

***Aktivierung des P2X7-Purinrezeptors der Maus
(Mus musculus; Linnaeus, 1758) durch kovalent
und nicht-kovalent gebundene Liganden***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Department Biologie

vorgelegt von
Nicole Schwarz
aus Hamburg

Hamburg, November 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. F. KOCH-NOLTE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ
Tag der Disputation: 18. September 2009

Hamburg, den 04. September 2009



J. Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Dank

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die Überlassung des spannenden Themas, seine hervorragende Betreuung und seine Anleitung zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Ich danke ihm weiterhin für seine Unterstützung bei der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongress- und Kooperationsreisen, die es mir ermöglicht hat, weitere wichtige wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Lothar Renwrandt für sein Interesse an meiner Dissertation und seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu verfassen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Friedrich Haag und Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Tipps bei praktischen Problemen.

Dr. Felix Scheuplein möchte ich für die Einarbeitung in die Techniken sowohl am Anfang meiner Doktorarbeit, als auch während meines späteren Auslandsaufenthalts in den Jackson Laboratories in Bar Harbor, Maine danken. Weiterhin danke ich ihm für die Durchführung der Versuche in Abbildung 6 A und B sowie Frau Fabienne Seyfried und Frau Valea Schumacher für die Genotypisierungen der hier genutzten Mäuse.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in den letzten Wochen, das sehr gute Arbeitsklima und die schönen gemeinsamen Jahre im IfI.

Meiner Familie danke ich für die Ermunterung während der Doktorarbeit und ganz besonders meiner Mutter, die mich früh mit ihrer Begeisterung für die Biologie angesteckt hat.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Florian von ganzem Herzen danken für seine wertvolle Unterstützung während allen Phasen der Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Dank.....	3
1. Zusammenfassung	7
1.1 Abstract.....	8
1.2 Publierte Ergebnisse	9
2. Einleitung	10
2.1 Purinrezeptoren.....	11
2.2 Zytolytischer P2X7-Rezeptor	12
2.3 ADP-Ribosyltransferasen	15
2.3.1 Kovalente Modifikation: Mono-ADP-Ribosylierung.....	16
2.3.2 ART2.1 und ART2.2	17
2.4 Signalmoleküle: Extrazelluläres NAD ⁺ und ATP.....	18
2.5 Knock-out-Mausmodelle zur Erforschung der Rollen von ART2 und P2X7	20
2.6 Phagozytose von apoptotischen T-Zellen.....	21
2.7 Zielsetzung der Arbeit	22
3. Materialien.....	23
3.1 Laborgeräte.....	23
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.3 Zelllinien.....	24
3.4 Konstrukte	24
3.5 Mausstämme	24
3.6 Antikörper.....	25
3.7 Chemikalien.....	26
3.8 ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7	27
3.9 Puffer und Medien	27
3.9.1 Medien	27
3.9.2 Puffer	28
3.10 Software.....	29
4. Methoden.....	30
4.1 Zellbiologische Methoden	30
4.1.1 Kultur und Ernte von adhärenenten HEK-Zellen	30
4.1.2 Transiente Transfektion adhärenenter HEK-T-Zellen	30
4.1.3 Transiente Transfektion der HEK-Zellen in Suspension.....	30
4.1.4 Calcium-Imaging-Assay	31
4.1.5 Präparation muriner Lymphozyten.....	32
4.1.6 B-Zell-Depletion	33
4.1.7 Präparation muriner Peritonealmakrophagen	33
<i>Peritoneallavage</i>	33
<i>Kultivierung der Peritonealmakrophagen</i>	33
4.2 Immunologische Methoden	34
4.2.1 Durchflusszytometrie (FACS)	34
4.2.2 Antikörperanfärbung	34
4.2.3 NAD ⁺ - und ATP-Behandlung muriner Lymphozyten.....	34
4.2.4 AnnexinV-Bindung/PI-Aufnahme	35
4.2.5 Yo-Pro-1-Aufnahme.....	35
4.2.6 Etheno-NAD ⁺ -ADP-Ribosylierungsassay	35
4.2.7 Temperatur-Wirkungs-Untersuchungen	35
4.2.8 Phagozytose-Assays	36

	<i>Anfärbung der T-Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen</i>	36
	„On-Plate“ Assay.....	36
	„In solution“ Assay	36
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	37
4.3.1	[³² P]-NAD ⁺ -ADP-Ribosylierungsassay.....	37
4.3.2	Immunpräzipitation	37
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradiographie....	37
4.3.4	Coomassie-Färbung.....	38
4.4	ART2.2-Blockade-Assay.....	38
4.4.1	Intravenöse Injektion von inhibierenden Antikörpern/eNAD ⁺	38
5.	Ergebnisse	39
5.1	Funktionsanalysen der P2X7-Rezeptormutanten im HEK-Zellmodell.....	39
5.1.1	Calciumantworten der P2X7-Mutanten nach ATP-Stimulation	39
5.1.2	Calciumantworten der P2X7-Mutanten nach NAD ⁺ -Stimulation.....	41
5.1.3	Relevanz der beiden Zielarginine der ART2.2 im P2X7-Rezeptor	42
5.1.4	ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.1	45
5.2	Funktionsanalyse des murinen P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen	48
5.2.1	Konsequenzen der P2X7-Aktivierung durch NAD ⁺ und ATP	48
	<i>Exposition von Phosphatidylserin und Verlust des CD62L-Selektins</i>	48
	<i>Verlust von CD27</i>	51
5.3	Freisetzung von NAD ⁺ während der T-Zellpräparation.....	52
5.3.1	Temperaturabhängigkeit der P2X7-Aktivierung.....	52
5.3.2	Temperaturabhängigkeit der ADP-Ribosylierung	53
5.3.3	ART2.2-Inhibition durch spezifische Einzeldomänenantikörper	55
5.4	Phagozytose von T-Zellen nach P2X7-Aktivierung	58
5.4.1	Phagozytose NAD ⁺ -behandelter T-Zellen durch Makrophagen.....	58
5.4.2	ART2- und P2X7-Abhängigkeit der Nukleotid-induzierten Phagozytose	61
5.4.3	Dosis-Wirkungs-Analysen der Nukleotid-induzierten Phagozytose.....	62
5.4.4	Phagozytose von Nukleotid- vs. Staurosporin-behandelten T-Zellen.....	64
5.4.5	Selektive Phagozytose NAD ⁺ -behandelter T-Zellen.....	65
5.4.6	Schicksal der phagozytierten T-Zellen	67
6.	Diskussion	68
6.1	Funktionsanalysen der Rezeptormutanten im HEK-Zellmodell.....	68
	<i>Transiente Calciumsignale in untransfizierten HEK-Zellen</i>	68
	<i>Stabile Calciumsignale der P2X7-Rezeptormutanten</i>	69
	<i>Vergleich der P2X7-Aktivierung durch ATP und ADP-Ribosylierung</i>	71
	<i>Bedeutung des Arginins 125 im P2X7-Rezeptor</i>	73
	<i>Aktivierungsmodell</i>	74
	<i>ADP-Ribosylierung und Aktivierung des P2X7 durch ART2.1</i>	76
	<i>Zusammenfassung</i>	78
6.2	Funktionsanalysen des P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen	78
	<i>Aktivierung des P2X7 durch ATP vs. NAD⁺</i>	78
	<i>Modulation der T-Zellfunktionen</i>	79
	<i>Zusammenfassung</i>	81
6.3	Freisetzung von NAD ⁺ während der Präparation von T-Zellen	81
	<i>ART2.2 ist bei 4°C aktiv, Effekte der P2X7-Aktivierung erfolgen bei 37°C</i>	81
	<i>ART2.2-inhibierende Einzeldomänenantikörper schützen vor NAD⁺</i>	82
	<i>Zusammenfassung</i>	83
6.4	Phagozytose von T-Zellen nach P2X7-Aktivierung	83
	<i>Temperaturabhängigkeit der Phagozytose</i>	83

	<i>Phagozytose von NAD⁺ - vs. ATP-behandelten T-Zellen.....</i>	84
	<i>Nukleotid-induzierte vs. Klassische Apoptose.....</i>	84
	<i>Bystander-Hypothese.....</i>	85
	<i>Zusammenfassung.....</i>	86
6.5	Ausblick.....	86
7.	Literatur.....	88
8.	Anhang.....	100
8.1	Abkürzungen und Anglizismen.....	100
	Nachwort.....	102

1. Zusammenfassung

Die Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP) und Nikotinamidadenosindinukleotid (NAD^+) nehmen, neben ihrer Rolle als Schlüsselmetabolite des intrazellulären Energiestoffwechsels, weitere Funktionen als extrazelluläre Signalmoleküle ein. Eines ihrer Zielproteine ist der P2X7-Ionen Kanal, der auf einer Vielzahl von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Er kann sowohl durch seinen löslichen Liganden ATP als auch durch NAD^+ -abhängige ADP-Ribosylierung aktiviert werden. Diese kovalente Modifikation wird durch die murine ADP-Ribosyltransferase ART2.2 katalysiert, die die ADP-Ribosegruppe von NAD^+ auf Argininreste verschiedener Membranproteine überträgt. Die extrazelluläre Domäne des P2X7-Rezeptors enthält elf Argininreste, die in Maus-, Ratten- und humanen P2X7 konserviert sind. Die funktionale Signifikanz dieser Argininreste wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von transfizierten HEK-Zellen, die den Wildtyp oder Arginin>Lysin Substitutionsmutanten des P2X7-Rezeptors, alleine oder in Kombination mit der ART2.2 exprimierten, untersucht. Zwei Mutanten (R294K und R307K) zeigten drastisch verminderte Calciumantworten auf ATP, drei Mutanten (R206K, R76K, R277K) eine deutlich erhöhte Sensibilität gegenüber ATP und NAD^+ -abhängige ADP-Ribosylierung. Arginin 125 wurde als die ADP-Ribosylierungsstelle identifiziert, durch die der P2X7-Rezeptor aktiviert wird.

Die vorliegende Arbeit beschreibt ferner die Effekte der P2X7-Aktivierung im HEK-Zellmodell und bei primären, murinen T-Zellen durch ATP oder durch ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung. Die Aktivierung des Rezeptors bedingt in transfizierten HEK-Zellen den Influx von Calcium, blasige Ausstülpungen der Zellmembran (membrane-„blebbing“), gefolgt von einer raschen Exposition von Phosphatidylserin (PS) und der Aufnahme von Yo-Pro-1. Bei T-Zellen kommt es zur PS-Exposition, dem Verlust von CD62L, CD27 und schließlich zur Aufnahme von Propidiumiodid (PI). Eine Behandlung von naiven T-Zellen mit ATP oder NAD^+ bedingt die Phagozytose dieser Zellen durch Peritonealmakrophagen. Dabei kann eine positive Korrelation zwischen der Phagozytose der behandelten T-Zellen und der PS-Exposition auf der Außenseite der T-Zellmembran beobachtet werden.

Der P2X7-Rezeptor zeigt eine 40-fach höhere Sensitivität gegenüber NAD^+ als gegenüber ATP. Die Freisetzung von endogenem NAD^+ bei der Ernte von HEK-Zellen sowie bei der Präparation von primären T-Zellen verursacht bereits eine Aktivierung des P2X7 auf einem Teil der Zellen. Im Fall von primären T-Zellen kann dies durch intravenöse Injektion von ART2.2-blockierenden Einzeldomänenantikörpern 10 Minuten vor der Präparation der Lymphozyten verhindert werden.

1.1 Abstract

The nucleotides adenosine triphosphate (ATP) and nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD⁺) function as extracellular signaling molecules in addition to their roles as key metabolites of intracellular metabolism. One of the ATP and NAD responsive receptors is the ligand-gated P2X7 ion channel, which is expressed on a number of cells of hematopoietic origin. The P2X7-receptor can be activated either directly by its soluble ligand ATP, or indirectly by NAD-dependent ADP-ribosylation. The latter post translational modification is catalyzed by murine ADP-ribosyltransferase ART2.2, which transfers the ADP-ribosyl moiety from NAD⁺ to target arginine residues in membrane proteins. The extracellular domain of the P2X7-receptor contains 11 arginine residues which are conserved in P2X7 of mice, rats and humans. In this work, the functional significance of these arginine residues was investigated in transfected HEK-cells expressing wildtype P2X7 or arginine to lysine P2X7 mutants either alone or in combination with ART2.2. Two mutants (R294K and R307K) showed drastically reduced calcium responses to ATP, while three mutants (R206K, R276K and R277K) showed enhanced sensitivities to ATP and to NAD-dependent ADP-ribosylation. Arginine 125 was identified as the ADP-ribosylation site by which the P2X7-receptor is activated.

This thesis describes the effects of activation of P2X7 by ATP or by ART2.2-mediated ADP-ribosylation in a HEK-cell model as well as in primary murine T-cells. In transfected HEK-cells, activation of the receptor triggers an influx of calcium, membrane-“blebbing” followed by a rapid exposure of phosphatidylserine (PS) and the uptake of Yo-Pro-1. T-cells respond to P2X7 activation with PS-exposure, loss of CD62 and CD27 and finally, the uptake of propidium iodide (PI). Treatment of naïve T-cells with ATP or NAD⁺ prompts their phagocytosis by peritoneal macrophages. Here, a positive correlation between the phagocytosis of nucleotide treated T-cells and PS-exposure by these cells was observed.

The P2X7-receptor shows a 40-fold higher sensitivity to NAD⁺ than to ATP. During the harvesting of HEK-cells and during preparation of primary T-cells enough NAD⁺ is released to allow ART2.2-mediated activation of the receptor on a fraction of cells. In case of T cells, this can be prevented by the intravenous injection of ART2.2-blocking single domain antibodies 10 min prior to cell preparation.

1.2 Publierte Ergebnisse

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde in folgenden Fachzeitschriften publiziert.

SCHWARZ, N.*; FLIEGERT, R.*; ADRIOUCH, S.*; SEMAN, M.; GUSE, A.H.; SEMAN, M.; HAAG, F. AND KOCH-NOLTE, F. (2009): Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands.

Purinergic signalling 2, 139-149

* *gleicher Beitrag (contributed equally)*

SCHUEPLEIN, F.*; SCHWARZ, N.*; ADRIOUCH, S.; KREBS, K., BANNAS, P.; RISSIEK, B.; SEMAN, M.; HAAG, F. AND KOCH-NOLTE, F. (2009): NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells.

J I 5, 2898-2908

* *gleicher Beitrag (contributed equally)*

HONG, S.; SCHWARZ, N.; BRASS, A.; SEMAN, M.; HAAG, F.; KOCH-NOLTE, F.; SCHILLING, W.P. AND DUBYAK, G.R. (2009): Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular NAD and ecto-ARTs in murine macrophages and T cells.

J I 1, 578-592

JANUSZ WESOLOWSKI¹, VANINA ALZOGARAY², JAN REYELT¹, MANDY UNGER¹, KARLA JUAREZ^{1,3}, MARIELA URRUTIA², ANA CAUERHFF², WELBECK DANQUAH¹, BJÖRN RISSIEK¹, FELIX SCHEUPLEIN^{1,4}, NICOLE SCHWARZ¹, SAHIL ADRIOUCH⁵, OLIVIER BOYER⁵, MICHEL SEMAN⁵, ALEXEI LICEA³, DAVID V. SERREZE⁴, FERNANDO A. GOLDBAUM², FRIEDRICH HAAG¹ AND FRIEDRICH KOCH-NOLTE. (2009): Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.

MMI 3, 157-174

ADRIOUCH, S.; BANNAS, P.; SCHWARZ, N.; FLIEGERT, R.; GUSE, A.H.; SEMAN, M.; HAAG, F. AND KOCH-NOLTE, F. (2008): ADP-Ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site.

FASEB J. 22, 861-869

KOCH-NOLTE, F.; REYELT, J.; SCHÖBOW, B.; SCHWARZ, N.; SCHEUPLEIN, F.; ROTHENBURG, S.; HAAG, F.; ALZOGARAY, V.; CAUERHFF, A. AND GOLDBAUM, F.A. (2007):

Single domain antibodies from Llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*.

FASEB J. 21, 3490-3498

2. Einleitung

Die Nukleotide ATP und NAD^+ sind als omnipräsente Schlüsselmetabolite des intrazellulären Energiestoffwechsels für jede Zelle essenziell. Als Geoffrey Burnstock 1972 am Beispiel von Nervenzellen zeigte, dass ATP in den extrazellulären Raum sezerniert wird und bald darauf Purin-sensitive Rezeptoren auf Muskelzellen beschrieb, war der Gedanke von Nukleotiden als extrazelluläres Signalmolekül noch ungewöhnlich (Burnstock 1972; Burnstock 1976). Es ist inzwischen allgemein akzeptiert, dass extrazelluläre Nukleotide nicht nur bei erregbaren Zellen sondern auch bei vielen, anderen Zellen eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation einnehmen (Brake and Julius 1996; Buell *et al.* 1996). Heute sind verschiedene, purinerge Rezeptorfamilien bei höheren und niederen Lebewesen bekannt, die für ATP, UTP und ihre Derivate, z.T. auch für NAD^+ sensitiv sind (Moreschi *et al.* 2006; Burnstock and Verkhratsky 2009). Die Expression von Purinrezeptoren auf vielen Immunzellen und die Tatsache, dass unter Zellstressbedingungen wie Entzündungen ATP und NAD^+ aus geschädigten Zellen freigesetzt werden, macht die purinergen Rezeptoren auch für die Immunologie höchst interessant (Di Virgilio *et al.* 1996; Haag *et al.* 2007).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Aktivierung des Purinrezeptors P2X7 auf murinen T-Zellen durch ATP, seinen löslichen Liganden (Abb. 1A), sowie durch ADP-Ribosylierung (Abb. 1B), eine kovalente Modifikation, die Enzym-vermittelt und ebenfalls Nukleotid-abhängig ist, da NAD^+ als Substrat fungiert (Seman *et al.* 2003; Seman *et al.* 2004). Hierbei werden Funktionsanalysen des Rezeptors sowie seine modulatorische Wirkung auf T-Zellen vorgestellt.

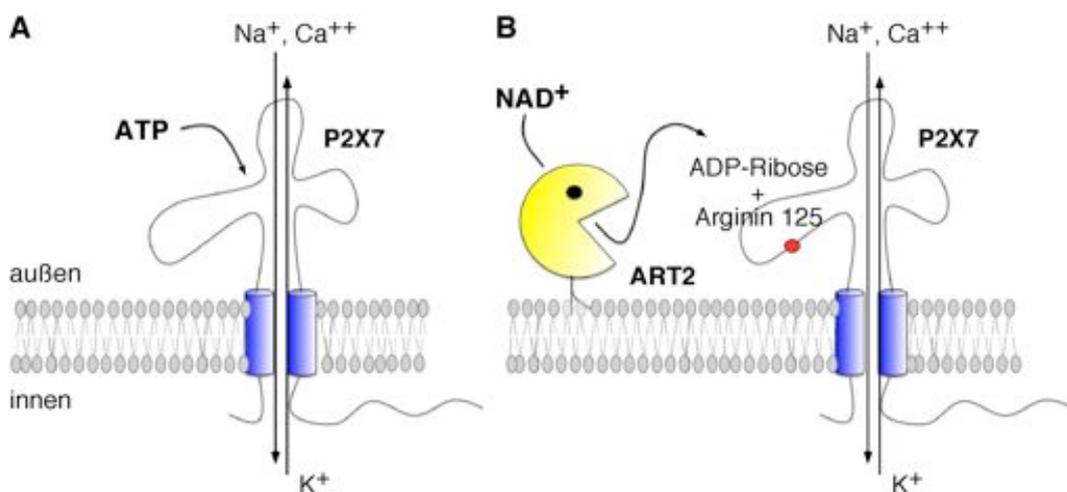


Abb. 1: Aktivierung des zytolytischen P2X7-Purinrezeptors durch seinen löslichen Liganden ATP (A) oder alternativ durch die ART2-katalysierte ADP-Ribosylierung des Arginins 125 (B). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt zu einem Kationenstrom über die Zellmembran. ART2, membranständige ADP-Ribosyltransferase 2, die aufgrund der Kristallstruktur der verwandten Ratten-ART2 als „Pacman“ dargestellt wird. Der Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker der ART2 ist als Verzweigung dargestellt.

2.1 Purinrezeptoren

Die ersten P2X-Rezeptoren wurden ursprünglich aus Nervenzellen kloniert und charakterisiert (Brake *et al.* 1994; Valera *et al.* 1994). Erst später stellte sich heraus, dass sie nahezu in allen Geweben von Wirbeltieren exprimiert werden. Bei den sieben Mitgliedern der P2X-Rezeptorenfamilie, P2X1-P2X7, handelt es sich um ATP-gesteuerte Ionenkanäle, die sowohl für monovalente (Na^+ , K^+) als auch für divalente Kationen (Ca^{2+}) durchlässig sind (Buell *et al.* 1996; Di Virgilio *et al.* 1996; Soto *et al.* 1997).

P2X-Rezeptoren sind zwischen 379 und 595 Aminosäuren lang und besitzen auf der Proteinebene eine 30-50%-ige Sequenzidentität (Abb. 2) (North 2002; Khakh and North 2006). Die Topologie einer Untereinheit setzt sich aus zwei hydrophoben Transmembranregionen, TM1 und TM2, einer zwischengeschalteten, langen, extrazellulären Domäne mit ATP-Bindungsstelle und 10 konservierten Cysteinresten, die vermutlich fünf stabilisierende Disulfidbrücken ausbilden, sowie intrazellulären N- und C-Termini zusammen. Eine Kristallstruktur von P2X-Rezeptoren existiert bisher nicht. Die Stöchiometrie der P2X-Rezeptoren beinhaltet wahrscheinlich drei Untereinheiten, wobei Homo- und z.T. auch Heterotrimere gebildet werden (Nicke *et al.* 1998; North 2002; Nicke *et al.* 2005; Roberts *et al.* 2006; Nicke 2008).

Um P2X-Rezeptoren zu aktivieren, müssen alle drei Ligandenbindungsstellen, die zwischen benachbarten Untereinheiten vermutet werden, jeweils 1 ATP Molekül binden (Ding and Sachs 1999; Jiang *et al.* 2003). Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors resultiert innerhalb von Millisekunden nach ATP-Bindung in der Öffnung eines Kanals für Kationen, an deren Bildung die TM2-Region maßgeblich beteiligt sein soll (Egan *et al.* 1998; Haines *et al.* 2001; Li *et al.* 2008). Der schnelle Influx von Na^+ und Ca^{2+} und Efflux von K^+ führt zur Membrandepolarisation. Insbesondere der Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration führt zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse, die noch nicht vollständig verstanden sind (Di Virgilio *et al.* 2001). Interessanterweise zeigen einige P2X-Rezeptoren eine selektive Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen, die vermutlich durch saure Aminosäuren an der äußeren Porenöffnung und durch polare Aminosäurereste innerhalb des Kanals bestimmt wird (Egan and Khakh 2004; Samways and Egan 2007; Samways *et al.* 2008).

Die Entfernung des Liganden ATP führt bei allen P2X-Rezeptoren zu einem mehr oder weniger raschen Verschluss des Ionenkanals (North 2002). Eine andauernde ATP-Stimulation führt innerhalb der P2X-Rezeptoren zu verschiedenen Reaktionen: Bei den Rezeptoren P2X1 und P2X3 kommt es zur Desensitierung und zum Verschluss der Pore (Khakh *et al.* 1999; Stojilkovic *et al.* 2005), während es bei P2X2, P2X4 und P2X7 zu einer höheren Permeabilität für organische Kationen kommt. Diese Zunahme der Permeabilität wird als Ausweitung des Ionenkanals, als sogenannte „Pore dilation“, gedeutet (Khakh and Lester 1999; North 2002). Im Falle des P2X7-Rezeptors werden zudem weitere Membranproteine

wie z.B. Pannexin-1 rekrutiert, die eine Ausbildung großer Membranporen und damit eine gesteigerte Permeabilität für relativ große Moleküle (≤ 900 Da) bedingen (Pelegriin and Surprenant 2006; Yan *et al.* 2008).

2.2 Zytolytischer P2X7-Rezeptor

Aufmerksam wurden Immunologen u.a. auf den P2X7-Rezeptor durch seine einzigartige Eigenschaft, bei einer andauernden Rezeptoraktivierung, den Tod von Immunzellen herbeizuführen (Di Virgilio *et al.* 1996; Surprenant *et al.* 1996; Di Virgilio *et al.* 1998; Burnstock and Knight 2004).

Der P2X7-Rezeptor enthält typische Merkmale der P2X-Rezeptorfamilie (Abb. 2): Jede Untereinheit besitzt zwei hydrophobe Transmembrandomänen, die durch eine lange, extrazelluläre Domäne getrennt sind sowie intrazelluläre N- und C-Termini. Der C-Terminus ist mit 240 Aminosäuren im Vergleich zu dem anderer P2X-Rezeptoren mit 27-120 Aminosäuren sehr lang (Surprenant *et al.* 1996). Verschiedene Ergebnisse sprechen dafür, dass das lange C-terminale Ende des P2X7-Rezeptors sowohl bei der Oberflächenexpression des P2X7-Rezeptors, der Bildung der zytolytischen Pore und der intrazellulären Signaltransduktion involviert ist (Di Virgilio *et al.* 1998; Smart *et al.* 2003). Einige Mausstämme wie z.B. C57Bl/6-Mäuse tragen eine Punktmutation P451L im zytosolischen Abschnitts des Rezeptors, die eine geringere Sensivität gegenüber ATP bedingt (Adriouch *et al.* 2002). Die Koexpression des P2X7-Rezeptors mit sogenannten Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) auf murinen Immunzellen bedingt eine weitere Besonderheit des P2X7-Rezeptors: Er kann hier sowohl in Gegenwart seines löslichen Liganden ATP als auch in Gegenwart von NAD^+ aktiviert werden (Seman *et al.* 2003; Seman *et al.* 2004; Koch-Nolte *et al.* 2006; Scheuplein *et al.* 2009). Makrophagen und T-Zellen zeigen interessanterweise unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber ATP und NAD^+ . Während 25 μM NAD^+ und 250 μM ATP ausreichen, um den P2X7-Rezeptor auf murinen T-Zellen zu aktivieren, so reagieren Makrophagen nur auf höhere Konzentrationen ATP (> 1 mM) und nicht auf NAD^+ (Seman *et al.* 2003; Di Virgilio 2007; Hong *et al.* 2009). Auch innerhalb der T-Zellsubpopulationen konnten unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber ATP und NAD^+ beobachtet werden. Regulatorische T-Zellen aus C57Bl/6-Mäusen waren sensitiver gegenüber extrazellulärem NAD^+ und ATP heraus als andere CD4^+ - und CD8^+ - T-Zellen (Aswad *et al.* 2005).

Eine kurzzeitige Aktivierung des Rezeptors von 1-2 Sekunden führt zur transienten Öffnung des Ionenkanals mit einem typischen Calcium-lastigen Kationen-Influx (Abb. 3) (Surprenant *et al.* 1996; Rassendren *et al.* 1997). Der P2X7-Rezeptor besitzt je nach Spezies und Zelltyp eine vergleichsweise niedrige Affinität gegenüber ATP: Die EC_{50} des P2X7 wird im Bereich zwischen 120 μ M und 1,5 mM angegeben, während die EC_{50} der restlichen P2X-Rezeptoren im niedrigen micromolaren Bereich von 1-10 μ M ATP liegen (Buisman *et al.* 1988; Murgia *et al.* 1992; North and Surprenant 2000; Schwarz *et al.* 2009).

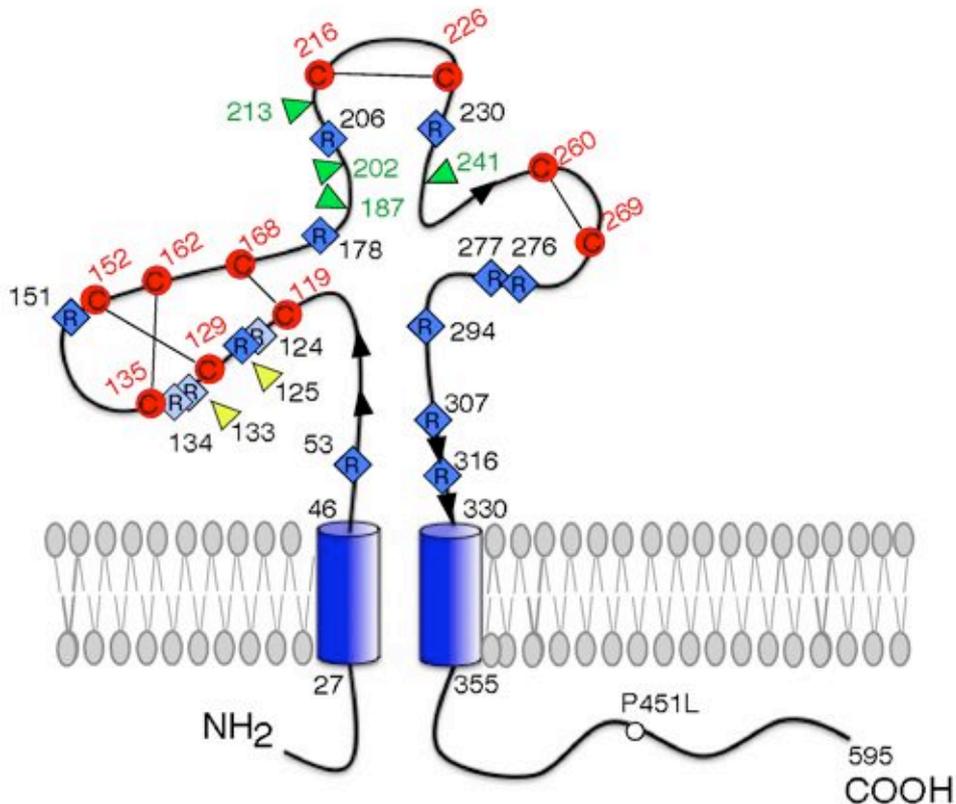


Abb. 2: Schematische Übersicht einer Untereinheit des P2X7-Purinrezeptors. Da die 3D-Struktur des homotrimeren P2X7-Rezeptors noch nicht bekannt ist, wird hier zur Übersicht nur eine Untereinheit in linearer Form dargestellt. Zehn in allen P2X-Rezeptoren konservierte Cysteinreste (rote Kreise) bilden vermutlich fünf intramolekulare Disulfidbrücken (die hier gezeigte Verknüpfung ist für P2X1 und P2X2 experimentell gestützt, Vial *et al.* 2004). Sechs, dicht aufeinanderfolgende Cysteine bilden eine kompakte Finger-ähnliche, Cystein-reiche Region. Zwei Argininreste in dieser Region (R125, R133, gelbe Dreiecke) wurden als die Ziele der ART2-katalysierten ADP-Ribosylierung identifiziert (Bannas 2007; Adriouch *et al.* 2008). Ferner hervorgehoben sind potentielle Glykosylierungsstellen (grüne Dreiecke), vorhergesagte β -Faltblattregionen (schwarze Pfeile) sowie die im Maus-, Ratten- und humanen Rezeptor konservierten 11 Argininreste (dunkelblaue Karos). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits verfügbare Rezeptormutanten genutzt, bei denen jedes der dargestellten Arginine, einzeln und in Kombination, durch Lysin ersetzt wurde (modifiziert nach Adriouch *et al.* 2008).

Einzigartig ist, dass eine andauernde Stimulation des P2X7-Rezeptors mit ATP (oder dem ATP-Analogen BzATP) zur Ausbildung großer, zytolytischer Membranporen führt, die für Moleküle von bis zu 900 Da durchlässig sind. Die resultierende Permeabilität der Zellmembran wird durch die Aufnahme von organischen Molekülen wie N-Methyl-D-Glucosamin oder fluoreszierenden DNA-Farbstoffen wie Yo-Pro-1 nachgewiesen (Buisman *et al.* 1988; Surprenant *et al.* 1996; Rassendren *et al.* 1997; Sluyter and Wiley 2002; Schwarz *et al.* 2009). Diese Membranporen werden anscheinend nicht von P2X7 selbst, sondern u.a. von einem anderen Membranprotein namens Pannexin-1 gebildet, das strukturelle Ähnlichkeiten mit den Connexinen aufweist (Pelegriin and Surprenant 2006).

Die chronische Aktivierung des P2X7-Rezeptors induziert eine Kette von Reaktionen, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind. Sehr schnell nach dem Calcium-Influx kommt es zur PS-Exposition auf der Zelloberfläche (Savill and Fadok 2000; Le Stunff *et al.* 2004; Scheuplein *et al.* 2009). Ebenfalls sehr rasch kommt es zu einem Verlust von CD62L und CD27 von der Zelloberfläche von T-Lymphozyten sowie zu einem Verlust von CD23 auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Gu *et al.* 1998; Sluyter and Wiley 2002; Scheuplein *et al.* 2009). Der Verlust dieser Membranproteine wird als Abspalten („Shedding“) bezeichnet, das durch Metalloproteasen wie TNF-alpha-converting enzyme (TACE oder ADAM17) vermittelt wird (Gu *et al.* 1998; Peschon *et al.* 1998; Moon *et al.* 2006). CD62L (L-Selektin) ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül, das unter anderem eine entscheidene Rolle bei der Auswanderung von Lymphozyten aus der Blutbahn in Lymphknoten spielt (Gearing and Newman 1993; Steeber *et al.* 1996). Dabei reguliert CD62L das Rollen und Anheften der Lymphozyten an die Wand der Lymphknotenvenolen (Warnock *et al.* 1998). Bei CD27 handelt es sich um ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie. Das CD27-vermittelte Signalling wird durch die Expression des Liganden CD70 gesteuert, der unter Aktivierungsbedingungen hochreguliert wird. Hierbei kann die CD27-CD70-Interaktion sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Konsequenzen auf die Immunantwort haben (Nolte *et al.* 2009).

Bei T-Lymphozyten und anderen Zellen ist die chronische Aktivierung des P2X7 mit einem Anschwellen, Blebben und Schrumpfen der Zelle verbunden (Adriouch *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2009). T-Lymphozyten zeigen nach ca. einer Stunde eine Caspasenaktivierung (Scheuplein 2005). Der Tod der Zelle zeigt sich in einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung der zytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH), DNA-Fragmentierung und irreversibler PI-Aufnahme (Abb. 3) (Scheuplein *et al.* 2003; Seman *et al.* 2003; Le Stunff *et al.* 2004).

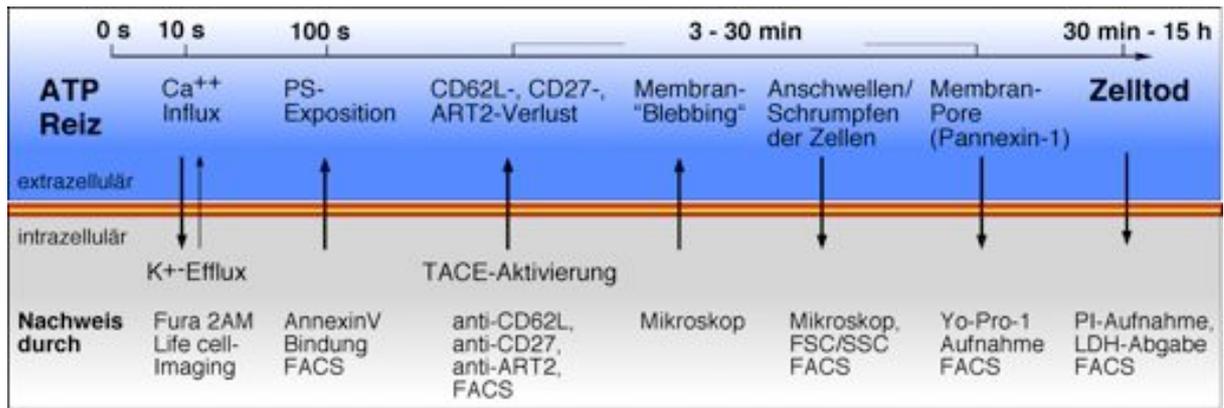


Abb. 3: Schematische Übersicht der Reaktionen von T-Zellen auf chronische P2X7-Aktivierung. Oben dargestellt sind die Reaktionen von T-Zellen auf P2X7-Aktivierung durch andauernde Behandlung mit ATP, unten die Methoden, die zur Messung der jeweiligen Ereignisse angewandt werden.

Bei Lipopolysaccharid-(LPS)-geprägten Makrophagen kommt es nach P2X7-Aktivierung zur Prozessierung und Freisetzung des proinflammatorischen Interleukins IL-1 β . Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP vermittelt die Aktivierung des Inflammasoms und somit der Caspase-1, die die inaktive Vorform des IL-1 β in die aktive Form spaltet. Neben der Freisetzung des IL-1 β durch apoptotische Zellyse wird auch der Export über Membrantransporter oder durch sekretorische Lysosomen vorgeschlagen. Teilweise folgt der Freisetzung des IL-1 β die Abgabe von LDH (Hogquist *et al.* 1991; Singer *et al.* 1995; Khakh *et al.* 1999; Ferrari *et al.* 2006; Pelegrin and Surprenant 2006; Brough and Rothwell 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rezeptormutanten eingesetzt, die in unserem Labor von Sahil Adriouch hergestellt wurden (Adriouch *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2009). In den Mutanten wurden einzelne Arginin durch Lysin ersetzt, um die funktionale Relevanz der jeweiligen Arginine, während der ATP- und NAD⁺-vermittelten Rezeptoraktivierung zu untersuchen.

