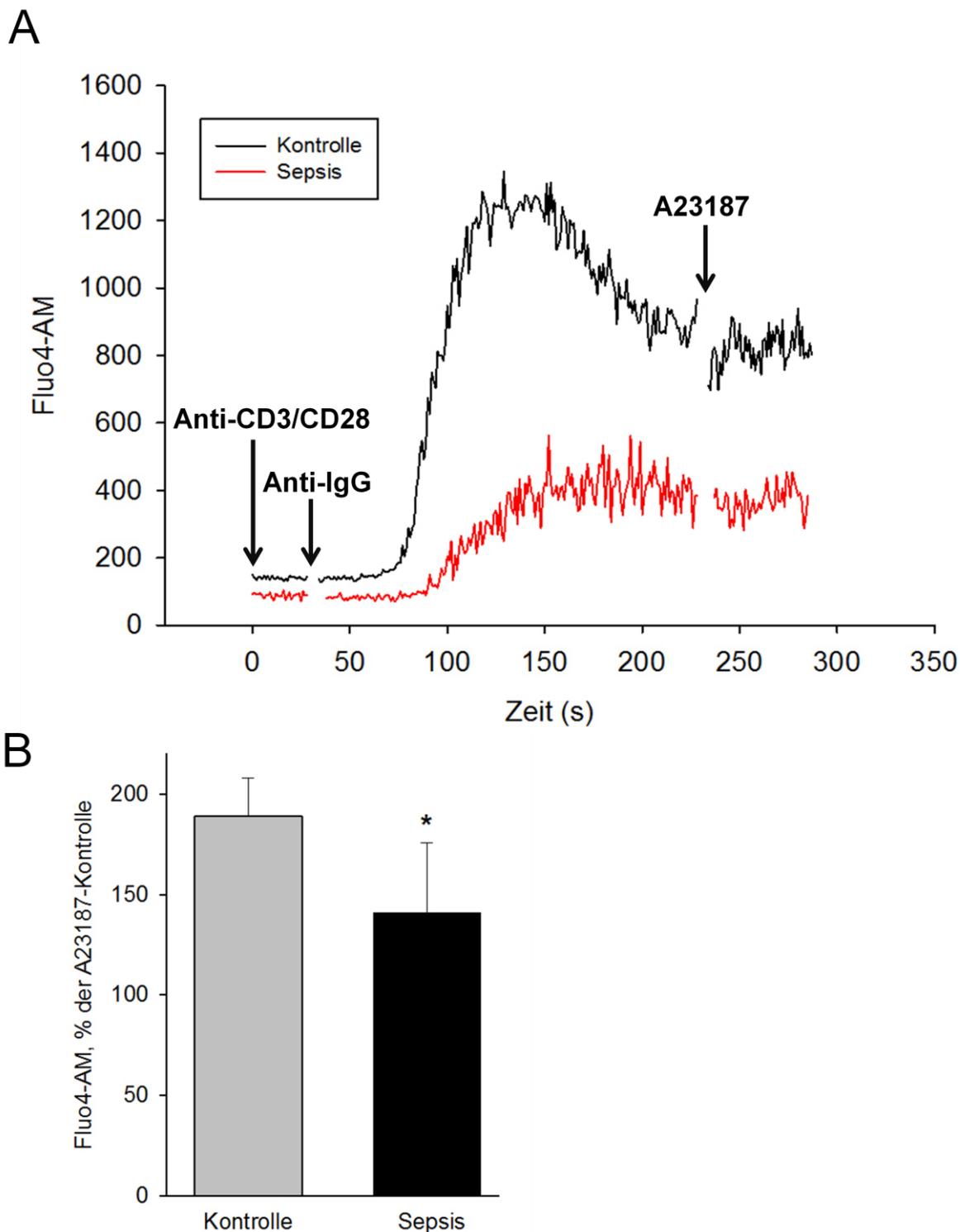


Abbildung 19. Vergleich von septischen und gesunden CD4⁺-T-Lymphozyten hinsichtlich der Calcium-Antwort auf Stimulation. Septische und gesunde CD4⁺-T-Zellen wurden für 40 min mit Fluo-4 AM (5 μ M) geladen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in einer Echtzeitmessung die Calcium-Antwort nach CD3/CD28-Crosslinking bestimmt. Als Kontrolle wurde 60 s vor Ende der Messung das Calcium-Ionophor A23187 (5 μ M) zugegeben. (A) Repräsentative Gegenüberstellung der Zeit-/Fluo-4 AM-Kurven von Kontroll- (schwarz) und Sepsis-Probanden (rot). (B) Vergleich des maximalen Fluo-4 AM-Signals in Kontroll- und Sepsis-CD4⁺-T-Zellen in Prozent des Calcium-Signals nach A23187-Zugabe. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte von 6 gesunden und 8 septischen Probanden. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

6. Diskussion

Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation der mitochondrialen ATP-Produktion durch purinerge Signalübertragung eine entscheidende Rolle bei der T-Zellaktivierung spielt. In der vorliegenden Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass *Purinergic Signaling* auch in unstimulierten CD4⁺-T-Zellen zur Regulation der mitochondrialen Aktivität beiträgt. Eine Störung in diesem basalen Regelkreis könnte an der Ausbildung von Fehlfunktionen der spezifischen Immunantwort ursächlich beteiligt sein.

6.1. Regulation der basalen mitochondrialen Aktivität durch purinerge Signaltransduktion

Um einen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Aktivität und purinenger Signaltransduktion in unstimulierten CD4⁺-T-Zellen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit T-Lymphozyten mit dem unspezifischen P2-Rezeptorblocker Suramin behandelt. Durch diese unspezifische P2-Rezeptorblockade reduzierte sich die basale mitochondriale Aktivität von primären CD4-positiven T-Zellen und Jurkat-T-Zellen signifikant. Aus diesem Resultat kann sowohl auf die Existenz einer P2-Rezeptoraktivierung durch basal freigesetztes ATP als auch auf einen Zusammenhang zwischen purinenger Signaltransduktion und basaler Mitochondrienaktivität geschlossen werden. Beide Schlussfolgerungen stimmen mit einer Studie der Arbeitsgruppe von Yegutkin et al. überein, die im direkten Umfeld von unstimulierten Lymphozyten mikromolare und damit für eine Stimulierung von P2-Rezeptoren ausreichende Konzentrationen von ATP nachweisen konnten [77].

Für eine genauere Charakterisierung des genannten Zusammenhangs wurde anschließend in separaten Experimenten der spezifische Einfluss bestimmter Purinorezeptoren auf die basale mitochondriale Aktivität untersucht.

6.1.1. Stimulation der basalen Mitochondrienaktivität über die Purinorezeptoren P2X1, P2X7 und P2Y12

6.1.1.1. Einfluss von P2X1, P2X4 und P2X7

P2X-Rezeptoren sind ATP-abhängige Calcium-Kanäle. Ihre Stimulation führt im Rahmen der T-Zellaktivierung über den in der Einleitung erläuterten positiven

Rückkopplungsmechanismus zu einer gesteigerten mitochondrialen ATP-Produktion, die die Grundlage für eine wirkungsvolle purinerge Signalübertragung und T-Zellaktivierung darstellt. Inhibition, Mutation oder Silencing des P2X1- und P2X4-Rezeptors führten in einer Studie von Woehrle et al. zu einem reduzierten Calcium-Einstrom ins Zellinnere, einer insuffizienten NFAT-Aktivierung und einer supprimierten Interleukin-2-Produktion nach TCR-Stimulation [49]. Yip et al. und Schenk et al. beschrieben, dass eine Inhibition des P2X7-Rezeptors eine abgeschwächte T-Zellaktivierung und eine Inhibition der T-Zellproliferation zur Folge hat [63, 64]. Zahlreiche andere Studien konnten die wichtige aktivierende Rolle des P2X7-Rezeptors für die zellvermittelte Immunantwort unterstreichen. Eine Blockade des P2X7-Rezeptors reduzierte die Symptome von allergischen Atemwegserkrankungen [93], verringerte die Abstoßungsraten nach Herz- und Inselzelltransplantationen [94, 95] und konnte im Tiermodell als Prophylaxe gegen die experimentelle Induktion einer Colitis eingesetzt werden [96]. Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass eine Inhibition von P2X1-, P2X4- und P2X7-Rezeptoren eine adäquate T-Zellaktivierung verhindert und die Ausprägung einer Entzündungsreaktion supprimiert. Die genannten P2X-Rezeptoren wirken also physiologischerweise stimulierend und aktivierend auf das Immunsystem.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass P2X1-Rezeptoren auch in unstimulierten T-Lymphozyten basale Funktionen regulieren. Eine Blockade der P2X1-Rezeptoren mit den P2X1-Antagonisten NF023 und NF157 führte zu einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Aktivität. In Jurkat-Zellen war zusätzlich der P2X7-Rezeptor an der Aufrechterhaltung der basalen mitochondrialen ATP-Synthese beteiligt.

