

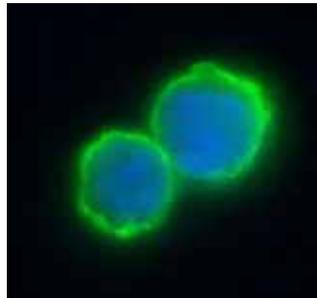
Aus dem Institut für Immunologie  
des Zentrums für klinische Pathologie



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

# **ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auf der Zellmembran von Lymphozyten**



Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Christian Krebs

aus Köln

unter der Betreuung von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:  
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

*für Dorothee*

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis  | 4  |
| Abbildungsverzeichnis   | 7  |
| Zusammenfassung   | 10 |
| Abstract  | 11 |
| Abkürzungsverzeichnis   | 13 |
| Anglizismen   | 14 |
| 1 Einleitung  | 15 |
| 1.1 Das Immunsystem   | 15 |
| 1.1.1 Produktion von Antikörpern durch B Zellen   | 15 |
| 1.1.2 Bedeutung von T Zellen im Immunsystem   | 16 |
| 1.2 ADP-Ribosylierung   | 17 |
| 1.2.1 Die enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung                                   | 17 |
| 1.2.2 ADP-Ribosyltransferasen bei Prokaryonten  | 19 |
| 1.2.3 Überblick über die ADP-Ribosyltransferasen höherer Lebewesen                      | 20 |
| 1.2.4 Rolle der ART2 im Immunsystem   | 20 |
| 1.2.5 Expression der ART2 bei verschiedenen Mausmodellen                                | 22 |
| 1.2.6 Nachweis der ADP-Ribosylierung mit etheno-NAD und dem monoklonalen Antikörper 1G4 | 22 |
| 1.3 Reversibilität der ADP-Ribosylierung  | 23 |
| 1.4 Die Familie der ADP-Ribosylcyclasen und NADasen                                     | 25 |
| 1.5 Apoptose - der programmierte Zelltod  | 27 |
| 1.5.1 „Klassische“ Signalwege der Apoptose  | 27 |
| 1.5.2 P2X7-Rezeptor-vermittelter Zelltod  | 28 |
| 1.6 Autoimmunerkrankungen und die Rolle von ADP-Ribosyltransferasen                     | 29 |
| 1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit  | 31 |
| 2 Material und Methoden   | 32 |
| 2.1 Materialien   | 32 |
| 2.1.1 Laborgeräte   | 32 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien   | 32 |
| 2.1.3 Mausstämme  | 32 |
| 2.1.4 Zelllinien  | 32 |
| 2.1.5 Antikörper und Streptavidine  | 33 |
| 2.1.6 Chemikalien   | 34 |
| 2.1.7 Zellkulturmedien  | 34 |
| 2.1.8 Erythrozytenlysepuffer  | 34 |
| 2.1.9 MACS-Puffer   | 34 |
| 2.1.10 SDS-PAGE und Western Blot  | 34 |
| 2.1.11 Puffer für NAD cycling assay   | 35 |

---

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.1.12 | Puffer für Dünnschichtchromatographie   | 35 |
| 2.2    | Methoden  | 35 |
| 2.2.1  | Kultivierung und Gewinnung von Lymphomzellen  | 35 |
| 2.2.2  | Präparation von primären lymphatischen Zellen   | 35 |
| 2.2.3  | Depletion von CD38 positiven Zellen   | 36 |
| 2.2.4  | „Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ (FACS)   | 37 |
| 2.2.5  | Messung der ART2 Aktivität mit dem 1G4 Assay  | 38 |
| 2.2.6  | Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen  | 38 |
| 2.2.7  | Immunfluoreszenz-Mikroskopie  | 38 |
| 2.2.8  | Apoptose-Assay  | 39 |
| 2.2.9  | Western Blot Analysen   | 39 |
| 2.2.10 | Radioisotopen-basierte enzymatische Assays  | 41 |
| 2.2.11 | Berechnung von 3D-Strukturen <i>in silico</i>   | 41 |
| 2.2.12 | NAD-Cycling-Assay   | 42 |
| 3      | Ergebnisse  | 43 |
| 3.1    | Allgemeine Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung und deren Detektion mit dem 1G4 Antikörper  | 43 |
| 3.1.1  | Nachweis von etheno-ADP-ribosylierten Membranproteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 auf ART2-transfizierten Lymphomzellen in FACS-Analysen | 43 |
| 3.1.2  | Nachweis von etheno-ADP-ribosylierten Membranproteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 in der Immunfluoreszenzmikroskopie                     | 45 |
| 3.1.3  | Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Proteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 im Western Blot   | 46 |
| 3.1.4  | Untersuchungen zur Enzymkinetik der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen  | 48 |
| 3.1.5  | Einfluss von DTT auf die ART-Aktivität von muriner ART2.1   | 51 |
| 3.1.6  | Untersuchung einer Zelllinie mit endogener ART-Aktivität  | 53 |
| 3.1.7  | Untersuchungen zur Inhibition der ADP-Ribosylierung   | 55 |
| 3.2    | Untersuchungen zur NAD induzierten Apoptose   | 57 |
| 3.2.1  | Untersuchung der möglichen ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinozeptors   | 57 |
| 3.2.2  | Abhängigkeit des NAD induzierten Zelltods von ART2 und P2X7   | 59 |
| 3.2.3  | Untersuchung des Einflusses von Zelllysaten auf den NAD induzierten Zelltod   | 61 |
| 3.2.4  | Untersuchung des NAD induzierten L-Selectin Shedding  | 64 |
| 3.3    | Untersuchungen zum Einfluss von CD38 auf die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen   | 68 |
| 3.3.1  | Einfluss von CD38 positiven Zellen auf die ADP-Ribosylierung von CD38 negativen Zellen  | 68 |
| 3.3.2  | Untersuchung der ART-Aktivität von Zellen aus CD38 Knock-out Mäusen   | 70 |
| 3.3.3  | Einfluss von CD38 positiven Zellen auf das für ADP-Ribosylierung benötigte extrazelluläre NAD   | 72 |