2.3 ADP-Ribosyltransferasen

ADP-Ribosyltransferasen werden sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen exprimiert. Das Diphtherie-Toxin wurde vor über hundert Jahren von Paul Ehrlich und Emil von Behring entdeckt und in den 1960-er Jahren als ADP-Ribosyltransferase beschrieben (Honjo *et al.* 1968). Inzwischen sind weitere, bakterielle Toxine wie z.B. das Cholera-, das Pertussis- oder das C2- und C3-Toxin aus *Clostridium botulinum* dafür bekannt, ihre Toxizität in Säugerzellen durch die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen zu entfalten (Corda and Di Girolamo 2003). Typischerweise handelt es sich bei den bakteriellen ARTs um sezernierte Toxine, die ihre Zielproteine nach Translokation in die Wirtszelle erreichen: Das

Diphtherie-Toxin blockiert z.B. die Proteinsynthese der Wirtszelle durch die ADP-Ribosylierung des Diphthamids, einer modifizierten Form des Histidins, am Elongationsfaktor EF2, das C2-Toxin hingegen ADP-ribosyliert Aktin am Arginin 177 und blockiert damit dessen Polymerisation (Honjo *et al.* 1968; Richard *et al.* 1999; Aktories and Just 2000; Collier 2001).

Toxin-verwandte ADP-Ribosyltransferasen wurden auch in Säugetieren gefunden. Es werden zwei Gruppen unterschieden: Die extrazellulären Mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs oder ARTs) und die intrazellulären Poly-ADP-Ribosyltransferasen (pARTs oder PARPs) (Bazan and Koch-Nolte 1997; Glowacki *et al.* 2002; Otto *et al.* 2005; Koch-Nolte *et al.* 2006).

Die ersten Familienmitglieder der extrazellulären Mono-ADP-Ribosyltransferasen, die in Wirbeltieren molekular kloniert wurden, waren die ART1 aus dem Skelettmuskel des Kanninchens und die ART2 (RT6) aus T-Zellen der Ratte (Koch *et al.* 1990; Zolkiewska *et al.* 1992). Seitdem wurden weitere Mono-ADP-Ribosyltransferasen kloniert, die als kleine (200-250 Aminosäuren lang), membranständige, GPI-(Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerte Ekto-Enzyme (ART1-4) oder als sezernierte Enzyme, in verschiedenen Geweben exprimiert werden (ART5). Der Mensch besitzt mit ART1, ART3, ART4 und ART5 vier Mitglieder aus dieser Ekto-Enzymfamilie, während die Maus mit ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4 und ART5 sechs Mitglieder aufweist (Glowacki *et al.* 2002). Das ART2-Gen beim Menschen und anderen Primaten enthält im Leseraster drei vorzeitige Stoppcodons, wodurch es zu einem sogenannten Pseudogen wird (Haag *et al.* 1994; Koch-Nolte *et al.* 1996). Die kristallographischen Strukturanalysen der Ratten ART2 (RT6) sowie einiger bakterieller ADP-Ribosyltransferasen zeigen eine an einen „Pacman“ erinnernde Struktur, bestehend aus zwei β -Faltblättern, die den „Oberkiefer“ und Unterkiefer des NAD^+ -bindenden, katalytischen Spaltes bilden (Choe *et al.* 1992; Sixma *et al.* 1993; Mueller-Dieckmann *et al.* 2002).

2.3.1 Kovalente Modifikation: Mono-ADP-Ribosylierung

Die Mono-ADP-Ribosylierung ist, ähnlich der Phosphorylierung, eine reversible, posttranslationale Proteinmodifikation. Mono-ADP-Ribosyltransferasen katalysieren hierbei die Übertragung einer ADP-Ribose-Gruppe von NAD^+ auf einen spezifischen Aminosäurerest, wobei Nikotinamid freigesetzt wird (Abb. 4) (Just and Aktories 1991). Als Zielaminosäuren sind Arginin, Asparagin, Cystein und modifiziertes Histidin (Diphthamid) bekannt (Hassa *et al.* 2006). Die Spezifität variiert je nach ADP-Ribosyltransferase: Die bisher beschriebenen mARTs der Wirbeltiere sind, soweit bekannt, Arginin-spezifisch.

Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible Modifikation, die durch verschiedene Mechanismen rückgängig gemacht werden kann. Die Familie der Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen spaltet die Phosphodiesterbindung der ADP-Ribose-Gruppe. Dadurch bleibt am Zielprotein ein Ribosephosphatrest zurück, der das Protein vor erneuter ADP-Ribosylierung schützt. Ob und wie der verbleibende Ribosephosphatrest entfernt wird, ist bisher unbekannt. Beschrieben wurde dieser Mechanismus für die Oberflächen-ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ auf Skelettmuskelzellen (Moss *et al.* 1997). Die Familie der ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) entfernt die ADP-Ribose-Gruppe vollständig vom Zielprotein. Mitglieder dieser Enzymfamilie wurden bisher nur intrazellulär identifiziert (Moss *et al.* 1992; Takada *et al.* 1993; Takada *et al.* 1994; Kernstock *et al.* 2006; Niere *et al.* 2008).

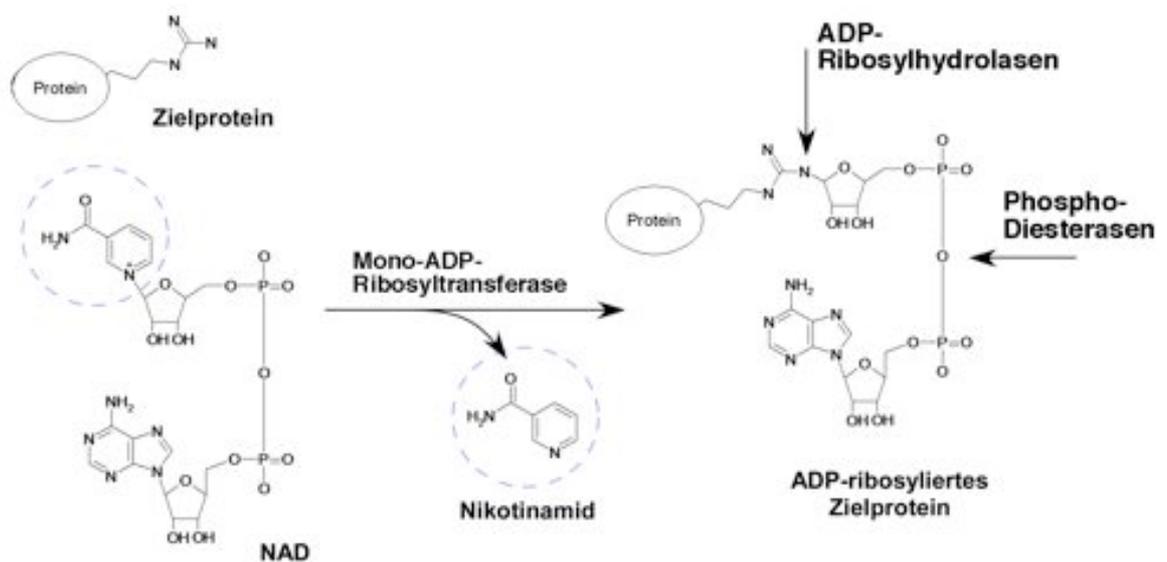


Abb.4: Schematische Übersicht der Mono-ADP-Ribosylierungsreaktion. Die Mono-ADP-Ribosyltransferasen katalysieren die Übertragung der ADP-Ribose-Gruppe (ADPR) von NAD⁺ auf einen spezifischen Aminosäurerest, wobei Nikotinamid freigesetzt wird. Diese Proteinmodifikation inhibiert oder aktiviert das entsprechende Zielprotein. Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterase (E-NPP) und ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) machen die Reaktion reversibel, wobei die PDEs die ADP-Ribose-Gruppe nur teilweise, die ARHs die ADPR vollständig entfernen (Braß 2008).

2.3.2 ART2.1 und ART2.2

In Mäusen werden die beiden ART2-Isoenzyme, ART2.1 und ART 2.2, durch ein dupliziertes Gen auf dem Chromosom Nummer 7 codiert. Die Identität der Aminosäuresequenz beträgt 80% (Hollmann *et al.* 1996). Beide Ektoenzyme werden auf murinen Immunzellen exprimiert, wobei ART2.1 anscheinend überwiegend auf aktivierten Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch auf naiven T-Zellen exprimiert wird, während ART2.2 vorwiegend auf naiven T-Zellen, aber auch auf regulatorischen T-Zellen und iNKT-Zellen

vorkommt (Koch-Nolte *et al.* 1999; Aswad *et al.* 2005; Kawamura *et al.* 2006; Hong *et al.* 2007). Die Zielproteinspezifität der ART2.1 und ART2.2 ist ähnlich, allerdings unterscheiden sich die beiden Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität: Durch eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 80 und 201 ist die Aktivität von ART2.1 von reduzierenden Bedingungen abhängig, während ART2.2 konstitutiv aktiv ist (Koch-Nolte *et al.* 1996; Hara *et al.* 1999; Glowacki *et al.* 2002; Hong *et al.* 2009).

ART2.2 ADP-ribosyliert verschiedene Oberflächenproteine, die eine Rolle bei der Aktivierung, Proliferation und Migration der T-Zelle spielen. Neben den Adhäsionsmolekülen LFA-1 und CD44, dem MHC-Klasse-I-Corezeptor CD8, den Leukozytenoberflächenproteine CD27, CD43 und CD45 wurde auch der zytolytische P2X7-Rezeptor als Zielprotein der ART2.2 identifiziert (Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998; Seman *et al.* 2003). Die Lokalisation der GPI-verankerten ART2.2 in definierten Membranregionen, sogenannten Lipid Rafts, fokussiert das Enzym auf ebenfalls Rafts assoziierte Membranproteine (Bannas *et al.* 2005).

ART2.2 besitzt in Gegenwart von extrazellulärem NAD^+ eine zytotoxische Wirkung auf naive T-Zellen. Die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors führt zu einer dauerhaften Aktivierung des P2X7-Rezeptors, die den Tod der Zelle bedingt (Abb. 3). Dieser Vorgang wird als NICD, NAD^+ induced cell death, bezeichnet (Seman *et al.* 2003; Seman *et al.* 2004). Da die ART2.2 während der Aktivierung der T-Zelle durch eine Metalloprotease von der Zelloberfläche abgeschnitten wird, betrifft das zytotoxische Zusammenspiel von ART2.2 und P2X7 hauptsächlich die Population der naiven T-Zellen (Kahl *et al.* 2000). Die Behandlung von naiven T-Zellen mit dem ART2-Substrat NAD^+ bedingt genau wie bei der Behandlung mit ATP einen rapiden Calcium-Influx in die Zelle, die PS-Exposition auf der Zelloberfläche sowie den Verlust von CD62L und CD27. Das Schrumpfen der Zellen, ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, DNA-Fragmentierung sowie die Freisetzung von LDH kann ebenfalls im Zusammenhang mit der NAD^+ - und ART2-vermittelten P2X7-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 3) (Adriouch *et al.* 2001; Seman *et al.* 2003; Scheuplein *et al.* 2009). Der NAD^+ -induzierte Zelltod ist strikt von der ART2-katalysierten ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors abhängig und wird daher nicht in ART2-defizienten oder P2X7-defizienten T-Zellen beobachtet (Ohlrogge *et al.* 2002; Scheuplein *et al.* 2009).

2.4 Signalmoleküle: Extrazelluläres NAD^+ und ATP

Die in dieser Arbeit untersuchte ATP- und NAD^+ -vermittelte Aktivierung eines zytolytischen Membranproteins erfordert die Freisetzung dieser Nukleotide sowie die Regulation ihrer Konzentrationen und Wirkungen im extrazellulären Raum. Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. oxidativem Stress, Ischämie oder dem Einfluss von DNA-schädigenden Substanzen können Zellen ihren mitochondrialen NAD^+ -Speicher ins Zytoplasma entleeren (Di Lisa and Ziegler 2001). Sowohl ATP als auch NAD^+ werden mittels Exozytose,

Diffusion durch Transmembrantransporter sowie Freisetzung aus permeabilisierten, sterbenden Zellen ins extrazelluläre Medium abgeben (Schwiebert and Zsembery 2003; Smyth *et al.* 2004). Für beide Purine wurde der Membrantransport durch gap-junctions aus Connexin43-Proteinen beschrieben (Bruzzone *et al.* 2001; Stout *et al.* 2002), die durch mechanischen oder metabolischen Stress kontrolliert werden (Contreras *et al.* 2002; Cherian *et al.* 2005). Erythrozyten können unter Stressbedingungen wie Scherspannung oder niedrigen Sauerstoffgehalt ATP über Pannexin-1-Poren freisetzen (Locovei *et al.* 2006). Adriouch *et al.* haben gezeigt, dass bei akuten, örtlichen Entzündungen, wie sie experimentell durch subkutane Injektionen von *Biogel* (Gel aus Polyacrylamidkügelchen) verursacht werden können, NAD^+ in den Entzündungsbereichen freigesetzt wird. Dies führte zu einem Verlust von CD62L auf den T-Zellen exklusiv im drainierenden Lymphknoten (Adriouch *et al.* 2007). Die freigesetzten Nukleotide werden als „Gefahrensignale“ gedeutet, die auf geschädigte Zellen hinweisen (Di Virgilio *et al.* 2001; la Sala *et al.* 2003; Hanley *et al.* 2004; Cabrini *et al.* 2005).

Die intrazellulären Konzentrationen werden für NAD^+ mit 250 - 500 μM und für ATP mit 5 - 10 mM angegeben (D'Amours *et al.* 1999; Di Virgilio *et al.* 2001; Scheuplein *et al.* 2009). Die extrazellulären Konzentrationen von NAD^+ und ATP sowie ihrer Derivate werden durch verschiedene Ektoenzyme stark begrenzt (Lund *et al.* 1998; Zimmermann and Braun 1999; Zimmermann *et al.* 2000; Schuber and Lund 2004). Extrazelluläres ATP wird hauptsächlich durch Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDs) wie CD39 und Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/ Phospho-diesterasen (E-NPPs) wie CD203 abgebaut (Robson *et al.* 2006). Hierbei entstehen die ATP-Derivate ADP und AMP. AMP kann durch 5'-Ekto-Nukleotidasen wie CD73 weiter zu Adenosin abgebaut werden (Haag *et al.* 2007). Die verschiedenen P1- und P2-Purinrezeptoren sind für ATP, UTP und deren Metabolite sensibel. Somit können Nukleotide über Purinrezeptoren Signale in Zellen vermitteln und damit wichtige Funktionen bei der lokalen Regulation des Blutdrucks oder der Entwicklung von Entzündungsreaktionen einnehmen (Ralevic and Burnstock 1998; Dubyak 2003).

Extrazelluläres NAD^+ wird durch Ekto- NAD^+ -Glykohydrolasen/ADP-Ribose-Cyclasen (NADasen) wie CD38 und CD157 sowie E-NPPs zu ADP-Ribose, cADP-Ribose, Adenosin und Nikotinamid verstoffwechselt (Krebs *et al.* 2005; Haag *et al.* 2007). Bis auf den humanen P2Y11-Purinrezeptor sind bisher keine NAD^+ -sensitiven Rezeptoren bekannt (Moreschi *et al.* 2006). Einige dieser NAD^+ -Metabolite können in ihrer Funktion als „Second messenger“-Moleküle z.B die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Reservoiren initiieren (De Flora *et al.* 1998; Guse 2000). Die Koexistenz von ART2, der NADase CD38, die auf B-Zellen stark exprimiert wird, und dem zytolytischen P2X7-Rezeptor in lymphatischen Geweben legt die Vermutung nahe, dass CD38 eine zellprotektive Wirkung auf die Immunzellen haben kann, indem sie das ART-Substrat NAD^+ limitiert (Krebs *et al.* 2005).

2.5 Knock-out-Mausmodelle zur Erforschung der Rollen von ART2 und P2X7

Die Auswirkungen der P2X7-Aktivierung durch extrazelluläre Nukleotide sind komplex und *in vivo* schwer nachzuweisen. Es stehen aber inzwischen verschiedene Knock-out-(KO)-Tiermodelle zur Verfügung, mit denen die Rollen des P2X7-Rezeptors, ART2- und CD38 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* leichter zu erforschen sind.

Neben P2X7-defizienten Mäusen (Solle *et al.* 2001) sind ART2-defiziente (Ohlrogge *et al.* 2002) und CD38-defiziente Tiere vorhanden (Cockayne *et al.* 1998). Mit Hilfe dieser Mäuse kann zum einen der Einfluss des Rezeptors selbst untersucht werden, zum anderen aber auch zwischen ATP- und NAD⁺/ART2-vermittelten Effekten auf den P2X7-Rezeptor unterschieden werden. Diese KO-Mäuse werden in dieser Arbeit für vergleichende Analysen der T-Zellen *in vitro* eingesetzt.

Alle drei Mauslinien, die P2X7.KO-, ART2.KO- und CD38.KO-Mäuse, sind überlebensfähig, fertil und zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Somit unterscheiden sich die gesunden KO-Tiere äußerlich nicht sichtbar von gesunden Wildtyp-Tieren. Um homozygote KO-Mäuse von ihren Geschwistern zu unterscheiden, werden PCR-basierte Genotypisierungen oder FACS-Analysen durchgeführt (Cockayne *et al.* 1998; Solle *et al.* 2001; Ohlrogge *et al.* 2002). Bei CD38-defizienten Mäusen wurde eine Auffälligkeit im Sozialverhalten beschrieben. Weibliche CD38.KO-Tiere zeigten ein verzögertes „Wiederfinden“ ihrer Nachkommen, wenn diese in den Ecken des Käfigs versteckt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe (Jin *et al.* 2007).

In verschiedenen Krankheitsmodellen zeigen diese drei Knock-out-Mauslinien einen immunologischen Phänotyp: Eine Injektion mit Concanavalin A (ConA) induziert eine T-Zell-abhängige Hepatitis, die von einer Lyse der Leberzellen begleitet wird und durch freigesetzte zytosolische Leberenzyme im Plasma nachweisbar ist (Tiegs *et al.* 1992). ART2- bzw. P2X7-defiziente Mäuse entwickelten eine mildere Form der Erkrankung, was mit einer erniedrigten Sensitivität von ART2- bzw. P2X7-defizienten iNKT-Zellen der Leber gegenüber Nukleotid-vermittelter Apoptose korrelierte (Kawamura *et al.* 2006). Eine Injektion mit dem ART2-Substrat NAD⁺ drei Stunden nach ConA-Injektion verschlechterte den Krankheitszustand der WT-Tiere. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ART2 und extrazelluläres NAD⁺ die ConA-induzierte Hepatitis in diesem Mausmodell fördern (Kawamura *et al.* 2006). Eine ähnliche Korrelation von erhöhter ART2 Aktivität und verstärkter Autoimmunreaktionen wurde auch für das non-obese diabetic-(NOD)-Mausmodell für den juvenilen, autoimmunen Typ-I Diabetes (Serreze and Leiter 1994) beobachtet. So zeigen CD38-defiziente NOD-Mäuse, die erhöhte NAD⁺-Level aufweisen, einen beschleunigten Krankheitsverlauf (Chen *et al.* 2006). Dieser korrelierte mit einer erhöhten Sensitivität der regulatorischen T-Zellen gegenüber dem ART2-abhängigen NICD und konnte

durch zusätzlichen Knock-out des ART2-Proteins aufgehoben werden (Chen *et al.* 2006). In einem Modell für eine weitere Autoimmunerkrankung, zeigten P2X7-defiziente Mäuse hingegen einen schwereren Krankheitsverlauf als Wildtyp-Kontrollen (bei der Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein-(MOG)-induzierten *Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis* (EAE) Modell für die Multiple Sklerose (Chen and Brosnan 2006). Möglicherweise hängen pro- und antiinflammatorische Auswirkungen der P2X7-Aktivierung von Ort und Konzentration der freigesetzten Nukleotide sowie von der betroffenen Zellart ab. Denkbar ist jedenfalls, dass eine pharmakologische Hemmung von ART2, CD38 oder P2X7 in einigen Krankheitsmodellen therapeutische Wirkung erzielen könnte.

2.6 Phagozytose von apoptotischen T-Zellen

Die chronische Aktivierung des zytolytischen P2X7-Rezeptors führt zur Apoptose von T-Zellen, die damit für die Phagozytose durch Phagozyten gekennzeichnet sein könnten. Grundsätzlich ist die effiziente Aufnahme von apoptotischen Zellen elementar für die tägliche Kontrolle der Gewebe-Homöostase. Sezernierte „Finde-mich“-, expositionierte „Friss-mich“- und fehlende „Friss-mich-nicht“-Signale bilden die zentralen Elemente bei der Beseitigung apoptotischer Zellen (Fadok *et al.* 1992). Die schnelle Entsorgung ist dabei wichtig, um die Freisetzung möglicher zytotoxischer und antigener, intrazellulärer Bestandteile aus einer zunehmend nekrotisch werdenden Zelle zu unterbinden. Nach der Aufnahme von apoptotischen Zellen sezernieren Phagozyten antiinflammatorische, immunsuppressive Zytokine (Fadok *et al.* 1992; Savill and Fadok 2000; Fadok *et al.* 2001). Es gibt viele Hinweise darauf, dass Autoimmunkrankheiten durch eine beeinträchtigte Beseitigung apoptotischer Zellen verursacht werden könnten (Hanayama *et al.* 2002).

Das Entfernen der apoptotischen Zellen ist grundsätzlich die Aufgabe von professionellen Phagozyten wie Makrophagen oder dendritischer Zellen (DC), aber auch von Fibroblasten oder Endothelzellen. Die Beseitigung besteht aus zwei zentralen Elementen: Das Erkennen der apoptotischen Zelle und die konsequente Aufnahme der gebundenen Zelle durch den Phagozyten. Eines der am besten erforschten „Friss-mich“-Signale auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen ist die PS-Exposition, die mit einem Verlust der Phospholipidsymmetrie der Zellmembran einhergeht (Fadok *et al.* 1992; Henson *et al.* 2001; Lauber *et al.* 2004). Verursacht wird die Asymmetrie wahrscheinlich durch die Inhibition der Aminophospholipid-Translokase (auch Flippase genannt) und die durch Calcium-Influx aktivierte Phospholipid-Scramblase (Williamson and Schlegel 2002). Interessanterweise scheinen die apoptotischen Vorgänge in der Zelle wie Caspasen-Aktivierung, Cytochrom c-Freisetzung oder DNA-Fragmentierung keine Auslöser für die PS-Exposition zu sein, sondern die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. So konnte die Exposition von Phosphatidylserin mit Inhibitoren für Calciumkanäle blockiert werden (Balasubramanian *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP oder ADP-Ribosylierung zu einer Phagozytose der T-Zellen durch Makrophagen führt.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war, die funktionelle Bedeutung von Argininresten in der extrazellulären Domäne des P2X7-Rezeptors für die Aktivierung des Rezeptors durch ATP oder NAD⁺-abhängige ADP-Ribosylierung in transfizierten HEK-Zellen zu klären. Dabei sollten insbesondere die Argininreste bestimmt werden, die für die Aktivierung des Rezeptors durch ADP-Ribosylierung essentiell sind. Ein weiteres Ziel war die Analyse der Reaktion des P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen auf exogene und endogene Nukleotide. Die dabei beobachtete P2X7-abhängige Modulation der T-Zellen ergab die Frage, ob und wie schnell T-Zellen von Makrophagen nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors phagozytiert werden.

3. Materialien

3.1 Laborgeräte

Axiovert 200M (Mikroskop)	Zeiss, Jena
CCD-Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Jena
CCD-Kamera C4742-95	Hamamatsu Photonics, Herrsching
Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fujix BAS2000 Phosphoimager	Fuji Film, Tokyo (Japan)
High Voltage Power Pack P30	Whatman Biometra, Göttingen
Kulturschaleneinsatz R-C37	Warner Instruments, Hamden, CT (USA)
Leica DM IRBE (Mikroskop)	Leica, Wetzlar
Mini-Peristaltic PumpII	Harvard Apparatus, March Hugstetten
Polychrom II (Lichtquelle)	Till Photonics, Gräfeling
Öl-Immersionsobjektiv 40x N.A. 1,3	Leica, Wetzlar
Öl-Immersionsobjektiv 63x N.A.	Zeiss, Jena
Sechs-Kanal-Perfusionspumpen-Kontrollsystem (VC-6)	Warner Instruments, Hamden, CT (USA)
T3Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Xcell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Paisley (Großbritannien)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Becton Dickinson (Heidelberg), Nunc (Roskilde) und Invitrogen (Großbritannien) bezogen.

8-Kammer-Kulturobjektträger	Becton Dickinson, Heidelberg
96 Well Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Cellstrainer (70 µM Maschenweite)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kodak Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Company, Connecticut (USA)
Low bind Reaktionsgefäß 1,5 mL	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Nitex Membran (80 µm Maschenweite)	Cadisch Precision Meshes Ltd., London (Großbritannien)
Nitrocellulose-Hybond-C (NC) Membran	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
NuPAGE precast Gele 10%	Invitrogen, Paisley (Großbritannien)
T25 Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde (Dänemark)

Glasboden-Zellkulturschalen (ø 35 mm)

MaTEK, Ashland, MA (USA)

3.3 Zelllinien

Bezeichnung:

HEK293-T

Herkunft:

UKE, Hamburg

3.4 Konstrukte

Bezeichnung:

mRFP (monomeric red fluorescent protein)

pME.ART2.2

pCDNA6.mP2X7

Herkunft:

Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA (USA)

(Koch-Nolte *et al.* 1999)

(Adriouch *et al.* 2005)

3.5 Mausstämme

Die verwendeten Mauslinien wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet.

Bezeichnung:

BALB/c

C57Bl/6

BALB/c.ART2.1.KO/ART2.2.KO

BALB/c.CD38.KO

BALB/c. P2X7.KO

C57Bl/6.P2X7.KO

Herkunft:

UKE, Hamburg

UKE, Hamburg

wurden in Zusammenarbeit mit Dr. N. Killeen (UCSF, San Francisco, USA) hergestellt und auf den Balb/c Hintergrund rückgekreuzt (Ohlrogge *et al.* 2002).

wurden von Dr. F. Lund (Trudeau Institute, Saranac Lake, USA) (Cockayne *et al.* 1998) zur Verfügung gestellt.

P2X7.KO Pfizer-Maus (Solle *et al.* 2001).

Pfizer-Maus (Solle *et al.* 2001). Im UKE mind. 12 x auf den BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt.

3.6 Antikörper

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Antikörper stammen von der Firma BD Pharmingen (Heidelberg). Für den Nachweis des P2X7-Rezeptors, der ADP-Ribosyltransferasen und des etheno-Adenosins sowie der Blockade von ART2.2 wurden Antikörper genutzt, die im Institut für Immunologie hergestellt wurden (Koch-Nolte *et al.* 1999; Koch-Nolte *et al.* 2007; Moller *et al.* 2007).

In unserem Labor hergestellte Antikörper:

Spezifität:

Ratte-anti-Maus-ART2.1-Alexa488
Ratte-anti-Maus-ART2.2-Alexa488
Ratte-anti-Maus-ART2.1/2.2Alexa488
Maus-anti-Ethenoadenosin-Alexa488
Maus-anti-Ethenoadenosin
Kaninchen-anti-Maus-P2X7 Serum
Kaninchen-anti-Maus-P2X7-Alexa647
Lama-anti-Maus-ART2.2 sdAb (s+16a)
Lama-anti-Maus-ART2.2 sdAb (s+16b)
Lama-anti-Maus-ART2.2 sdAb (s+14)
Lama-anti-Maus-ART2.2-sdAb (l-17)

Herkunft:

AG Nolte, UKE Hamburg
AG Nolte, UKE Hamburg

Gekaufte Antikörper:

Spezifität:

Hamster-anti-Maus-CD3-FITC
Hamster-anti-Maus-CD3-APC
Hamster-anti-Maus-CD27-PE
Ratte-anti-Maus-CD4-APC
Ratte-anti-Maus-CD8-PE
Ratte-anti-Maus-CD11b-FITC
Ratte-anti-Maus-CD11b-PE
Ratte-anti-Maus-CD62L-FITC
Ratte-anti-Maus-CD62L-PE
Ratten-anti-Maus-CD16/CD32 (FC γ III/II)
Esel-anti-Maus-IgG1-PE

Herkunft:

Pharmingen, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg
Dianova, Hamburg

Detektion von Phosphatidylserin:

Bezeichnung:

AnnexinV-FITC
AnnexinV-APC

Herkunft:

Becton Dickinson, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg

3.7 Chemikalien

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Fluka (Neu Ulm) bezogen.

Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA	New England Biolabs, Frankfurt
Celltracker Green	Molecular Probes, Karlsruhe
Destaining Bags	Amresco, Solon, Ohio, USA
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1	Dynal, Hamburg
Etheno-NAD	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FURA-2AM	Molecular Probes, Karlsruhe
Gel Drying Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Serva
HEPES	Gibco, Karlsruhe
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
KN62(1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenyl-piperazin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MultiMark Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe
β -NAD	Sigma-Aldrich
NOVEX Colloidal Blue stain kit	Invitrogen, Karlsruhe
NOVEX Sharp Pre-Stained Protein Standards	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidans	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE LDS Probenpuffer 4x	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE precast Gele, 10% Bis-Tris	Invitrogen, Karlsruhe
JetPEI	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PKH26	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
^{32}P]-NAD	Amersham, Braunschweig
Precision Plus Protein, All Blue Standards	BioRad, München
Propidiumjodid	BD Pharmingen, Heidelberg
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
QIAquick Gel Extracton Kit	Qiagen, Hilden
Ultramount, permanent Mounting Medium	DAKO-Cytomation, Glostrup Dänemark
YO-PRO-1	Molecular Probes, Karlsruhe

3.8 ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7

Als Substrate für die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung wurden NAD^+ und das NAD-Analogon 6'-etheno-NAD⁺ in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. Die etheno-ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors führt nicht zu dessen Aktivierung. Als löslicher Agonist des P2X7-Rezeptors wurde ATP in den angegebenen Konzentrationen benutzt. Der P2X7-Inhibitor KN62 wurde in Blockadeexperimenten in den angegebenen Konzentrationen verwendet. In Abb. 5 sind die Strukturformeln dieser Moleküle dargestellt.

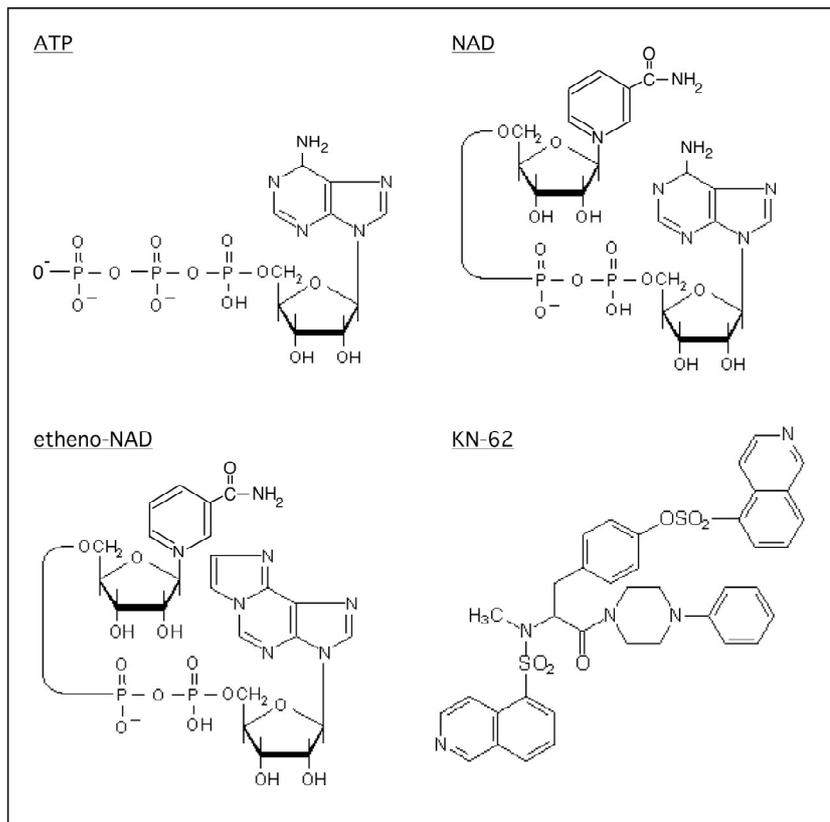


Abb. 5: Strukturformeln von NAD^+ , etheno-NAD, ATP und KN62. NAD^+ und 6'-etheno-NAD dienen beide als Substrat für ADP-Ribosyltransferasen. ATP ist ein Agonist für den P2X7-Purinrezeptor. KN62 ist ein Inhibitor des P2X7-Purinrezeptors.

3.9 Puffer und Medien

3.9.1 Medien

Das Fötale Kälberserum (FCS) wurde vor der Verwendung zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 Minuten bei 56 °C erhitzt. Die für die Medien verwendeten Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

RPMI Komplettmedium:	RPMI 1640 10% FCS 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 µM β-Mercapto-Ethanol 50 µg/l Gentamycin
DMEM Komplettmedium:	DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 100 mM HEPES 1% nicht-essentielle Aminosäuren

3.9.2 Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden die Puffer sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

AnnexinV-Bindepuffer:	140 mM Natriumchlorid 2,5 mM Calciumchlorid 10 mM HEPES pH 7,4
------------------------------	----------------------------------------------------------------------

ECS-Ca⁺⁺-Puffer:	140 mM Natriumchlorid 5 mM Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumdichlorid 10 mM Glucose 0,1% BSA 1,35 mM Calciumdichlorid 15 mM HEPES pH 7,4
------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

für die Perfusions wurden jeweils NAD⁺ oder ATP in entsprechender Konzentration dazugegeben

Lysispuffer:	1% TritonX-100 1 mM AEBSF 1 mM ADP-Ribose 1 mM NAD 2 mM EDTA in PBS 50 mM MOPS
---------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------

MOPS-Puffer:	50 mM TrisBase 3,5 mM SDS 1 mM EDTA pH 7,7
ECS-NaCl-Puffer:	140 mM Natriumchlorid 5 mM Kaliumchlorid 10 mM Glukose 10 mM HEPES pH 7,4
PBS:	2,67 mM Kaliumchlorid 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat 138 mM Natriumchlorid 8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
Waschpuffer:	1 mM ADP-R in RPMI 1640

3.10 Software

Software open lab	Impovision, Heidelberg
CellquestPro	BD, Heidelberg
AxioVision	Zeiss, Jena

4. Methoden

Die beschriebenen Methoden entsprechen den in den folgenden Standardwerken beschriebenen Methoden:

Current Protocols In Immunology (Coico 2001)

Current Protocols In Molecular Biology (Ausubel 1999)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (E.F. Fritsch 1989)

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultur und Ernte von adhärenenten HEK-Zellen

Adhärenente HEK-Zellen wurden in DMEM Komplettmedium in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage umgesetzt. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch eine fünfminütige Trypsinierung bei Raumtemperatur abgelöst. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von Komplettmedium inaktiviert, die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die HEK-Zellen wurden entweder für FACS-Analysen eingesetzt oder in frischem Medium resuspendiert und 1:10 in neuen Flaschen zur Weiterzucht ausgesät.

4.1.2 Transiente Transfektion adhärenenter HEK-T-Zellen

Adhärenente HEK-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion so geteilt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt 50% konfluent waren. Das alte DMEM Komplettmedium wurde am Tag der Transfektion durch frisches Medium ersetzt. Für die Transfektionen mit P2X7- und ART2-Expressionsplasmiden wurde JetPEI (polyplus) genutzt. Die gebrauchsfertige DNA/JetPEI-Lösung wurde direkt auf das frische Medium aufgetropft und durch sanftes Schwenken gemischt. Es wurden 1 µg pME.ART2- und 5 µg pCDNA.mP2X7-Plasmid-DNA sowie 10 µL JetPEI-Reagenz für 1-2 x 10⁶ HEK-Zellen eingesetzt. Die Herstellung der DNA/JetPEI-Lösung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung der Transfektionsreagenz beschrieben. Die Zellen wurden 24 - 48 Stunden nach der Transfektion geerntet (4.1.1) und im Versuch eingesetzt.

4.1.3 Transiente Transfektion der HEK-Zellen in Suspension

Für Calcium-Imagingversuche wurden HEK-Zellen in Suspension transfiziert, um sie parallel zur Transfektion auf spezielle Imaging-Kulturschalen mit Glasboden (MaTEK), umsetzen zu

können. Hierfür wurden adhärenente HEK-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit trypsinhaltigem PBS von den Kulturflaschen abgelöst. Dabei wurden die Zellen durch sanftes Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Das Trypsin wurde mit DMEM Komplettmedium inaktiviert, die Vereinzelnung der Zellen unter dem Mikroskop überprüft und ggf. nochmals pipettiert. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Transfektionen mit P2X7-, ART2- und mRFP-Expressionsplasmiden wurde JetPEI (polyplus) genutzt. Es wurden 1 µg pME.ART2-, 5 µg pCDNA.mP2X7- und 1 µg mRFP-(monomeric red fluorescent protein)-Plasmid-DNA sowie 10 µL JetPEI für 1-2 x 10⁶ HEK-Zellen eingesetzt. Jeweils 400 µL der DNA/JetPEI/Zellsuspension (2-4 x 10⁵ HEK-Zellen) wurden kreisförmig über dem Glasboden einer Imaging-Kulturschale übertragen, in die 1 mL DMEM Komplettmedium vorgelegt wurde. Die Herstellung der DNA/JetPEI-Lösung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung der Transfektionsreagenz beschrieben. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion im Calcium-Imagingversuch eingesetzt.