Eine Antagonisierung des P2X4-Rezeptors hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die basale Mitochondrienaktivität. Obwohl der P2X4-Rezeptor besonders in der frühen Phase nach der TCR/CD28-Stimulation eine tragende Funktion innehat [49], scheint er folglich an der Regulation von basalen Zellfunktionen nicht wesentlich beteiligt zu sein.

6.1.1.2. Einfluss von P2Y12

In weiteren Experimenten wurde die Funktion des P2Y12-Rezeptors untersucht. P2Y12 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer Inhibition

der Adenylatzyklase und der cAMP-Produktion führt [60]. Er ist einer der am stärksten exprimierten P2Y-Rezeptoren in T-Lymphozyten. Trotzdem existieren bis heute keine Studien, die seine Funktion in T-Zellen untersuchen [67]. Für eine Inhibition des ADP-abhängigen P2Y₁₂-Rezeptors mit Clopidogrel zeigte sich in der vorliegenden Studie eine signifikante Suppression der basalen Mitochondrienaktivität. Der P2Y₁₂-Rezeptor hat also physiologischerweise in ruhenden CD4⁺-T-Zellen einen stimulierenden Einfluss auf die mitochondriale ATP-Produktion, der über eine Reduzierung der cAMP-Konzentration vermittelt wird.

Dieses Ergebnis passt gut zu den bisherigen Erkenntnissen über cAMP, das als *second messenger* prinzipiell immunsuppressiv wirkt [97]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass der P2Y₁₂-Rezeptor über die Regulation der cAMP-Konzentration an der Steuerung der basalen Mitochondrienaktivität beteiligt ist und hierüber die Ausübung von T-Zellfunktionen beeinflussen kann.

In einer Studie aus dem Jahr 2004 wurde gezeigt, dass Clopidogrel den Anstieg des Inflammationsmarkers C-reaktives Protein (CRP) nach perkutaner Koronarintervention (PCI) aus bisher noch unbekanntem Gründen deutlich reduziert [98]. Die durch die P2Y₁₂-Blockade hervorgerufene Inhibition des basalen Kreislaufs aus mitochondrialer ATP-Produktion und purinergem Signaltransduktion und die dadurch möglicherweise erschwerte Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen könnte ein Grund für diese antiinflammatorische Wirkung von Clopidogrel sein.

6.1.2. Suppression über die Purinorezeptoren P2Y₁₁ und A_{2A}

6.1.2.1. Einfluss von P2Y₁₁

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der Funktion des P2Y₁₁-Rezeptors. Dieser Rezeptor nimmt eine Sonderstellung unter den P2Y-Rezeptoren ein. Sein primärer Ligand ist ATP und als einziger P2Y-Rezeptor ist er mit einem G_s-Protein gekoppelt. Seine Aktivierung führt daher im Gegensatz zum P2Y₁₂-Rezeptor zu einer gesteigerten Aktivität der Adenylatzyklase und einer erhöhten Produktion von cAMP [66, 99]. Zur Rolle des P2Y₁₁-Rezeptors auf T-Lymphozyten gibt es bisher keine Untersuchungen. Jedoch konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP nicht nur über die P2X-Stimulation zur Aktivierung von T-Zellen beiträgt, sondern sich auch inhibierend auf T-Zellproliferation und Zytokin-Produktion

auswirken kann [100-103]. Obwohl die verantwortlichen Mechanismen und Rezeptoren noch nicht vollständig identifiziert werden konnten, wird davon ausgegangen, dass diese immunsupprimierenden Effekte teilweise über einen P2Y-Rezeptor vermittelt werden, dessen Aktivierung zu einer erhöhten Produktion von cAMP führt [101, 102, 104].

Diese Hypothese wird durch die vorliegende Arbeit unterstützt. Eine spezifische Blockade des P2Y₁₁-Rezeptors mit NF340 steigerte die mitochondriale Aktivität, was auf einen physiologischerweise inhibierenden Einfluss des P2Y₁₁-Rezeptors auf die basale ATP-Synthese schließen lässt. Die kombinierte P2X₁-/P2Y₁₁-Inhibition mit NF157 führte allerdings zu einer starken Suppression der mitochondrialen Aktivität, was dafür spricht, dass die stimulierende P2X₁-Wirkung in unstimulierten T-Zellen die supprimierende P2Y₁₁-Wirkung deutlich überwiegt. Dazu passen die unterschiedlichen Ligandenbindungsaffinitäten der beiden Rezeptoren. Der P2Y₁₁-Rezeptor hat eine wesentlich höhere EC₅₀ als der P2X₁-Rezeptor (17 µM vs. 0,05-1 µM) [65]. Damit wird der P2Y₁₁-Rezeptor mit den von gesunden, unstimulierten Zellen physiologischerweise in den Extrazellularraum freigesetzten ATP-Konzentrationen viel schwächer aktiviert als der P2X₁-Rezeptor.

6.1.2.2. Einfluss von Adenosin

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Adenosin auf die basale mitochondriale Aktivität untersucht. Die antiinflammatorische Wirkung von Adenosin auf T-Zellen wird überwiegend über den A_{2A}-Rezeptor und den nachgeschalteten Signalweg Adenylatzyklase - cAMP - Proteinkinase A (PKA) vermittelt [92, 105]. Um die spezifische Wirkung des A_{2A}-Rezeptors auf die mitochondriale Aktivität zu untersuchen, wurden CD4⁺-T-Zellen in der vorliegenden Studie mit den A_{2A}-Agonisten CGS21680 und PSB0777 behandelt. Beide Agonisten hatten einen ähnlichen, supprimierenden Effekt auf die mitochondriale Aktivität. Der A_{2A}-Antagonist CSC hingegen führte zu einer Steigerung der Mitochondrienaktivität, wodurch die Ergebnisse der Experimente mit den A_{2A}-Agonisten bestätigt werden konnten.

In guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte auch die Inhibition der cAMP-abhängigen PKA mit H89 zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Aktivitätssteigerung der Mitochondrien, was darauf schließen lässt, dass die PKA

auch in unstimulierten T-Lymphozyten aktiv ist und einen hemmenden Einfluss auf die mitochondriale Aktivität hat. Insgesamt zeigen diese Resultate, dass Adenosin in unstimulierten T-Zellen die mitochondriale Aktivität über den A2A-Rezeptor und seine klassische nachgeschaltete Signalkaskade inhibiert.

Dieses Resultat reiht sich in eine Reihe von Beobachtungen ein, die eine immunsupprimierende Wirkung von Adenosin auf die Immunantwort beschreiben. Eine A2A-Stimulation reduzierte die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten [106], Makrophagen [107] und Granulozyten [108] und verminderte die IL2-Produktion [109] und Zellproliferation von aktivierten CD4⁺-T-Zellen [110]. Die vorliegenden Experimente zeigen, dass Adenosin bereits auf die Grundaktivität von unstimulierten T-Lymphozyten supprimierend einwirkt.

6.2. Unterschiede zwischen Jurkat-T-Lymphozyten und primären CD4⁺-T-Lymphozyten

Jurkat-Zellen sind ein anerkanntes und weitverbreitetes T-Zellmodell. Viele der heutigen Erkenntnisse über T-Zellen, T-Zellaktivierung, T-Zellsignalwege und T-Zelleffektorfunktionen wurden an Jurkat-Zellen gewonnen [111]. Trotzdem müssen Ergebnisse, die in der Tumorzelllinie gewonnen werden, immer vorsichtig interpretiert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl in unstimulierten primären T-Zellen als auch in ruhenden Jurkat-T-Zellen basale purinerge Signalwege existieren, die die mitochondriale ATP-Produktion und andere Zellfunktionen regulieren. Dabei werden stimulierende Signale in beiden Zellarten hauptsächlich über P2X-Rezeptoren vermittelt, während supprimierende Mechanismen vor allem über Adenosin als Transmitter am A2A-Rezeptor initiiert werden. Im Einzelnen legen die Resultate der vorliegenden Studie jedoch den Schluss nahe, dass insbesondere der suppressive Einfluss von Adenosin auf die basale mitochondriale Aktivität in Jurkat-T-Zellen deutlich weniger ausgeprägt ist als in primären Zellen. Dafür sprechen vor allem die in Jurkat-T-Zellen drastisch verminderte Auswirkung einer PKA-Inhibition auf die mitochondriale ATP-Produktion sowie die nicht vorhandene Wirkung des A2A-Antagonisten CSC. Beide Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die A2A-Rezeptoren von Jurkat-Zellen nicht so stark durch Adenosin aktiviert sind wie die A2A-Rezeptoren primärer T-Lymphozyten. Da die A2A-Agonisten jedoch in beiden

Zellarten einen ähnlichen Effekt auf die mitochondriale Aktivität hatten, kann davon ausgegangen werden, dass der Adenosin-Signalweg an sich in Jurkat-T-Zellen intakt ist. Die Ursache für die verminderte basale Suppression der mitochondrialen Aktivität bei Jurkat-Zellen könnte in - verglichen mit primären CD4⁺-T-Zellen - niedrigeren perizellulären Adenosinkonzentrationen liegen, die z.B. durch Unterschiede im Expressions- oder Aktivitätsmuster von Ektonukleotidasen zustande kommen könnten.

Der stimulierende Einfluss von P2X-Rezeptoren sowie die supprimierende Wirkung von Adenosin konnte prinzipiell für beide Zellarten nachgewiesen werden. Insgesamt rechtfertigen diese Ergebnisse die Verwendung von Jurkat-T-Zellen als T-Zellmodell in der vorliegenden Arbeit. Weitere Studien sollten aber klären, ob Unterschiede in der Expression von Purinorezeptoren bzw. im Metabolismus von extrazellulären Purinen zwischen Jurkat-T-Zellen und primären T-Lymphozyten existieren. Insbesondere aus onkologischer Sicht erscheinen solche Untersuchungen vielversprechend.

6.3. Mögliche Bedeutung der Regulation der mitochondrialen ATP-Produktion in unstimulierten CD4⁺-T-Zellen durch basal aktivierte Purinorezeptoren

Im Rahmen der T-Zellaktivierung kommt es zu einer stark gesteigerten mitochondrialen ATP-Produktion und der lokalisierten Freisetzung von ATP an der Immunologischen Synapse [69, 70]. Das ATP dient dort der autokrinen Aktivierung von P2X-Rezeptoren, die für die suffiziente Aktivierung von T-Zellen nach TCR-Stimulation unerlässlich ist [48, 49, 64, 112]. Die Mitochondrien liefern dabei nicht nur das nötige ATP, sondern sind auch eine wichtige Schaltzentrale für die Integration von purinergem Signaltransduktion und Calciumsignal. Von Bedeutung sind dabei vor allem

- 1) die gesteigerte mitochondriale ATP-Synthese nach TCR-Stimulation,
- 2) die dadurch verstärkte autokrine purinerge Stimulation von ATP-abhängigen P2X-Rezeptoren, die zu einer Erhöhung der intrazellulären und mitochondrialen Calcium-Konzentration führt,
- 3) die nachfolgend weitere Aktivierung der mitochondrialen ATP-Produktion (positive Rückkopplung) und

4) die als Nebenprodukt der ATP-Synthese anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die als *second messenger* dienen.

So werden über die mitochondriale Aktivität verschiedenste T-Zelleffektorfunktionen beeinflusst (s. Einleitung, insbesondere Abbildung 2) [49, 63, 69, 76].

Bisher wurde das Zusammenspiel aus purinergem Signaltransduktion, Calcium-Signal und mitochondrialer ATP- bzw. ROS-Produktion lediglich als Mechanismus zur Amplifizierung des TCR/CD28-Signals in aktivierten T-Zellen angesehen [63, 69, 76]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen jedoch, dass dieser Regelkreis in leicht abgeänderter Form auch in unstimulierten T-Zellen aktiv ist: Basal aktivierte Purinorezeptoren regulieren die mitochondriale ATP- und ROS-Produktion und beeinflussen darüber - analog zu stimulierten T-Zellen - möglicherweise auch andere Zellfunktionen.

Dabei gibt es stimulierende und supprimierende Mechanismen. Eine Aktivierung der ATP-abhängigen Calcium-Kanäle P2X1 und P2X7 sowie eine Stimulation des G_i-gekoppelten P2Y12-Rezeptors durch ADP wirkt sich positiv auf die mitochondriale ATP-Produktion aus, eine Aktivierung des P2Y11-Rezeptors durch ATP bzw. eine Stimulation des A2A-Rezeptors durch Adenosin führt über eine vermehrte Produktion von cAMP und eine nachfolgend gesteigerte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A zu einer Reduktion der Mitochondrienaktivität. Abbildung 20 gibt einen Überblick über diesen Zusammenhang.