4.1.4 Calcium-Imaging-Assay

Die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration wurde mit dem Ca⁺⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 verfolgt. Zunächst wurde vorsichtig das alte Medium aus den Imaging-Kulturschalen (MaTEK) entfernt und die transfizierten, adhärenenten HEK-Zellen (4.1.3) für 30 Minuten bei 37 °C in 1 mL ECS-Ca⁺⁺-Puffer (140 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumdichlorid, 10 mM Glucose, 0,1% BSA, 1,35 mM Calciumdichlorid, 15 mM HEPES pH 7,4) mit 4 µM FURA-2AM inkubiert. Vor der Messung wurde der FURA-2AM-haltige Puffer entfernt und durch 1 mL frischen 37 °C-warmen ECS+Ca⁺⁺-Puffer ersetzt. Die FURA-2-beladenen Zellen konnten direkt im Perfusions- oder Tropfenversuch eingesetzt werden.

Die HEK-Zellen wurden zunächst für eine Minute mit 37 °C-warmen ECS-Ca⁺⁺-Puffer perfundiert, gefolgt von jeweils dreiminütigen Perfusionen mit Lösungen ansteigender NAD⁺- oder ATP-Konzentration. Die Perfusionsanlage bestand aus einem Sechs-Kanal-Perfusionspumpen-Kontrollsystem (VC-6 von Warner Instruments), das über eine Mini-Pumpe (Harvard Apparatus) angetrieben wurde. Die Imaging-Kulturschale war durch einen speziellen Kulturschaleneinsatz mit der Perfusionsanlage verbunden. Verfolgt wurde der Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration von mRFP-positiven HEK-Zellen. Die Zellen wurde mit Hilfe eines Mikroskops vom Typ DM-IRBE von Leica (Öl-Immersionsobjektiv: 40x N.A. 1,3 von Leica; Lichtquelle: Polychrom II von Till Photonics) auf einem Monitor dargestellt und die Veränderungen der FURA-2AM-Exitationen mit einer CCD-Kamera (C4742-95 von Hamamatsu Photonics) protokolliert. Dabei wurde alle 5 Sekunden eine Aufnahme gemacht. Im Tropfenversuch wurden mRFP-positiven HEK-Zellen nicht perfundiert, sondern direkt mit 400 µL einer NAD⁺- oder ATP-Lösung betropft. Der Verlauf der Calciumkonzentration der einzelnen Zellen wurde später mit der Open-Lab-Software ausgewertet.

4.1.5 Präparation muriner Lymphozyten

6-10 Wochen alte Mäuse wurden zunächst mit einem O₂/CO₂-Gasgemisch (21% O₂, 79% CO₂) narkotisiert und anschließend mit reinem CO₂-Gas getötet. Die Mäuse wurden im Ethanolbad desinfiziert und auf einem Styroporblock entsprechend Abb. 6 aufgespannt.

Es wurden die axillaren, thorakalen, cervicalen, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten (Abb. 6) präpariert und in Petrischalen, gefüllt mit 6-8 mL eisgekühltem RPMI 1640, gelegt. Die Lymphozyten wurden durch das Zerdrücken der Lymphknoten zwischen zwei Nytex Membranen (80 µM) in das kalte Medium freigesetzt und anschließend durch ein Zellsieb (70 µM) in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 400 x g für 10 Minuten abzentrifugiert, zweimal mit RPMI Komplettmedium gewaschen und in 1 mL RPMI Komplettmedium resuspendiert. Die Lymphozyten wurden entweder direkt oder als sIgG- (surface IgG)-negative-Lymphozyten (T-Zellen) nach B-Zell-Depletion (4.1.5) im Versuch eingesetzt.

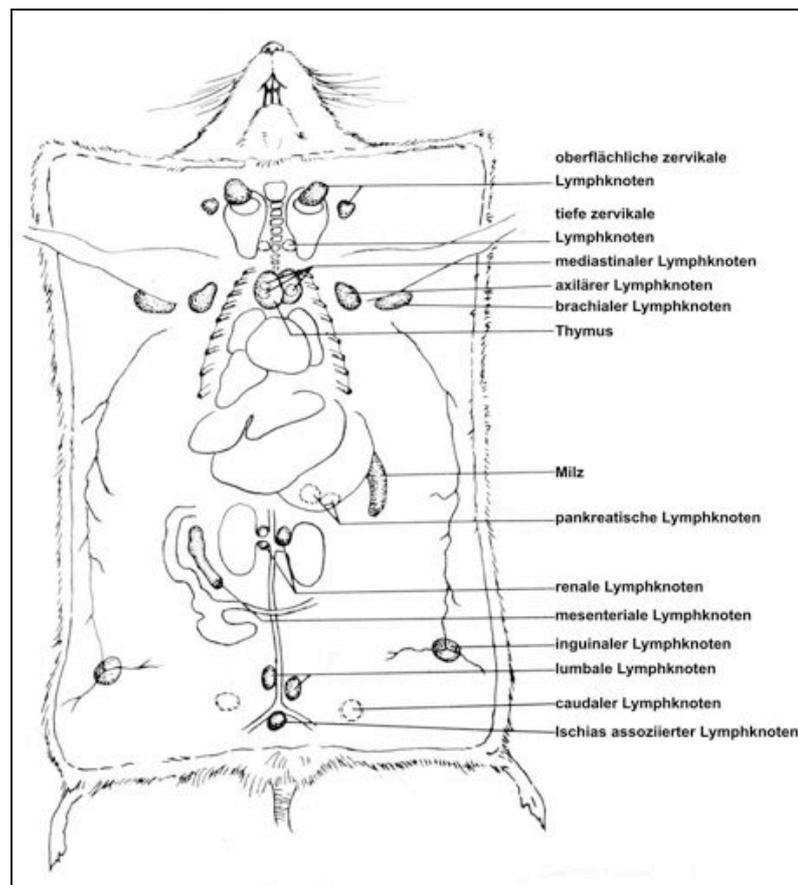


Abb. 6: Lymphatische Organe der Maus. Die Abbildung zeigt die Lage der lymphatischen Organe der Maus: Lymphknoten, Milz und Thymus. Für Gewinnung von Gesamtlymphknotenzellen wurden die oberflächlichen zervikalen, axillären, brachialen, inguinalen, lumbalen und mesenterialen Lymphknoten präpariert (modifiziert nach: http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php).

4.1.6 B-Zell-Depletion

Zur Depletion der B-Zellpopulation wurden Magnetkügelchen (Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1 von Dynal) eingesetzt, an denen anti-Maus-IgG1 immobilisiert war. Die Beads wurden zweimal durch zehnmütiges Rollern bei RT mit RPMI Komplettmedium gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, nachdem sich die Beads im Magneten abgesetzt hatten. Die gewaschenen Beads wurden mit der Zellsuspension für zehn Minuten bei 4 °C gerollert, das Röhrchen in einen Magneten gestellt und der Überstand nach zwei Minuten in ein Röhrchen mit frischen Beads überführt und der Vorgang wiederholt. Die Zahl der aufgereinigten sIgG-(surface IgG)-negativen Lymphozyten (T-Zellen) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die T-Zellen für die weitere Behandlung auf 1×10^7 Zellen/ mL RPMI Komplettmedium eingestellt.

4.1.7 Präparation muriner Peritonealmakrophagen

Peritoneallavage

6-10 Wochen alte Mäuse wurden zunächst mit einem O₂/CO₂-Gasgemisch (21% O₂, 79% CO₂) narkotisiert und anschließend mit reinem CO₂-Gas getötet. Die Mäuse wurden im Ethanolbad desinfiziert und vorsichtig geöffnet, ohne das Bauchfell zu beschädigen. Es wurden 5 mL eisgekühltes PBS in den Bauchraum gespritzt, die Maus für 10 Sekunden leicht geschüttelt und die Peritoneallavage wieder entnommen. Die Zellen wurden anschließend einmal gewaschen, in 1 mL eisgekühltem RPMI 1640 resuspendiert und in ein „low-bind“-Gefäß überführt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Makrophagen wurden entweder unmittelbar in „In solution“-Phagozytoseassays eingesetzt oder für „On plate“-Phagozytoseassays auf speziellen Mikroskopobjektträgern (8-Kammer-Kulurobjektträger von Becton Dickinson) kultiviert.

Kultivierung der Peritonealmakrophagen

Jeweils $2-4 \times 10^5$ Peritonealmakrophagen wurden in 800 µL RPMI Komplettmedium aufgenommen und in jeweils eine Kammer der Kulturobjektträger gegeben. Die Makrophagen wurden anschließend für 12-24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nicht haftende Zellen wurden durch sanftes Waschen entfernt und die Zellen zwei weitere Tage im Brutschrank kultiviert.

4.2 Immunologische Methoden

4.2.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen angefärbt wurden, durch eine Kapillare gedrückt, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht. Die einzelnen Zellen werden durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge erfasst. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Lichtstreuung wird als Vorwärtstreuung (forward scatter) und die seitliche Streuung (side scatter) registriert. Der Forwardscatter entspricht dem Schatten, den eine angestrahlte Zelle wirft und damit einem Maß für ihre Größe. Das zur Seite gestreute Licht (Sidescatter) gibt Auskunft über die Granularität der angestrahlten Zelle. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz in den jeweiligen Kanälen entspricht der Expressionsstärke des durch Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle bzw. Stärke der Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen. Alle durchgeführten Messungen wurden mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt und mit der Cellquest Pro Software ausgewertet (Becton Dickinson).

4.2.2 Antikörperanfärbung

Die Antikörperanfärbungen wurden in FACS-Röhrchen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in eisgekühltem RPMI 1640 resuspendiert und pro Anfärbung 100 µl Zellsuspension (1×10^6 Lymphozyten bzw. $2-4 \times 10^5$ Peritonealmakrophagen) eingesetzt. Die Zellen wurden bei $400 \times g$ für 5 Minuten abzentrifugiert, in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert (Antikörperkonzentration 0,2-1 µg/ 100 µL RPMI 1640) und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und entweder direkt in 300 µL RPMI 1640 aufgenommen und im FACSCalibur (Becton Dickinson) gemessen oder bei der Verwendung eines unkonjugierten Erstantikörpers für weitere 30 Minuten bei 4 °C mit einem Fluochrom-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Die Analyse der angefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Software Cellquest Pro.

4.2.3 NAD⁺- und ATP-Behandlung muriner Lymphozyten

Grundsätzlich wurden 100 µL NAD⁺- oder ATP-Lösung zu 100 µL Zellsuspension (1×10^6 Zellen) gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend zweimal gewaschen und in RPMI Kompletmedium resuspendiert. Zur Inhibition des P2X7-Rezeptors wurden 10 µM KN62 parallel zur jeweiligen Nukleotidbehandlung eingesetzt. Bei Untersuchungen zur ART2.1-Aktivität wurden die Nukleotidbehandlungen in Gegenwart von 1 mM DTT und 1 mM ADP-Ribose durchgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal

gewaschen und wie im jeweiligen Versuch angegeben, für die Phagozytose oder FACS-Anfärbungen verwendet.

4.2.4 AnnexinV-Bindung/PI-Aufnahme

Phosphatidylserin bindet in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen AnnexinV und kann so im FACS durch Fluochrom-konjugiertes AnnexinV nachgewiesen werden. Um die Exposition von PS zu induzieren, wurden 100 μL NAD^+ - oder ATP-Lösung zu 100 μL Zellsuspension (1×10^6 Zellen) gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Calcium-haltigem AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und anschließend in 100 μL AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert. Pro Ansatz wurden 2,5 μL Fluochrom-konjugiertes AnnexinV hinzugegeben und die Zellen für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen erhielten kurz vor der Messung 0,5 μL PI (0,5 μg PI) direkt ins FACS-Röhrchen. Das Gesamtvolumen pro Ansatz wurde mit Annexinpuffer auf 200 μl erhöht und die Zellen am FACS gemessen.

4.2.5 Yo-Pro-1-Aufnahme

Die Zellen wurden auf $1 \times 10^7/\text{ml}$ in NaCl-Puffer (140 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES pH 7,4) resuspendiert und 100 μl pro Ansatz eingesetzt. Nach der Zugabe von 100 μl NAD^+ - oder ATP-Lösung und 1 μM YoPro-1 wurden die Zellen 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, zweimal mit 1 mL NaCl-Puffer gewaschen, anschließend AnnexinV angefärbt (4.3.4) und am FACS gemessen.

4.2.6 Etheno- NAD^+ -ADP-Ribosylierungsassay

Die Messung der ART2.2-Aktivität erfolgte mit Hilfe des NAD-Analogons etheno- NAD^+ (e NAD^+), das von der ART2.2 ebenso wie NAD^+ als Substrat genutzt werden kann. Die etheno-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen kann mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 nachgewiesen werden, der gegen die etheno-Adenosin-Gruppe gerichtet ist. Die Zellen wurden auf 1×10^7 Zellen/ ml in RPMI 1640 resuspendiert und 100 μl pro Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden mit 5 bzw. 25 μM e NAD^+ bei den angegebenen Temperaturen für 30 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit RPMI 1640 gewaschen. Die Anfärbung mit dem 1G4-Antikörper erfolgte wie unter (4.3.2) beschrieben.

4.2.7 Temperatur-Wirkungs-Untersuchungen

Die Nukleotidbehandlungen wurden in PCR-Röhrchen durchgeführt. Hierzu wurden 75 μL e NAD^+ -, NAD^+ - oder ATP-Lösung zu 75 μL Zellsuspension (1×10^6 Zellen) gegeben und für 30 Minuten bei den angegebenen Temperaturen im T3 Gradient-Thermocycler (Biometra) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt, zweimal

gewaschen und in RPMI Kompletmedium resuspendiert. Es folgte die entsprechende Anfärbung mit AnnexinV (4.3.4) oder anti-etheno-Adenosin-1G4-Antikörper (4.3.2).

4.2.8 Phagozytose-Assays

Anfärbung der T-Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Aufgereinigte T-Zellen wurden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um sie später von den Makrophagen unterscheiden zu können. Für die Anfärbung mit dem rot-fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 wurden 1×10^7 T-Zellen in 1 mL PKH26-Puffer mit 4 μ M PKH26 für 5 Minuten bei RT inkubiert. Für die Anfärbung mit dem zytoplasmatischen Celltracker Green (CTG) wurden 1×10^7 T-Zellen in 1 mL RPMI Kompletmedium mit 1 μ M CTG für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen zweimal gewaschen und in RPMI 1640 resuspendiert. Sollte zusätzlich der Zellkern angefärbt werden, wurden die Zellen für weitere 30 Minuten bei 37 °C in 1 mL RPMI Kompletmedium mit 1 μ M DNA-Farbstoff Hoechst 33342 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die T-Zellen für die Phagozytose mit NAD⁺ und ATP behandelt (4.3.3).

„On-Plate“ Assay

Adhärente Peritonealmakrophagen (4.1.6) wurden bis zu 12 Stunden mit Nukleotid-vorbehandelten T-Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank koinkubiert. Nicht phagozytierte T-Zellen wurden mit eisgekühltem PBS mit 0,5 mM EDTA gewegewaschen und die Phagozytose mit 2% PFA in PBS (10 Minuten bei RT) gestoppt. Die Makrophagen wurden entsprechend der weiter verwendeten Analyseverfahren entweder durch starkes Auf- und Abpipettieren mit eisgekühltem PBS mit 0,5 mM EDTA vom Kulturobjektträger gelöst, mit Fluochrom-konjugierten anti-Mac1-Antikörpern angefärbt (4.3.2) und im FACS analysiert oder direkt auf dem Kulturobjektträger mit 100 μ L Antikörperlösung (4.3.2) angefärbt, mit Mounting Medium eingedeckt und im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Für die mikroskopischen Untersuchungen der Makrophagen wurde ein inverses Mikroskop des Typs Axiovert 200M (Plan Achromat Öl-Immersionsobjektiv: 63x N.A. 1,25, Lichtquelle: Quecksilberdampfampe HBO103) benutzt. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte mit der Software Axiovision (Zeiss). Als Kamera wurde die CCD-Kamera AxioCam MRm benutzt.

„In solution“ Assay

Frisch präparierte Peritonealmakrophagen (4.1.6) wurden in einem 1,5 mL „low bind“-Reaktionsgefäß mit Nukleotid-vorbehandelten T-Zellen bei 4 °C (Kühlschrank) oder 37 °C (Brutschrank) für die angegebenen Zeitpunkte koinkubiert. Die Phagozytose wurde mit 2% PFA in PBS (10 Minuten bei RT) gestoppt und die Zellen zweimal mit eisgekühltem PBS mit 0,5 mM EDTA gewaschen. Die Makrophagen wurden mit Fluochrom-konjugierten anti-Mac1-Antikörpern angefärbt (4.3.2) und im FACS analysiert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 [³²P]-NAD⁺-ADP-Ribosylierungsassay

Für den Nachweis von ADP-ribosylierten Oberflächenproteinen auf transfizierten HEK-T-Zellen wurde radioaktives [³²P]-NAD verwendet. Die Zellen (1×10^7 / Immunpräzipitation) wurden für 20 Minuten bei 4 °C in Gegenwart von 0,1 µM NAD⁺, 1 mM ADP-R, 1 bzw. 5 mM DTT und 2,5 µCi [³²P]-NAD inkubiert. Die nicht inkorporierte Aktivität wurde durch 10-faches Waschen mit 1 mL Waschpuffer entfernt. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis lysiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 800 x g (Präzipitation der Zellkerne) wurde der Überstand abgenommen und erneut für 15 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert, um die Membranfragmente zu pelletieren. Das Zelllysate wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Zelllysate wurden am nächsten Tag aufgetaut und für die Immunpräzipitation (4.4.2) mit anschließender SDS-PAGE (4.4.3) eingesetzt. Die hier beschriebenen Arbeiten wurden im Isotopenlabor durchgeführt.

4.3.2 Immunpräzipitation

Zur Präzipitation des P2X7-Rezeptors aus den Zelllysaten wurde der entsprechende Antikörper (aufgereinigte anti-Maus-P2X7-(K1G)-Antikörper aus dem Kannehchen) an ProteinG Sepharose gekoppelt. Die Sepharose wurde hierfür zunächst dreimal mit PBS gewaschen, bevor 20 µl Sepharose pro Ansatz mit 1 µg K1G-Antikörper in einem Gesamtvolumen von 200 µl für eine Stunde bei 4 °C gerollert wurden. Nach der Kopplung des K1G-Antikörpers wurde die Sepharose dreimal mit je 1 mL Lysispuffer gewaschen. Zwischen den Waschschrirten wurde die Sepharose durch fünfminütige Zentrifugation mit 600 x g präzipitiert. Vor der Inkubation der Zelllysate mit der Antikörper-gekoppelten Sepharose wurde das Zelllysate für eine Stunde bei 4 °C mit gewaschener, ungekoppelter Sepharose (20 µl pro Ansatz) inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine aus dem Zelllysate zu entfernen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert, das vorgeklärte Zelllysate zur Antikörper-gekoppelten Sepharose gegeben und abermals eine Stunde bei 4 °C gerollert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Immunpräzipitat (Sepharose mit spezifisch gebundenen Proteinen) dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Ein Aliquot des Zelllysats, die Sepharose aus der Vorklärung und das Immunpräzipitat wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradiographie

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die SDS-PAGE wurde mit 10%-tigen Bis-Tris Gelen (Invitrogen) und MOPS-Puffer mit 1 mM DTT durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben (Immunpräzipitate) mit einem entsprechenden Volumen an 4x

LDS-Puffer und 10x DTT versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Es wurden jeweils 20 µL der Proben neben 5 µL eines Proteinmarkers (Multi Mark) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer vom Typ Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) für ca. 30 Minuten bei 200 V. Das Gel wurde Coomassie gefärbt, getrocknet (4.4.4) und anschließend auf einen Röntgenfilm aufgelegt, der für 24 Stunden bei -80 °C belichtet wurde.

4.3.4 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach der SDS-PAGE erfolgte mit dem NOVEX Colloidal Blue Stain Kit (Invitrogen). Das Gel wurde für zwei Stunden in der Färbelösung (55 ml H₂O, 20 ml Methanol, 20 ml Stain A, 5 ml Stain B) geschwenkt und anschließend in Wasser mit einem Aktivkohlebeutel entfärbt. Das Gel wurde für etwa zehn Minuten in der Drying Solution geschwenkt, zwischen zwei Blätter Zellophanfolie gelegt und in einen Trockenrahmen über Nacht getrocknet.

4.4 ART2.2-Blockade-Assay

Für die Blockade der ART2.2-Enzymaktivität wurden Einzeldomänenantikörper eingesetzt, die von Dr. Jan Reyelt in unserem Labor hergestellt wurden (Koch-Nolte *et al.* 2007).

Die *in vitro*-Blockade-Assays wurden auf 96-well Platten durchgeführt. Die aufgereinigten T-Zellen (1×10^6) wurden für 10 Minuten bei 4 °C in 100 µL RPMI 1640 mit 2 µg der angegebenen sd Antikörper inkubiert. Nach einmaligem Waschen folgte eine 30-minütige Behandlung der T-Zellen mit 100 µL RPMI 1640 mit 25 µM NAD⁺-, 250 µM ATP- oder 5 µM eNAD⁺ bei 37 °C. Die Zellen wurden gewaschen und mit AnnexinV (4.3.4) bzw. anti-etheno-Antikörper (4.3.2) angefärbt und im FACSCalibur gemessen.

4.4.1 Intravenöse Injektion von inhibierenden Antikörpern/eNAD⁺

Die CD38.KO-Mäuse erhielten 10 Minuten vor der Tötung eine Injektion in die Schwanzvene ohne, mit 200 µg der angegebenen sd Antikörper oder 2 mg eNAD⁺ in 200 µL warmen PBS (RT). Anschließend wurden die Lymphozyten präpariert (4.1.4) und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit AnnexinV (4.3.4) oder anti-CD62L-Antikörper (4.3.2.) angefärbt und im FACSCalibur gemessen.

5. Ergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen werden im folgenden Ergebnisteil in vier Abschnitten dargelegt. Der erste Abschnitt vergleicht die Reaktionen verschiedener P2X7-Rezeptormutanten in transfizierten HEK-Zellen auf ATP und die NAD⁺-abhängige ADP-Ribosylierung. Hierbei stehen Calciumantworten und die Identifizierung der ADP-Ribosylierungsstelle, durch die der murine P2X7-Rezeptor aktiviert wird, im Mittelpunkt der Untersuchungen. Diese Ergebnisse werden im zweiten Abschnitt um Funktionsanalysen des P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen ergänzt (Exposition von PS und Verlust von CD62L und CD27 nach Behandlung der Zellen mit ATP und NAD⁺). Der dritte Abschnitt befasst sich mit der Freisetzung von NAD⁺ während der Lymphozytenpräparation und der daraus resultierenden ART2-vermittelten P2X7-Aktivierung. Hierbei werden Temperaturabhängigkeit der ADP-Ribosylierung und der P2X7 Aktivierung untersucht, sowie ART2.2-spezifische Einzeldomänen-Antikörper vorgestellt, mit deren Einsatz die Präparations-bedingte Aktivierung des P2X7 durch ADP-Ribosylierung inhibiert werden kann. Im letzten Abschnitt wird die Phagozytose von P2X7-aktivierten T-Zellen durch Peritonealmakrophagen vorgestellt.

5.1 Funktionsanalysen der P2X7-Rezeptormutanten im HEK-Zellmodell

Die extrazelluläre Domäne des P2X7-Rezeptors enthält 11 konservierte Argininreste, die im Maus-, Ratten- und humanen Rezeptor konserviert sind (Abb. 2). Die potentielle funktionale Signifikanz dieser Argininreste wurde anhand von transfizierten HEK-Zellen, die den Wildtyp-P2X7 oder Arginin>Lysin Substitutionsmutanten des P2X7-Rezeptors exprimieren, untersucht. Die Funktionalität der P2X7-Mutanten wurde 20 Stunden nach Transfektion anhand der Calciumantwort und des Membran-„Blebbings“ mit Hilfe der Life-Cell-Imaging-Technik untersucht. Die adhären Zellen wurden hierfür jeweils für drei Minuten mit ansteigenden Konzentrationen von ATP oder NAD⁺ perfundiert. Mit der gleichen Technik wurde untersucht, welche der beiden als Zielaminoacide der ART2.2 bekannten Arginine für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung essentiell ist. Schließlich wurde mit Radiomarkierungsassays untersucht, ob die Thiol-abhängige ART2.1 den P2X7 ebenfalls ADP-ribosylieren und dadurch die Exposition von PS induzieren kann.

5.1.1 Calciumantworten der P2X7-Mutanten nach ATP-Stimulation

Die Expression der ADP-Ribosyltransferase ART2.2 und der P2X7-Rezeptormutanten wurde auf transient transfizierten HEK-Zellen mit spezifischen Antikörpern im FACS nachgewiesen. Alle Rezeptormutanten, mit Ausnahme von R307K, konnten auf der Zelloberfläche detektiert

werden (Adriouch *et al.* 2008). Mock-transfizierte HEK-Zellen reagierten auf ansteigende ATP-Konzentrationen mit schwachen, vorübergehenden Signalen. Die Reizschwelle war mit 1 bis 10 μM ATP sehr niedrig (Abb. 7, Panel 1). Die Signale der mit WT-P2X7 transfizierten Zellen ließen sich deutlich von dieser Kontrolle unterscheiden: Nach den schwachen, vorübergehenden Signalen löste eine Konzentration von 1mM ATP eine starke, dauerhafte, P2X7-abhängige Calciumantwort aus, die erst mit der Auswaschung des ATPs durch eine anschließende Perfusion mit Pufferlösung zurückging (Panel 2).

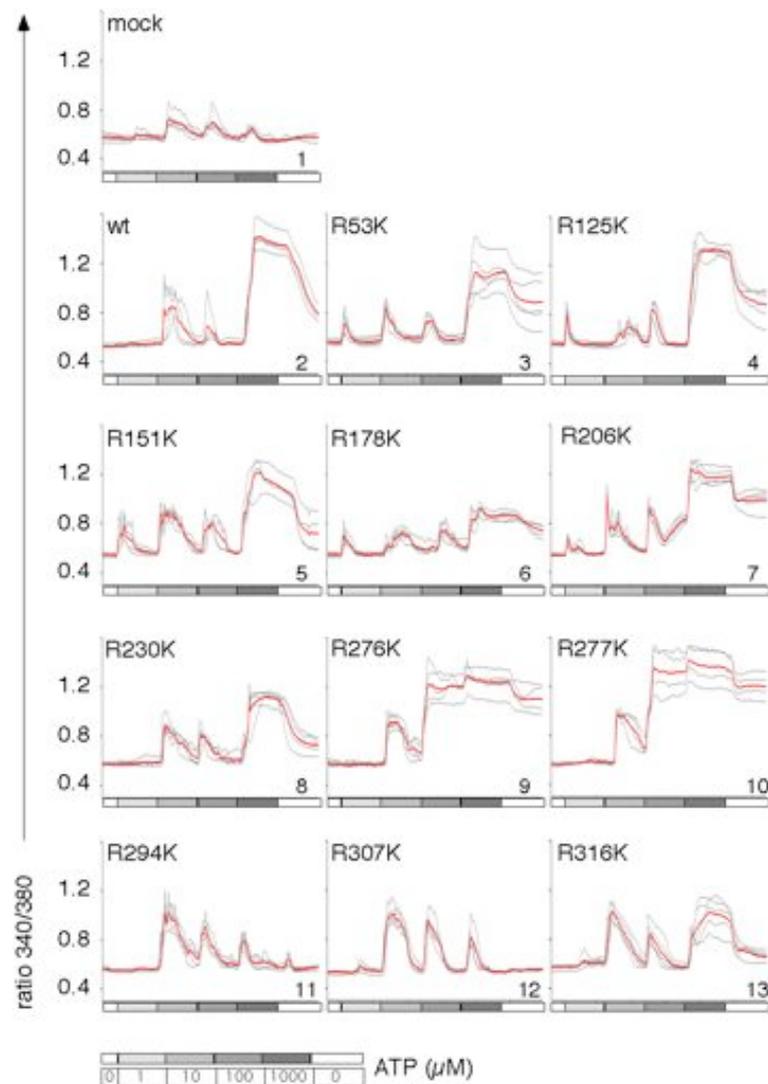


Abb. 7: ATP induziert Calciumeinstrom in P2X7-exprimierenden HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden mit Konstrukten für mRFP und Wildtyp-P2X7 oder P2X7-Mutanten kotransfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion mit dem Calciumsensitiven Fluorochrom FURA-2AM beladen und im Einzel-Zell-Imaging untersucht. Der Perfusionspuffer (37 °C) enthielt ansteigende Konzentrationen von ATP (s. Balken unter dem jeweiligen Balken; Perfusionsdauer pro Konzentration: 3 Minuten; Bildaufnahmen: alle 5 Sekunden). Der ATP-Perfusion folgte ein Auswaschen des Nukleotids mit Perfusionspuffer. Die grauen Linien zeigen die Verläufe einzelner Zellen; die roten Linien zeigen die kalkulierten Mittelwerte (Die Verläufe wurden mit der Openlab Software erstellt).

Die meisten P2X7-Mutanten lösten ein ähnliches Signalverhalten wie der WT-Rezeptor aus (Panel 3-6, 8, 13). Zwei Rezeptormutanten, R294K und R307K, zeigten, ähnlich der Mock-Kontrolle, vorübergehende Signale, verursachten aber keine dauerhafte Calciumantwort (Panel 11, 12 vs. 1). Die Substitution der benachbarten Arginine 276 und 277 resultierte in sensitiveren Rezeptormutanten, die bereits bei 100 μ M ATP ein starkes, dauerhaftes Calciumsignal auslösten, das zudem während der anschließenden Pufferperfusion nur teilweise abklang (Panel 9, 10). Die Calciumantwort in R206K-exprimierenden HEK-Zellen trat ebenfalls bereits bei 100 μ M ATP, allerdings zeitlich verzögert, auf (Panel 7).

5.1.2 Calciumantworten der P2X7-Mutanten nach NAD⁺-Stimulation

Mock-transfizierte HEK-Zellen zeigten bei einer Perfusion mit hohen NAD⁺-Konzentrationen von 250 μ M ein schwaches, vorübergehendes Signal (Abb. 8, Panel 1). Starke und dauerhafte Calciumantworten bei 100- bis 1000-fach niedrigeren NAD⁺-Konzentrationen (0,25-2,5 μ M) zeigten HEK-Zellen, die mit ART2.2 und den P2X7-Mutanten R206K, R276K und R277K kotransfiziert waren und sich dadurch deutlich von der Mock-Kontrolle abgrenzten. Diese Mutanten hatten sich bereits zuvor sensitiver als der WT gegenüber ATP gezeigt (vergl. Abb. 7 und 2, Panel 7, 9, 10). Interessanterweise konnte selbst bei hohen NAD⁺-Konzentrationen keine Calciumantwort in Transfektanten beobachtet werden, die mit ART2.2 und WT-P2X7 transfiziert waren (Abb. 8, Panel 2). Die Mutanten, die sich nach der Perfusion mit ATP wie der WT verhalten hatten, reagierten nicht auf NAD⁺ und verhielten sich damit wieder WT-ähnlich (Panel 3-6, 8, 13). Beim Vergleich der Aktivierung des P2X7 Purinorezeptors durch seinen löslichen Liganden ATP und der kovalenten Modifikation durch ADP-Ribosylierung fiel auf, dass die sensitiveren Rezeptormutanten R206K, R276K und R277K durch eine wesentlich niedrigere NAD⁺- (0,25-2,5 μ M) als ATP-Konzentration (100 μ M) aktiviert werden konnten.

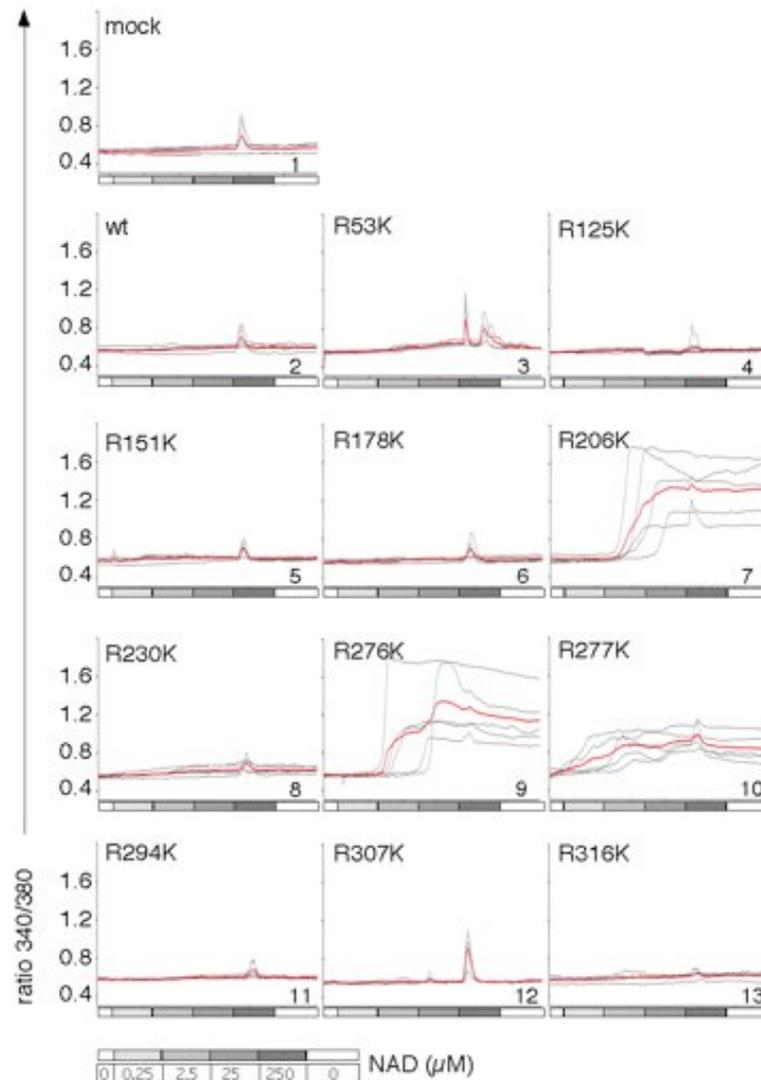


Abb.8: NAD^+ -abhängige ADP-Ribosylierung induziert Calciumeinstrom in ART2.2/P2X7-koexprimierenden HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden mit Konstrukten für mRFP, ART2.2 und Wildtyp-P2X7 oder P2X7-Mutanten kotransfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion mit dem Calcium-sensitiven Fluorochrom FURA-2AM beladen und im Einzel-Zell-Imaging untersucht. Der Perfusionspuffer (37 °C) enthielt ansteigende Konzentrationen von NAD^+ (s. Balken unter dem jeweiligen Panel; Perfusionsdauer pro Konzentration: 3 Minuten; Bildaufnahmen: alle 5 Sekunden). Der NAD^+ -Perfusion folgte ein Auswaschen des Nukleotids mit Perfusionspuffer. Die grauen Linien zeigen die Verläufe einzelner Zellen; Die roten Linien zeigen die kalkulierten Mittelwerte (Die Verläufe wurden mit der Openlab Software erstellt).

5.1.3 Relevanz der beiden Zielarginine der ART2.2 im P2X7-Rezeptor

Vorangegangene Autoradiographien von Immunpräzipitaten aus HEK-Zellen, die ART2.2 sowie verschiedene P2X7-Rezeptormutanten koexprimierten und mit radioaktiven [^{32}P]- NAD^+ behandelt waren, hatten gezeigt, dass neben dem konservierten Arginin 125 auch das nicht konservierte Arginin 133 im murinen Rezeptor durch ART2.2 ADP-ribosyliert wird

(Bannas 2007). Beide Argininreste sind in einer prominenten Finger-ähnlichen und Cysteinereichen Region des Rezeptors lokalisiert (Abb. 2 und Abb. 9 B). Durch Einsatz der NAD⁺-sensitiven R276K-Rezeptormutante, kombiniert mit weiteren Lysin-Substitutionen der Arginine 125 oder 133 (sowie der benachbarten Arginine 124 und 134), einzeln und in Kombination, sollte nun das Arginin, welches für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors notwendig ist, ermittelt werden.