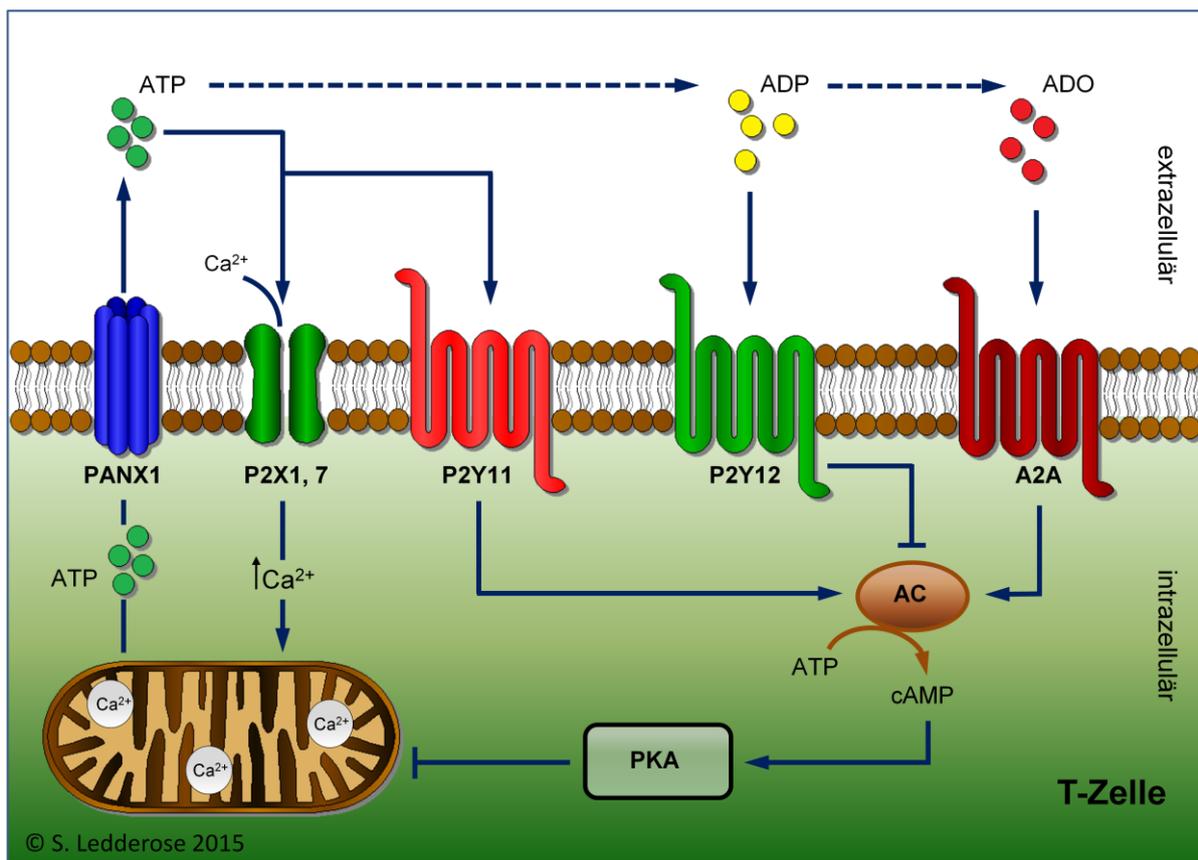


Abbildung 20: Eine basale Aktivierung von Purinorezeptoren durch autokrine purinerge Signaltransduktion reguliert die mitochondriale ATP-Produktion. Positiv-stimulierende Effekte auf die mitochondriale Aktivität werden über die ATP-abhängigen P2X1- und P2X7-Rezeptoren vermittelt, deren Stimulation zu erhöhten zytosolischen und mitochondrialen Calcium-Spiegeln führt; zusätzlich aktivierend wirkt die ADP-abhängige Inhibition der Adenylatzyklase über P2Y12. Suppressierend wirkt Adenosin über den A2A-Rezeptor und die nachgeschaltete Signalkaskade aus cAMP-Produktion und PKA-Aktivierung; ebenfalls einen dämpfenden Einfluss haben hohe ATP-Konzentrationen am P2Y11-Rezeptor.

T-Lymphozyten suchen ihre Umgebung fortlaufend nach Pathogenen und Entzündungszeichen ab [113]. Der hier beschriebene Regelkreis könnte ein Mechanismus sein, der den T-Zellen bei der Aufrechterhaltung dieser Wächterfunktion behilflich ist. Wird ein passendes Antigen detektiert, kommt es innerhalb von Sekunden zu einer Verdopplung der intrazellulären ATP-Konzentration, einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration und einer stark gesteigerten ATP-Freisetzung in den Extrazellulärraum [63, 64, 69, 73]. Der stimulierend wirkende Standby-Modus von P2X1, P2X7 und P2Y12-Rezeptoren, der die Mitochondrien in einer Art erhöhter Reaktionsbereitschaft hält, ist für diese erstaunliche Leistung wahrscheinlich von großer Bedeutung.

Gleichzeitig findet bereits auf dieser Ebene eine Gegenregulation statt, um eine vorzeitige und fälschliche T-Zellaktivierung zu verhindern. In den Extrazellularraum freigesetztes ATP wird durch verschiedene Ektonukleotidasen zu Adenosin abgebaut, das über den A2A-Rezeptor inhibierend auf die mitochondriale Aktivität einwirkt.

Fehlregulationen in diesem basalen Regelkreis könnten sowohl an überschießenden Immunreaktionen (z.B. im Rahmen einer Autoimmunerkrankung) als auch an der Entwicklung einer Immunsuppression beteiligt sein.

6.4. Bedeutung des basalen autokrinen purinergen Regelkreises für die CD4⁺-T-Zellfunktion in der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis führt aus bisher ungeklärten Gründen zu einer verminderten Aktivierbarkeit von nahezu sämtlichen T-Lymphozyten, was eine schwere Immunsuppression mit hoher Letalität zur Folge hat [21, 22, 24].

In dieser Studie wurden CD4⁺-T-Lymphozyten aus venösem Vollblut septischer Patienten mit CD4⁺-T-Zellen gesunder Kontroll-Probanden hinsichtlich ihrer basalen Mitochondrienaktivität und Aktivierbarkeit nach Stimulation verglichen. Dabei konnte durchflusszytometrisch in septischen CD4⁺-T-Zellen jeweils ein signifikant vermindertes Fluoreszenzsignal für DHR123 und TMRE detektiert werden, was für eine verminderte mitochondriale ATP-Produktion in der Sepsis spricht. Die intrazelluläre ATP-Konzentration war in Zellen von septischen Patienten folgerichtig ebenfalls erniedrigt. Die Calcium-Antwort auf CD3/CD28-Crosslinking lief in septischen T-Lymphozyten verlangsamt ab und fiel insgesamt deutlich schwächer aus als in gesunden Kontrollzellen. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CD4⁺-T-Zellen in der Sepsis aufgrund einer Störung im Calcium-Einstrom nur schlecht aktiviert werden können und dass ihre basale mitochondriale Funktion beeinträchtigt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Beobachtungen besteht.

Die hier beschriebenen Resultate decken sich mit mehreren Studien, in denen eine gestörte Mitochondrienfunktion bei septischen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) beschrieben werden konnte. Garrabou et al. zeigten, dass in PBMCs von septischen Patienten der mitochondriale Sauerstoffverbrauch und die Aktivität der mitochondrialen Enzymkomplexe I, III und IV stark reduziert sind [114]. Ähnliche

Ergebnisse beschreibt auch die Arbeitsgruppe von Belikova, in deren Studie die Inkubation von gesunden PBMCs mit Plasma septischer Patienten zu einer signifikant erniedrigten ATP-Produktion führte [115]. In einer Studie aus dem Jahr 2015 wurde von Weiss et al. beschrieben, dass es während einer Sepsis bei Kindern ebenfalls zur mitochondrialen Dysfunktionen in PBMCs kommt. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe des mitochondrialen Membranpotentials und der Dauer von Organausfällen [116]. Weitere Studien von Garrabou und Japiassú zeigten, dass eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion von PBMCs in der Sepsis mit einer stärker ausgeprägten Immunsuppression und einer höheren Mortalität assoziiert ist. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette zu der Paralyse von polymorphkernigen Leukozyten in der Sepsis beiträgt [114, 117].

All diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, Störungen in dem hier beschriebenen basalen autokrinen purinergen Regelkreis könnten an der Suppression der T-Zellimmunantwort in der Sepsis beteiligt sein. Möglich wäre dabei folgender Zusammenhang:

Befinden sich die Mitochondrien unstimulierter CD4⁺-T-Zellen aufgrund einer dysfunktionellen autokrinen purinergen Signaltransduktion nicht länger in einer erhöhten Reaktionsbereitschaft, ist eine rasche und stark gesteigerte mitochondriale Produktion von ATP nach TCR-Stimulation nicht mehr möglich, eine wirkungsvolle Amplifizierung des TCR-Signals unterbleibt. Verminderte intra- und extrazelluläre ATP-Konzentrationen führen lediglich zu einer insuffizienten Stimulation von purinergen P2X-Rezeptoren. Daher verläuft die Erhöhung der zytosolischen und mitochondrialen Calcium-Konzentration nach TCR-Stimulation verlangsamt und abgeschwächt. Ein positiver Rückkopplungskreislauf, der zu einer zusätzlich gesteigerten mitochondrialen ATP- und ROS-Produktion sowie zu einer weiteren Verstärkung des Calcium-Signals führen würde, findet nur unzureichend statt. Im Endeffekt unterbleibt so eine adäquate Aktivierung von T-Zelleffektorfunktionen, wodurch es zur Immunsuppression kommt.

6.5. Mögliche Faktoren, durch die die basale purinerge Signaltransduktion gestört werden kann

Die durch ATP und seine Abbauprodukte vermittelten Effekte reichen - abhängig von den jeweiligen Metabolit-Konzentrationen und den involvierten Rezeptoren - von der Stimulation bis zur Suppression der zellvermittelten Immunantwort [112]. Die purinerge Signaltransduktion findet dabei hauptsächlich im Extrazellularraum statt: Hier erfolgt der durch verschiedene Ektonukleotidasen katalysierte Abbau von ATP, hier binden ATP, ADP, AMP und Adenosin an zellmembranständige Purinorezeptoren. Diese Tatsache macht die feinregulierte purinerge Signalübermittlung gegenüber Störungen anfällig. Um genauer zu klären, welche extrazellulären Faktoren die basale purinerge Signalübertragung und damit den Standby-Modus von unstimulierten CD4⁺-T-Zellen in der Sepsis beeinträchtigen, sind weitere Studien nötig. Aufgrund der bisherigen Datenlage und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheinen aber vor allem die extrazellulären Konzentrationen von ATP und Adenosin relevant zu sein.

6.5.1. ATP als negativer Immunmodulator

Während einer Sepsis kommt es durch inflammatorische und teils zytotoxische Reaktionen zu Gewebe- und Zellschäden. Untergehende und beschädigte Zellen setzen vermehrt ATP frei, wodurch die Plasmakonzentration von ATP rasch ansteigt [118-120]. Extrazelluläres ATP gehört zur Gruppe der sogenannten DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern*) und wirkt als ein solches Gefahrensignal überwiegend proinflammatorisch [104]. Mehrere Studien konnten jedoch inzwischen nachweisen, dass ATP eine komplexere Rolle in der Immunregulation einnimmt und viele Effektorfunktionen verschiedenster Immunzellen inhibieren kann [100, 104, 121]. So blockiert eine chronische Exposition gegenüber extrazellulärem ATP oder dem nicht-hydrolysierbaren ATP_γ die Bildung inflammatorischer Zytokine von dendritischen Zellen und reduziert die Plasmakonzentrationen von TNF-α und IL-1α [122, 123]. Ähnliche Effekte konnten auch an Makrophagen und Splenozyten beobachtet werden [124]. Höhere extrazelluläre ATP-Konzentrationen verhindern neben der Proliferation von natürlichen Killerzellen auch die Proliferation von T-Lymphozyten sowie die Bildung und Sekretion von IFN-γ und IL-2 [101, 102, 125]. Außerdem konnten Trabanelli et al. nachweisen, dass eine Inkubation mit 1 mM ATP die Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten inhibiert [103]. Dazu passen Ergebnisse von

Csóka et al., die in einer Studie aus dem Jahr 2015 einen günstigen Effekt von CD39 im Sepsis-Maus-Modell feststellen [126]. CD39 ist eine membran-gebundene Ektonukleotidase, die ATP und ADP zu AMP abbaut. In den Versuchen von Csóka et al. verbesserte eine Elimination von ATP durch den CD39-Imitator Apyrase die Überlebensrate von Mäusen nach der Sepsis-Induktion durch CLP (*cecal ligation and puncture*). Ein Knock-out oder eine pharmakologische Blockade von CD39 erhöhte dagegen die Mortalität. All diese Resultate zeigen, dass eine zu hohe extrazelluläre ATP-Konzentration immunsuppressiv wirken kann. Als Grund hierfür wird neben einer Aktivierung des P2Y₁₁-Rezeptors (s.o.) auch eine P2-Rezeptordesensibilisierung diskutiert [100, 127].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit diesen Beobachtungen überein und zeigen einen möglichen Signalweg auf, der durch eine Desensibilisierung von P2-Rezeptoren bei erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen beeinträchtigt werden könnte. Nach der Rezeptor-Downregulation ist eine adäquate basale Stimulation der Mitochondrien durch autokrine purinerge Signaltransduktion nicht mehr möglich. Der hier postulierte Standby-Modus unstimulierter CD4⁺-T-Zellen ist gestört, was möglicherweise eine rasche und suffiziente Aktivierung der Lymphozyten verhindert.

6.5.2. Adenosin als negativer Immunmodulator

Der Abbau von ATP zu Adenosin und die Stimulation von A_{2A}-Rezeptoren ist bei der Regulation und Kontrolle der zellvermittelten Immunantwort ein wichtiger anti-inflammatorischer Mechanismus [128]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit dieser allgemein anerkannten Tatsache im Einklang. Die hier erforschte basale mitochondriale Aktivität wird vor allem über Adenosin als Ligand am A_{2A}-Rezeptor supprimiert, wodurch eine vorzeitige oder überschießende T-Zellaktivierung verhindert wird. Nach einer adäquaten T-Zellrezeptorstimulation kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer erhöhten ATP-Freisetzung, die extrazelluläre Adenosinkonzentration steigt jedoch nicht an [64, 69]. Das Verhältnis von ATP zu Adenosin verschiebt sich folglich zugunsten des stimulierenden ATP, wodurch die T-Zellaktivierung wirkungsvoll unterstützt werden kann.

Septische Patienten weisen signifikant höhere Adenosin-Plasmakonzentrationen auf als gesunde Probanden, wobei die Höhe der Adenosin-Plasmakonzentration mit der

Sepsis-Mortalität korreliert [129, 130]. Passend dazu berichten Nemeth et al. von einem positiven Effekt einer A2A-Blockade in einem Sepsis-Maus-Modell. A2A-Knockout-Mäuse zeigten nach der Sepsis-Induktion durch CLP eine geringere Bakterienlast und eine höhere Überlebensrate als Wildtyp-Mäuse; auch eine pharmakologische Blockade des A2A-Rezeptors verbesserte das Outcome nach CLP signifikant [131]. Adenosin wirkt folglich während einer aktiven Infektion immunsuppressiv.

Einen möglichen Grund hierfür liefert die vorliegende Arbeit: Zu hohe Adenosin-Konzentrationen im Plasma von septischen Patienten verursachen bereits in ruhenden CD4⁺-T-Zellen eine starke Inhibierung der basalen mitochondrialen ATP-Produktion, unterbrechen die erhöhte Reaktionsbereitschaft und verhindern dadurch wahrscheinlich eine adäquate Aktivierung der Lymphozyten nach TCR-Stimulation. Während der sekundären Phase der Immunparalyse könnten septische Patienten daher von einer A2A-Rezeptorblockade oder einer pharmakologischen Senkung der Adenosin-Plasmakonzentration profitieren, um Sekundär- und Superinfektionen vorzubeugen [132, 133].

6.6. Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass *Purinergic Signaling* auch in unstimulierten T-Zellen an der Kontrolle von wichtigen Zellfunktionen beteiligt ist. Der beschriebene Regelkreis ermöglicht es CD4⁺-T-Lymphozyten vermutlich, rasch und suffizient auf Alarmsignale zu reagieren und verhindert gleichzeitig eine vorschnelle T-Zellaktivierung. Um diese komplexe Balance zu erhalten, ist eine genaue Regulation der extrazellulären Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und Adenosin notwendig. Während der Sepsis werden diese Regulationsmechanismen durch die unkontrollierte Freisetzung von Purin-Metaboliten gestört. Dies verhindert primär die purinerge Signaltransduktion und sekundär die Ausübung verschiedenster basaler T-Zellfunktionen sowie eine suffiziente T-Zellaktivierung - eine Immunsuppression ist die Folge. Als mögliche Ursache kommen hierfür erhöhte extrazelluläre ATP- oder Adenosin-Konzentrationen in Betracht. Aus diesem Wissen eröffnet sich theoretisch die Möglichkeit, den hier beschriebenen Regulationsmechanismus durch pharmakologische Modifikation seiner einzelnen Bestandteile wiederherzustellen und so die Ausbildung einer T-Zellparalyse zu verhindern. Die Beeinflussung von unstimulierten T-Zellen durch

purinerge Signaltransduktion stellt damit einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung immunmodulatorischer Therapiestrategien dar und sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

7. Zusammenfassung

Purinergic signaling umschreibt das Konzept, dass ATP und verwandte Moleküle wie ADP und Adenosin über spezifische Purinrezeptoren Zellfunktionen beeinflussen. In den letzten Jahren häuften sich die Beweise dafür, dass *purinergic signaling* eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunzellen und der Steuerung der Immunantwort spielt.

CD4⁺-T-Zellen sind für die Ausbildung einer suffizienten, adaptiven Immunantwort von zentraler Bedeutung. Nach der T-Zellrezeptorstimulation kommt es in T-Lymphozyten sehr rasch zu einer stark gesteigerten mitochondrialen ATP-Synthese. Das ATP wird an der immunologischen Synapse freigesetzt und führt dort über autokrine Stimulation von membranständigen ATP-abhängigen Calcium-Kanälen (P2X-Rezeptoren) zu einer Erhöhung der intrazellulären und mitochondrialen Calciumkonzentration sowie zu einer Amplifizierung des T-Zellrezeptorsignals. Erst durch diesen verstärkenden Mechanismus wird eine wirkungsvolle T-Zellantwort möglich.

Während der sekundären Phase der Sepsis kommt es häufig zu einer ausgeprägten Dysfunktion der zellvermittelten Immunantwort, die unter anderem durch eine Suppression der CD4⁺-T-Zellfunktion hervorgerufen wird und maßgeblich für die nach wie vor hohe Morbidität und Mortalität verantwortlich ist. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen dieser T-Zellsuppression und -paralyse sind jedoch nicht eindeutig geklärt.