Von den vier untersuchten R276K-Rezeptor-Doppelmutanten, die mit ART2.2 kotransfiziert waren, zeigte nur die Doppelmutante R276K125K keine Calciumantwort auf NAD⁺ (Abb. 9 A, Panel 3-6). Die Doppelmutante R276R133K zeigte starke, dauerhafte Calciumsignale, war allerdings mit einer Reizschwelle von 25µM NAD⁺ weniger sensitiv als die Einzelmutante R276K (Panel 5 vs. 2). Der Austausch der beiden nicht konservierten Arginine R124 und R134, die sich benachbart zu den ART2.2 Ziel-ADP-Ribosylierungsstellen befinden, beeinflusste das Rezeptorgating nicht (Panel 3, 6). Daraus läßt sich schließen, dass die ADP-Ribosylierung des Arginin 125 für die Aktivierung des murinen P2X7-Rezeptors essentiell ist. Wie in Abb. 9 C gezeigt, vermittelt die Dreifachmutante R276K125K133K, inert gegenüber NAD⁺, jedoch dauerhafte Calciumsignale gegenüber ATP ab einer Konzentration von 100µM, (Panel 1, 2) und reagiert damit ähnlich sensitiv auf ATP wie die R276K Einzelmutante (Abb. 7, Panel 9). In der Abb. 9 D werden ausgewählte Bilder des Life-Cell-Imagings gezeigt. In der oberen Reihe sind die Calciumantworten der sensitiven ART2.2/R276K-Transfektanten auf einen Tropfen NAD⁺ dargestellt. Darunter die fehlende Calciumantwort der ART2.2/R276K125K133K-Transfektanten auf den Tropfen NAD⁺ und die ART2.2-unabhängige Calciumantwort auf den anschließenden Tropfen ATP. Der P2X7-vermittelten Calciumantwort folgte, unabhängig von der Art des Nukleotids, innerhalb von 60-180 Sekunden ein ausgeprägtes „Blebbing“ der Zellmembran (siehe z.B. die drei deutlich sichtbaren Ausstülpungen der Zellmembran bei der Zelle in der Mitte des Bildes in Abb. 9 D, obere Reihe).

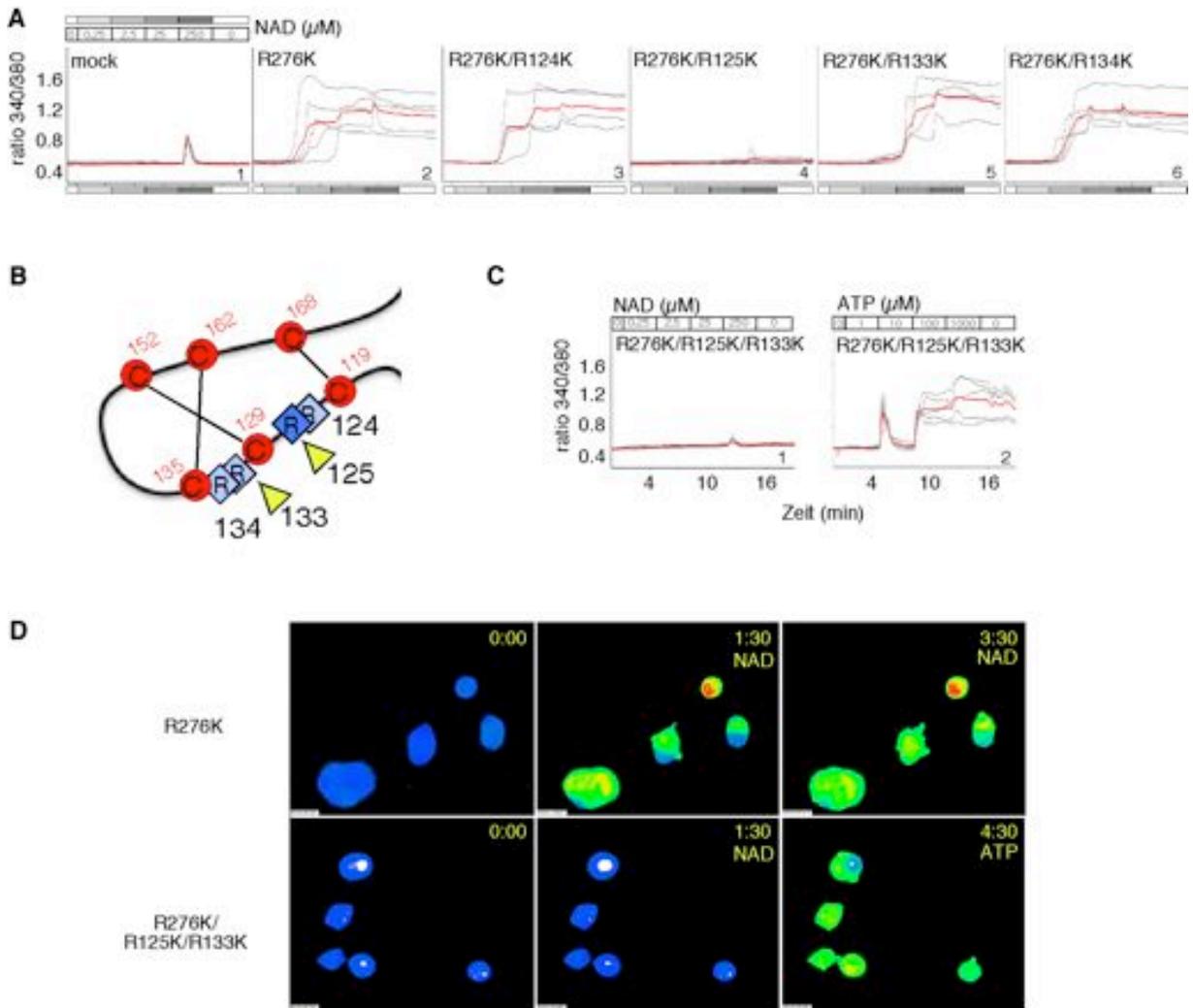


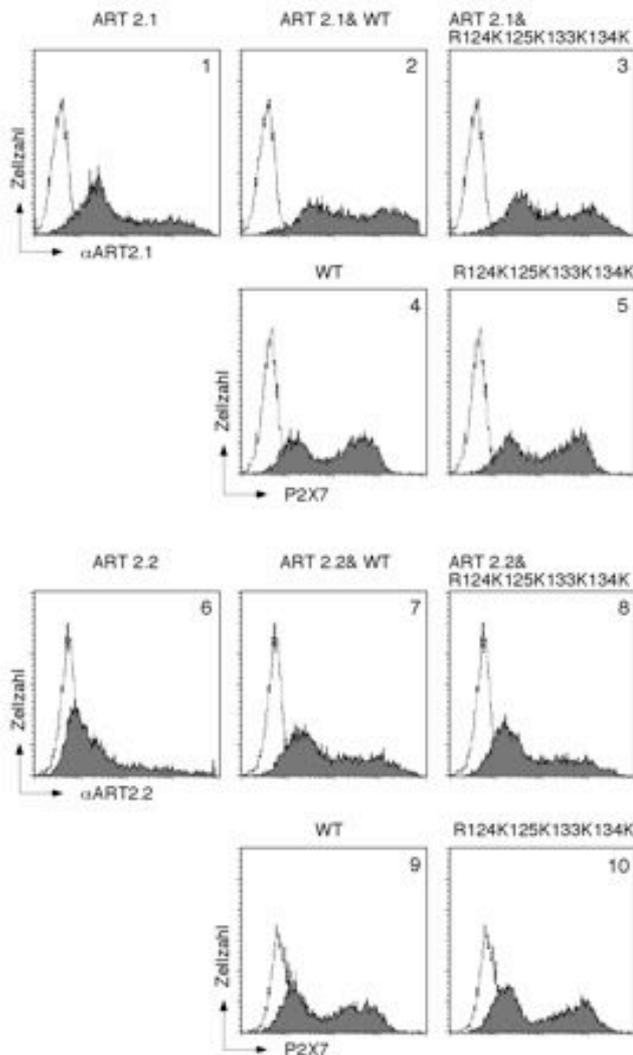
Abb.9: ADP-Ribosylierung von Arginin 125 ist notwendig, um den P2X7-Rezeptor zu aktivieren. HEK-Zellen wurden mit den Konstrukten für mRFP, ART2.2 und Wildtyp-P2X7 oder den angegebenen P2X7-Mutanten kotransfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff FURA-2AM beladen und im Einzel-Zell-Imaging untersucht. (A, C) Der Perfusionspuffer (37 °C) enthielt ansteigende Konzentrationen von NAD^+ und ATP (Perfusionsdauer pro Konzentration: 3 Minuten, Bildaufnahmen: alle 5 Sekunden). Die grauen Linien zeigen die Verläufe einzelner Zellen; Die roten Linien zeigen die kalkulierten Mittelwerte (Die Verläufe wurden mit der Openlab Software erstellt). (B) Schematische Übersicht der Cystein-reichen, prominenten Region des P2X7-Rezeptors. Die Pfeilspitzen markieren die beiden Arginine, die durch ART2.2 ADP-ribosyliert werden. Das funktionell relevante Arginin 125 ist dunkelblau hervorgehoben. (D) oben: Calciumantwort und „Blebbing“ von ART2.2/R276K-kotransfizierten HEK-Zellen nach Zugabe eines Tropfens NAD^+ (zum Zeitpunkt 0:30, 30 Sekunden); unten: Fehlende Calciumantwort auf einen Tropfen NAD^+ (zum Zeitpunkt 0:30) der HEK-Zellen, die mit ART2.2 und einer nicht ADP-ribosylierbaren P2X7-Mutante kotransfiziert wurden, gefolgt von einem Tropfen ATP (zum Zeitpunkt 3:30) und deutlicher ART2.2-unabhängiger Calciumantwort und Membran-„Blebbing“.

5.1.4 ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors durch ART2.1

Die ADP-Ribosyltransferase ART2 kommt auf murinen T-Zellen in zwei Varianten vor: Der thiol-unabhängigen ART2.2, die im murinen P2X7-Rezeptor die Arginine 125 und 133 ADP-ribosyliert, und der thiol-abhängigen ART2.1. Mit der folgenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob der P2X7-Rezeptor ein Zielprotein der ART2.1 darstellt und wenn ja, ob sich die ADP-Ribosylierungsstellen ebenfalls in dem prominenten Cystein-reichen "Finger" befinden (Abb. 2). Um diese Fragen zu beantworten, wurden HEK-Zellen mit ART2.1 oder ART2.2 und dem WT-Rezeptor oder der Vierfachmutante R124K125K133K134K, in der 4 Arginine im prominenten „Finger“ durch Lysin ersetzt sind (Abb. 9 C) kotransfiziert. Das Expressionsniveau von ART2.1 (Abb. 10 A, Panel 1, 2, 3) und ART2.2 (A, Panel 6, 7, 8) in Kombination mit dem WT-Rezeptor (A, Panel 4, 9) oder der Vierfachmutante (A, Panel 5, 10) war 20 Stunden nach der Transfektion vergleichbar.

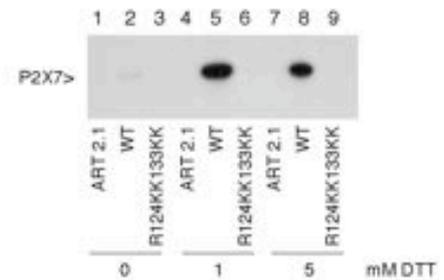
Der ADP-ribosylierte P2X7-Rezeptor wurde nach Immunpräzipitation über die kovalent-gebundene ³²P-ADPR-Gruppe mittels Autoradiographie als Bande bei 80kd detektiert. Ein entsprechendes Signal ist in dem Immunpräzipitat aus ART2.1 und WT-P2X7 koexprimierenden HEK-Zellen zu erkennen (Abb. 10 B, Spuren 5, 8), nicht aber aus ART2.1-Einzeltransfektanten (B, Spuren 4, 7). Die enzymatische Aktivität der ART2.1 war dabei von exogenem DTT abhängig. Ohne Zugabe von DTT konnte nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden, das auf eine minimale Restaktivität der ART2.1 hindeutet (B, Spuren 2 vs. 5, 8). Die ART2.2 erzielte auch in Abwesenheit von exogenem DTT eine deutliche ADP-Ribosylierung des P2X7 (C, Spuren 2, 5, 8). Die Vierfach-(R124K125K133K134)-Mutante konnte weder von ART2.1 noch ART2.2 ADP-ribosyliert werden. Die Zielarginine der ART2.1 liegen somit im gleichen Abschnitt des Rezeptors wie die der ART2.2 (B und C, Spuren 3, 6, 9). Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass ART2.1 mit R125 und R133 dieselben Argininreste ADP-ribosyliert wie die ART2.2. und beantwortet die Frage, ob der Rezeptor nach ADP-Ribosylierung durch ART2.1 auch aktiviert wird.

A Expressionskontrolle



B Immunpräzipitation

ART 2.1 - kotransfiziert



C Immunpräzipitation

ART 2.2 - kotransfiziert

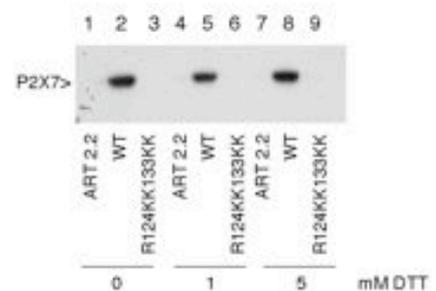


Abb. 10: Der P2X7-Rezeptor wird sowohl durch die thiol-abhängige ART2.1 als auch durch die thiol-unabhängige ART2.2 ADP-ribosyliert. HEK-Zellen wurden mit den Konstrukten für ART2.1 oder ART2.2 (Kontrolle) transfiziert oder zusätzlich mit dem Wildtyp-P2X7 oder der Vierfachmutante R124K/R125K/R133K/R134K kotransfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion geerntet. (A) FACS-Expressionskontrollen; jeweils ein Aliquot der Transfektanten wurde mit spezifischen Antikörpern gegen P2X7 (K1G), ART2.1 (GUGU2-54) oder ART2.2 (Nika102) angefärbt und im FACS analysiert. (B) SDS-PAGE Autoradiographie; die Transfektanten wurden für 20 Minuten bei 4 °C mit 2,5 μCi [^{32}P]-NAD $^{+}$, 0,1 μM NAD $^{+}$, 1 mM ADPR und den angegebenen DTT-Konzentrationen inkubiert. Die gewaschenen Zellen wurden lysiert und anschließend mit dem anti-P2X7-Ak K1G immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv-markierten Rezeptoren mittels Autographie detektiert.

Die Aktivierung des P2X7 führt zur Exposition von PS auf der Außenseite der Zellmembran und zur Aufnahme von DNA-Farbstoffen wie Yo-Pro-1, für die Zellmembranen natürlicherweise undurchlässig sind. Um das mögliche Gating des P2X7-Rezeptors durch ART2.1-vermittelte ADP-Ribosylierung zu untersuchen, wurden HEK-Zellen, die ART2.1

oder ART2.2 zusammen mit der sensitiven R276K-Rezeptormutante koexprimierten, mit NAD^+ behandelt und anschließend das expositionierte PS auf der Zelloberfläche und die Aufnahme von Yo-Pro-1 im FACS nachgewiesen. In Abwesenheit von NAD^+ und ATP oder in Gegenwart von DTT alleine zeigten ART2.1- und R276K- kotransfizierte HEK-Zellen keine bzw. nur sehr schwache Aktivierungsanzeichen (Abb. 11 A, Panel 1, 4). Behandlung dieser Transfektanten mit 500 μM ATP in Anwesenheit von DTT führte bei der Mehrheit der Zellen zu einer starken AnnexinV-Bindung und Yo-Pro-1-Aufnahme (A, Panel 10). Die Behandlung dieser Transfektanten mit NAD^+ und DTT führte zu einer ähnlich starken Exposition von PS, jedoch nur zu einer schwachen Anfärbung mit Yo-Pro-1 (A, Panel 7). Mutation der beiden ADP-Ribosylierungsstellen bei der Dreifach-(R276K125K133K)-Mutante resultierte in einen NAD^+ -resistenten Rezeptor, der aber weiterhin durch ATP aktivierbar war (A, Panel 8, 11). HEK-Zellen, die mit der R294K Mutante und ART2.1 kotransfiziert waren, reagierten weder auf ATP noch auf NAD^+ (A, Panel 9, 12).

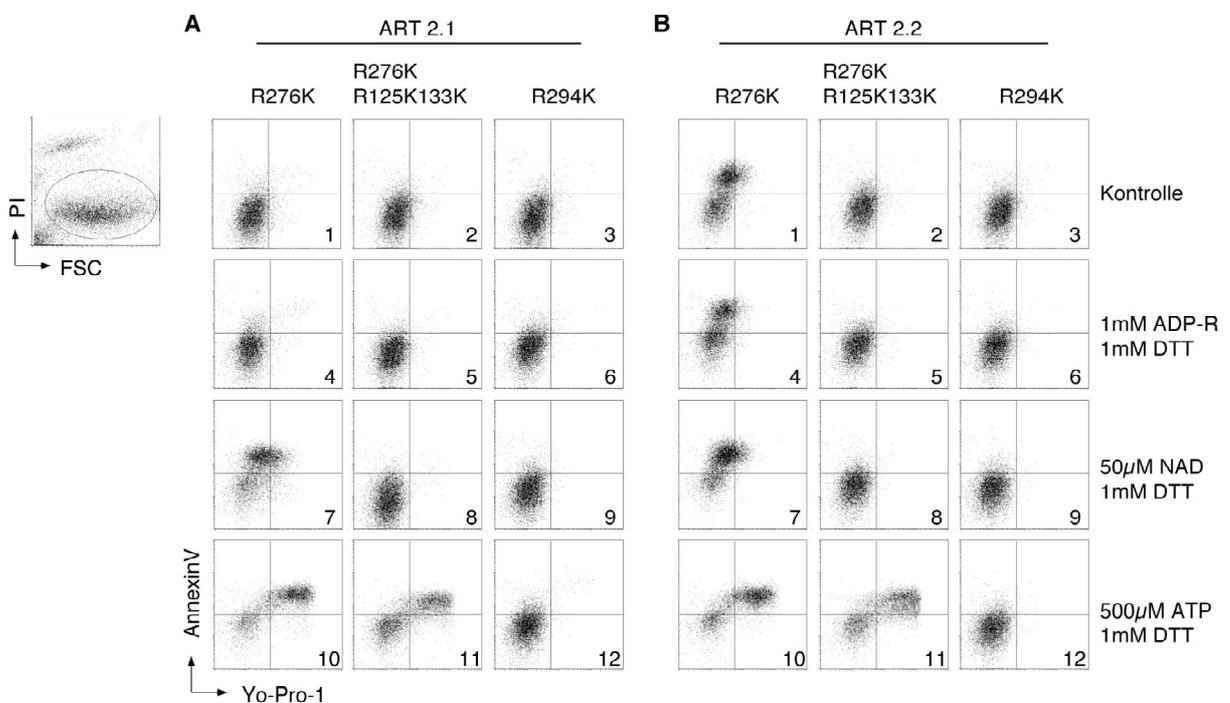


Abb. 11: AnnexinV/Yo-Pro-1-Anfärbung nach Aktivierung der sensitiven R276K-Rezeptormutante durch die thiol-abhängige ART2.1 und die thiol-unabhängige ART2.2. HEK-Zellen wurden mit den Konstrukten für ART2.1 (A) oder ART2.2 (B) und mit dem Wildtyp-P2X7 oder den P2X7-Mutanten (Einfachmutante R276K, R294K oder Dreifachmutante R276K/R125K/R133K) kotransfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion trypsiniert und für 60 Minuten bei 37 °C mit 1 μM Yo-Pro-1 ohne (Kontrolle) oder mit 50 μM NAD^+ oder 500 μM ATP in Gegenwart von 1 mM DTT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 20 Minuten bei 4 °C mit AnnexinV^{APC} angefärbt und im FACS analysiert.

Während die NAD⁺ und ATP-induzierten Antworten der ART2.1-Transfektanten mit denen der ART2.2-Transfektanten vergleichbar waren (A und B, Panel 7, 8, 10, 11), zeigten ART2.2/R276K-Transfektanten bereits ohne Behandlung mit exogenem NAD⁺ oder ATP eine partielle PS-Exposition (B, Panel 1, 4). Diese Reaktion scheint NAD⁺ und ART2.2 vermittelt zu sein, denn sie ist wie bei der Zugabe von exogenem NAD⁺ nur von einer schwachen Yo-Pro-1 Aufnahme begleitet. Zudem zeigen Zellen nach Kotransfektion von ART2.2 und der Dreifach-(R276K125K133K)-Mutante, die keine ADP-Ribosylierungsstelle besitzt, keine vergleichbare Reaktion (B, Panel 2). Ob diese "spontane" PS-Exposition bei R276K/ART2.2 kotransfizierten Zellen möglicherweise durch endogenes NAD⁺ zu erklären ist, das von den Zellen bei der Zellernte selbst freigesetzt wird, wird durch die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen noch näher beleuchtet.

5.2 Funktionsanalyse des murinen P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen

Die bisher im HEK-Zellmodell gezeigten, physiologischen Konsequenzen der Rezeptoraktivierung durch exogenes ATP oder NAD⁺ sollten als nächstes an primären, murinen T-Zellen untersucht werden. Um die Beteiligung des P2X7-Rezeptors nachzuweisen und zwischen den Effekten von ATP und ADP-Ribosylierung auf den Rezeptor unterscheiden zu können, wurden Zellen aus WT-Mäusen im Vergleich zu Zellen aus P2X7-defizienten bzw. ART2-defizienten Mäusen untersucht. Der Nachweis von PS auf der Außenseite der Zellmembran, die Aufnahme des DNA-Farbstoffes PI sowie der Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche dienten hierbei als Indikatoren der P2X7-Aktivierung.

5.2.1 Konsequenzen der P2X7-Aktivierung durch NAD⁺ und ATP

Exposition von Phosphatidylserin und Verlust des CD62L-Selektins

Die Behandlung von aufgereinigten T-Zellen mit exogenem NAD⁺ oder ATP führte innerhalb von 30 Minuten zur Exposition von PS und zu einem Verlust von CD62L auf der Außenseite der Zellmembran. Mit unterschiedlich zeitlicher Verzögerung folgte innerhalb von 20-60 Minuten die Aufnahme von PI. Diese Effekte waren bei WT-, nicht aber bei P2X7-defizienten T-Zellen zu beobachten und sind somit offensichtlich vom P2X7-Rezeptor abhängig (Abb. 12 A-D Panel 2, 4; C, D Panel 8, 10). Dem entsprechend konnten die Exposition von Phosphatidylserin und der Verlust von CD62L durch KN-62 (Humphreys *et al.* 2000; Hibell *et al.* 2001), einem spezifischen Inhibitor des P2X7-Rezeptors, verhindert werden (A und B, Panel 3, 5). ART2-defiziente T-Zellen waren empfindlich gegenüber ATP, zeigten aber keine Sensitivität gegenüber NAD⁺, da für die ADP-Ribosylierung des Rezeptors ART2 essentiell ist (A und B, Panel 7, 9).

T-Zellen von C57Bl/6-Mäusen, die aufgrund einer Mutation (P451L) im zytosolischen Teil des P2X7 eine beeinträchtigte Rezeptorfunktion aufweisen (Adriouch *et al.* 2002), benötigten 10-fach höhere Konzentrationen von NAD⁺ und ATP, um dieselben Effekte zu zeigen wie T-Zellen, die aus einer BALB/c WT-Maus gewonnen wurden (A, Panel 2, 4 vs. C und D, Panel 2-5). Bemerkenswert ist, dass nach der Behandlung mit NAD⁺ die Mehrheit der Zellen zwar AnnexinV-positiv, aber nicht gleichzeitig, wie im Fall von ATP, PI-positiv war (A, Panel 2, 4). Dies erinnert an die unterschiedlichen Reaktionen der ART2/P2X7R276K-kotransfizierten HEK-Zellen auf NAD⁺ und ATP (Abb. 11 A und B, Panel 7, 10). Es fällt auf, dass ein kleiner Anteil der WT-T-Zellen bereits ohne Zugabe von exogenem NAD⁺ AnnexinV-positiv oder CD62L-negativ ist (A, B, C und D, Panel 1). Dieser Effekt ist offensichtlich ART2- und P2X7-abhängig (A, B, C und D, Panel 6), erinnert an die "spontane" Reaktion von ART2.2/R276K-kotransfizierten HEK-Zellen (Abb. 11 B, Panel 1) und könnte möglicherweise auf die Freisetzung von endogenem NAD⁺ hindeuten. Weiterhin fällt auf, dass ART2-defiziente Zellen etwas sensitiver als WT-Zellen auf exogenes ATP reagieren (A, Panel 4, 9).

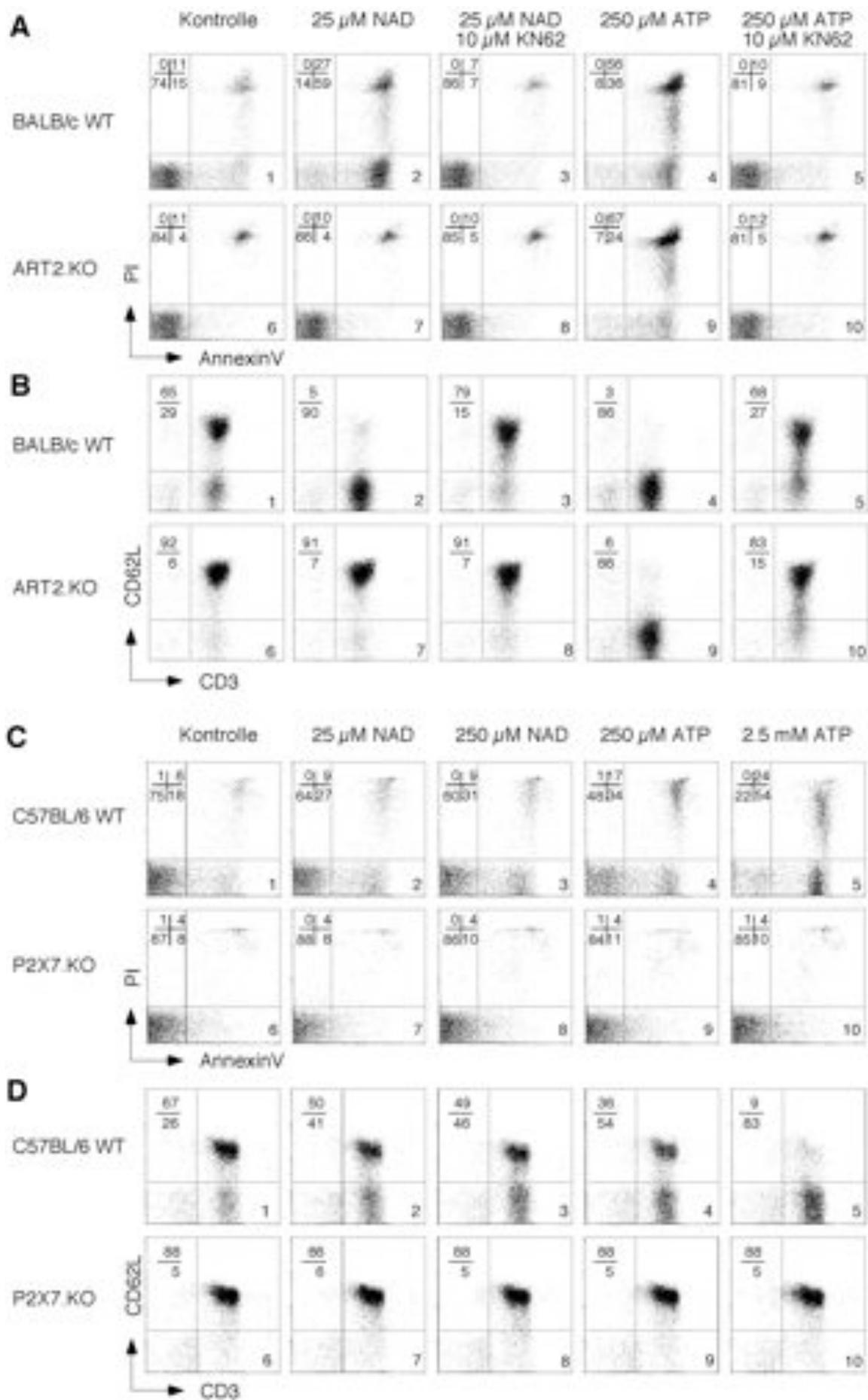


Abb. 12: Exogenes NAD^+ und ATP induzieren die P2X7-abhängige Exposition von Phosphatidylserin, den Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche und die Aufnahme von PI durch primäre T-Zellen. (A, B) Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp- und einer ART2.KO-Maus wurden ohne (Panel 1, 6) oder mit $25 \mu\text{M}$ NAD^+ oder $250 \mu\text{M}$ ATP (Panel 2, 4) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Parallele Inkubationen wurden in der Gegenwart des P2X7-Antagonisten KN-62 ($10 \mu\text{M}$) (Panel 3, 5, 8, 10) durchgeführt. (A) Die Zellen wurden gewaschen, mit AnnexinV^{FITC} und PI oder (B) mit anti-CD62L^{PE} und anti-CD3^{FITC} angefärbt und anschließend im FACS analysiert. (C, D) Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer C57Bl/6 Wildtyp- und einer P2X7.KO-Maus wurden ohne (Panel 1, 6) oder mit $25 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$ NAD^+ , $250 \mu\text{M}$ und 2.5mM ATP (Panel 2, 3, 4, 5) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vor der FACS-Analyse, wie in A und B angegeben, angefärbt. (A, C) Die Zahlen geben die Prozente der Zellen in jedem Quadranten an. (B, D) Die Prozente des oberen und unteren rechten Quadranten sind angegeben.

Verlust von CD27

Im folgenden Versuch wurden Lymphozyten einer BALB/c WT- und ART2.KO-Maus vor und nach ATP- und NAD^+ -Behandlung auf die Expression von CD27 untersucht, das ebenso wie CD62L als TACE-(TNF- α -converting enzyme)-sensitives Protein bekannt ist. CD27 konnte auf unbehandelten WT- und ART2.KO-T-Zellen detektiert werden (Abb. 13, Panel 1, 4). Die Behandlung der WT-Lymphozyten mit exogenem NAD^+ oder ATP führte zu einer Abnahme des Oberflächenproteins (Panel 2, 3). ART2-defiziente T-Zellen reagierten auf ATP, aber nicht auf NAD^+ (Panel 5, 6). Ähnlich wie im Fall von CD62L (Abb. 12 B, Panel 1) war ein kleiner Anteil der WT-T-Zellen, nicht aber der ART2-defizienten Zellen, bereits ohne Zugabe von exogenem NAD^+ CD27-negativ (Panel 1 vs. 4).

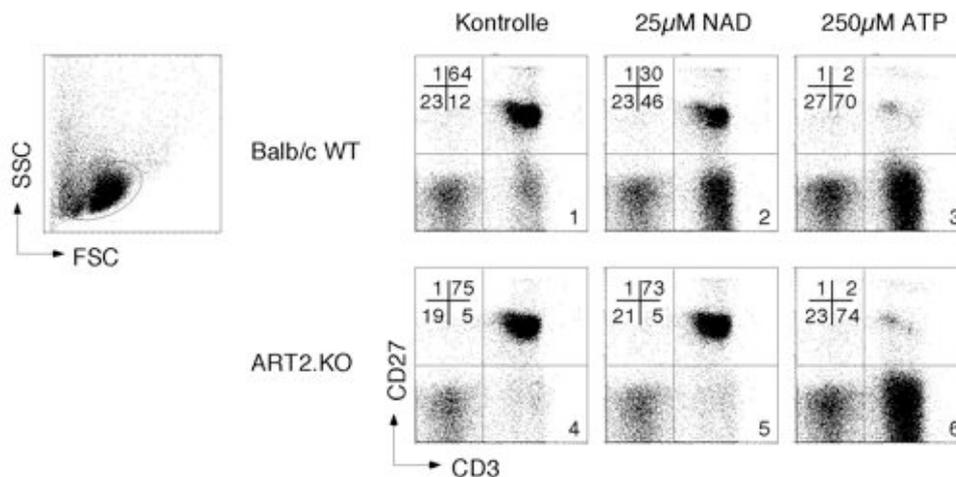


Abb. 13: Exogenes NAD^+ und ATP induzieren den Verlust von CD27 auf der Zelloberfläche primärer T-Zellen. Primäre Lymphozyten aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp- und einer ART2.KO-Maus wurden ohne (Kontrolle, Panel 1, 4) oder mit $25 \mu\text{M}$ NAD^+ oder $250 \mu\text{M}$ ATP (Panel 2, 3, 5, 6) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit anti-CD27^{PE} und anti-CD3^{APC} angefärbt und anschließend im FACS analysiert

5.3 Freisetzung von NAD^+ während der T-Zellpräparation

In den vorangegangenen Versuchen fiel auf, dass ein Teil der WT-T-Zellen bereits vor der Behandlung mit exogenem NAD^+ deutliche Anzeichen der P2X7-Aktivierung zeigte. Gleichzeitig war zu beobachten, dass diese Effekte P2X7- und ART2-abhängig und somit offensichtlich NAD^+ -vermittelt waren (Abb. 12 A-D, Panel 1 vs. 6; Abb. 13, Panel 1 vs. 4). Da die primären T-Zellen bei 4 °C präpariert und dann bei 37 °C inkubiert worden waren, kam die Frage auf, ob eine Vor-ADP-Ribosylierung bzw. Voraktivierung des P2X7 schon in der Maus oder während der Präparation der T-Zellen stattgefunden hatte. Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Untersuchungen sollten einen genauen Einblick in die Temperaturabhängigkeit der ART2-Aktivität und der P2X7-Aktivierung geben und zudem klären, ob es zu einer Freisetzung von endogenem NAD^+ während der Präparation kommen könnte. Neben BALB/c WT- und ART2.KO-Mäusen wurden hier auch CD38.KO-Mäuse eingesetzt, die durch das Fehlen der NAD^+ -Glykohydrolase höhere Mengen an extrazellulärem NAD^+ (Partida-Sanchez *et al.* 2003) und dadurch eine verstärkte ART2-Aktivität aufweisen (Krebs *et al.* 2005).

5.3.1 Temperaturabhängigkeit der P2X7-Aktivierung

Abb. 14 zeigt die Ergebnisse einer Analyse der Temperaturabhängigkeit der Exposition von Phosphatidylserin (A und B) und des Verlustes von CD62L (C und D) nach einer Behandlung von T-Zellen mit exogenem ATP oder NAD^+ . T-Zellen, die strikt bei 4 °C gehalten wurden, kehrten unabhängig von der Art des Agonisten weder PS nach außen, noch gaben sie CD62L von der Zelloberfläche ab. Erkennbare Reaktionen auf die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors nach Behandlung mit NAD^+ zeigten sich erst bei annähernd physiologischen Temperaturen ab 30 °C (A und C), während die T-Zellen nach ATP-Behandlung schon bei 20 °C deutlich sichtbare Reaktionen zeigten (B und D).

Es fällt auf, dass die zuvor beschriebene "spontane" Exposition von PS ebenso wie der "spontane" Verlust von CD62L bei WT Zellen ohne Zugabe exogener Nukleotide temperaturabhängig ist (Abb. 14 A-D, offene Kreise), d.h. erst bei 30 °C sichtbar wurde. Es fällt ferner auf, dass CD38-defizienten Zellen auch ohne Zugabe exogener Nukleotide bei 30 °C verstärkt PS exponierten und CD62L verloren (Abb. 14 A-D, offene Quadrate). ART2-defiziente Zellen waren inert gegenüber exogenem NAD^+ und zeigten keine "spontane" Reaktion (Abb. 14 A, C gefüllte und offene Dreiecke). Sie zeigten jedoch normale Reaktionen auf exogenes ATP (Abb. 14 B, D, gefüllte Dreiecke).