Ausgehend hiervon wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und wie autokrine purinerge Mechanismen bereits die mitochondriale Aktivität unstimulierter CD4⁺-T-Zellen regulieren. Als Messparameter für die Mitochondrienaktivität wurden dabei das mitochondriale Membranpotential und die mitochondriale ROS-Produktion in Abhängigkeit von verschiedenen Purinorezeptorantagonisten und -agonisten durchflusszytometrisch und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Anschließend wurde überprüft, ob eine Störung eines solchen basalen Regelkreises an der Ausbildung der T-Zellparalyse in der Sepsis beteiligt sein könnte. Hierfür wurden CD4⁺-T-Lymphozyten septischer Patienten mit CD4⁺-T-Zellen gesunder Kontroll-Probanden hinsichtlich ihrer basalen Mitochondrienaktivität und Aktivierbarkeit nach Stimulation verglichen.

Es ergaben sich folgende Resultate:

- Die basale Mitochondrienaktivität unstimulierter CD4⁺-T-Zellen wird über die ATP-abhängigen Purinorezeptoren P2X1 und P2X7 und den ADP-Rezeptor P2Y12 stimuliert.
- Eine Aktivierung des P2Y11-Rezeptors durch ATP bzw. eine Stimulation des A2A-Rezeptors durch Adenosin führt über eine vermehrte Produktion von cAMP und eine nachfolgend gesteigerte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A zu einer Reduktion der basalen Mitochondrienaktivität.
- Die mitochondriale ATP-Synthese, die entscheidend an der T-Zellaktivierung beteiligt ist, unterliegt folglich in unstimulierten T-Lymphozyten einer komplexen Regulation.

- In CD4⁺-T-Zellen von septischen Patienten zeigte sich eine signifikant verminderte basale mitochondriale Aktivität.
- Die intrazelluläre ATP-Konzentration war in PBMCs von septischen Patienten ebenfalls erniedrigt.
- Die Calcium-Antwort auf eine Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern lief in septischen T-Lymphozyten verlangsamt ab und blieb deutlich unter der Maximalantwort, die in gesunden Kontrollzellen erreicht wurde.
- Diese Ergebnisse zeigen, dass die basale mitochondriale Funktion und die Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten in der Sepsis beeinträchtigt sind. Es erscheint gut möglich, dass Störungen in dem hier beschriebenen Regelkreis daran ursächlich beteiligt sind.

Die Beeinflussung der purinergen Signaltransduktion könnte somit einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung immunmodulatorischer Therapiestrategien zur Verhinderung einer T-Zellparalyse in der Sepsis darstellen und sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(16):1546-1554.
2. Mayr FB, Yende S, Angus DC: **Epidemiology of severe sepsis.** *Virulence* 2014, **5**(1):4-11.
3. Walmrath D, Grimminger F, Seeger W: **[Severe sepsis--new therapeutic options].** *Der Internist* 2001, **42**(12):1619-1620, 1623-1630.
4. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S *et al*: **Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study.** *Intensive care medicine* 2007, **33**(4):606-618.
5. Melamed A, Sorvillo FJ: **The burden of sepsis-associated mortality in the United States from 1999 to 2005: an analysis of multiple-cause-of-death data.** *Critical care* 2009, **13**(1):R28.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** *Critical care medicine* 2001, **29**(7):1303-1310.
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM *et al*: **The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).** *Jama* 2016, **315**(8):801-810.
8. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: **The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine.** *Intensive care medicine* 1996, **22**(7):707-710.
9. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y *et al*: **International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.** *Jama* 2009, **302**(21):2323-2329.
10. Angus DC, van der Poll T: **Severe sepsis and septic shock.** *The New England journal of medicine* 2013, **369**(21):2063.

11. Castellino DJ, McNair P, Kay TW: **Lymphocytopenia in a hospital population--what does it signify?** *Australian and New Zealand journal of medicine* 1997, **27**(2):170-174.
12. van der Poll T, Opal SM: **Host-pathogen interactions in sepsis.** *The Lancet Infectious diseases* 2008, **8**(1):32-43.
13. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: **Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.** *Chest* 1997, **112**(1):235-243.
14. Ledderose C: **Expression von Adenosinrezeptoren auf humanen polymorphkernigen Leukozyten in einem in-vitro-Sepsismodell.** *Dissertation, LMU München* 2007.
15. Carson WFt, Cavassani KA, Ito T, Schaller M, Ishii M, Dou Y, Kunkel SL: **Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis.** *European journal of immunology* 2010, **40**(4):998-1010.
16. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG *et al*: **Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans.** *Journal of immunology* 2001, **166**(11):6952-6963.
17. Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS: **Impact of sepsis on CD4 T cell immunity.** *Journal of leukocyte biology* 2014, **96**(5):767-777.
18. Green AM, Difazio R, Flynn JL: **IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection.** *Journal of immunology* 2013, **190**(1):270-277.
19. Pepper M, Jenkins MK: **Origins of CD4(+) effector and central memory T cells.** *Nature immunology* 2011, **12**(6):467-471.
20. Weinstein JS, Hernandez SG, Craft J: **T cells that promote B-Cell maturation in systemic autoimmunity.** *Immunological reviews* 2012, **247**(1):160-171.
21. Wherry EJ: **T cell exhaustion.** *Nature immunology* 2011, **12**(6):492-499.
22. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd, Kreisel D, Krupnick AS *et al*: **Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure.** *Jama* 2011, **306**(23):2594-2605.

23. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: **Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach.** *The Lancet Infectious diseases* 2013, **13**(3):260-268.
24. Ward PA: **Immunosuppression in sepsis.** *Jama* 2011, **306**(23):2618-2619.
25. Angus DC: **The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?** *Jama* 2011, **306**(23):2614-2615.
26. Marti-Carvajal AJ, Sola I, Gluud C, Lathyris D, Cardona AF: **Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2012, **12**:CD004388.
27. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A *et al*: **Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock.** *The New England journal of medicine* 2012, **366**(22):2055-2064.
28. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H *et al*: **Hydrocortisone therapy for patients with septic shock.** *The New England journal of medicine* 2008, **358**(2):111-124.
29. Szakmany T, Hauser B, Radermacher P: **N-acetylcysteine for sepsis and systemic inflammatory response in adults.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2012, **9**:CD006616.
30. Wenzel RP, Edmond MB: **Septic shock--evaluating another failed treatment.** *The New England journal of medicine* 2012, **366**(22):2122-2124.
31. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M *et al*: **Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial.** *Jama* 2013, **309**(11):1154-1162.
32. Webster NR, Galley HF: **Immunomodulation in the critically ill.** *British journal of anaesthesia* 2009, **103**(1):70-81.
33. Cohen J, Carlet J: **INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis.** International Sepsis Trial Study Group. *Critical care medicine* 1996, **24**(9):1431-1440.
34. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA *et al*: **Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial.** The Interleukin-1 Receptor

- Antagonist Sepsis Investigator Group.** *Critical care medicine* 1997, **25(7):1115-1124.**
35. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S *et al*: **Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study.** *Critical care medicine* 2001, **29(4):765-769.**
 36. Derkx B, Wittes J, McCloskey R: **Randomized, placebo-controlled trial of HA-1A, a human monoclonal antibody to endotoxin, in children with meningococcal septic shock. European Pediatric Meningococcal Septic Shock Trial Study Group.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1999, **28(4):770-777.**
 37. Barochia AV, Cui X, Vitberg D, Suffredini AF, O'Grady NP, Banks SM, Minneci P, Kern SJ, Danner RL, Natanson C *et al*: **Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials.** *Critical care medicine* 2010, **38(2):668-678.**
 38. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC: **The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate.** *Critical care* 2011, **15(4):R183.**
 39. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: **Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony.** *Molecular medicine* 2008, **14(1-2):64-78.**
 40. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS: **The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer?** *Virulence* 2014, **5(1):45-56.**
 41. Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P: **Sepsis: time has come to focus on the later stages.** *Medical hypotheses* 2008, **71(2):203-208.**
 42. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, Sacristan C, Victora GD, Zanin-Zhorov A, Dustin ML: **Functional anatomy of T cell activation and synapse formation.** *Annual review of immunology* 2010, **28:79-105.**
 43. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: **The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.** *Science* 1999, **285(5425):221-227.**
 44. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS: **T cell activation.** *Annual review of immunology* 2009, **27:591-619.**

45. van der Merwe PA, Dushek O: **Mechanisms for T cell receptor triggering.** *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(1):47-55.
46. van der Merwe PA: **The TCR triggering puzzle.** *Immunity* 2001, **14**(6):665-668.
47. Viola A, Contento RL, Molon B: **Signaling amplification at the immunological synapse.** *Current topics in microbiology and immunology* 2010, **340**:109-122.
48. Junger WG: **Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling.** *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(3):201-212.
49. Woehrle T, Yip L, Elkhail A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, Junger WG: **Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse.** *Blood* 2010, **116**(18):3475-3484.
50. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A: **Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut.** *British journal of pharmacology* 1970, **40**(4):668-688.
51. Burnstock G: **Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential.** *The Keio journal of medicine* 2013, **62**(3):63-73.
52. Burnstock G: **Purinergic signalling: from discovery to current developments.** *Experimental physiology* 2014, **99**(1):16-34.
53. Lazarowski ER: **Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release.** *Purinergic signalling* 2012, **8**(3):359-373.
54. Zimmermann H: **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2000, **362**(4-5):299-309.
55. Corriden R, Insel PA: **Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation.** *Science signaling* 2010, **3**(104):re1.
56. Ralevic V, Burnstock G: **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacological reviews* 1998, **50**(3):413-492.
57. Jarvis MF, Khakh BS: **ATP-gated P2X cation-channels.** *Neuropharmacology* 2009, **56**(1):208-215.
58. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS: **Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels.** *Pharmacological reviews* 2011, **63**(3):641-683.

59. Surprenant A, North RA: **Signaling at purinergic P2X receptors**. *Annual review of physiology* 2009, **71**:333-359.
60. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA *et al*: **International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy**. *Pharmacological reviews* 2006, **58**(3):281-341.
61. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE: **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update**. *Pharmacological reviews* 2011, **63**(1):1-34.
62. Filippini A, Taffs RE, Sitkovsky MV: **Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, **87**(21):8267-8271.
63. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F: **Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels**. *Science signaling* 2008, **1**(39):ra6.
64. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG: **Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors**. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, **23**(6):1685-1693.
65. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC: **Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation**. *Pharmacology & therapeutics* 2006, **112**(2):358-404.
66. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR: **Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells**. *Blood* 2001, **97**(3):587-600.
67. Wang L, Jacobsen SE, Bengtsson A, Erlinge D: **P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells**. *BMC immunology* 2004, **5**:16.
68. Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S: **Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation**. *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(23):17406-17416.

69. Ledderose C, Bao Y, Lidicky M, Zipperle J, Li L, Strasser K, Shapiro NI, Junger WG: **Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling.** *The Journal of biological chemistry* 2014, **289**(37):25936-25945.
70. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M: **T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(36):14418-14423.
71. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS: **Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes.** *The Journal of cell biology* 1997, **137**(3):633-648.
72. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R: **Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(24):13807-13812.
73. Lewis RS: **Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes.** *Annual review of immunology* 2001, **19**:497-521.
74. Oh-hora M: **Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells.** *Immunological reviews* 2009, **231**(1):210-224.
75. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS: **Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression.** *The Journal of experimental medicine* 2002, **195**(1):59-70.
76. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H *et al*: **Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling.** *Immunity* 2013, **38**(2):225-236.
77. Yegutkin GG, Mikhailov A, Samburski SS, Jalkanen S: **The detection of micromolar pericellular ATP pool on lymphocyte surface by using lymphoid ecto-adenylate kinase as intrinsic ATP sensor.** *Molecular biology of the cell* 2006, **17**(8):3378-3385.
78. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK: **Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(40):31061-31068.

79. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: **Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(12):862-874.
80. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**(6):1644-1655.
81. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA: **The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford.** *Clinical chemistry* 2002, **48**(10):1819-1827.
82. Ibrahim SF, van den Engh G: **Flow cytometry and cell sorting.** *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2007, **106**:19-39.
83. Han D, Williams E, Cadenas E: **Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space.** *The Biochemical journal* 2001, **353**(Pt 2):411-416.
84. Nicholls DG, Budd SL: **Mitochondria and neuronal survival.** *Physiological reviews* 2000, **80**(1):315-360.
85. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G: **Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis.** *Biochimica et biophysica acta* 2003, **1606**(1-3):137-146.
86. Sobreira C, Davidson M, King MP, Miranda AF: **Dihydrorhodamine 123 identifies impaired mitochondrial respiratory chain function in cultured cells harboring mitochondrial DNA mutations.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1996, **44**(6):571-579.
87. Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW: **Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives.** *Biophysical journal* 1999, **76**(1 Pt 1):469-477.
88. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I: **Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes.** *Cell calcium* 2000, **27**(2):97-106.
89. Chapman EH, Kurec AS, Davey FR: **Cell volumes of normal and malignant mononuclear cells.** *Journal of clinical pathology* 1981, **34**(10):1083-1090.

90. Ullmann H, Meis S, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Nickel P, Communi D, Boeynaems JM, Wolf C, Hausmann R *et al*: **Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency.** *Journal of medicinal chemistry* 2005, **48**(22):7040-7048.
91. Yegutkin GG: **Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade.** *Biochimica et biophysica acta* 2008, **1783**(5):673-694.
92. Linden J: **Regulation of leukocyte function by adenosine receptors.** *Advances in pharmacology* 2011, **61**:95-114.
93. Muller T, Vieira RP, Grimm M, Durk T, Cicko S, Zeiser R, Jakob T, Martin SF, Blumenthal B, Sorichter S *et al*: **A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011, **44**(4):456-464.
94. Vergani A, Fotino C, D'Addio F, Tezza S, Podetta M, Gatti F, Chin M, Bassi R, Molano RD, Corradi D *et al*: **Effect of the purinergic inhibitor oxidized ATP in a model of islet allograft rejection.** *Diabetes* 2013, **62**(5):1665-1675.
95. Vergani A, Tezza S, D'Addio F, Fotino C, Liu K, Niewczas M, Bassi R, Molano RD, Kleffel S, Petrelli A *et al*: **Long-term heart transplant survival by targeting the ionotropic purinergic receptor P2X7.** *Circulation* 2013, **127**(4):463-475.
96. Marques CC, Castelo-Branco MT, Pacheco RG, Buongusto F, do Rosario A, Jr., Schanaider A, Coutinho-Silva R, de Souza HS: **Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1842**(1):65-78.
97. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M: **Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008, **39**(2):127-132.
98. Vivekananthan DP, Bhatt DL, Chew DP, Zidar FJ, Chan AW, Moliterno DJ, Ellis SG, Topol EJ: **Effect of clopidogrel pretreatment on periprocedural rise in C-reactive protein after percutaneous coronary intervention.** *The American journal of cardiology* 2004, **94**(3):358-360.
99. Schnurr M, Toy T, Stoitzner P, Cameron P, Shin A, Beecroft T, Davis ID, Cebon J, Maraskovsky E: **ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling.** *Blood* 2003, **102**(2):613-620.
100. Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC: **Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity.** *Current opinion in pharmacology* 2009, **9**(4):507-513.

101. Duhant X, Schandene L, Bruyns C, Gonzalez NS, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D: **Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4+ T lymphocytes.** *Journal of immunology* 2002, **169**(1):15-21.
102. Duhant X, Suarez Gonzalez N, Schandene L, Goldman M, Communi D, Boeynaems JM: **Molecular mechanisms of extracellular adenine nucleotides-mediated inhibition of human Cd4(+) T lymphocytes activation.** *Purinergic signalling* 2005, **1**(4):377-381.
103. Trabanelli S, Ocadlikova D, Gulinelli S, Curti A, Salvestrini V, Vieira RP, Idzko M, Di Virgilio F, Ferrari D, Lemoli RM: **Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation.** *Journal of immunology* 2012, **189**(3):1303-1310.
104. Vitiello L, Gorini S, Rosano G, la Sala A: **Immunoregulation through extracellular nucleotides.** *Blood* 2012, **120**(3):511-518.
105. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P: **Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases.** *Nature reviews Drug discovery* 2008, **7**(9):759-770.
106. Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ: **Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes.** *Journal of immunology* 2000, **164**(1):436-442.
107. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES: **Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice.** *Journal of immunology* 1996, **157**(10):4634-4640.
108. Thiel M, Chouker A: **Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes.** *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1995, **126**(3):275-282.
109. Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM, Linden J, Worthington MT, Ernst PB: **Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis.** *Journal of immunology* 2006, **177**(5):2765-2769.
110. Sevigny CP, Li L, Awad AS, Huang L, McDuffie M, Linden J, Lobo PI, Okusa MD: **Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition.** *Journal of immunology* 2007, **178**(7):4240-4249.