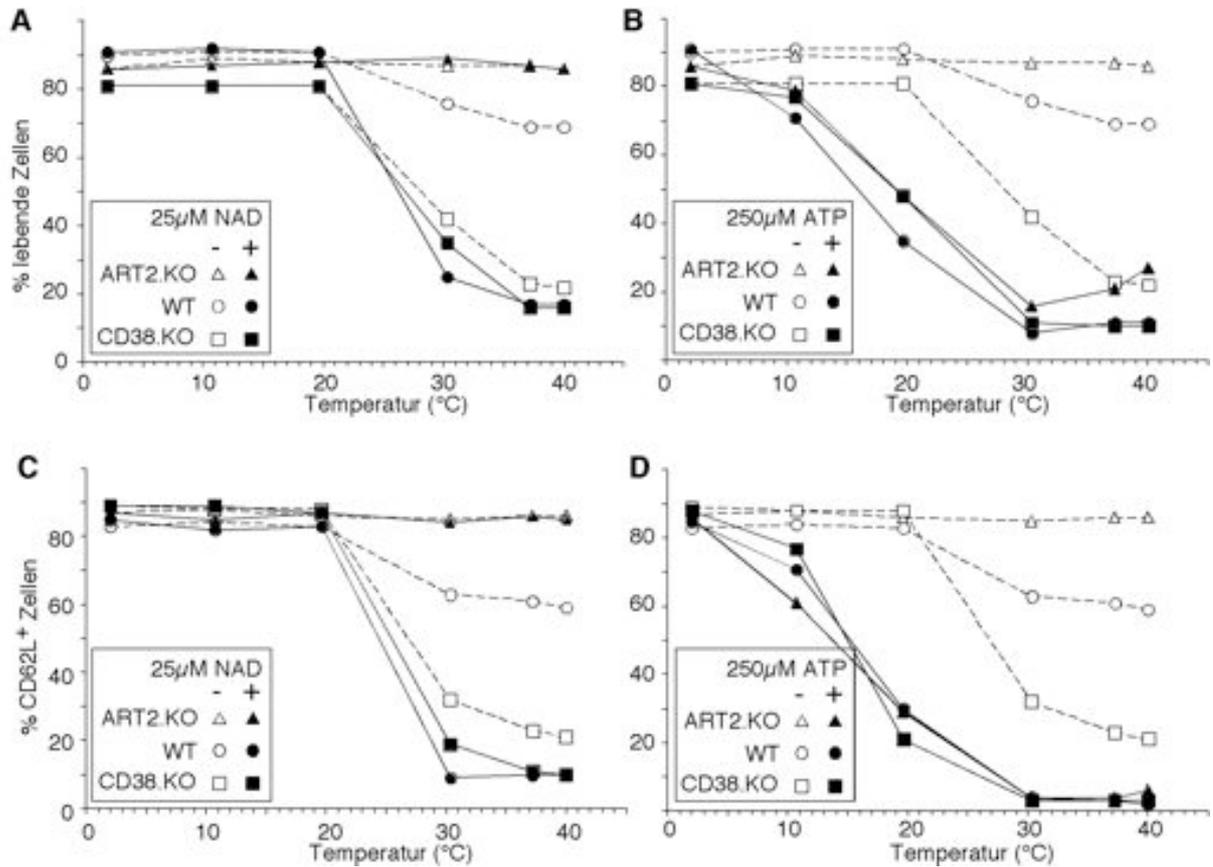


Abb. 14: Temperaturabhängigkeit der ATP und NAD^+ -induzierten Exposition von Phosphatidylserin und des Verlustes von CD62L. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp-, einer ART2.KO- und einer CD38.KO-Maus wurden für 30 Minuten bei den angegebenen Temperaturen ohne (Kontrolle) oder mit $25 \mu\text{M}$ NAD^+ (A und C) oder $250 \mu\text{M}$ ATP (B und D) inkubiert. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen mit Annexin V^{FITC} und PI (A und B; Annexin V /PI -Zellen in Prozent der T-Zellen) oder mit anti-CD62L $^{\text{PE}}$ und anti-CD3 $^{\text{APC}}$ (C und D; CD62L $^+$ -Zellen in Prozent der T-Zellen) angefärbt und im FACS analysiert.

5.3.2 Temperaturabhängigkeit der ADP-Ribosylierung

Die Beobachtung, dass die NAD^+ -vermittelten Effekte auf T-Zellen erst bei annähernd physiologischen Temperaturen auftraten (5.3.1), führte zu der Frage, ob die ADP-Ribosyltransferase ART2 erst bei diesen Temperaturen enzymatisch aktiv wird. Durch den Einsatz von etheno- NAD^+ , einem Substratanalogon für ART2, konnte der ADP-Ribosylierungsgrad der Oberflächenproteine bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe eines etheno-ADP-Ribose-spezifischen Antikörpers im FACS bestimmt werden (Abb. 15 A). Während bei ART2-defizienten T-Zellen erwartungsgemäß kein Einbau von etheno-ADP-Ribose nachweisbar war (A), zeigten WT T-Zellen bei 4°C einen wesentlich höheren Anteil an etheno-ADP-ribosylierten Oberflächenproteinen als bei physiologischen Temperaturen.

Um die Stabilität der ADP-Ribosylierung zu untersuchen, wurden T-Zellen in einem zusätzlichen Experiment nach etheno-NAD⁺-Behandlung gewaschen und ohne das ART2-Substrat bei 4 °C oder 37 °C weiter inkubiert, bevor das ADP-Ribosylierungsniveau bestimmt wurde (Abb. 15 B). Eine deutliche Abnahme des ADP-Ribosylierungsgrades trat bei T-Zellen auf, die, nach einer etheno-NAD⁺-Inkubation bei 4 °C, eine Stunde bei 37 °C ohne ART2-Substrat weiter inkubiert worden waren (B, Panel 3 vs. 1). Anders verhielten sich T-Zellen, die bei 37 °C etheno-ADP-ribosyliert und bei 4 °C nachinkubiert wurden. Hier zeigte sich keine Abnahme des ADP-Ribosylierungsgrades (B, Panel 4 vs. 2). Diese Beobachtungen zeigen eine Reversion der ADP-Ribosylierung bei physiologischen Temperaturen.

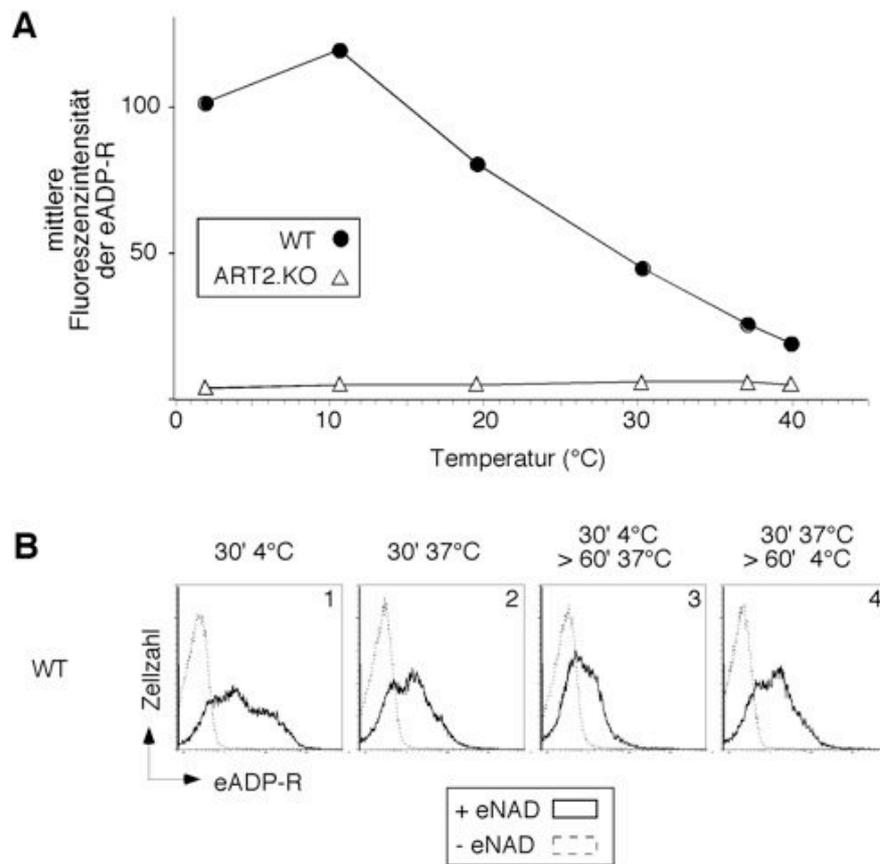


Abb. 15: ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen ist bei 4 °C effizienter als bei 37 °C. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp- und ART2.KO-Maus wurden für 30 Minuten bei den angegebenen Temperaturen mit 25 μ M eNAD⁺ inkubiert. (A) Die gewaschenen Zellen wurden direkt mit dem anti-eADP-R mAK 1G4^{Alexa488} angefärbt und im FACS analysiert. (B) erst nach einer weiteren, einstündigen Inkubation bei 4 °C oder 37 °C in Abwesenheit von eNAD⁺ wurden die T-Zellen wie in A angefärbt und im FACS analysiert.

5.3.3 ART2.2-Inhibition durch spezifische Einzeldomänenantikörper

Die „spontane“ Exposition von PS und der Verlust von CD62L von einem kleinen Anteil der primären WT-T-Zellen könnte ein Anzeichen für einen vorausgegangenen Kontakt mit endogenem NAD^+ z.B. schon *in vivo* oder während der Präparation sein. Um diese Frage zu klären, wurden im Folgenden ART2.2-inhibierende Einzeldomänenantikörper (sdAb = single domain antibody) aus dem Lama (*Lama glama*) eingesetzt, die im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit am Institut für Immunologie generiert worden war (Reyelt 2008).

T-Zellen einer BALB/c WT-Maus wurden nach einer 10-minütigen Vorbehandlung mit vier verschiedenen ART2-spezifischen Einzeldomänenantikörpern für 30 Minuten mit $5 \mu\text{M}$ etheno- NAD^+ oder $25 \mu\text{M}$ NAD^+ weiterinkubiert. Die Aktivität der ART2.2 wurde wie zuvor über die etheno-ADP-ribosylierten Oberflächenproteine (Abb. 16 A), die ART2.2-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors über die Exposition von PS im FACS nachgewiesen (Abb. 16 B). Die Ergebnisse zeigen, dass drei der vier eingesetzten Antikörper (s+16a, s+16b, l-17) die ART2.2-vermittelte etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf CD4-positiven wie auf CD4-negativen T-Zellen ebenso wie die durch exogenes NAD^+ induzierte Exposition von PS effizient inhibierten (A und B, Panel 4, 5, 6 vs. 1). Hingegen zeigte sich keinerlei Inhibition von ART2-Aktivität oder P2X7-Aktivierung bei den mit s-14 vorbehandelten T-Zellen (Abb. 16 A und B, Panel 3). Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass die drei inhibierenden Einzeldomänenantikörper jedoch die "spontane" PS-Exposition offensichtlich nicht inhibieren konnten.

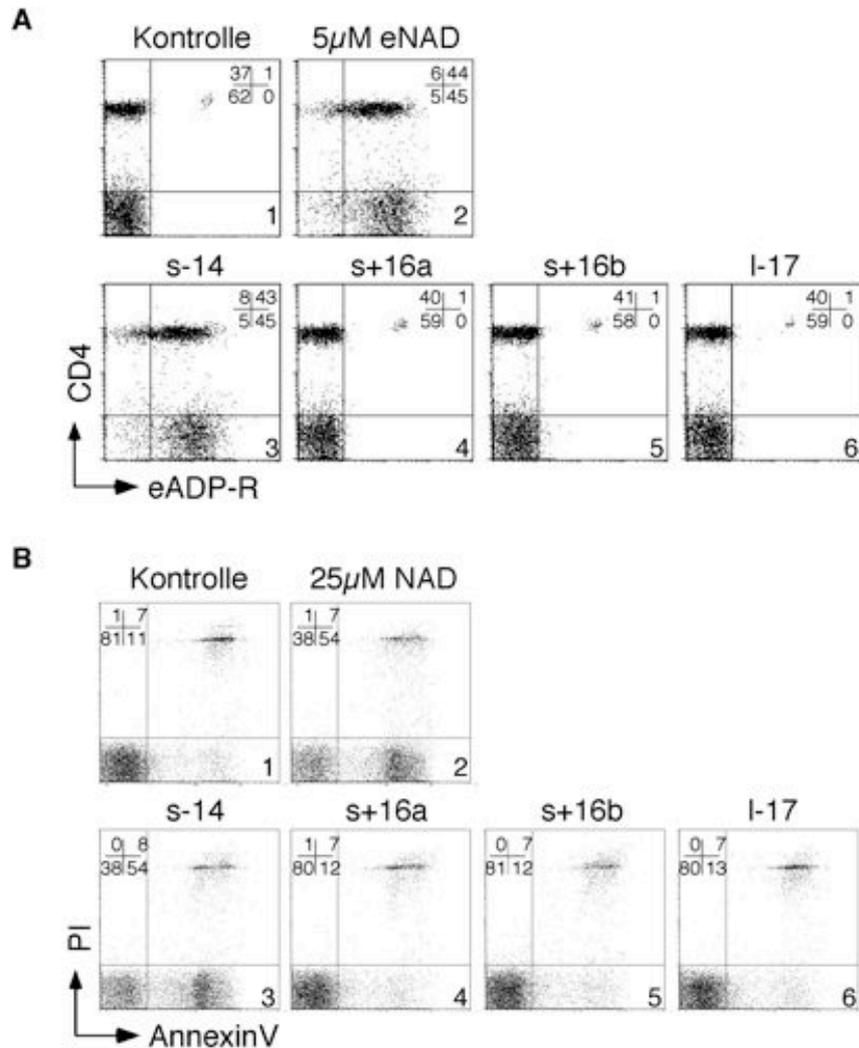


Abb. 16: Spezifische Einzeldomänenantikörper (sdAb) blockieren die enzymatische Aktivität der ART2.2 auf primären Lymphknoten-T-Zellen *in vitro*. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden vor der Zugabe von 5 μ M eNAD⁺ (A) oder 25 μ M NAD⁺ (B) mit 2 μ g der aufgereinigten ART2.2-spezifischen sd Antikörper für 10 Minuten vorinkubiert. (A) Die Zellen wurden gewaschen, mit anti-etheno-Adenosin 1G4-Antikörper und anti-CD4 Antikörper angefärbt und im FACS analysiert. Panel 1, 2: Kontrollzellen mit und ohne eNAD⁺-Behandlung; Panel 3, 4, 5, 6: Lymphozyten, die mit sdAb vorinkubiert und eNAD⁺ behandelt wurden. (B) Die Zellen wurden gewaschen, mit AnnexinV^{Fluorescein} und PI angefärbt und im FACS analysiert. Panel 1, 2: Kontrollzellen mit und ohne NAD⁺-Behandlung; Panel 3, 4, 5 und 6: Lymphozyten, die mit sdAb vorinkubiert und NAD⁺ behandelt wurden.

Im folgenden Versuch wurden neben WT- und ART2.KO-Mäusen auch CD38-defiziente Mäuse eingesetzt, die aufgrund ihrer hohen extrazellulären NAD⁺-Konzentrationen deutlichere "spontane" Reaktionen, d.h. auch ohne Zugabe von exogenem NAD⁺, zeigten. T-Zellen wurden zehn Minuten nach einer *i.v.*-Injektion des ART2.2-spezifischen Einzeldomänenantikörpers s+16a präpariert, wie zuvor für PS und CD62L angefärbt, und im FACS analysiert. Es erfolgte keine zusätzliche Behandlung mit exogenem NAD⁺.

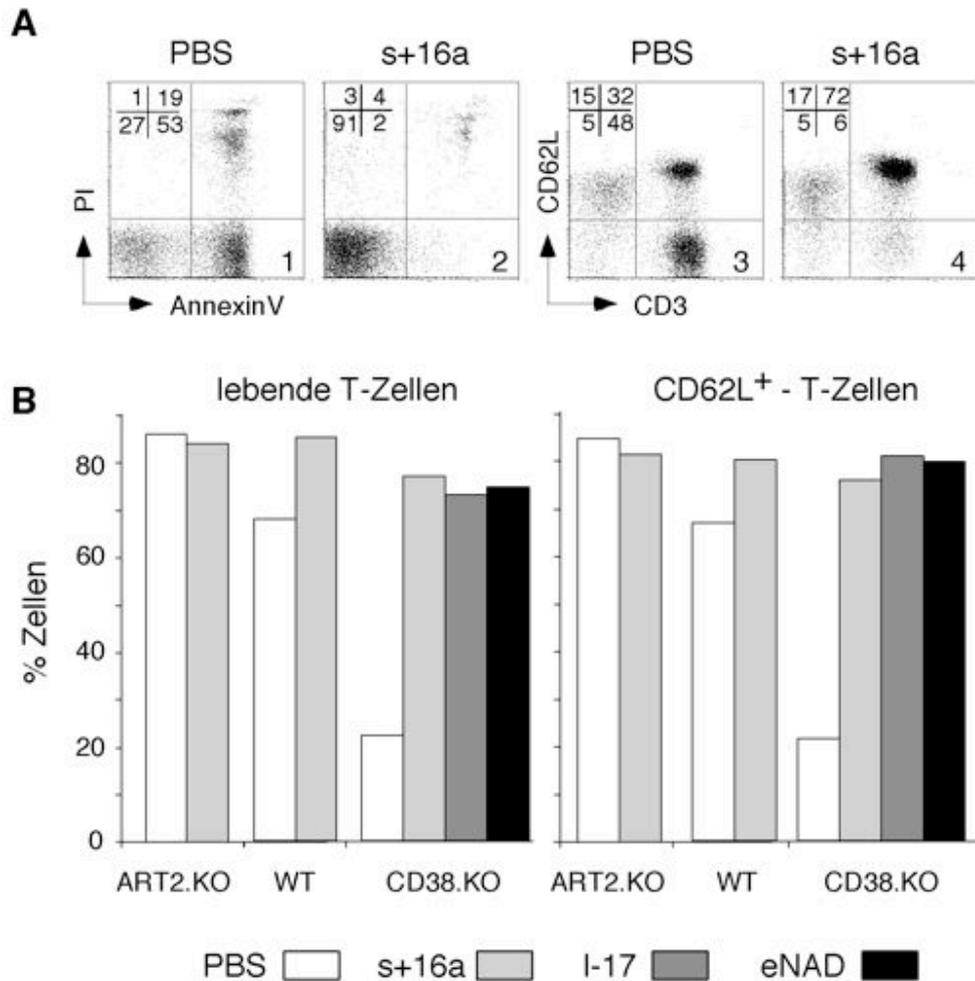


Abb. 17: *In vivo*-Blockade von ART2.2 mit Einzeldomänenantikörpern (sdAb) verhindert die spontane Exposition von Phosphatidylserin sowie den Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche frisch präparierter T-Zellen. Eine BALB/c Wildtyp-, ART2.KO- und CD38.KO-Maus erhielten zehn Minuten vor der Tötung und anschließender Lymphknotenpräparation eine i.v. Injektion mit PBS (Kontrolle) oder PBS mit 300 µg ART2.2-spezifischem sdAb s+16a. Zwei weitere CD38.KO-Mäuse erhielten i.v. Injektionen mit sdAb l-17 oder 2 mg etheno-NAD⁺. Die hergestellten Zellsuspensionen wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit AnnexinV^{FITC}, anti-CD3^{APC} und PI oder mit anti-CD62L^{PE} und anti-CD3^{FITC} angefärbt und anschließend im FACS analysiert. (A) FACS-Abbildungen des CD62L-Verlustes (Panel 1, 2) bzw. der Exposition von PS (Panel 3, 4) von T-Zellen aus CD38.KO-Mäusen, die Injektionen mit PBS oder PBS mit sdAb s+16a erhalten hatten. (B) Graphik: Angegeben sind lebende (AnnexinV/PI⁻)-Zellen in Prozent der CD3⁺-Zellen und CD62L⁺-Zellen in Prozent der CD3⁺-Zellen.

Die „spontane“ Exposition von PS und der "spontane" Verlust von CD62L ließen sich gut an den PBS-behandelten CD38.KO- und WT-Tieren erkennen: Die Mehrheit der CD38-defizienten und ein Teil der WT-T-Zellen war nach einer Inkubation bei 37 °C ohne exogenes NAD⁺ AnnexinV-positiv bzw. CD62L-negativ (Abb. 17 A, Panel 1 und 3). Diese Effekte waren strikt ART2-abhängig, da ART2-defiziente T-Zellen keine spontanen Reaktionen zeigten (B). Eine Injektion mit den Antikörpern s+16a oder l-17 kurz vor der Präparation

konnte WT-T-Zellen und sogar CD38-defiziente T-Zellen erfolgreich vor den ART2.2-vermittelten Effekten schützen (A, Panel 2, 4; B). Interessanterweise hatte eine Injektion mit 2 mg etheno-NAD⁺ (Die etheno-ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors führt nicht zu dessen Aktivierung) zehn Minuten vor der Präparation der CD38-defizienten Zellen einen ähnlichen präventiven Effekt, wenngleich hierdurch nicht die ART2.2-Aktivität blockiert wurde, sondern vielmehr mögliche ADP-Ribosylierungsstellen in P2X7 und anderen Zielproteinen mit etheno-ADP-Ribose besetzt wurden. (B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die untersuchten T-Zellen erst während der Präparation und nicht bereits zuvor *in vivo* ADP-ribosyliert wurden.

5.4 Phagozytose von T-Zellen nach P2X7-Aktivierung

Die dauerhafte Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung von Arginin 125 oder chronische ATP-Exposition führt, wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, zu verschiedenen Modifikationen der T-Zelle und löst schließlich den Zelltod aus. Apoptotische Zellen werden normalerweise durch Makrophagen phagozytiert. Dabei gilt die Exposition von PS auf der Außenseite einer Zellmembran als ein „Friss-mich“-Signal (s.a. 5.2.1) (Fadok *et al.* 1992; Fadok *et al.* 2001). Daher stellte sich die Frage, ob T-Zellen nach Behandlung mit exogenem ATP oder NAD⁺ durch Makrophagen phagozytiert werden. Hierfür wurden aufgereinigte T-Zellen mit exogenem NAD⁺ oder ATP vorbehandelt und anschließend mit Peritonealmakrophagen koinkubiert. Um T-Zellen und Makrophagen später in der Immunfluoreszenz oder im FACS voneinander unterscheiden zu können, wurden T-Zellen mit einem fluoreszierenden Zellfarbstoff (CFSE (Celltracker Green) oder PKH26 (roter Zellmembranfarbstoff)), Makrophagen mit Fluorochrom-gekoppelten anti-CD11a (Mac1, Integrin α M) Antikörpern angefärbt.

5.4.1 Phagozytose NAD⁺-behandelter T-Zellen durch Makrophagen

In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob NAD⁺-behandelte T-Zellen von Peritonealmakrophagen phagozytiert werden. Hierzu wurden mit PKH26 markierte T-Zellen für 30 Minuten mit NAD⁺ behandelt, dann in Suspension bei 4 °C oder 37 °C zusammen mit Peritonealmakrophagen für unterschiedliche Zeiten inkubiert, fixiert und dann mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bzw. FACS analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen, die mit 25 μ M NAD⁺ behandelt worden waren, innerhalb von 50 Minuten durch Makrophagen phagozytiert wurden (Abb. 18 A). Die Phagozytose der T-Zellen war dabei von der Temperatur abhängig: Während T-Zellen bei 4°C außen an den Makrophagen zu kleben schienen (Abb. 18 A, panel 2, weiße Pfeile), waren sie bei 37 °C zu einem großen Anteil aufgenommen und teilweise bereits zersetzt worden (Abb. 18 A, panel 1, weiße Pfeile). Die parallel durchgeführten FACS-Analysen zeigten, dass ca. ein Drittel der Phagozyten, die für 50 Minuten bei 37 °C mit NAD⁺-behandelten T-Zellen koinkubiert worden waren, Mac-

1^{FITC}/PKH26-doppelt positiv waren (Abb. 18 B, Panel 2), während bei den 4 °C-Proben keine bzw. nur sehr wenige Makrophagen doppelt positiv waren (Abb. 18 B, Panel 3, 4). Somit wurden im FACS offensichtlich nur die Makrophagen als PKH26-(T-Zell)-positiv angezeigt, die T-Zellen internalisiert hatten. Sowohl die Mac-1^{FITC}-einfach positiven Makrophagen als auch die PKH26-positiven T-Zellen sind als distinkte Populationen deutlich zu erkennen. (Abb. 18 B, Panel 4 vs. 2).

Abb. 18 C und D vermitteln einen Einblick in den Verlauf der Phagozytose innerhalb der ersten Stunde der Koninkubation der Makrophagen mit den NAD⁺-behandelten T-Zellen. Die Zunahme der PKH26/Mac-1^{FITC}-positiven Makrophagen erreichte nach 50 bis 60 Minuten Koinkubation maximale Werte, wenn die Zellen bei 37 °C koinkubiert wurden (Abb. 18 C, rote Balken). Unbehandelte Kontrollzellen wurden mit ähnlichem Verlauf, aber zu einem wesentlich geringeren Anteil als NAD⁺-behandelte T-Zellen, phagozytiert (Abb. 18 C, rosa Balken). Bei den 4 °C-Proben war über den gesamten Zeitraum keine oder eine nur sehr geringe Phagozytose sowohl von unbehandelten als auch von NAD⁺-behandelten T-Zellen zu beobachten (Abb. 18 C, hell- und dunkelblaue Balken).

Die Phagozytose NAD⁺-behandelter T-Zellen war dabei ART2-abhängig: Während WT-T-Zellen nach einer Behandlung mit 25 µM NAD⁺ durch Makrophagen phagozytiert wurden, war keine Phagozytose von NAD⁺-behandelten ART2-defizienten T-Zellen zu beobachten (Abb. 18 D).

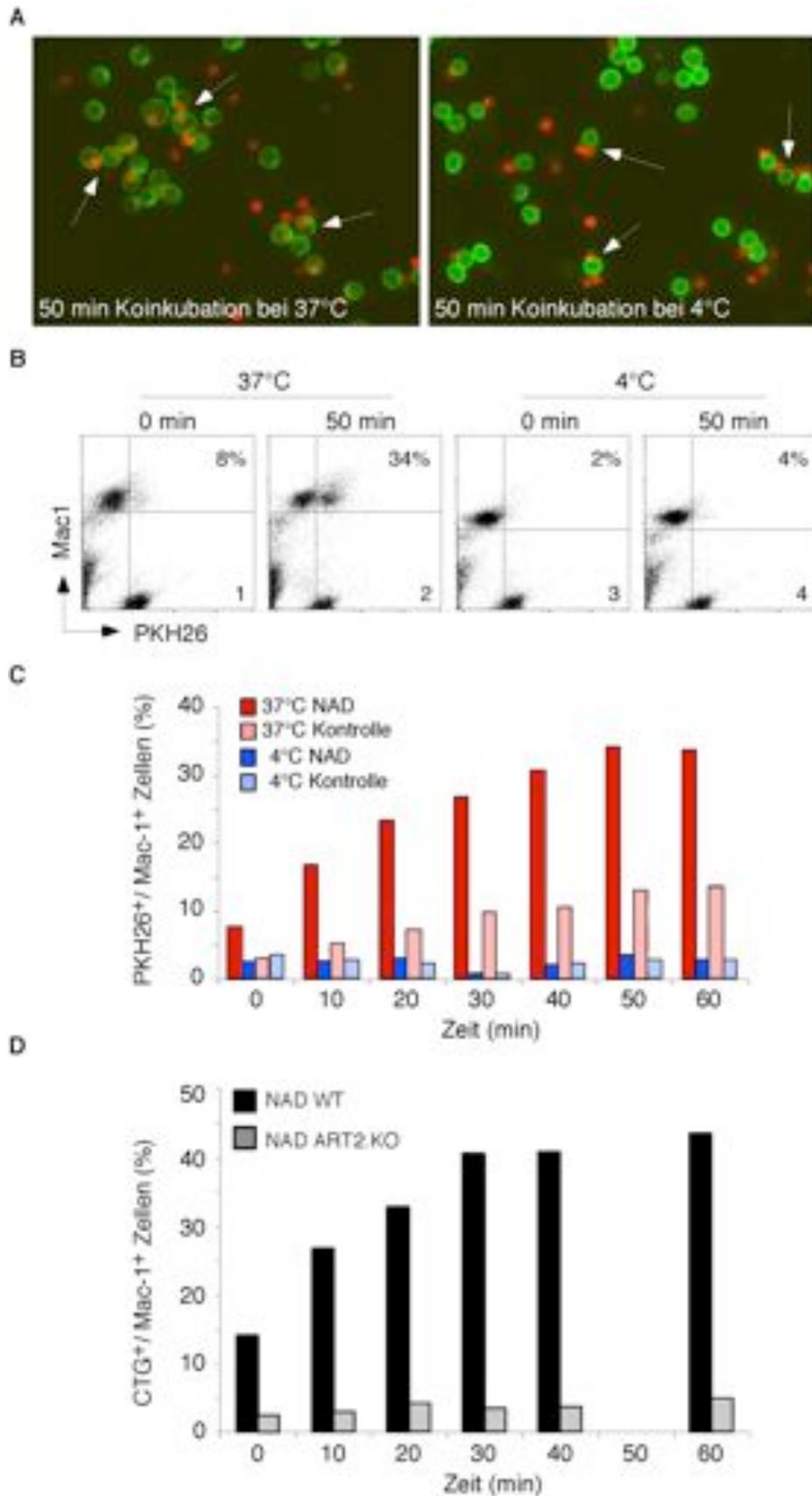


Abb.18: NAD⁺-behandelte T-Zellen werden durch Peritonealmakrophagen phagozytiert. Aus Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp-Maus aufgereinigte T-Zellen wurden mit 4 μ M PKH26 angefärbt, gewaschen und anschließend ohne oder mit 25 μ M NAD⁺ für 30

Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen im Verhältnis 1:1 in Suspension mit Peritonealmakrophagen für die angegebenen Zeitpunkte bei 4 °C oder 37 °C koinkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Phagozytose jeweils durch Überführung eines Aliquots der Zellen in 2% PFA gestoppt, die Zellen gewaschen und die Makrophagen mit anti Mac-1^{FITC} angefärbt. (A) Ein Teil der Zellen wurde im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert (Zeiss Axiovert 200M, Objektiv: 40x (N.A. 0,75)). Weiße Pfeile markieren einige Makrophagen, die NAD⁺-behandelte T-Zellen bei 37 °C phagozytiert oder bei 4 °C gebunden haben. (B,C) Ein weiterer Teil der Zellen wurde im FACS analysiert. Angegeben sind PKH26/Mac-1^{FITC}-doppelt positiven Zellen in Prozent der Mac-1^{FITC}-positiven Population. (D) Aus Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp-Maus und einer ART2.KO-Maus aufgereinigte T-Zellen wurden mit 1 µM Celltracker Green (CTG) angefärbt, gewaschen und mit 25 µM NAD⁺ für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden T-Zellen in Suspension im Verhältnis von 9:1 (WT) bzw. 20:1 (ART2.KO) mit Peritonealmakrophagen für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C koinkubiert. Die Phagozytose wurde wie in (C) mit 2% PFA gestoppt, die Zellen gewaschen, die Makrophagen mit anti Mac-1^{PE} angefärbt und im FACS analysiert.

5.4.2 ART2- und P2X7-Abhängigkeit der Nukelotid-induzierten Phagozytose

Die beobachtete Phagozytose von NAD⁺-behandelten WT-T-Zellen, aber nicht von ART2-defizienten T-Zellen deutet an, dass die Phagozytose von T-Zellen von der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf diesen Zellen abhängt. Es liegt die Vermutung nahe, dass speziell die NAD⁺/ART2-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors und die anschließende Exposition des „Friss-mich“-Signals Phosphatidylserin auf der T-Zellmembran die Phagozytose der T-Zellen durch die Peritonealmakrophagen bedingt. Um die Beteiligung des P2X7-Rezeptors zu untersuchen, wurden im Folgenden deshalb WT-, ART2- und P2X7-defiziente T-Zellen mit NAD⁺, NAD⁺ in Kombination mit dem P2X7-Inhibitor KN-62, oder ATP behandelt und anschließend mit Makrophagen koinkubiert. Parallel wurde an einem Anteil der jeweiligen T-Zellpopulationen die Exposition von PS untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass P2X7-defiziente T-Zellen, im Gegensatz zu WT Zellen, weder nach Vorbehandlung mit NAD⁺, noch mit ATP nennenswert phagozytiert wurden (Abb. 19 A, graue und schwarze Balken). ART2-defiziente T-Zellen hingegen wurden nur nach ATP-Behandlung phagozytiert (Abb. 19 A, schwarze Balken). Somit lässt sich die beobachtete Phagozytose auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch seinen löslichen Liganden ATP oder die NAD⁺/ART2-induzierte ADP-Ribosylierung zurückführen. Die Ergebnisse mit dem P2X7-Inhibitor KN62 bestätigen dies, da in seiner Gegenwart die NAD⁺-vermittelte Phagozytose der WT-T-Zellen bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen reduziert war (Abb. 19 A, schraffierte Balken). Interessanterweise korrelierte die Phagozytose der T-Zellen positiv mit ihrer PS-Exposition (Abb. 19 B). NAD⁺- oder ATP-behandelte WT-T-Zellen, die PS expositionierten, wurden, ebenso wie ATP-behandelte ART2.KO Zellen, von

Makrophagen phagozytiert, während T-Zellen, die kaum PS expositionierten (z.B. P2X7.KO T-Zellen und NAD⁺-behandelte ART2.KO Zellen) kaum phagozytiert wurden (Abb. 19 B).

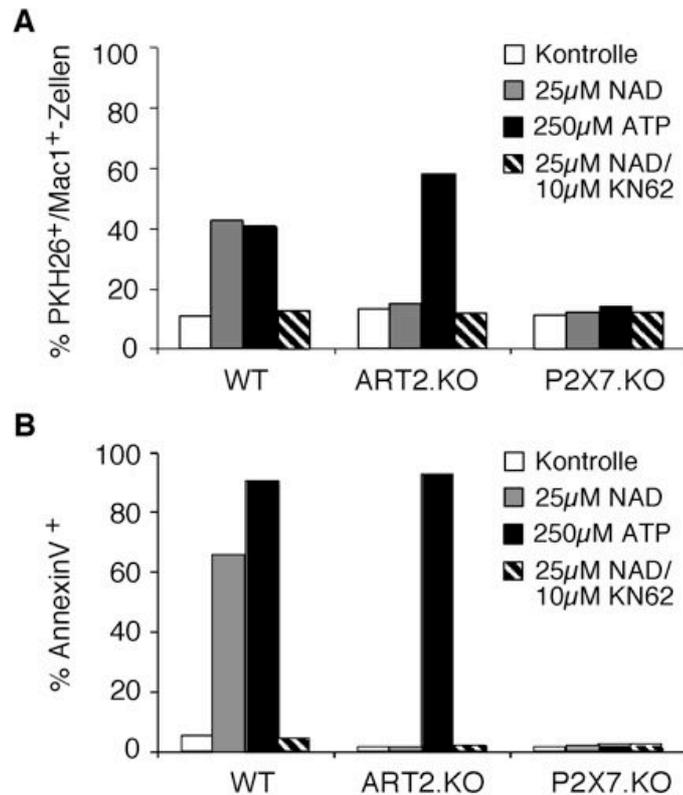


Abb. 19: Phagozytose von NAD⁺- und ATP-behandelten T-Zellen korreliert mit der PS-Exposition nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors. Aus Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp-, ART2.KO- und P2X7.KO-Maus aufgereinigte T-Zellen wurden mit 4 μM PKH26 angefärbt, gewaschen und anschließend ohne exogene Nukleotide (Kontrolle), mit 25 μM NAD⁺ oder 250 μM ATP für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Parallele Inkubationen wurden in der Gegenwart von 25 μM NAD⁺ und dem P2X7-Antagonisten KN-62 (10 μM) durchgeführt. (A) Vorbehandelte T-Zellen wurden für 60 Minuten bei 37 °C in Suspension mit Peritonealmakrophagen im Verhältnis von 4:1 (WT sowie P2X7.KO) bzw. 8:1 (ART2.KO) koinkubiert und wie in Abbildung 12 im FACS analysiert. Angegeben sind die PKH26/Mac-1^{FITC}-doppelt positiven Zellen in Prozent der Mac-1^{FITC}-positiven Zellen. (B) Ein Teil der behandelten T-Zellen wurde parallel mit AnnexinV^{FITC} angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben sind die AnnexinV⁺-Zellen in Prozent der T-Zellen.

5.4.3 Dosis-Wirkungs-Analysen der Nukleotid-induzierten Phagozytose

Der folgende Abschnitt zeigt die Ergebnisse von vergleichenden Dosis-Wirkungs-Untersuchungen der NAD⁺- bzw. ATP-induzierten Phagozytose von T-Zellen durch Makrophagen und der PS-Exposition der T-Zellen. Die Ergebnisse zeigen wieder eine positive Korrelation zwischen der Phagozytose von T-Zellen durch Makrophagen (Abb. 19 A) und der NAD⁺- oder ATP-induzierten Exposition von PS auf T-Zellen (Abb. 19 B). In beiden Fällen reicht eine Vorbehandlung der WT-T-Zellen mit 3 μM NAD⁺ aus, um die T-Zellen

effektiv für die Phagozytose zu markieren und die PS-Exposition zu induzieren. Es waren wesentlich höhere ATP-Konzentrationen (125 μM) notwendig, um T-Zellen vergleichbar für die Phagozytose zu kennzeichnen, bzw. die Exposition von PS zu induzieren. ART2-defiziente T-Zellen wurden wie zuvor nur nach ATP-Behandlung phagozytiert (Abb. 20 A, schraffierte Balken).