111. Abraham RT, Weiss A: **Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm.** *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(4):301-308.
112. Burnstock G, Boeynaems JM: **Purinergic signalling and immune cells.** *Purinergic signalling* 2014, **10**(4):529-564.
113. von Andrian UH, Mempel TR: **Homing and cellular traffic in lymph nodes.** *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(11):867-878.
114. Garrabou G, Moren C, Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, Casademont J: **The effects of sepsis on mitochondria.** *The Journal of infectious diseases* 2012, **205**(3):392-400.
115. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D: **Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis.** *Critical care medicine* 2007, **35**(12):2702-2708.
116. Weiss SL, Selak MA, Tuluc F, Perales Villarroel J, Nadkarni VM, Deutschman CS, Becker LB: **Mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells in pediatric septic shock.** *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2015, **16**(1):e4-e12.
117. Japiassu AM, Santiago AP, d'Avila JC, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, Bozza FA, Oliveira MF: **Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity.** *Critical care medicine* 2011, **39**(5):1056-1063.
118. Gallucci S, Matzinger P: **Danger signals: SOS to the immune system.** *Current opinion in immunology* 2001, **13**(1):114-119.
119. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G: **Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides.** *Journal of leukocyte biology* 2003, **73**(3):339-343.
120. Rubartelli A, Lotze MT: **Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox.** *Trends in immunology* 2007, **28**(10):429-436.
121. Boeynaems JM, Communi D: **Modulation of inflammation by extracellular nucleotides.** *The Journal of investigative dermatology* 2006, **126**(5):943-944.
122. la Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G: **Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses.** *Journal of immunology* 2001, **166**(3):1611-1617.

123. Proctor RA, Denlinger LC, Leventhal PS, Daugherty SK, van de Loo JW, Tanke T, Firestein GS, Bertics PJ: **Protection of mice from endotoxic death by 2-methylthio-ATP.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(13):6017-6020.
124. Hasko G, Kuhel DG, Salzman AL, Szabo C: **ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages.** *British journal of pharmacology* 2000, **129**(5):909-914.
125. Miller JS, Cervenka T, Lund J, Okazaki IJ, Moss J: **Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor.** *Journal of immunology* 1999, **162**(12):7376-7382.
126. Csoka B, Nemeth ZH, Toro G, Koscsó B, Kokai E, Robson SC, Enjyoji K, Rolandelli RH, Erdelyi K, Pacher P *et al*: **CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2015, **29**(1):25-36.
127. Huang NN, Wang DJ, Heller E, Heppel LA: **Homologous desensitization of ATP-stimulated mitogenesis: mechanism involves desensitization of arachidonic acid release and cAMP elevation but not the activation of protein kinase A.** *Journal of cellular physiology* 1995, **165**(3):667-675.
128. Sitkovsky MV, Ohta A: **The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?** *Trends in immunology* 2005, **26**(6):299-304.
129. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Lysenko L, Peter K, Thiel M: **Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from patients with septic shock.** *Shock* 2007, **27**(1):25-31.
130. Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R: **High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 2000, **28**(9):3198-3202.
131. Nemeth ZH, Csoka B, Wilmanski J, Xu D, Lu Q, Ledent C, Deitch EA, Pacher P, Spolarics Z, Hasko G: **Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis.** *Journal of immunology* 2006, **176**(9):5616-5626.
132. Hasko G, Cronstein BN: **Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity.** *Trends in immunology* 2004, **25**(1):33-39.
133. Ramackers BP, Riksen NP, Pickkers P: **The immunomodulatory actions of adenosine during systemic inflammation.** *Netherlands Journal of Critical Care* 2014, **18**(5):4-10

9. Abkürzungen

5-BDBD	5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzofuro[3,2- <i>e</i>]-1,4-diazepin-2-one
A23187	5-(Methylamino)-2-[[2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>R</i>]-3,9,11-trimethyl-8-[(1 <i>S</i>)-1-methyl-2-oxo-2-(1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)-ethyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl]methyl]-4-benzoxazolecarboxylic acid
A438079	3-[[5-(2,3-Dichlorophenyl)-1 <i>H</i> -tetrazol-1-yl]methyl]pyridine hydrochloride
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Apache II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
APC	Antigen Presenting Cell
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CGS21860	4-[2-[[6-Amino-9-(<i>N</i> -ethyl-β-D-ribofuranuronamidoyl)-9 <i>H</i> -purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic acid hydrochloride
Clopidogrel	(<i>S</i>)-(+)-Methyl 2-(4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2- <i>c</i>]pyridin-5-yl)-2-(2-chlorophenyl)acetate hydrogen sulfate
CSC	(<i>E</i>)-8-[2-(3-Chlorophenyl)ethenyl]-3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1 <i>H</i> -purine-2,6-dione
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DHR123	Dihydrorhodamin123; 2-(3,6-diamino-9 <i>H</i> -xanthen-9-yl)-benzoic acid, methylester
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
Fluo-4 AM	Fluo-4 Acetoxymethylester; 2-[[2-(2-{5-is(carboxymethyl)amino}-2-methylphenoxy)ethoxy)-4-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl) enyl](carboxymethyl)amino} acetic acid
FSC	Forward Scatter
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein

H89	<i>N</i> -[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-soquinolinesulfonamide dihydrochloride
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LRP	Leukozytenreiches Plasma
MFI	Mean Fluorescence Intensity, Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF023	8,8'-[carbonyl <i>bis</i> (imino-3,1-phenylenecarbonylimino)] <i>bis</i> -1,3,5-naphthalene-trisulphonic acid, hexasodium salt
NF157	8,8'-[Carbonyl <i>bis</i> [imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-fluoro-3,1-phenylene)carbonylimino]] <i>bis</i> -1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCA	Perchloric Acid
PKA	Proteinkinase A
PSB0777	4-[2-[(6-Amino-9-β-D-ribofuranosyl-9 <i>H</i> -purin-2-yl)thio]ethyl]benzenesulfonic acid ammonium salt
RLU	Relative Light Unit
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standard Deviation
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SSC	Sideward Scatter
TCR	T-Cell Receptor
TMRE	Tetramethylrhodaminester; Xanthylium, 3,6-bis(dimethylamino)-9-[2-(ethoxycarbonyl)phenyl]-, perchlorate 115532-52-0

10. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

Ledderose C, Bao Y, Ledderose S, Woehrle T, Heinisch M, Yip L, Zhang J, Robson SC, Shapiro NI, Junger WG. **Mitochondrial Dysfunction, Depleted Purinergic Signaling, and Defective T Cell Vigilance and Immune Defense.** *Journal of Infectious Diseases* 2016, **213**(3):456-64.

Ledderose C, Woehrle T, Ledderose S, Strasser K, Seist R, Bao Y, Zhang J, Junger WG. **Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling?** *Purinergic Signalling* 2016, **12**(3):439-51.

11. Danksagung

Nach Abschluss dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. W. Junger für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Forschungslabor am Department of Surgery des BIDMC in Boston (Harvard Medical School, USA), für sein Engagement und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Briegel danke ich für seine Aufgeschlossenheit der Arbeit gegenüber und für die Vertretung dieser Dissertation vor der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herzlich danken möchte ich Dr. J. Zhang, Dr. Y. Bao, Dr. A. Lee und Dr. C. Ledderose für ihren fachlichen Rat, für wertvolle Anregungen, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die purinerge Regulation der Mitochondrienaktivität in unstimulierten CD4⁺-T-Lymphozyten und deren potentielle Bedeutung für die T-Zellsuppression in der Sepsis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10. 02. 2018, Stephan Ledderose

Ort, Datum, Unterschrift