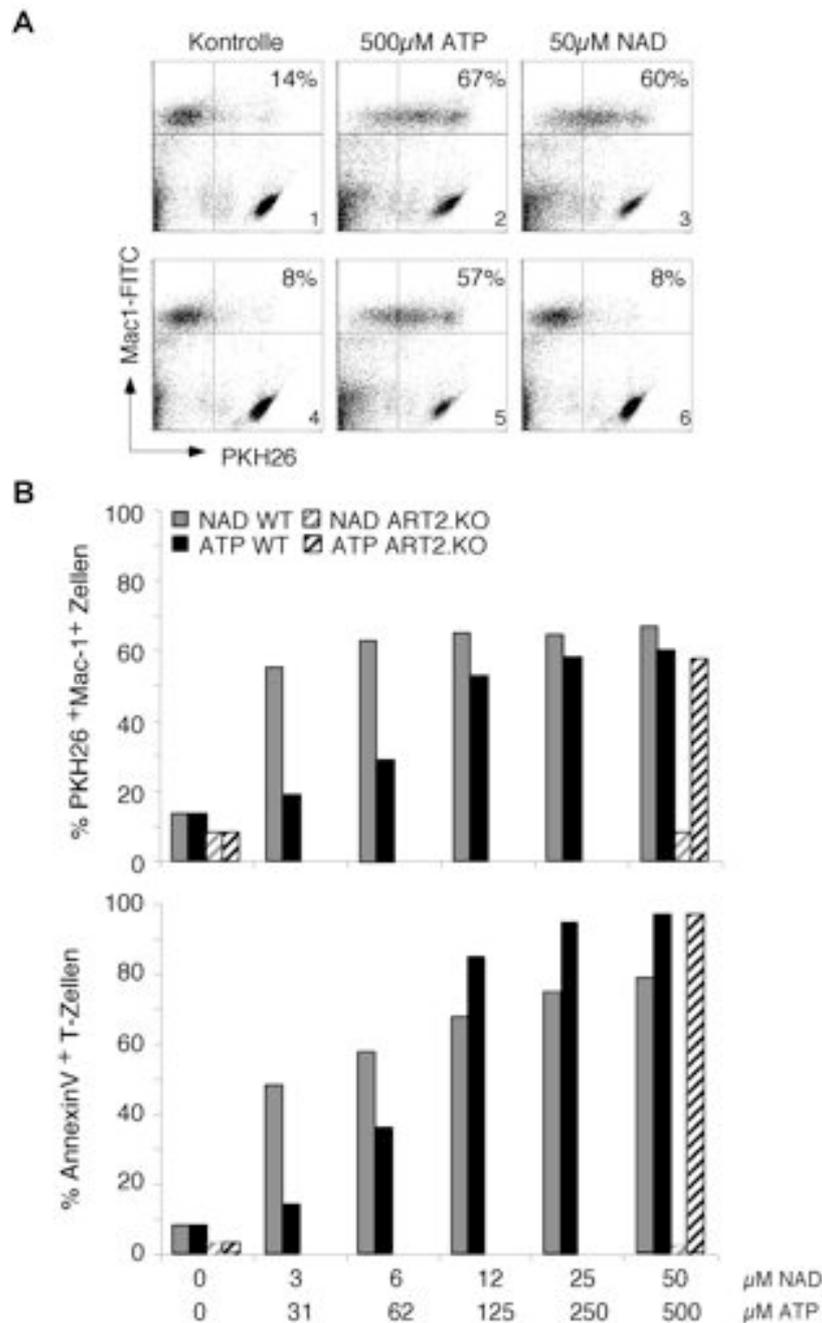


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Kurve. T-Zellen wurden wie in Abbildung 13 mit PKH26 angefärbt und mit den angegebenen NAD^+ - oder ATP-Konzentrationen für 30 Minuten bei 37 °C vorbehandelt. Anschließend wurden die T-Zellen jeweils für 60 Minuten im Verhältnis von 2,5:1 mit Peritonealmakrophagen bei 37 °C koinkubiert und die Phagozytose sowie PS-Exposition wie in Abbildung 13 im FACS analysiert. (A, B) Angegeben sind die PKH26/Mac-

I^{FITC}-doppelt positiven Zellen in Prozent der Mac-I^{FITC}-positiven Zellen bzw. (B) die AnnexinV⁺-Zellen in Prozent der T-Zellen.

5.4.4 Phagozytose von Nukleotid- vs. Staurosporin-behandelten T-Zellen

Klassische Wege der Apoptoseinduktion wie die Aktivierung von FAS-, TNFR- und anderen Todesrezeptoren, UV-Bestrahlung oder die Behandlung mit Zellgiften führen erst innerhalb von Stunden zur Exposition von PS und zur Phagozytose durch Makrophagen (Henson *et al.* 2001). Verglichen damit, erscheint die Aktivierung des P2X7-Rezeptors beides sehr rasch zu induzieren.

Im folgenden Versuch sollte die Nukleotid-induzierte PS-Exposition/Phagozytose mit der durch Staurosporin-induzierten PS-Exposition/Phagozytose verglichen werden. Staurosporin ist ein unspezifischer Proteinkinase-Inhibitor und wird häufig als Beispiel für eine Zellgift-induzierte Apoptose benutzt (Chae *et al.* 2000). Hierfür wurden T-Zellen unterschiedlich lang mit Staurosporin, NAD⁺ oder ATP vorbehandelt und dann Makrophagen zur Phagozytose angeboten.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine 10-minütige Behandlung der T-Zellen mit NAD⁺ oder ATP ausreichte, um eine effiziente Phagozytose durch Makrophagen zu induzieren (Abb. 21, graue und schwarze Balken). Eine deutliche Phagozytose von Staurosporin-behandelten T-Zellen konnte erst nach einer sechsständigen Vorbehandlung der T-Zellen mit Staurosporin erreicht werden (Abb. 21, schraffierte Balken). Kürzere Staurosporinbehandlungen führten nicht zu einer Phagozytose, die über die der unbehandelten T-Zellen hinausging (Abb. 21, schraffierte vs. hellgraue Balken). Eine sechsständige Vorinkubation bei 37 °C führte auch bei unbehandelten WT- und ART2-defizienten Kontrollzellen zu einer leichten aber deutlichen Zunahme der Phagozytose dieser T-Zellen durch die Makrophagen (Abb. 21 A).

Die in Abb. 21 B gezeigten Ergebnisse bestätigen die Korrelation zwischen Phagozytose und PS-Exposition. Während Nukleotid-behandelte T-Zellen nach einer Kurzzeitbehandlung von 10 bis 30 Minuten PS expositionierten und durch Makrophagen phagozytiert wurden, zeigten Staurosporin-behandelte T-Zellen erst nach 6 Stunden PS auf ihrer Oberfläche, also zu dem gleichen Zeitpunkt, zu dem die Makrophagen diese T-Zellen erkennbar phagozytierten (Abb. 21 B).

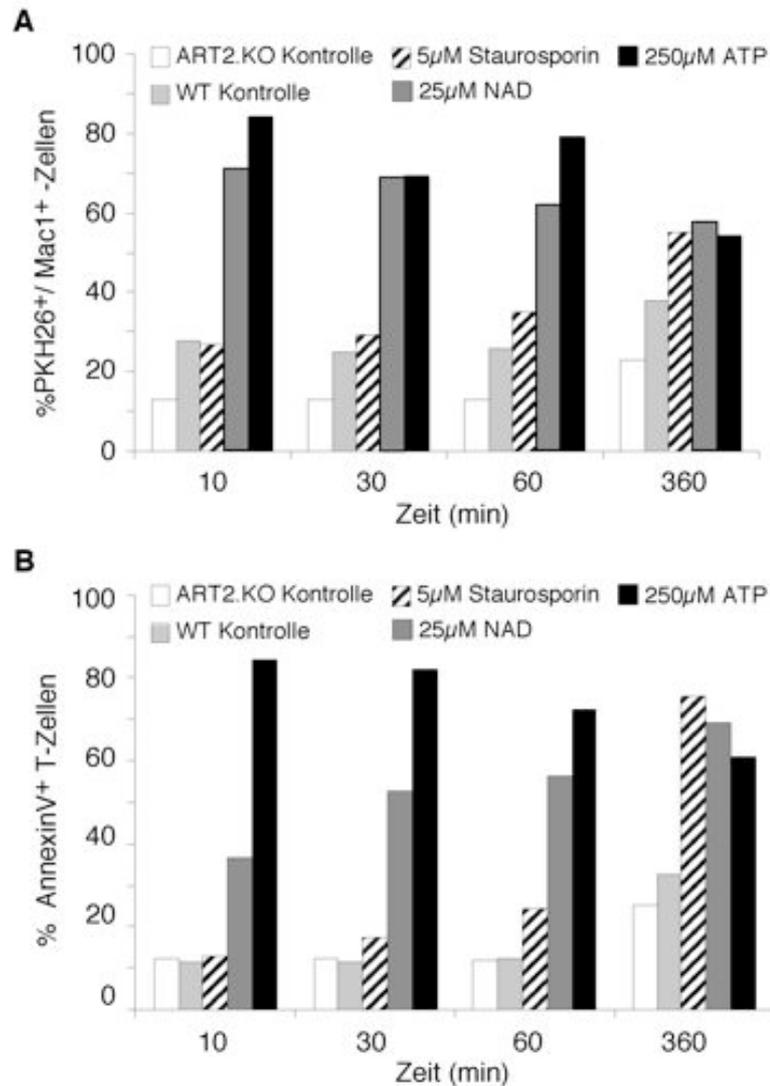


Abb. 21: Vergleich der NAD⁺-, ATP- und Staurosporin-vermittelten Phagozytose von T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen wurden wie in Abbildung 13 mit PKH26 angefärbt, gewaschen und anschließend ohne (Kontrolle) oder mit 25 µM NAD⁺, 250 µM ATP oder 5 µM Staurosporin für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. (A) Anschließend wurden die T-Zellen im Verhältnis von 2:1 (Mariathasan et al.) und 3:1 (ART2.KO) mit Peritonealmakrophagen für 60 Minuten bei 37 °C koinkubiert, bevor die Phagozytose wie in Abbildung 13 im FACS analysiert wurde. Angegeben sind die PKH26/Mac-1^{FITC}-doppelt positiven Zellen in Prozent der Mac-1^{FITC}-positiven Zellen. (B) Ein Teil der behandelten T-Zellen wurde mit AnnexinV^{FITC} angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben sind die AnnexinV⁺-Zellen in Prozent der T-Zellen.

5.4.5 Selektive Phagozytose NAD⁺-behandelter T-Zellen

Die bisherigen Phagozytose-Assays wurden in Suspension mit frisch isolierten Peritonealmakrophagen durchgeführt. Um die Morphologie der Makrophagen und der phagozytierten T-Zellen besser beurteilen zu können, wurden die folgenden Phagozytose-Assays mit adhärennten Makrophagen nach dreitägiger Kultur auf Zellkammer-Objektträgern

(chamber-slides) durchgeführt. Im folgenden Versuch wurden WT- und ART2.KO-T-Zellen unterschiedlich angefärbt, im gleichen Verhältnis miteinander gemischt und mit NAD^+ behandelt, bevor das Gemisch den adhärennten Makrophagen angeboten wurde (Abb. 22). Ein Teil der Zellen wurde wie zuvor mit AnnexinV angefärbt und im FACS analysiert (Abb. 22 A). Die NAD^+ -sensitiven WT-T-Zellen expositionierten PS unabhängig von ihrer Anfärbung, während ART2.KO T-Zellen inert gegenüber NAD^+ waren (Panel 1, 2). Die Behandlung der WT- oder ART2.KO-T-Zellen mit ATP führte, ebenfalls unabhängig von der Anfärbung, zur Exposition von PS (Panel 3, 4). Die Ergebnisse des Phagozytose-Assay zeigen, dass Makrophagen aus dem Gemisch NAD^+ -behandelter WT und ART2KO T-Zellen selektiv die WT-Zellen phagozytierten (Abb. 22 B; Panel a, b). Nach der ART2-unabhängigen P2X7-Aktivierung durch ATP hingegen, wurden gleichermaßen WT- als auch ART2-defiziente T-Zellen phagozytiert (Panel c).

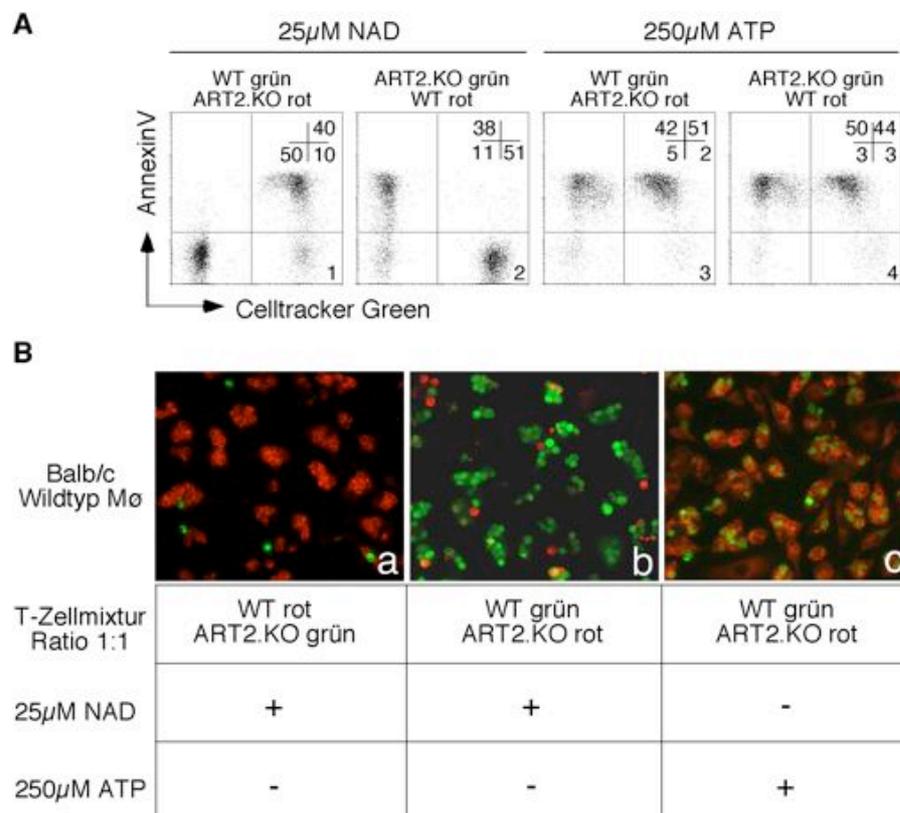


Abb. 22: Selektive Phagozytose von NAD^+ -behandelten Wildtyp-T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp- und einer ART2.KO-Maus wurden alternierend PKH26 (rot) oder CTG (grün) angefärbt, gewaschen und in gleichem Verhältnis miteinander gemischt. Die gemischten Wildtyp- und ART2.KO-T-Zellen wurden anschließend mit 25 μM NAD^+ oder 250 μM ATP für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. (A) Ein Teil der Zellen wurden mit AnnexinV^{APC} angefärbt und im FACS untersucht. (B) Die restlichen Zellen wurden für 60 Minuten bei 37 °C im Verhältnis 10:1 mit kultivierten, adhärennten Peritonealmakrophagen koinkubiert. Die chamber-slides wurden gewaschen, mit mounting-medium eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Zeiss Axiovert 200M, Objektiv: 63x (N.A. 1,25), Öl).

5.4.6 Schicksal der phagozytierten T-Zellen

Im folgenden Versuch wurde das Schicksal der durch adhärenzte Makrophagen phagozytierten T-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie weiterverfolgt (Abb. 23). Hierzu wurden T-Zellen vor der NAD^+ -Behandlung wie bisher mit dem Membranfarbstoff PKH26, sowie zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342, angefärbt. Die Ergebnisse bestätigen die nahezu vollständige Internalisierung der T-Zellen nach 40-minütiger Koinkubation mit Makrophagen. Zu diesem Zeitpunkt sind Membran- und DNA-Farbstoffe noch weitgehend kolokalisiert. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach dreistündiger Inkubation. Nach 12 Stunden hingegen sind die beiden Farbstoffe nicht mehr kolokalisiert. Während der DNA-Farbstoff nunmehr im Zellkern der Makrophagen zu finden ist, zeigt der Membranfarbstoff PKH26 eine vesikuläre, zytoplasmatische Lokalisation.

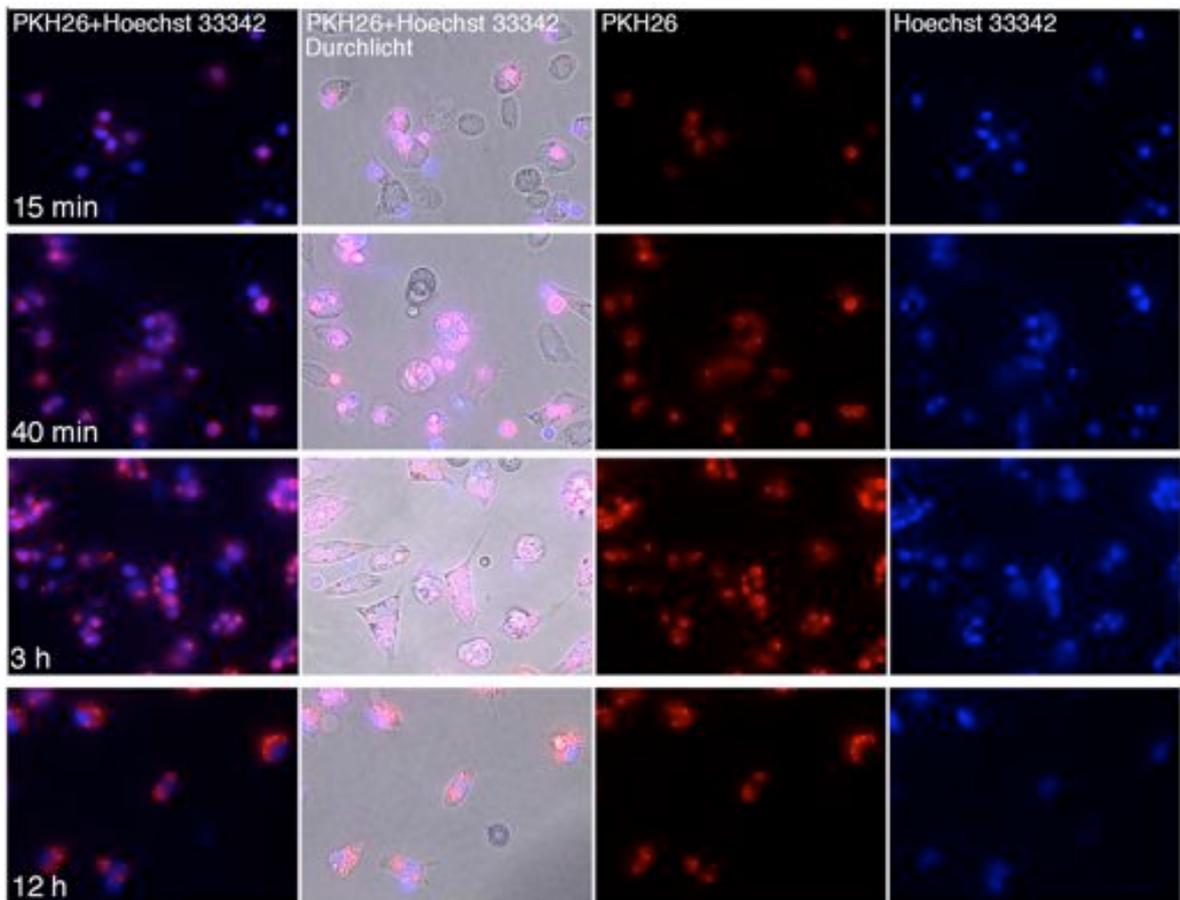


Abb. 23 Schicksal der phagozytierten T-Zellen. Aufgereinigte T-Zellen aus dem Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp-Maus wurden mit dem Membranfarbstoff PKH26 und dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt, gewaschen und für 30 Minuten bei 37 °C mit 25 μM NAD^+ inkubiert. Die vorbehandelten T-Zellen wurden anschließend 1:10 mit kultivierten, adhärenzten Peritonealmakrophagen für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C koinkubiert. Die chamber-slides wurden gewaschen, mit mounting-medium eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Zeiss Axiovert 200M, Objektiv: 63x (N.A. 1,25), Öl).

6. Diskussion

6.1 Funktionsanalysen der Rezeptormutanten im HEK-Zellmodell

Die untersuchten Substitutionsmutanten des P2X7-Rezeptors wurden ursprünglich hergestellt und analysiert, um die ADP-Ribosylierungsstelle(n) der ADP-Ribosyltransferase ART2.2 zu identifizieren, und damit einen alternativen Aktivierungsweg des P2X7-Rezeptors genauer zu verstehen. Interessanterweise zeigten einige Rezeptormutanten erhöhte Sensitivitäten sowohl gegenüber ATP als auch gegenüber NAD^+ .

Transiente Calciumsignale in untransfizierten HEK-Zellen

Alle Mitglieder der P2Y- und P2X-Familie könnten beteiligt sein, wenn es sich um die Zuordnung der beobachteten, transienten Calciumsignale auf ATP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich handelt (Abb. 7, Panel 1). Die meisten Untersuchungen verneinen die Existenz von P2X-Rezeptoren auf proliferierenden HEK293-Zellen (Buell *et al.* 1996; Evans *et al.* 1996; Stoop *et al.* 1997). Interessanterweise wurde eine Abhängigkeit zwischen der Expression von P2X-Rezeptoren und der Zelldichte der HEK-Zellkultur beschrieben. Dabei begannen die Zellen ab konfluenter Zelldichte, P2X1, P2X3- und P2X6-Rezeptoren zu exprimieren und waren zunehmend apoptotisch (Worthington *et al.* 1999). Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit vereinzelt HEK-Zellen durchgeführt, so dass eine Dichte-abhängige Expression von P2X-Rezeptoren unwahrscheinlich war. Zudem konnte keine endogene Expression des P2X7-Rezeptors auf untransfizierten HEK-Zellen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. HEK-Zellen exprimieren aber endogen mehrere Mitglieder der P2Y-Familie. Es konnten die Purinrezeptoren P2Y1, 2 und 4 nachgewiesen werden, die mit transienten Signalen (< 60 s) auf eine ATP-Konzentration von $30 \mu\text{M}$ reagierten. Diese Signale wurden auch im Calcium-freien Medium beobachtet, konnten aber mit der Depletion der intrazellulären Calciumspeicher verhindert werden, was diese Calciumsignale eindeutig mit den Mitgliedern der G-Protein-gekoppelten P2Y-Familie assoziiert (Fischer *et al.* 2005). Dies stimmt sehr gut mit den hier gemachten Beobachtungen überein und könnte die transienten, P2X7-unabhängigen Calciumsignale erklären.

Die Perfusion von untransfizierten HEK-Zellen mit NAD^+ löste typischerweise bei $250 \mu\text{M}$ NAD^+ eine transiente Calciumantwort aus (Abb. 8, Panel 1). Diese könnten möglicherweise ebenfalls auf die Aktivierung eines P2Y-Rezeptors zurückzuführen sein. Die endogene Expression von P2Y1, 2 und 4-Rezeptoren auf der HEK-Zelloberfläche wurde, wie oben erwähnt, nachgewiesen (Fischer *et al.* 2005). Auf m-RNA-Ebene konnten ferner P2Y6, 11 und 13 detektiert werden (Wirkner *et al.* 2004). Moreschi *et al.* beschrieben den Purinrezeptor P2Y11 als sensitiv für extrazelluläres $\beta\text{-NAD}^+$. Dabei zeigten humane Granulozyten, die mit

Obwohl „gain-of-function“- Mutanten eher selten vorkommen (Roberts and Evans 2007), konnten in der vorliegenden Arbeit mit den Mutanten R206K, R276K und R277K gleich drei Rezeptormutanten im murinen P2X7-Rezeptor aufgedeckt werden, die wesentlich sensitiver gegenüber ATP als der Wildtyp-Rezeptor waren (Abb. 7, Panel 7, 9, 10 vs. 2). Die Frage ist, wodurch die 10-fach höhere Sensitivität gegenüber ATP zustande kommt. Einerseits könnten die „gain-of-function“- Mutanten eine höhere Affinität für ihren Liganden ATP aufweisen. Das würde erklären, warum wesentlich niedrigere ATP-Konzentrationen ausreichend sind, um die Rezeptormutanten zu aktivieren. Andererseits könnten die Mutationen das Rezeptorgating erleichtern, wodurch die Auswirkungen der Bindung des ATPs effektiver wären. Tatsächlich haben Patch-Clamp-Untersuchungen gezeigt, dass die R276A-Mutation die Kanalöffnung beschleunigte, und die offene Konformation nach dem Entfernen des Liganden stabilisierte (Adriouch *et al.* 2005). Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt: Während das Wegwaschen des ATPs beim WT-Rezeptor einen starken Rückgang des Calciumsignals zeigte, das als charakteristisches Schließen des P2X-Ionenkanals gedeutet werden kann, waren die Calciumsignale der „gain-of-function“- Mutanten nicht oder nur partiell reversibel, da der Kanal anscheinend noch geöffnet blieb (Abb. 7, Panel 7, 9, 10 vs. 2). Möglicherweise bedingt eine Kombination aus erhöhter Affinität gegenüber ATP und ein verbessertes Rezeptorgating die erhöhte Sensitivität der „gain-of-function“- Mutanten R206K, R276K und R277K. In einer äquivalenten Position zum R206 befindet sich im humanen P2X1-Rezeptor das Arginin 202. Die Mutation des R202 zu Alanin hatte keine Auswirkungen auf die Sensitivität des Rezeptors gegenüber ATP (Ennion *et al.* 2000). Das Arginindublett R276 und R277 des murinen P2X7-Rezeptors ist in anderen P2X-Rezeptoren ebenfalls konserviert: im humanen P2X7 (R276/R277), im Ratten-P2X2 (R274/R275) und im Ratten-P2X4 (R277/R278). Während die Substitution von R278 zu Lysin im Ratten-P2X4 zu einer leichten Zunahme der ATP-Sensitivität führte, kam es bei einer Substitution des Arginins zu Alanin zu einem dramatischen Verlust der Sensitivität (s.a. Tab. 1) (Yan *et al.* 2005).

Neben den „gain-of-function“- Mutanten fielen zwei „loss-of-function“- Mutanten auf. Die Rezeptormutante R307K wird, im Gegensatz zur R294K-Mutante, nicht auf der Zelloberfläche exprimiert (Adriouch *et al.* 2008). Es ist daher nicht verwunderlich, dass bei R307K transfizierten Zellen keine P2X7-spezifischen Calciumsignale messbar waren (Abb. 7, Panel 12 vs. 2). R307 ist somit anscheinend wichtig für die Faltung, Stabilität und das Trafficking des Rezeptors an die Zelloberfläche (Adriouch *et al.* 2008). Beim Menschen existiert eine allele Variante dieses Arginins (R307Q), die nicht auf exogenes ATP reagierte, obwohl sie auf der Zelloberfläche exprimiert wurde (Gu *et al.* 2004). Die R294K-Mutante zeigte eine starke Expression auf der Zelloberfläche und war dennoch komplett inert, selbst gegenüber sehr hohen ATP-Konzentrationen (Abb. 7, Panel 11 vs. 2). R294 ist ein Bestandteil des konservierten NFR-(Asparagin-Phenylalanin-Arginin)-Motivs, das in allen P2X-Rezeptoren wiedergefunden werden kann und möglicherweise an der Ligandenbindung z.B. durch Koordination der Adenosin- und Ribosegruppen beteiligt ist (Vial *et al.* 2004). Eine Veränderung dieses Motivs wird dementsprechend auch in der Literatur als fatal für die Rezeptorfunktion beschrieben. Sowohl für den humanen P2X1 (R292), den Ratten-P2X2

(R290) und den Maus-P2X7 hat sich gezeigt, dass selbst eine konervative Mutation dieses Arginins zu Lysin zu einem unsensitiven Rezeptor führte (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Roberts and Evans 2004; Adriouch *et al.* 2005). Detaillierte Analysen des humanen P2X1-Rezeptors bestätigten, dass die Aminosäurereste N290, F291, R292 und K309 für die Bindung von ATP wichtig sind. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung von radioaktiv-markiertem 2-Azido-ATP um 80% zurückging, wenn das Arginin 292 durch Cystein substituiert wurde (Roberts and Evans 2007). Es ist wahrscheinlich, dass diese prä-TM2-Region der P2X-Rezeptoren ein konserviertes ATP-Bindungsmotiv beinhaltet. Damit liegen die beiden Arginine 294 und 307 genau in einer Region, die auch im murinen P2X7-Rezeptor für die ATP-Bindung bedeutend sein könnte. Möglicherweise sind die positiven Ladungen in dieser Region wichtig für die Stabilisierung der negativ-geladenen Phosphatreste des ATPs. Allerdings spielt dabei anscheinend auch die Länge der Argininseitenkette eine wichtige Rolle, da die positive Ladung des Lysins in der R294K-Mutante das Arginin nicht ersetzen konnte.

Tab. 1: Zusammenfassung relevanter Phänotypen der Rezeptormutanten und korrespondierender Aminosäurereste in P2X-Rezeptoren anderer Spezies

mP2X7	hP2X7	hP2X1	rP2X2	rP2X4
R125K	R125	G123	H120A	A122
<u>R206K</u>	R206	R202A	K200	K203
<u>R276K</u>	<i>R276H</i>	H277	R274	R277
<u>R277K</u>	R277	G278	R275	R278K
R294K	R294	R292A	R290A	R295
R307K	R307Q	R305A	R304A	R309

Fett gedruckt und unterstrichen: „gain-of-function“- Mutanten; Fett gedruckt: „loss-of-function“- Mutanten, kursiv: nicht bekannte Auswirkung (Ennion et al. 2000; Jiang et al. 2000; Clyne et al. 2002; Worthington et al. 2002; Gu et al. 2004; Nakazawa et al. 2004; Cabrini et al. 2005; Yan et al. 2005).

Vergleich der P2X7-Aktivierung durch ATP und ADP-Ribosylierung

Vergleicht man die ATP-induzierten Calciumantworten mit denen, die durch ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors ausgelöst wurden, dann gibt es mehrere Beobachtungen, die bemerkenswert sind: die fehlende Reaktion des WT-P2X7-Rezeptors auf NAD⁺, die Reaktion der „gain-of-function“- Mutanten auf NAD⁺, die Reaktion dieser Mutanten auf 40-fach niedrigere Konzentrationen NAD⁺ als ATP und die „spontane“ PS-Exposition durch R276K-ART2 kotransfizierte HEK-Zellen auch ohne exogene Zugabe von NAD⁺ oder ATP.

Zunächst fällt auf, dass HEK-Zellen, die mit ART2.2 und WT- P2X7 oder den Mutanten, die sich im ATP-Versuch WT-ähnlich verhalten hatten, kotransfiziert wurden, nicht auf eine NAD⁺-Behandlung reagierten (Abb. 8, Panel 2-6, 8, 13). Diese Zellen reagierten auch nicht

auf eine weit über der für eine sättigende ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen benötigten NAD^+ -Konzentration ($\geq 10 \mu\text{M eNAD}^+$) (Bannas *et al.* 2005), obwohl die Autoradiographieuntersuchungen eindeutig die ADP-Ribosylierung des WT-Rezeptors durch die ART2.2 im HEK-Zellmodell belegten (Abb. 10, C). Diese Reaktionen ähneln Beobachtungen an Makrophagen, auf denen der P2X7-Rezeptor zwar (durch ART2.1) ADP-ribosyliert, aber - im Gegensatz zu T-Zellen - dadurch nicht aktiviert werden kann (Hong *et al.* 2009). Ähnlich wie auf HEK-Zellen, benötigt der P2X7-Rezeptor auf Makrophagen deutlich höhere ATP-Konzentrationen für die Aktivierung als der Rezeptor auf T-Zellen (Seman *et al.* 2003).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität von P2X7 auf verschiedenen Zelltypen ist alternatives Spleißen der prä-mRNA, das verschiedene WT-Rezeptorvarianten mit unterschiedlichen Sensitivitäten bedingt. Nicke und Kollegen haben jüngst zwei alternative Spleißvarianten des P2X7 bei Ratten und Mäusen demonstriert, die in HEK-Zellen unterschiedlich stark auf den starken P2X7-Agonisten BzATP reagierten (Nicke *et al.* 2009). Im Gegensatz zu der bei dieser Arbeit verwendeten P2X7.KO-Maus, in der keine der beiden Varianten exprimiert werden kann, kam es bei der zweiten bisher etablierten P2X7.KO-Mauslinie offensichtlich aus Versehen nur zur Deletion der von Makrophagen exprimierten, weniger sensitiven Splice-Variante (Nicke *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2009). Dadurch ist der P2X7-Rezeptor in dieser P2X7.KO-Mauslinie zwar auf Makrophagen und dendritischen Zellen funktionslos, nicht aber auf T-Zellen (Taylor *et al.* 2009). Offensichtlich entspricht der in dieser Arbeit eingesetzte WT-Rezeptor der Spleißvariante von Makrophagen, während die sensitive Spleißvariante ein Äquivalent des P2X7-Rezeptors auf T-Zellen darstellt. Frau Dr. Anette Nicke hat uns kürzlich die neue Spleißvariante des P2X7-WT-Rezeptors zur Verfügung gestellt, die sich tatsächlich nach Kotransfektion mit ART2.2 in HEK-Zellen als sensitiv für NAD^+ herausstellte (Welbeck Danquah, persönliches Gespräch). Die beiden Rezeptorvarianten unterscheiden sich nur in Exon 1, das für den N-terminalen zytosolischen Schwanz und einen Teil der TM-1 kodiert. Die hier beschriebenen „gain-of-function“-Mutanten ähneln in ihren ATP und NAD^+ Sensitivitäten der T-Zell spezifischen Splicevariante. So sind die „gain-of-funcion“- Mutanten R206K, R276K und R277K, im Gegensatz zum untersuchten WT-Rezeptor, sensitiv für NAD^+ und benötigen für die Aktivierung viel niedrigere ATP-Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$) (Abb. 8, Panel 7, 9, 10).

Die zweite bemerkenswerte Beobachtung betrifft die Reaktion der sensitiven Rezeptormutante in HEK-Zellen auf 40x niedrigere NAD^+ - ($\text{EC}_{50} 2 \mu\text{M}$) als ATP- ($\text{EC}_{50} 100 \mu\text{M}$) Konzentrationen. Ein ähnlicher Unterschied in der Sensitivität gegenüber den extrazellulären Nukleotiden NAD^+ und ATP wurde bereits für primäre T-Zellen beschrieben (Seman *et al.* 2003). Hier lagen die EC_{50} -Werte für NAD^+ bei $3 \mu\text{M}$ und für ATP bei $125 \mu\text{M}$ (Seman *et al.* 2003). Die 40-fach höhere Sensitivität des Rezeptors gegenüber NAD^+ hat möglicherweise mit der Art der Aktivierung zu tun: Eine kovalente Modifikation bedingt eine hohe Stabilität und Bindung des Agonisten im Vergleich zur Anlagerung des löslichen Liganden ATP. Dies scheint sich auch beim Auswaschen der beiden Agonisten zu zeigen.

Während die Calciumsignale des WT-Rezeptors nach ATP-Stimulation leicht rückgängig gemacht werden konnten, blieben die NAD⁺-vermittelten Signale bestehen, da die kovalent gebundene ADP-Ribose nicht gewaschen werden konnte (Abb. 7, 8, Panel 2 vs. 7, 9, 10). Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen an primären T-Lymphozyten gestützt: Eine Kurzzeitbehandlung der Zellen mit ATP war reversibel, während eine Aktivierung des Rezeptors mit exogenem NAD⁺ nicht rückgängig zu machen war (Seman *et al.* 2003).

Die Ergebnisse zur P2X7-induzierten Aufnahme von Yo-Pro-1 (Abb. 11) deuten ferner an, dass NAD⁺ bei niedrigeren Konzentrationen (über die ADP-Ribosylierung) die sensitive P2X7-Rezeptormutante R276K zwar aktivieren kann, ATP jedoch stärkere Folge-Reaktionen auszulösen vermag. Während die Mehrheit der HEK-Zellen, die ART2.2 oder ART2.1 mit R276K koexprimierten, nach ATP-Behandlung doppelt-positiv für AnnexinV und Yo-Pro-1 waren, so zeigten sich dieselben Transfektanten nach NAD⁺-Behandlung zwar AnnexinV-positiv aber nicht oder nur schwach Yo-Pro-1 positiv (Abb. 11 A und B, Panel 10 vs. 7). Für die ATP-vermittelte Aktivierung des P2X7 wurde gezeigt, dass bei andauernder Stimulation mittels Pannexin1-Rekrutierung eine Art Hemichannel aktiviert wurde, der für die großen DNA-Farbstoffe wie Yo-Pro-1 oder Ethidium Bromid durchgängig war (Pelegri and Surprenant 2006). Dieser Beweis steht für die NAD⁺-vermittelte Aktivierung noch aus. Es wäre möglich, dass der ADP-ribosylierte Rezeptor das Pannexin weniger effektiv rekrutiert. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich auch bei der Aktivierung von primären WT vs. ART2KO T-Zellen nach Behandlung mit exogenem ATP (Abb. 12 A, Panel 4, 9).

Schließlich fällt auf, dass HEK-Zellen, die mit der sensitiven P2X7/R276K-Variante und ART2.2 kotransfiziert waren, „spontan“ PS exponierten, während mit ART2.1 kotransfizierten Zellen keine „spontanen“ Reaktionen zeigten. Anscheinend kann mechanischer Stress, der bei der Ernte auf die transfizierten HEK-Zellen einwirkt, genügend NAD⁺ freisetzen, um die NAD⁺-sensitive Rezeptormutante R276K via ART2.2 zu aktivieren. ART2.1-kotransfizierte HEK-Zellen hingegen konnten eine ausreichende Vor-ADP-Ribosylierung nicht vermitteln, da bei der Ernte der Zellen offensichtlich nicht genügend endogene Reduktionsmittel freigesetzt wurden, um die thiolabhängige ART2.1 zu aktivieren (Abb. 11 A und B, Panel 1, 4). Auch bei der Präparation von primären Lymphozyten wird vermutlich aufgrund von mechanischem Stress genügend NAD⁺ für die Vor-ADP-Ribosylierung und Teil-Aktivierung des P2X7 auf T-Zellen freigesetzt (Abb. 12 A-D, Panel 1, 6, Diskussion hierzu s. 6.2).

Bedeutung des Arginins 125 im P2X7-Rezeptor

Die Analyse von radioaktiv-markierten P2X7-Mutanten aus ART2.2-kotransfizierten HEK-Zellen, die radioaktives [³²P]-NAD als ART2-Substrat erhalten hatten, ermöglichte es, die Arginine 125 und 133 als Zielaminosäuren der ART2.2 im P2X7-Wildtyprezeptor zu identifizieren (Adriouch *et al.* 2008). Dieselbe Methode offenbarte, dass die thiolabhängige

ART2.1 ebenfalls einen oder beide Argininreste 125 und 133 ADP-ribosyliert (Abb. 10 B) (Hong *et al.* 2009).

Der Einsatz der NAD⁺-sensitiven Mutante R276 in Kombination mit der Substitution von R125 oder R133 ermöglichte zudem die eindeutige Identifizierung des Arginins 125 als die für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors notwendige Zielaminosäure (Abb. 9 A, Pnael 4 vs. 2) (Adriouch *et al.* 2008). Die Sensitivität der Rezeptormutanten R125K und R133K gegenüber ATP wurde nicht beeinflusst, unabhängig davon, ob sie allein oder in Kombination mutiert wurden (Abb. 9 C). Dies spricht dafür, dass die Arginine 125 und 133 nicht direkt in die Bindung des Liganden ATP involviert sind.

Die Ergebnisse betonen die funktionale Wichtigkeit der Cystein-reichen Region, die durch die Bildung von drei Disulfidbrücken wahrscheinlich, wie beim humanen P2X1-Rezeptor, prominent und Finger-ähnlich stabilisiert ist (Vial *et al.* 2004; Vial *et al.* 2006). Die Argininreste 125 und 133 befinden sich dabei offensichtlich in einer gut zugänglichen Position für die ADP-Ribosylierung durch ART2.2 bzw. ART2.1 (Abb. 24). Für eine vorgestreckte, prominente Struktur dieser Region spricht auch, dass die Paratope des polyklonalen anti-P2X7-Kaninchenserums und des monoklonalen Antikörpers Hano43 das Arginin R151 beinhalten, welches ebenfalls in dieser Region an der Spitze des Fingers zu finden ist (Adriouch *et al.* 2008). Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauern die funktionelle Bedeutung dieser Cystein-reichen Region für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors. Young *et al.* verglichen die Sensitivitäten des Maus-P2X7-Rezeptors mit denen des Ratten-P2X7-Rezeptors, wobei sich herausstellte, dass der Rattenrezeptor 10-mal sensitiver gegenüber ATP und 80-mal sensitiver gegenüber BzATP ist als der Mausrezeptor. Die Substitution der Aminosäure Alanin 127 durch Lysin im Mausrezeptor konnte den Sensitivitätsunterschied gegenüber BzATP auf das 20-fache verringern (Young *et al.* 2007). Im humanen P2X7-Rezeptor bewirkte die Mutation des Histidins 155 zu Tyrosin ebenfalls einen Anstieg der Sensitivität gegenüber ATP (Cabrini *et al.* 2005) und die Substitution des Histidins 130 zu Alanin im Ratten-P2X7 bedingte, dass die Rezeptormutanten weniger stark auf den negativ-allosterischen Effekte des Kupfers ansprachen (Acuna-Castillo *et al.* 2007).

Aktivierungsmodell

Die Ergebnisse von „crosslinking“-Experimenten am P2X1-Rezeptor der Ratte stützen die Theorie, dass die ATP-Bindungsstelle an der Berührungsstelle zweier Rezeptoruntereinheiten liegt: Gleichzeitige Cystein-Substitution der Aminosäuren Phenylalanin 291 und Lysin 68 (Phenylalanine 293 und Lysin 64 im murinen P2X7) führte zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Rezeptoruntereinheiten. Dies konnte durch die Zugabe von ATP unterbunden werden, was für die Orientierung des ATPs in dieser Rezeptorregion und zwischen zwei Untereinheiten spricht (Marquez-Klaka *et al.* 2007). Das Phenylalanin 293 bildet zusammen mit Arginin 294, das selbst bei konservativer Substitution nach Lysin die ATP-Sensitivität des Rezeptors aufhebt, Teil des beschriebenen funktionell wichtigen NFR

Motifs. Dieses Modell der Ligandenbindung zwischen zwei Rezeptoruntereinheiten deckt sich mit denen, die für Glutamat- und Nikotinrezeptoren vorgeschlagen werden (North 2002; Vial *et al.* 2004).

Auch die hier vorgestellten Untersuchungen unterstützten dieses Modell. Dabei schlagen wir vor, dass auch die ADP-Ribosegruppe, die kovalent an das Arginin 125 gebunden ist, einen Liganden darstellt, der in die Nukleotidbindungstasche zwischen benachbarten Untereinheit hineinragt und damit den Rezeptor aktiviert (Abb. 25) (Adriouch *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2009). Dafür sprechen mehrere Beobachtungen: Erstens ist R125 offensichtlich ebenfalls an der Berührungsstelle zwischen zwei Untereinheiten lokalisiert. Dies wird durch Mutationsexperimente am Ratten P2X2-Rezeptor gestützt: für Histidin 120 dieses Rezeptors, (das R125 im P2X7 entspricht) konnte gezeigt werden, dass die Substitution zu Cystein zur Ausbildung von Disulfidbrücken zur benachbarten Untereinheit führte, wenn dort das H213 ebenfalls zu Cystein mutiert wurde. Immunoblotanalysen der H120C/H213C-Proteine deckten unter nativen Bedingungen die Disulfidbrückenbindungen auf (Nagaya *et al.* 2005). Dies belegt die Nähe der Aminosäuren um die Position 120 (125 im P2X7) zur benachbarten Untereinheit. Zweitens, kann der Rezeptor nicht durch kovalente Modifikation des R125 mit etheno-ADP-Ribose oder anderen ADP-Riboseanaloga aktiviert werden (Seman *et al.* 2003). Anscheinend passen diese nicht optimal in die Bindungstasche. Und drittens kann die ADP-Ribosegruppe am R133 offensichtlich den Rezeptor nicht aktivieren (Abb. 9 A, Panel 4, 5), da sie möglicherweise die Bindungstasche nicht erreicht.

Eine hochauflösende Strukturanalyse der trimeren P2X-Rezeptoren liegt bisher nicht vor. Es wurde jüngst vorgeschlagen, dass P2X-Rezeptoren, trotz geringer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, Membran-topologische und quartär-strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem Protonen-aktivierten Acid-Sensing Ion Channel 1 (ASIC1) teilen, dessen 3D-Struktur bekannt ist (Jasti *et al.* 2007). Ein auf ASIC1 basiertes 3D-Modell des P2X- Rezeptors plazierte in der Tat alle für die Bindung von ATP bisher implizierten Aminosäuren, ebenso wie die Targetaminosäure der ADP-Ribosylierung, R125 in enger räumlicher Nachbarschaft an der Kontaktfläche benachbarter Untereinheiten. (Guerlet *et al.* 2008). Neuere Mutationsversuche von Aminosäuren in den TM-Regionen deuten ferner daraufhin, dass die TM2-Regionen den zentralen Kanal des trimeren P2X-Rezeptors auskleiden, während die TM1-Regionen die TM-2-Regionen peripher umgeben. Anteile der TM2-Regionen behinderten den Ionenfluss im geschlossenen Zustand des Rezeptors (Li *et al.* 2008).

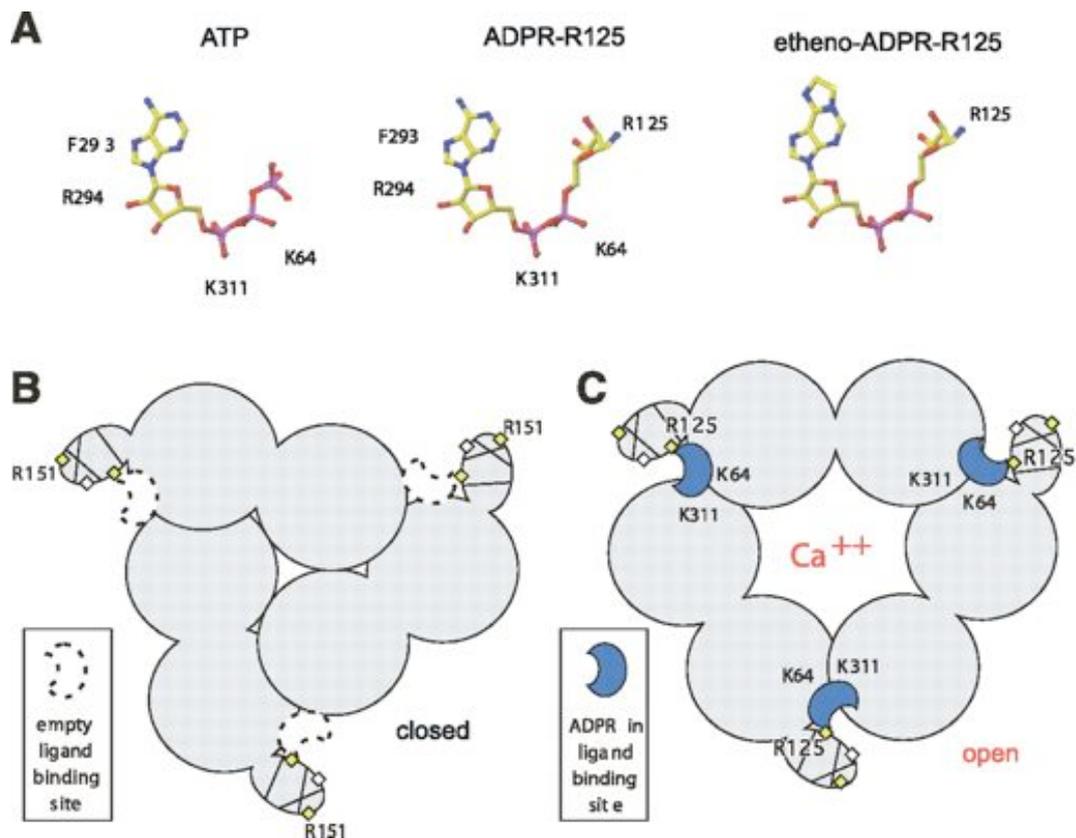


Abb. 25: Aktivierungsmodell für den P2X7-Rezeptor durch ADP-Ribosylierung am Arginin 125 (A) Lösliches ATP und die kovalent an R125 gebundene ADP-Ribose haben ein ähnliches Adenin-Ribonukleotid-Grundgerüst. Die Adenin-Gruppe ist bei etheno-NAD, das für etheno-ADP-Ribosylierungsassays eingesetzt wird, modifiziert. Die Reste K64 und K311 koordinieren möglicherweise negativ-geladene Phosphatgruppen, während R293 und R294 Adenin-Ribose-Reste koordinieren (Vial et al. 2004; Khakh and North 2006). Die etheno-ADP-Ribose kann den Rezeptor nicht aktivieren, weil sie möglicherweise nicht in die Bindungstasche passt. B und C zeigen den geschlossenen und geöffneten Rezeptor im Querschnitt. Zwei verbundene Kreise stellen jeweils die beiden Transmembranregionen der Rezeptoruntereinheiten dar. Linien markieren mögliche Disulfidbrücken in der prominenten Cystein-reichen Region des Rezeptors mit R151 als Paratop P2X7-spezifischer Antikörper. ADP-Ribosylierung am R125 plaziert die ADPR in die Ligandenbindungstasche und induziert damit die Öffnung des Calcium Kanals (Adriouch et al. 2008; Schwarz et al. 2009).

ADP-Ribosylierung und Aktivierung des P2X7 durch ART2.1

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ART2.1 den P2X7-Rezeptor in kotransfizierten HEK-Zellen ebenfalls ADP-ribosylieren und die R276K-Mutante aktivieren kann (Abb. 10 und Abb. 11 A, Panel 7). Dabei teilen die beiden Isoenzyme ART2.2 und ART2.1 nicht nur das gleiche Zielprotein, sondern auch dieselben Zielarginine, denn sowohl die Substitutionsmutante R276K/R124K125K/R133K134K sowie die R276K/R125K/R133K konnten von beiden Enzymen nicht mehr ADP-ribosyliert und aktiviert werden (Abb. 10 B und C, Abb. 11 A und B, Panel 8) (Hong et al. 2009).

Die Autoradiographien der vorliegenden Arbeit zeigen eine leichte ADP-Ribosylierung des WT-P2X7-Rezeptors durch die ART2.1 auch in Abwesenheit von DTT. Diese wurde aber in Gegenwart von DTT deutlich gesteigert (Abb. 10 B, Spure 5, 5). Hara et al. zeigten ebenfalls, dass es eine schwache Aktivität der murinen ART2.1 auf Milzzellen gibt und diese in Anwesenheit von DTT um das 5-fache gesteigert werden konnte. Mit Hilfe von Mutageneseversuchen ist es ihnen ebenfalls gelungen, das Cystein-201 der ART2.1 als das Cystein zu identifizieren, welches die Thiol-Abhängigkeit vermittelt und in der Thiol-unabhängigen ART2.2 zusammen mit dem Cystein 80 fehlt. Die Substitution des Cysteins 201 durch Phenylalanin, der entsprechenden Aminosäure in ART2.2, konnte die Thiol-Abhängigkeit der ART2.1 aufheben (Hara *et al.* 1999).

ART2.1 wird physiologischerweise vorwiegend auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und wird dort durch Interferone hochreguliert (Hong *et al.* 2007; Hong *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009). Dabei scheint die ADP-Ribosylierung via ART2.1 alleine nicht für eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors auszureichen. Allerdings erhöhte die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors die Sensitivität des Rezeptors für ATP (Hong *et al.* 2009). Das bedeutet, dass NAD^+ und ATP bei der Regulation des P2X7-Rezeptors auf murinen Makrophagen möglicherweise synergistisch wirken. Dabei ist die Freisetzung von endogenen Thiol-Reduktionsmitteln wie Cystein oder Glutathion zur Aktivierung der ART2.1 denkbar. So zirkulieren im humanen Plasma ca. 8 - 10 μM Cystein und 2 - 4 μM Glutathion. Zudem erreicht Glutathion Werte von 400 μM in der menschlichen Lunge und millimolare Werte im Dünndarm, die durch Sezernierung aus der Leber zustande kommen (Moriarty-Craige and Jones 2004). Die aktive Abgabe von L-Cystein ins extrazelluläre Medium konnte auch bei humanen Monozyten-abstammenden Makrophagen nach LPS-Stimulation und während einer HIV-Infektion, begleitet von einer Stimulation mit dem Virusprotein gp120, beobachtet werden (Gmunder *et al.* 1990; Yeh *et al.* 2000).

Zusammenfassung

Die ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung des Arginins 125 stellt neben der Bindung von ATP einen alternativen Weg zur Aktivierung des P2X7-Purinrezeptors dar. Nach Abschluss der hier durchgeführten Arbeiten publizierte Ergebnisse zeigen, dass P2X7 in zwei alternativen Splice-Varianten vorkommt, wobei die hier untersuchte offensichtlich der weniger sensitiven Splice-Variante der Makrophagen entspricht. Die Untersuchungen der Rezeptormutanten offenbaren, dass bereits einzelne Abwandlungen in der Aminosäuresequenz zu drastischen Veränderungen der Sensitivität des Rezeptors gegenüber ATP und NAD^+ führen können. So sind die Arginin-Lysin-Substitutionsmutanten R276K und R277K 10-fach sensitiver gegenüber ATP als der WT-Rezeptor. Zudem sind diese Rezeptormutanten - anders als der WT Rezeptor - durch ADP-Ribosylierung aktivierbar. Die benötigten NAD^+ -Konzentrationen sind dabei fast 40-fach niedriger als die des ATPs. Somit ähneln diese Mutanten der auf T-Zellen exprimierten sensitiveren Splice-Variante. Darüberhinaus zeigen die Ergebnisse, dass die thiol-abhängige ART2.1 im HEK-Zellmodell unter reduzierenden Bedingungen den P2X7-Rezeptor verstärkt ADP-ribosyliert und die sensitive R276K „gain-of-function“- Mutante auch aktivieren kann. Diese Ergebnisse unterstützen ein Modell der P2X7-Aktivierung, bei dem ATP als löslicher Ligand und ADP-Ribose als kovalent gebundener Ligand in die gleiche Bindungstasche zwischen zwei benachbarten Rezeptoruntereinheiten binden und damit auf ähnliche Weise eine Konformationsänderung zur Öffnung des Calciumkanals induzieren.

6.2 Funktionsanalysen des P2X7-Rezeptors auf primären T-Zellen

Aktivierung des P2X7 durch ATP vs. NAD^+

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der WT-P2X7-Rezeptor auf aufgereinigten, primären T-Zellen durch exogenes NAD^+ und ATP aktiviert werden kann. Die Exposition von PS und der Verlust von CD62L auf der T-Zelloberfläche sowie die Aufnahme von Propidium Iodid dienen dabei als Marker für die P2X7-Aktivierung (Abb. 12 A und B, Panel 2, 4). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass chronische Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch die ADP-Ribosylierung via ART2.2, ähnlich der Stimulation mit ATP, unter anderem eine zytotoxische Auswirkung hat (Di Virgilio *et al.* 1989; Seman *et al.* 2003; Kawamura *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit wird zudem durch den Einsatz von P2X7-defizienten Mäusen und dem P2X7-Inhibitor KN62 gezeigt, dass die Exposition von PS und der Verlust von CD62L vom P2X7-Rezeptor abhängig sind (Abb. 12 C und D, Panel 3 vs. 8, 5 vs. 10) (Seman *et al.* 2003).

Modulation der T-Zellfunktionen

Es ist davon auszugehen, dass die Exposition von PS sowie der Verlust von CD62L und CD27 T-Zellfunktionen modulieren. In der Summe könnten diese Modifikationen auf T-Zellen anti-migratorische, pro-apoptotische und pro-phagozytotische Wirkung haben (Abb. 26).

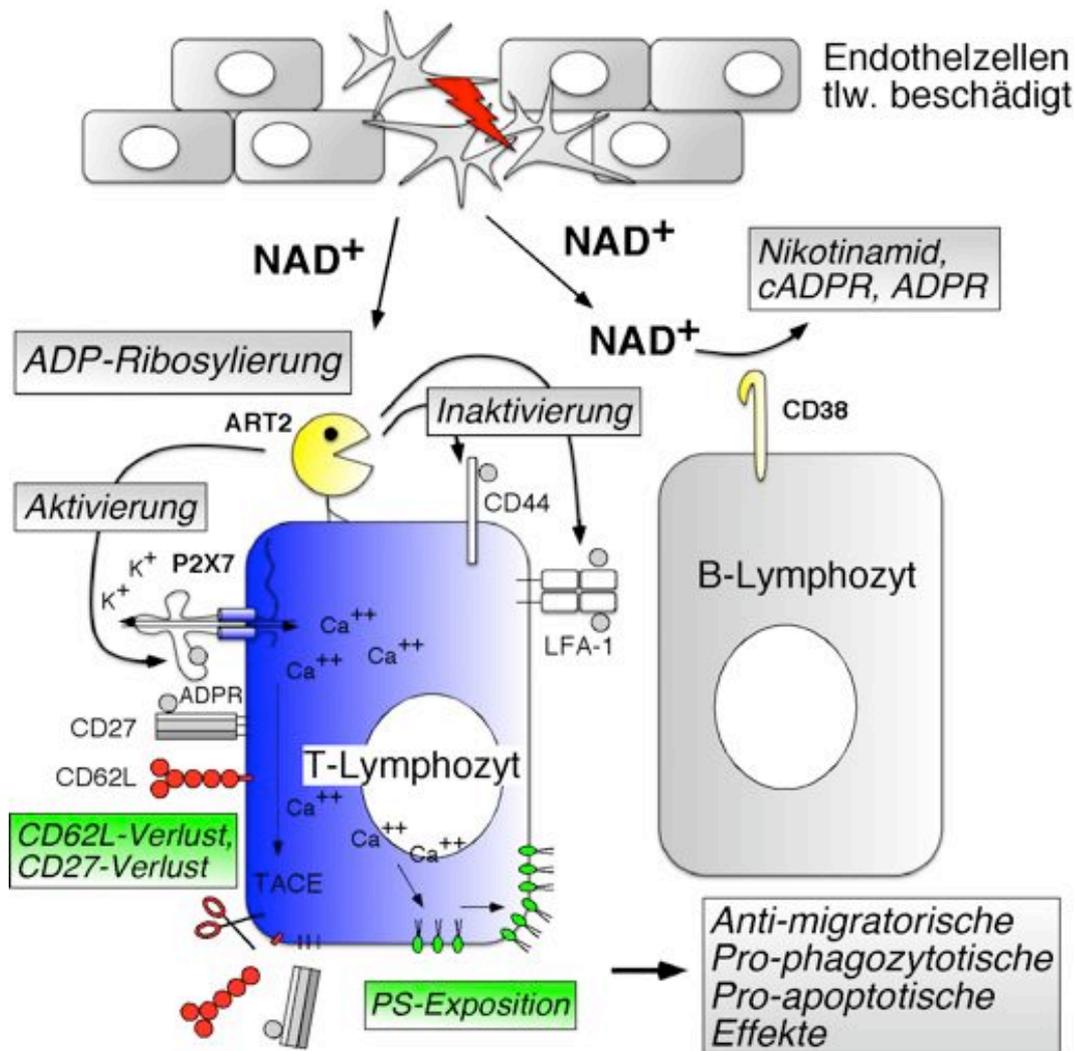


Abb. 26: Extrazelluläres NAD^+ und ART2-katalysierte T-Zellmodifikation (modifiziert nach Salmi and Jalkanen 2005). NAD^+ wird aus geschädigten Zellen freigesetzt und dient der auf T-Zellen exprimierten ART2.2 als Substrat, um verschiedene Zielproteine zu ADP-ribosylieren (grau gefüllte Kreise stellen eine ADPR-Gruppe dar). Die P2X7-Aktivierung führt zu anti-migratorischen (CD62L-Verlust), pro-apoptotischen (CD27-Verlust) und pro-phagozytotischen (PS-Exposition) Modifikationen der T-Zellen. Die ADP-Ribosylierung der Zelladhäsionsmoleküle CD44 und LFA-1 könnte den anti-migratorischen Effekt noch unterstützen (Okamoto et al. 1998; Salmi and Jalkanen 2005). Die NAD^+ -Glykohydrolase CD38 begrenzt die Verfügbarkeit von extrazellulärem NAD^+ als ART2.2 Substrat (Krebs et al. 2005). Die Menge an freigesetztem NAD^+ sowie die Höhe der lokal-exprimierten ART2.2 und CD38 sind somit wichtige Faktoren für die Menge an ADP-ribosylierten Zielproteinen auf T-Zellen.

CD62L-positive Lymphozyten werden normalerweise zu Entzündungsherden rekrutiert, wo ihr Eintritt in das Gewebe die Expression des L-Selektin (CD62) erfordert, um an den Endothelzellen festzuhaften. So wandern CD62L-defiziente Zellen vermindert aus dem Blutgefäß in das Gebiet der Entzündung ein (Tedder *et al.* 1995). Zudem ist CD62L auch als Lymph Node Homing Factor bekannt, und Lymphozyten ohne CD62L zeigten eine beeinträchtigte Rückkehr in periphere Lymphknoten (Gearing and Newman 1993; Steeber *et al.* 1996). Der Verlust von CD62L nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors könnte somit das Migrationsverhalten der T-Zellen beeinträchtigen. Die ART2-katalysierte, ADP-Ribosylierung von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 und CD44 könnte dabei die Hemmung des Migrationsverhaltens der T-Zellen noch forcieren (Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998).

Der Verlust von CD27 (Abb. 13) könnte die pro-apoptotischen, pro-phagozytotischen Effekte der P2X7-Aktivierung unterstützen. Eine der Funktionen, die CD27 nach Ligandenbindung einnimmt, ist die Hochregulation von intrazellulären, anti-apoptotischen Molekülen wie BCL-XL (BCL2L1). CD27 ist somit mit der Unterstützung des Überlebens einer T-Zelle assoziiert. Die Stimulation des CD27-Rezeptors durch seinen Liganden CD70 führt zu einer Induktion der Zellteilung und INF- γ -Produktion der CD27-positiven T-Zellen (van Oosterwijk *et al.* 2007; Croft 2009; Ribot *et al.* 2009). Auf zytotoxischen T-Zellen wurde CD27 darüber hinaus auch als Zielprotein der ADP-Ribosylierung beschrieben (Okamoto *et al.* 1998). Die Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf die Funktion von CD27 sind bisher noch unbekannt, aber es wäre möglich, dass die ADP-Ribosylierung von CD27 die Bindung des Liganden CD70 inhibiert, oder dass das nach P2X7-Aktivierung sezernierte CD27 als löslicher Kompetitor für die Bindung von CD70 wirkt.

Für den Verlust von CD62L von der Zelloberfläche sind in erster Linie die Metalloproteasen ADAM17 (auch TACE oder TNF-alpha converting enzyme) und ADAM 10 verantwortlich (Peschon *et al.* 1998). Beide Proteasen können direkt durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert werden (Le Gall *et al.* 2009). Sowohl für CD62L als auch für CD27 konnte ein Metalloproteasen-abhängiges Abspalten nach P2X7-Aktivierung gezeigt werden (Gu *et al.* 1998; Moon *et al.* 2006). Der Einsatz eines Inhibitors von Matrix-Metalloproteasen verhinderte den ATP-induzierten Verlust von CD62L und CD27 von murinen Lymphozyten. Möglicherweise hat auch die Neuordnung des Phosphatidylserins in der Zellmembran einen Einfluss auf den Verlust der Oberflächenproteine. Die Blockade der Translokation von PS durch den Inhibitor DIDS verhinderte den Verlust von CD62L (Elliott *et al.* 2005).

Die Exposition von PS, die umgehend nach der Aktivierung des P2X7-Rezeptors auftritt, könnte eine direkte Konsequenz der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sein (Balasubramanian *et al.* 2007). Die Exposition von PS wird als „Friss-mich“-Signal einer apoptotischen Zelle gewertet, das zu einer erhöhten Bindung und Phagozytose durch

Makrophagen führen kann (Balasubramanian *et al.* 2007). Tatsächlich führt die Aktivierung des P2X7 zu einer raschen Phagozytose durch Makrophagen (s.u. Abschnitt 6.4).

Zusammenfassung

Der P2X7-Rezeptor kann auf naiven T-Zellen sowohl durch NAD^+ als auch durch ATP aktiviert werden. Die induzierte Exposition von PS sowie der Verlust von CD62L und CD27 sind P2X7- bzw. im Fall von NAD^+ zusätzlich ART2.2-abhängig. Wahrscheinlich ist die Aktivierung der Metalloprotease TACE für das Abspalten von CD62L und CD27 verantwortlich. Es ist anzunehmen, dass diese Modifikationen anti-migratorische, pro-apoptotische und pro-phagozytische Auswirkungen auf T-Zellen haben. Ähnlich wie die mit ART2 und der sensitiven P2X7/R276K-Mutante kotransfizierten HEK-Zellen, waren primäre T-Zellen wesentlich sensitiver gegenüber NAD^+ als gegenüber ATP. Zudem zeigte ein Teil der T-Zellen - wiederum ähnlich wie ART2.2/R276K-kotransfizierte HEK-Zellen - auch ohne Behandlung mit exogenen Nukleotiden eine ART2-vermittelte Aktivierung des P2X7-Rezeptors.

6.3 Freisetzung von NAD^+ während der Präparation von T-Zellen

Es fiel auf, dass ein Teil der T-Zellen - ähnlich wie ART2.2/R276K-kotransfizierte HEK-Zellen - auch ohne Behandlung mit exogenen Nukleotiden eine ART2-vermittelte Aktivierung des P2X7-Rezeptors zeigten. Deshalb wurden detaillierte Analysen durchgeführt, um zu ermitteln, inwiefern dies auf eine Freisetzung von NAD^+ während der Zellpräparation oder auf eine vorherige NAD^+ -Exposition *in vivo* zurückzuführen sein könnte.

ART2.2 ist bei 4°C aktiv, Effekte der P2X7-Aktivierung erfolgen bei 37°C

Die Ergebnisse von Untersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten, dass ART2.2 bereits bei 4 °C effizient Zelloberflächenproteine ADP-ribosyliert (Abb. 15), während der P2X7-abhängige Verlust von CD62L erst bei physiologischen Temperaturen auftrat (Abb. 14). Eine NAD^+ -Exposition in der Maus (bei 37 °C) müsste zu einer deutlichen Reduktion von CD62L auf der Zelloberfläche führen. Bei einer strikten Präparation bei 4 °C waren jedoch - selbst bei CD38KO Mäusen - fast alle T-Zellen CD62L+. Erst die anschließende Inkubation *ex vivo* bei 37 °C führte bei einem großen Anteil der T-Zellen zu einem CD62L Verlust (bei 25% der WT Zellen und bei 70% der CD38KO Zellen, nicht aber bei ART2 KO Zellen, s. Abb. 14 C). Ein Kontakt von T-Zellen mit NAD^+ vor der Präparation erscheint somit unwahrscheinlich. Eine gleichzeitige Exposition mit ATP ist nicht auszuschließen, da ATP-vermittelte Effekte durch das Einhalten von 4 °C bei der Präparation der Zellen und dem anschließenden Auswaschens des ATPs verhindert würden. Die kovalent-

gebundene ADP-Ribosegruppe hingegen kann nicht vom Rezeptor abgewaschen werden und vermittelt die nachfolgenden Signale (PS-Exposition/CD62L-Verlust), sobald die T-Zellen wieder in physiologische Temperaturen überführt werden.

Die Freisetzung von NAD^+ und ATP ins extrazelluläre Medium über Connexin43-Halbkanäle ist durch verschiedene Arbeiten bestätigt (Zocchi *et al.* 1999; Bruzzone *et al.* 2001; Romanello *et al.* 2001). Eine Öffnung dieser Kanäle während der Zellernte ist durchaus denkbar, da Connexin43 auch durch mechanischen oder hypoxischen Stress geöffnet werden kann (Evans *et al.* 2006). Zusätzlich könnte es bei der Ernte zur Zerstörung von Zellen kommen. Allerdings wurde eine ähnlich starke „spontane“ Reaktion von primären T-Zellen auch bei verschiedenen Präparationsprotokollen sowohl aus Lymphknoten als auch Milz beobachtet (sanftes Zerreiben mit und ohne vorheriges Zerschneiden der Gewebe mit einem Skalpell, langsame Perfusion der punktierten Milz, Kollagenase-Verdau).

Häufig werden primäre Lymphozyten bei niedrigen Temperaturen isoliert und analysiert, aber für Funktionsassays wieder auf physiologische Temperaturen erwärmt, z.B. bei *in vivo* - Migrations oder adoptiven Transfer-Versuchen. Dabei bliebe der Verlust von CD62L und CD27 sowie die Exposition von PS unbemerkt. In Abschnitt 5.4 wurde zudem gezeigt, dass Nukleotid-behandelte T-Zellen bevorzugt durch Makrophagen phagozytiert werden. Es ist somit anzunehmen, dass ein Teil der WT- und CD38-defizienten T-Zellen nach adoptivem Transfer *in vivo* durch Makrophagen phagozytiert werden würden (**s.u 6.4**). Eine pharmakologische Unterbindung dieser durch freigesetztes NAD^+ -vermittelten T-Zell Funktionsstörungen wäre wünschenswert. Die im nächsten Abschnitt diskutierten Ergebnisse belegen, dass der Einsatz von ART2.2-inhibierenden Einzeldomänenantikörpern ein effektives Werkzeug sein kann, um die ART2.2-Aktivität *in vitro* und *in vivo* zu blockieren.

ART2.2-inhibierende Einzeldomänenantikörper schützen vor NAD^+

ART2.2-spezifische Einzeldomänenantikörper konnten, nach der Präparation von T-Zellen eingesetzt, zuverlässig eine weitere ADP-Ribosylierung der Oberflächenproteine und damit die Exposition von PS verhindern, die Vor-ADP-Ribosylierung der T-Zellen durch endogenes NAD^+ , welches während der Präparation freigesetzt wurde, aber nicht mehr rückgängig machen (Abb. 16). Eine Injektion mit ART2.2-inhibierenden Einzeldomänenantikörpern direkt vor der Präparation der T-Zellen blockierte die ADP-Ribosylierung der Zielproteine (Abb. 17). Die geringe Größe des Einzeldomänenantikörpers (12-24 kDa), seine gute Löslichkeit und hohe Stabilität bedingt einerseits eine rasche Gewebepenetration und somit das schnelle Erreichen seines Zielproteins auf T-Zellen in Lymphknoten, und andererseits eine sehr schnelle Ausscheidung über die Nieren. Die Serum-Halbwertszeit liegt bei 5 Minuten, während ein konventioneller IgG-Antikörper eine Halbwertszeit von über 10 Tagen erreichen kann (Muyldermans 2001; Holliger and Hudson 2005). Ein Vorteil von Einzeldomänenantikörpern gegenüber intakten IgG Antikörpern ist ihre fehlende Fc-Region, die Fc-vermittelte Nebenwirkungen wie die Aktivierung des Komplementsystems oder Antikörper-basierende Zytotoxizität vermitteln könnte (Muyldermans 2001; Holliger and

Hudson 2005). Um die ADP-Ribosylierung während der Präparation der T-Zellen zu verhindern, ist eine Kurzzeitblockade mit Einzeldomänenantikörpern vollkommen ausreichend.

Zusammenfassung

Bei der Präparation von primären T-Zellen wird offensichtlich endogenes NAD⁺ freigesetzt. Die daraus resultierende NAD⁺/ART2-vermittelte Modifikation der T-Zellen kann ein Problem für den späteren Einsatz dieser Zellen in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen darstellen. Da die ART2.2 auch bei niedrigen Temperaturen aktiv ist, während sich die Auswirkungen der P2X7-Aktivierung erst bei physiologischen Temperaturen zeigen, können ART2-vermittelten T-Zellmodifikationen unbemerkt bleiben. Eine Injektion mit einem ART2.2-inhibierenden Einzeldomänenantikörper kurz vor der Präparation kann diese Modifikationen verhindern.

6.4 Phagozytose von T-Zellen nach P2X7-Aktivierung

Die Ergebnisse der Untersuchungen des letzten Abschnitts der Arbeit zeigen, dass die P2X7-Aktivierung auf T-Zellen zu einer Phagozytose durch Makrophagen führt. Im Kontext einer Entzündungsreaktion könnten über diesen Mechanismus potentiell autoaggressive, sog. Bystander-T-Zellen beseitigt und damit Platz für aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen geschaffen werden.

Temperaturabhängigkeit der Phagozytose

Die Ergebnisse von Phagozytoseassays, bei denen T-Zellen nach 30-minütiger NAD⁺-Vorbehandlung mit Makrophagen in Suspension koinkubiert wurden, zeigen, dass Makrophagen NAD⁺-behandelte T-Zellen bei 37 °C innerhalb von 50 Minuten weitgehend phagozytierten, während bei 4 °C allenfalls eine schwache Bindung zu beobachten war (Abb. 18). Die in der Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtete „Bindung“ etlicher, NAD⁺-behandelter T-Zellen an die Makrophagen bei 4 °C konnte im FACS nicht bestätigt werden: Die Bindung war anscheinend zu schwach, um den mechanischen Anforderungen im FACS standzuhalten (Abb. 18 A und B). Andererseits war bei 37 °C ein kleiner Anteil der NAD⁺-behandelten T-Zellen innerhalb von Sekunden nach Zusammenpipettierung mit Makrophagen (Nullminutenwert) stark genug gebunden, um ein doppel-positives Signal im FACS zu liefern (Abb. 18 C und D). Ähnliche Beobachtungen wurden von Xu et al. für die Phagozytose von apoptotischen Jurkat-T-Zellen durch humane Makrophagen berichtet, bei der eine Internalisierung der T-Zellen ebenfalls nur bei 37 °C stattfand (Xu *et al.* 2006). Allerdings zeigten in diesem System die Makrophagen auch bei 4 °C eine im FACS detektierbare Bindung der T-Zellen. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine verlängerte

Apoptose-Induktion (18-stündige Behandlung mit dem Telomerase Inhibitor Etoposid) und damit verbundene, andere Membranveränderungen zurückzuführen.

Phagozytose von NAD⁺- vs. ATP-behandelten T-Zellen

Die in dieser Arbeit beobachtete Phagozytose von Nukleotid-behandelten T-Zellen durch Makrophagen ist auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP oder ADP-Ribosylierung via ART2.2 zurückzuführen (Abb. 19). Dabei korreliert die P2X7-vermittelte Exposition von PS mit der Phagozytose der Nukleotid-behandelten T-Zellen (Abb. 19 Abb. 20 B). Es ist denkbar, dass PS hierbei als wichtiges „Friss-mich“-Signal (Fadok *et al.* 1992) zwischen Nukleotid-behandelten T-Zellen und Peritonealmakrophagen fungiert. Es könnten aber durchaus auch weitere „Friss-mich“- und „Friss-mich-nicht“-Signale eine Rolle spielen, z.B. der Verlust von CD62L, CD27 oder anderer TACE-sensitiver Oberflächenproteine. Des Weiteren könnte auch die ADP-Ribosylierung von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 oder CD31 zur Phagozytose beitragen (Nemoto *et al.* 1996; Brown *et al.* 2002; Bannas 2007). Wie bei den vorherigen Untersuchungen zur P2X7-Aktivierung, waren auch für die Phagozytose-Induktion wesentlich geringere Konzentrationen an NAD⁺ als ATP ausreichend (Abb. 20). Bemerkenswert ist, dass selbst bei hohen NAD⁺ und ATP-Konzentrationen, NAD⁺-behandelte T-Zellen ebenso effizient oder z.T. sogar effizienter von Makrophagen phagozytiert wurden als ATP-behandelte T-Zellen, obwohl letztere i.d.R. einen höheren Anteil an PS-exponierenden Zellen aufwiesen (Abb. 20). Dies stützt die Annahme, dass die durch P2X7-Aktivierung induzierte Phagozytose durch ADP-Ribosylierung weiterer Membranproteine noch verstärkt wird.

Nukleotid-induzierte vs. Klassische Apoptose

Es wird angenommen, dass die Phagozytose von Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose dazu dient, die Freisetzung von intrazellulären Proteinen und damit möglichen Autoantigenen aus apoptotischen Zellen zu verhindern (Fadok and Henson 1998; Fadok *et al.* 1998; Savill and Fadok 2000). Früher Zeitpunkt der Apoptose bedeutet bei T-Zellen 4-12 Stunden nach Auslösung der Apoptose, wie bei der „klassischen“ Apoptose nach chronischer Ligation des T-Zell-Rezeptors, IL-2 Entzug, Todesrezeptoraktivierung, Hypoxie, Behandlung mit Glucokortikoiden, Staurosporin, Etoposid und anderen Zellgiften oder DNA-Schädigungen durch UV-Bestrahlung (Verhoven *et al.* 1999; Kurosaka *et al.* 2003; Xu *et al.* 2006). Auch hier korreliert die Phagozytose der T-Zellen in der Regel mit der Exposition von PS (Fadok *et al.* 1992). Im Einklang mit diesen Untersuchungen wurden die hier Staurosporin-behandelten T-Zellen ebenfalls erst nach 6 Stunden durch Makrophagen nennenswert phagozytiert (Abb. 21). Im Gegensatz hierzu wurden T-Zellen nach einer nur 10-minütigen Behandlung mit exogenem NAD⁺ oder ATP bereits durch Makrophagen phagozytiert (Abb. 21). Somit stellt die P2X7-vermittelte Markierung von T-Zellen für die Phagozytose den bisher schnellsten bekannten physiologischen Auslöser für die Beseitigung frühapoptotischer Zellen dar. Eine ähnliche schnelle Induktion der T-Zell Phagozytose konnte

bisher nur durch unphysiologische Reize wie Poren-Induktion durch Ionophore, Erhitzen und Schockgefrieren erzielt werden (Verhoven *et al.* 1999; Hirt and Leist 2003).

In vitro führt die Nukleotidbehandlung von T-Zellen nach mehreren Stunden zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und noch später zur Fragmentierung der DNA (Di Virgilio *et al.* 1989; Seman *et al.* 2003; Scheuplein 2005). Es ist davon auszugehen, dass diese Prozesse normalerweise nach Phagozytose in den Makrophagen erfolgen. Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen zeigen drei Stunden nach Phagozytose noch erkennbare T-Zell-„Leichen“ mit kolokalisierten DNA- und Membranfarbstoffen. Nach 12 Stunden hingegen sind T-Zellen als distinkte Strukturen nicht mehr zu erkennen, während der DNA Farbstoff im Kern der Makrophagen und der Membranfarbstoff in zytosolischen Kompartimenten wieder zu finden sind (Abb. 23).

Bystander-Hypothese

Es ist davon auszugehen, dass NAD^+ und ATP *in vivo* vor allem bei massiven Gewebeschäden und Entzündungsreaktionen freigesetzt werden. Im Falle der Biogel-induzierten Entzündungsreaktion wurde die Freisetzung von NAD^+ in relevanter Höhe (4 μM) bereits beobachtet (Adriouch *et al.* 2007). T-Zellen, die ART2.2 und P2X7 exprimieren würden dabei für die Phagozytose markiert und durch Makrophagen beseitigt werden. Antigen-spezifische Effektorzellen regulieren ART2 nach Aktivierung stark herunter, wodurch sie gegenüber extrazellulären NAD^+ inert werden (Kahl *et al.* 2000). $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$ Regulator T-Zellen hingegen sind aufgrund einer hohen ART2- und P2X7- Expression besonders empfindlich gegenüber freigesetzten Nukleotiden (Aswad *et al.* 2005). Es ist möglich, dass naive T-Zellen und Regulator T-Zellen gegenüber aktivierten Effektorzellen bevorzugt phagozytiert werden. Die Fähigkeit der Phagozyten zwischen Nukleotid-sensitiven und inerten T-Zellen zu unterscheiden wird durch die in Abbildung 17 gezeigten Ergebnisse demonstriert. Mit diesem Mechanismus würde einerseits Platz für die gewünschte Expansion von aktivierten (Pathogen-spezifischen) Effektorzellen geschaffen, andererseits könnte dies dazu dienen potentiell autoaggressive, sog. Bystander-T-Zellen zu beseitigen.

Zusammenfassung

Die phänotypischen Veränderungen, die T-Zellen nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors zeigen, haben Auswirkungen auf die Lebensdauer dieser Zellen. So werden NAD⁺- und ATP-behandelte T-Zellen bei 37 °C innerhalb von 30-50 Minuten durch Peritonealmakrophagen phagozytiert und innerhalb von mehreren Stunden vollständig zersetzt. Es reichen wesentlich geringere Konzentrationen an NAD⁺ als ATP, um T-Zellen effektiv für Makrophagen zu markieren. Die Phagozytose der ATP- und NAD⁺-behandelten T-Zellen ist P2X7- und im Falle der NAD⁺-Behandlung zusätzlich ART2-abhängig und korreliert mit der Exposition von PS auf den Nukleotid-behandelten T-Zellen. Im Gegensatz zu klassischen Apoptose-Auslösern markiert die P2X7-Aktivierung T-Zellen bereits nach wenigen Minuten statt mehrerer Stunden für die Phagozytose. Makrophagen können hochspezifisch Nukleotid-sensitive T-Zellen gegenüber Nukleotid-inerten T-Zellen unterscheiden und phagozytieren (Abb. 22). Im Kontext von Entzündungsreaktionen könnte dies einen Mechanismus zur bevorzugten Beseitigung von naiven und regulatorischen T-Zellen darstellen und damit Raum für die Expansion Pathogen-spezifischer Effektorzellen schaffen.

6.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen möglichen Regulationsmechanismus für die Beseitigung von naiven T-Zellen *in vivo*. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors induzierte die Exposition von PS, den Verlust von CD62L und CD27 sowie die Phagozytose dieser Zellen durch Peritonealmakrophagen *in vitro*. Die hohe Sensitivität der T-Zellen gegenüber NAD⁺ und ATP lässt vermuten, dass die Aktivierung des P2X7 durch extrazelluläre Nukleotide eine Rolle bei der Regulation von Immunantworten spielt. Es wurde bereits gezeigt, dass bei *Biogel*-induzierten Entzündungen genügend NAD⁺ freigesetzt wird, um T-Zellen im drainierenden Lymphknoten zu reduzieren. Auch bei verschiedenen Infektionskrankheiten ist die Freisetzung großer Mengen an Nukleotiden denkbar, wie z.B bei der Malaria oder der Toxoplasmose, die von einer starken Lyse von Erythrozyten und anderen infizierten Zellen begleitet sind. Die vorliegenden P2X7-, ART2- und CD38-defizienten Mauslinien könnten einen Einblick in die Funktion des beschriebenen Regulationsmechanismus in diesen Krankheitsmodellen ermöglichen. Darüber hinaus bieten die ART2.2-blockierenden Einzeldomänenantikörper ein neues Werkzeug für experimentelle und therapeutische Interventionen in diesen Regulationsmechanismus *in vivo*. Es ist denkbar, dass vergleichbare blockierende Einzeldomänenantikörper auch gegen CD38 und P2X7 entwickelt werden könnten.

Die hier beobachtete unterschiedliche Empfindlichkeit von P2X7 transfizierten HEK-Zellen und primären T-Zellen auf extrazelluläre Nukleotide könnte möglicherweise auf erst kürzlich entdeckte, unterschiedliche Spleißvarianten zurückzuführen sein. RT-PCR Untersuchungen

mit Hilfe von Spleißvarianten-spezifischen Primern könnten diese Frage klären. Die besonders empfindliche P2X7-Mutante R276K könnte ein wertvolles Werkzeug für weitere Untersuchungen darstellen, z.B. nach Organ-spezifischer Überexpression in transgenen Mäusen.

Die Entschlüsselung der Kristall-Struktur des P2X7-Rezeptors würde neue Einblicke in die Struktur und Funktion des Rezeptors liefern und Rückschlüsse auf die konformationelle/Funktionelle Bedeutung der hier untersuchten Arginin > Lysin Mutationen erlauben. Da die ADP-Ribosylierung als kovalente Bindung eine höhere Stabilität besitzt als die Bindung von ATP, könnte ADP-ribosylierter P2X7 dazu dienen, die offene Konformation des Rezeptors zu kristallisieren.

7. Literatur

- Acuna-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, and Huidobro-Toro JP (2007) Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor. J Neurochem 101: 17-26.
- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, and Koch-Nolte F (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. FASEB J 22: 861-9.
- Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, and Haag F (2002) Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor. J. Immunol. 169: 4108-4112.
- Adriouch S, Dubberke G, Diessenbacher P, Rassendren F, Seman M, Haag F, and Koch-Nolte F (2005) Probing the expression and function of the P2X7 purinoceptor with antibodies raised by genetic immunization. Cell Immunol 236: 72-7.
- Adriouch S, Hubert S, Pechberty S, Koch-Nolte F, Haag F, and Seman M (2007) NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. J Immunol 179: 186-94.
- Adriouch S, Ohlrogge W, Haag F, Koch-Nolte F, and Seman M (2001) Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. J. Immunol. 167: 196-203.
- Aktories K and Just I (2000) Bacterial Protein Toxins. Berlin, Springer Verlag.
- Aswad F, Kawamura H, and Dennert G (2005) High sensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. J Immunol 175: 3075-83.
- Ausubel FB, R.; Kingston, R.E.; Moor,DD (1999) Current Protocols in Molecular Biology.
- Balasubramanian K, Mirnikjoo B, and Schroit AJ (2007) Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. J Biol Chem 282: 18357-64.
- Bannas P (2007) Die murine T-Zell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2: Nachweis ihrer Lokalisation in Lipid Rafts und Identifizierung ihrer Zielproteine. Universität Hamburg, Institut für Immunologie, UKE.
- Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, and Koch-Nolte F (2005) Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. Blood 105: 3663-70.
- Bazan JF and Koch-Nolte F (1997) Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families. Adv Exp Med Biol 419: 99-107.
- Brake AJ and Julius D (1996) Signaling by extracellular nucleotides. Annu Rev Cell Dev Biol 12: 519-41.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, and Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature 371: 519-23.
- Braß A (2008) Bedeutung des P2X7 Purinorezeptors und von Ecto-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) für die Reifung und Funktion von antigenpräsentierenden Zellen der Maus (Mus musculus L.). Universität Hamburg, Institut für Immunologie, UKE.
- Brough D and Rothwell NJ (2007) Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. J Cell Sci 120: 772-81.
- Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, and Savill J (2002) Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. Nature 418: 200-3.

- Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, and De Flora A (2001) Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. Faseb. J. 15: 10-12.
- Buell G, Collo G, and Rassendren F (1996) P2X receptors: an emerging channel family. Eur J Neurosci 8: 2221-8.
- Buisman HP, Steinberg TH, Fischbarg J, Silverstein SC, Vogelzang SA, Ince C, Ypey DL, and Leijh PC (1988) Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 7988-92.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. Pharmacol Rev 24: 509-81.
- Burnstock G (1976) Purinergic receptors. J Theor Biol 62: 491-503.
- Burnstock G and Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. Int Rev Cytol 240: 31-304.
- Burnstock G and Verkhratsky A (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system. Acta Physiol (Oxf) 195: 415-47.
- Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P, Cuneo A, Castoldi G, Baricordi OR, and Di Virgilio F (2005) A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. J Immunol 175: 82-9.
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW, and Kim HR (2000) Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. Pharmacol Res 42: 373-81.
- Chen J, Chen YG, Reifsnnyder PC, Schott WH, Lee CH, Osborne M, Scheuplein F, Haag F, Koch-Nolte F, Serreze DV, and Leiter EH (2006) Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion. J Immunol 176: 4590-9.
- Chen L and Brosnan CF (2006) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. J Immunol 176: 3115-26.
- Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, and Jiang JX (2005) Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. Mol Biol Cell 16: 3100-6.
- Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PM, Kantardjieff KA, Collier RJ, and Eisenberg D (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. Nature 357: 216-22.
- Clyne JD, LaPointe LD, and Hume RI (2002) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. J Physiol 539: 347-59.
- Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, Muller-Steffner H, Randall TD, Lund FE, Murray R, Schuber F, and Howard MC (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. Blood 92: 1324-33.
- Coico R (2001) Current Protocols in Immunology.
- Collier RJ (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. Toxicon 39: 1793-803.
- Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, and Saez JC (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99: 495-500.
- Corda D and Di Girolamo M (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. Embo J 22: 1953-8.
- Croft M (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. Nat Rev Immunol 9: 271-85.

- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, and Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem J 342 (Pt 2): 249-68.
- De Flora A, Franco L, Guida L, Bruzzone S, and Zocchi E (1998) Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca(2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. Cell Biochem Biophys 28: 45-62.
- Di Lisa F and Ziegler M (2001) Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism. FEBS Lett 492: 4-8.
- Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. Trends Pharmacol Sci 28: 465-72.
- Di Virgilio F, Bronte V, Collavo D, and Zanovello P (1989) Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. J. Immunol. 143: 1955-1960.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, and Baricordi OR (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. Cell Death Differ 5: 191-9.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, and Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood 97: 587-600.
- Di Virgilio F, Ferrari D, Falzoni S, Chiozzi P, Munerati M, Steinberg TH, and Baricordi OR (1996) P2 purinoceptors in the immune system. Ciba Found Symp 198: 290-302; discussion 302-5.
- Ding S and Sachs F (1999) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. J Gen Physiol 113: 695-720.
- Dubyak GR (2003) Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. Mol Pharmacol 63: 773-6.
- E.F. Fritsch JS, T. Maniatis (1989) Molecular Cloning.
- Egan TM, Haines WR, and Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. J Neurosci 18: 2350-9.
- Egan TM and Khakh BS (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. J Neurosci 24: 3413-20.
- Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, Linton K, Alexander DR, and Higgins CF (2005) Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. Nat Cell Biol 7: 808-16.
- Ennion S, Hagan S, and Evans RJ (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. J Biol Chem 275: 35656.
- Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, and North RA (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. J Physiol 497 (Pt 2): 413-22.
- Evans WH, De Vuyst E, and Leybaert L (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. Biochem J 397: 1-14.
- Fadok VA, Bratton DL, and Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. J Clin Invest 108: 957-62.
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, and Bratton DL (2001) Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. J Biol Chem 276: 1071-7.
- Fadok VA and Henson PM (1998) Apoptosis: getting rid of the bodies. Curr Biol 8: R693-5.

- Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, and Henson PM (1998) Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. Biochem Soc Trans 26: 653-6.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, and Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 148: 2207-16.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, and Di Virgilio F (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. J Immunol 176: 3877-83.
- Fischer W, Franke H, Groger-Arndt H, and Illes P (2005) Evidence for the existence of P2Y1,2,4 receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y1 receptors after repetitive agonist application. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 371: 466-72.
- Gearing AJ and Newman W (1993) Circulating adhesion molecules in disease. Immunol Today 14: 506-12.
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, and Koch-Nolte F (2002) The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. Protein Sci 11: 1657-70.
- Gmunder H, Eck HP, Benninghoff B, Roth S, and Droge W (1990) Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. Cell Immunol 129: 32-46.
- Gu B, Bendall LJ, and Wiley JS (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. Blood 92: 946-951.
- Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petrou S, and Wiley JS (2004) An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. J Biol Chem 279: 31287-95.
- Guerlet G, Taly A, Prado de Carvalho L, Martz A, Jiang R, Specht A, Le Novere N, and Grutter T (2008) Comparative models of P2X2 receptor support inter-subunit ATP-binding sites. Biochem Biophys Res Commun 375: 405-9.
- Guse AH (2000) Cyclic ADP-ribose. J Mol Med 78: 26-35.
- Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller M, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, and Koch-Nolte F (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. Purinergic Signalling 3: 71-81.
- Haag F, Koch-Nolte F, Kuhl M, Lorenzen S, and Thiele HG (1994) Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. J Mol Biol 243: 537-46.
- Haines WR, Migita K, Cox JA, Egan TM, and Voigt MM (2001) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. J Biol Chem 276: 32793-8.
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, and Nagata S (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature 417: 182-7.
- Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, Heeg KM, Preisig-Muller R, and Daut J (2004) Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 9479-84.
- Hara N, Badruzzaman M, Sugae T, Shimoyama M, and Tsuchiya M (1999) Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase. Eur J Biochem 259: 289-94.

- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, and Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? Microbiol Mol Biol Rev 70: 789-829.
- Henson PM, Bratton DL, and Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. Curr Biol 11: R795-805.
- Henson PM, Bratton DL, and Fadok VA (2001) The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? Nat Rev Mol Cell Biol 2: 627-33.
- Hibell AD, Thompson KM, Xing M, Humphrey PP, and Michel AD (2001) Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. J Pharmacol Exp Ther 296: 947-57.
- Hirt UA and Leist M (2003) Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. Cell Death Differ 10: 1156-64.
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, and Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 8485-9.
- Holliger P and Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol 23: 1126-36.
- Hollmann C, Haag F, Schlott M, Damaske A, Bertuleit H, Matthes M, Kuhl M, Thiele HG, and Koch-Nolte F (1996) Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. Mol Immunol 33: 807-17.
- Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, and Dubyak GR (2007) Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. J Immunol 179: 6215-27.
- Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, and Dubyak GR (2009) Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid and lymphoid leukocytes. Purinergic Signal.
- Hong S, Schwarz N, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, Schilling WP, and Dubyak GR (2009) Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and ecto-ADP-ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. J Immunol 183: 578-92.
- Honjo T, Nishizuka Y, and Hayaishi O (1968) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. J Biol Chem 243: 3553-5.
- Humphreys BD, Rice J, Kertesy SB, and Dubyak GR (2000) Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. J Biol Chem 275: 26792-26798.
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, and Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. Nature 449: 316-23.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, and North RA (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. J Neurosci 23: 8903-10.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, and North RA (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. J Biol Chem 275: 34190-6.
- Jin D, Liu HX, Hirai H, Torashima T, Nagai T, Lopatina O, Shnayder NA, Yamada K, Noda M, Seike T, Fujita K, Takasawa S, Yokoyama S, Koizumi K, Shiraishi Y, Tanaka S, Hashii M, Yoshihara T, Higashida K, Islam MS, Yamada N, Hayashi K, Noguchi N, Kato I, Okamoto H, Matsushima A, Salmina A, Munesue T, Shimizu N, Mochida S, Asano M, and Higashida H (2007) CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. Nature 446: 41-5.

- Just I and Aktories K (1991) [ADP ribosylation of actin--a cytotoxic principle of bacterial toxins]. Immun Infekt 19: 18-21.
- Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, Haag F, and Koch-Nolte F (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. J. Immunol. 165: 4463-9.
- Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Govindarajan S, and Dennert G (2006) P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. J Immunol 176: 2152-60.
- Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Malone K, Kaslow H, Koch-Nolte F, Schott WH, Leiter EH, and Dennert G (2005) P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. J Immunol 174: 1971-9.
- Kernstock S, Koch-Nolte F, Mueller-Dieckmann J, Weiss MS, and Mueller-Dieckmann C (2006) Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human ARH3, the first eukaryotic protein-ADP-ribosylhydrolase. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 62: 224-7.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, and Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. Nat Neurosci 2: 322-30.
- Khakh BS and Lester HA (1999) Dynamic selectivity filters in ion channels. Neuron 23: 653-8.
- Khakh BS and North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. Nature 442: 527-32.
- Koch F, Haag F, Kashan A, and Thiele HG (1990) Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 964-7.
- Koch-Nolte F, Adriouch S, Bannas P, Krebs C, Scheuplein F, Seman M, and Haag F (2006) ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. Ann Med 38: 188-99.
- Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, Haag F, and Leiter EH (1999) A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. J. Immunol. 163: 6014-6022.
- Koch-Nolte F, Petersen D, Balasubramanian S, Haag F, Kahlke D, Willer T, Kastelein R, Bazan F, and Thiele HG (1996) Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADP-ribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. J. Biol. Chem. 271: 7686-7693.
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A, and Goldbaum FA (2007) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. FASEB J 21: 3490-8.
- Krebs C, Adriouch S, Braasch F, Koestner W, Leiter EH, Seman M, Lund FE, Oppenheimer N, Haag F, and Koch-Nolte F (2005) CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. J Immunol 174: 3298-305.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, and Kobayashi Y (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. J Immunol 171: 4672-9.
- la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, and Girolomoni G (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. J Leukoc Biol 73: 339-43.
- Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, and Wesselborg S (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Mol Cell 14: 277-87.
- Le Gall SM, Bobe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, and Blobel CP (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated

- components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. Mol Biol Cell 20: 1785-94.
- Le Stunff H, Auger R, Kanellopoulos J, and Raymond MN (2004) The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. J Biol Chem 279: 16918-26.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, and Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. Nat Neurosci 11: 883-7.
- Locovei S, Bao L, and Dahl G (2006) Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7655-9.
- Lund FE, Cockayne DA, Randall TD, Solvason N, Schuber F, and Howard MC (1998) CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. Immunol Rev 161: 79-93.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, and Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature 440: 228-32.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, and Nicke A (2007) Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. J Neurosci 27: 1456-66.
- Moller S, Jung C, Adriouch S, Dubberke G, Seyfried F, Seman M, Haag F, and Koch-Nolte F (2007) Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ectoenzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. Purinergic Signal 3: 359-66.
- Moon H, Na HY, Chong KH, and Kim TJ (2006) P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. Immunol Lett 102: 98-105.
- Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas RA, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, Usai C, Meis S, Kassack MU, Zocchi E, and De Flora A (2006) Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor in human granulocytes. J Biol Chem 281: 31419-29.
- Moriarty-Craige SE and Jones DP (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. Annu Rev Nutr 24: 481-509.
- Moss J, Stanley SJ, Nightingale MS, Murtagh JJ, Jr., Monaco L, Mishima K, Chen HC, Williamson KC, and Tsai SC (1992) Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases. J Biol Chem 267: 10481-8.
- Moss J, Zolkiewska A, and Okazaki I (1997) ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles. Adv Exp Med Biol 419: 25-33.
- Mueller-Dieckmann C, Ritter H, Haag F, Koch-Nolte F, and Schulz G (2002) Structure of the Ecto-ADP-ribosyl Transferase ART2.2 from Rat. J. Mol. Biol. 322: 687-696.
- Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, and Di Virgilio F (1992) Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. Biochem J 288 (Pt 3): 897-901.
- Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol 74: 277-302.
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, and Hume RI (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. J Biol Chem 280: 25982-93.
- Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, and Ohno Y (2004) Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. Eur J Pharmacol 483: 29-35.

- Nemoto E, Yu Y, and Dennert G (1996) Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. J Immunol 157: 3341-9.
- Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. Biochem Biophys Res Commun 377: 803-8.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, and Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. EMBO J 17: 3016-28.
- Nicke A, Kerschensteiner D, and Soto F (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. J Neurochem 92: 925-33.
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Gorecki DC, Murrell-Lagnado RD, and Soto F (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 KO mice. J Biol Chem.
- Niere M, Kernstock S, Koch-Nolte F, and Ziegler M (2008) Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix. Mol Cell Biol 28: 814-24.
- Nolte MA, van Olfen RW, van Gisbergen KP, and van Lier RA (2009) Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. Immunol Rev 229: 216-31.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev 82: 1013-67.
- North RA and Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 563-80.
- Ohlrogge W, Haag F, Lohler J, Seman M, Littman DR, Killeen N, and Koch-Nolte F (2002) Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. Mol. Cell. Biol. 22: 7535-7542.
- Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E, and Dennert G (1998) Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. J. Immunol. 160: 4190-4198.
- Otto H, Reche PA, Bazan F, Dittmar K, Haag F, and Koch-Nolte F (2005) In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). BMC Genomics 6: 139.
- Partida-Sanchez S, Randall TD, and Lund FE (2003) Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity. Microbes Infect 5: 49-58.
- Pelegrin P and Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J 25: 5071-82.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, and Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science 282: 1281-4.
- Ralevic V and Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 50: 413-92.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, and Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. J Biol Chem 272: 5482-6.
- Reyelt J (2008) Isolierung und Charakterisierung von inhibitorischen Einzeldomänen-Antikörpern aus dem Lama (Lama glama) gegen die T-Zell-Ekto-ADP-Ribosyltransferase der Maus (Mus musculus). Universität Hamburg, Institut für Immunologie, UKE.

- Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, Girardi M, Borst J, Hayday AC, Pennington DJ, and Silva-Santos B (2009) CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. Nat Immunol 10: 427-36.
- Richard JF, Petit L, Gibert M, Marvaud JC, Bouchaud C, and Popoff MR (1999) Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. Int Microbiol 2: 185-94.
- Roberts JA and Evans RJ (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. J Biol Chem 279: 9043-55.
- Roberts JA and Evans RJ (2007) Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors. J Neurosci 27: 4072-82.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, and Evans RJ (2006) Molecular properties of P2X receptors. Pflugers Arch 452: 486-500.
- Robson SC, Sevigny J, and Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal 2: 409-30.
- Romanello M, Pani B, Bicego M, and D'Andrea P (2001) Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 289: 1275-81.
- Salmi M and Jalkanen S (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. Nat Rev Immunol 5: 760-71.
- Samways DS and Egan TM (2007) Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. J Gen Physiol 129: 245-56.
- Samways DS, Migita K, Li Z, and Egan TM (2008) On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. J Biol Chem 283: 5110-7.
- Savill J and Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 407: 784-8.
- Scheuplein F (2005) Molekulare Mechanismen und Funktion der durch die ADP-Ribosyltransferase ART2-vermittelten Apoptose muriner T-Zellen Universität Hamburg, Institut für Immunologie, UKE.
- Scheuplein F, Adriouch S, Glowacki G, Haag F, Seman M, and Koch-Nolte F (2003) Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2. Ann N Y Acad Sci 1010: 296-9.
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, and Koch-Nolte F (2009) NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. J Immunol 182: 2898-908.
- Schuber F and Lund FE (2004) Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. Curr Mol Med 4: 249-61.
- Schwarz N, Fliegert R, Adriouch S, Seman M, Guse AH, Haag F, and Koch-Nolte F (2009) Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. Purinergic Signal 5: 139-49.
- Schwiebert EM and Zsembery A (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. Biochim Biophys Acta 1615: 7-32.
- Seman M, Adriouch S, Haag F, and Koch-Nolte F (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. Curr Med Chem 11: 857-72.

- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, and Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19: 571-82.
- Serreze DV and Leiter EH (1994) Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr Opin Immunol* 6: 900-6.
- Singer, II, Scott S, Chin J, Bayne EK, Limjuco G, Weidner J, Miller DK, Chapman K, and Kostura MJ (1995) The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J Exp Med* 182: 1447-59.
- Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, and Hol WG (1993) Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 230: 890-918.
- Sluyter R and Wiley JS (2002) Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol* 14: 1415-21.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, and Petrou S (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278: 8853-8860.
- Smyth LM, Bobalova J, Mendoza MG, Lew C, and Mutafova-Yambolieva VN (2004) Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder. *J Biol Chem* 279: 48893-903.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, and Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276: 125-32.
- Soto F, Garcia-Guzman M, and Stuhmer W (1997) Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol* 160: 91-100.
- Steeber DA, Green NE, Sato S, and Tedder TF (1996) Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol* 157: 1096-106.
- Stojilkovic SS, Tomic M, He ML, Yan Z, Koshimizu TA, and Zemkova H (2005) Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci* 1048: 116-30.
- Stoop R, Surprenant A, and North RA (1997) Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* 78: 1837-40.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, and Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277: 10482-8.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, and Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-8.
- Takada T, Iida K, and Moss J (1993) Cloning and site-directed mutagenesis of human ADP-ribosylarginine hydrolase. *J Biol Chem* 268: 17837-43.
- Takada T, Okazaki IJ, and Moss J (1994) ADP-ribosylarginine hydrolases. *Mol Cell Biochem* 138: 119-22.
- Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, Melvin JE, and Elliott JI (2008) Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol* 180: 300-8.
- Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Sojka DK, Richardson JC, Sheardown SA, Harrison SM, Pusey CD, Tam FW, and Elliott JI (2009) Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *J Leukoc Biol* 85: 978-86.

- Tedder TF, Steeber DA, and Pizcueta P (1995) L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. J Exp Med 181: 2259-64.
- Tiegs G, Hentschel J, and Wendel A (1992) A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. J Clin Invest 90: 196-203.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, and Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. Nature 371: 516-9.
- van Oosterwijk MF, Juwana H, Arens R, Tesselaar K, van Oers MH, Eldering E, and van Lier RA (2007) CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development. Int Immunol 19: 713-8.
- Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, and Williamson P (1999) Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. Cell Death Differ 6: 262-70.
- Vial C, Rigby R, and Evans RJ (2006) Contribution of P2X1 receptor intracellular basic residues to channel properties. Biochem Biophys Res Commun 350: 244-8.
- Vial C, Roberts JA, and Evans RJ (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. Trends Pharmacol Sci 25: 487-93.
- Warnock RA, Askari S, Butcher EC, and von Andrian UH (1998) Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. J Exp Med 187: 205-16.
- Williamson P and Schlegel RA (2002) Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. Biochim Biophys Acta 1585: 53-63.
- Wirkner K, Schweigel J, Gerevich Z, Franke H, Allgaier C, Barsoumian EL, Draheim H, and Illes P (2004) Adenine nucleotides inhibit recombinant N-type calcium channels via G protein-coupled mechanisms in HEK 293 cells; involvement of the P2Y13 receptor-type. Br J Pharmacol 141: 141-51.
- Worthington RA, Dutton JL, Poronnik P, Bennett MR, and Barden JA (1999) Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. Electrophoresis 20: 2065-70.
- Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petrou S, Wiley JS, and Barden JA (2002) Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. FEBS Lett 512: 43-6.
- Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, and van Kooten C (2006) IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. Blood 107: 4930-7.
- Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, and Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. J Gen Physiol 132: 563-73.
- Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T, and Stojilkovic SS (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. Mol Pharmacol 67: 1078-88.
- Yeh MW, Kaul M, Zheng J, Nottet HS, Thylin M, Gendelman HE, and Lipton SA (2000) Cytokine-stimulated, but not HIV-infected, human monocyte-derived macrophages produce neurotoxic levels of l-cysteine. J Immunol 164: 4265-70.
- Young MT, Pelegrin P, and Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. Mol Pharmacol 71: 92-100.
- Zimmermann H, Beaudoin AR, Bollen M, Goding JW, Guidotti G, Kirley TL, Robson SC, and Sano K (2000). Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolysing enzyme families expressed on the cell surface. Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases. Vanduffel L and Lemmens R. Maastricht, Shaker Publishing B.V.: 1-8.
- Zimmermann H and Braun N (1999) Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. Prog Brain Res 120: 371-85.

- Zocchi E, Usai C, Guida L, Franco L, Bruzzone S, Passalacqua M, and De Flora A (1999) Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺ mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes. FASEB J 13: 273-83.
- Zolkiewska A, Nightingale MS, and Moss J (1992) Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 11352-6.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen und Anglizismen

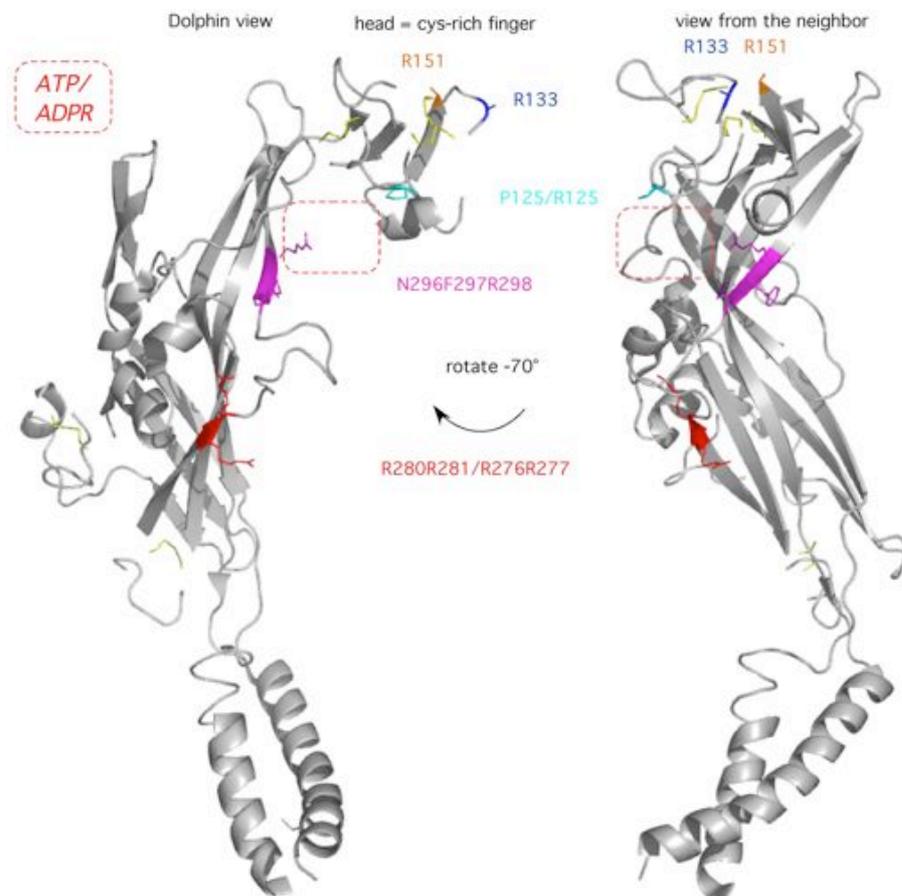
3D	Dreidimensional
A	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Alanin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP-R	Adenosin-5'-diphosphat-ribose
ADAM17	s.a. TACE
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APC	Allophycocyanin
ARH	ADP-Ribosyl-X-Hydrolase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BzATP	2-(3'-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat
cADP-R	Zyklische ADP-Ribose
C	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Cystein
CD	Nomenklatur für Oberflächenproteine (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CTG	Celltracker Green
Da	Dalton
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonische Säure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effiziente Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNAD	etheno-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
E-NPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/phosphodiesterasen
E-NTPD	Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-thiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
G	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Glycin
Gating	Das Hin- und Herschalten zwischen offenen und geschlossenen Rezeptorzuständen
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
H	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Histidin
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
i.d.R.	in der Regel

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Lysin
KN62	1-[N,O-bis(5-Isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
KO	<i>Knockout</i>
LDH	Lactat Dehydrogenase
LFA	funktionelles Leukozytenantigen (<i>leukocyte functional antigen</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	Monoklonaler Antikörper
mART	Mono-ADP-Ribosyltransferasen
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NAD ⁺	β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NC	Nitrozellulose
NICD	NAD ⁺ -induzierter Zelltod (<i>NAD⁺ induced cell death</i>)
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	Polyklonaler Antikörper
PARG	Poly-ADP-Ribosyl-Glykohydrolase
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphordiesterase
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Glutamin
R	Einbuchstaben-Bezeichnung für die Aminosäure Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
sd Ab	Einzeldomänenantikörper (<i>single domain antibody</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>)
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TM	Transmembranregion
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

Nachwort

Nach Fertigstellung dieser Arbeit wurde in der Ausgabe vom 30.07.09 in nature die 3D-Struktur der extrazellulären Domäne mit den beiden Transmembranmembran-Domänen des P2X₄ Rezeptors aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*) in geschlossener Konformation ohne Liganden veröffentlicht. Die Struktur scheint das hier vorgeschlagene Modell der P2X₇-Rezeptoraktivierung durch ADP-Ribosylierung an R125 zu stützen. Zudem gibt die Struktur Auskunft über die Lage der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Argininreste.

Die Seitenkette von P125 (entspricht dem R125 in mP2X₇) liegt an der Basis der prominenten Cystein-reichen Domäne unmittelbar über der vorhergesagten ATP-Bindungsstelle. Die Seitenkette des R133 liegt auf der anderen Seite dieser Domäne in weiter Distanz von der vermeintlichen Bindungstasche. R276 und R277 liegen an der Grenzfläche der Untereinheiten.



(von Prof. Nolte mit Hilfe des Pymol Programms erstellt)

Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state

Toshimitsu Kawate, Jennifer Carlisle Michel, William T. Birdsong, Eric Gouaux
Nature **460**, 592-598 (30 July 2009) doi:10.1038/nature08198