---

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.3.4 | Untersuchung des Einflusses von araF-NAD auf die Hemmung der ADP-Ribosylierung durch CD38                                | 74  |
| 3.3.5 | Vergleichende Untersuchungen des NAD induzierten Zelltods bei Zellen von Wildtyp und CD38 Knock-out Mäusen               | 77  |
| 3.4   | Untersuchung der ART-Aktivität auf Lymphozyten von verschiedenen Tierarten   | 77  |
| 3.4.1 | Untersuchung der ART-Aktivität von Zellen aus verschiedenen lymphatischen Geweben der Maus                               | 78  |
| 3.4.2 | Untersuchung der ART-Aktivität und des NAD induzierten Zelltods bei Hamster Lymphozyten                                  | 80  |
| 3.4.3 | Untersuchung von Lymphozyten des Kaninchens auf ART-Aktivität und NAD induzierten Zelltod                                | 82  |
| 3.4.4 | Untersuchung von ART-Aktivität auf Lymphozyten der Ratte   | 84  |
| 3.4.5 | Untersuchung von humanen Leukozyten auf ART-Aktivität  | 85  |
| 3.4.6 | Untersuchung von ADP-Ribosyltransferasen bei Hühnern   | 85  |
| 3.5   | Untersuchungen zur Reversibilität der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>  | 93  |
| 3.5.1 | Pulse-chase Analysen mit etheno-NAD bei primären Lymphozyten der Maus  | 94  |
| 3.5.2 | Hemmung der Reversibilität durch Inhibitoren von ADP-Ribosylhydrolasen und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen | 95  |
| 3.5.3 | Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung <i>in vivo</i>  | 98  |
| 4     | Diskussion   | 102 |
| 4.1   | Der 1G4 Assay ist ein nützliches und vielseitiges neues Werkzeug zur Untersuchung der ART-Aktivität                      | 102 |
| 4.2   | Der zytolytische P2X7 Purinozeptor wird durch ADP-Ribosylierung aktiviert  | 108 |
| 4.3   | CD38 beeinflusst durch Hydrolyse von NAD das Ausmaß der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen                           | 111 |
| 4.4   | Verschiedenen Tierarten unterscheiden sich stark in der ART-Aktivität auf Lymphozyten                                    | 113 |
| 4.5   | ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei primären Lymphozyten ist reversibel                                   | 117 |
| 4.6   | Mögliche Bedeutung des NICD für Immunreaktionen  | 120 |
| 5     | Perspektiven für weiterführende Untersuchungen   | 124 |
|       | Literaturverzeichnis   | 126 |
|       | Anhang   | 142 |
|       | Danksagung   | 143 |
|       | Lebenslauf   | 144 |
|       | Publikationen und Präsentationen   | 145 |
|       | Eidesstattliche Erklärung  | 146 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: ADP-Ribosylierung   | 18 |
| Abbildung 2: Strukturformeln von NAD und den hier verwendeten Analoga etheno-NAD, biotin-NAD und araF-NAD sowie der Angriffspunkt von verschiedenen Enzymen am $\alpha$ -ADP-Ribosyl-Rest      | 19 |
| Abbildung 3: Zielproteine der ARTs auf der Zelloberfläche von T Zellen   | 21 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nachweises der etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Assay  | 23 |
| Abbildung 5: Modell der Nitrogenase Regulation bei <i>Rhodospirillum rubrum</i> durch reversible ADP-Ribosylierung der Nitrogenase   | 25 |
| Abbildung 6: CD38 hydrolysiert NAD   | 26 |
| Abbildung 7: FACS-Anfärbung von C57BL/6 Milzzellen   | 27 |
| Abbildung 8: Lage der lymphatischen Organe bei der Maus  | 36 |
| Abbildung 9: Das Prinzip der FACS Untersuchung   | 38 |
| Abbildung 10: Nachweis von Proteinen im Western Blot mit der ECL-Reaktion  | 39 |
| Abbildung 11: NAD dient als Katalysator für die Reduzierung von MTT  | 42 |
| Abbildung 12: Nachweis der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf ART2.2-Transfizierten DC27.10 Lymphomzellen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 in FACS-Analysen                         | 44 |
| Abbildung 13: Inkubation von ART-transfizierten EL4 Lymphomzellen mit etheno-NAD und etheno-ADP-Ribose   | 45 |
| Abbildung 14: Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Inkubation ART-transfizierter DC27.10 Lymphomzellen mit etheno-NAD   | 45 |
| Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine von ART-transfizierten DC27.10 Lymphomzellen mittels Autoradiographie oder 1G4-ImmunoBlot nach SDS-PAGE  | 47 |
| Abbildung 16: Vergleichende Western Blot Analyse der modifizierten Proteine nach etheno-NAD-Inkubation von mit verschiedenen ARTs transfizierten DC27.10 Lymphomzellen <sup>48</sup>           |    |
| Abbildung 17: Kinetik der etheno-ADP-Ribosylierung nach Inkubation von ART2.2-transfizierten Lymphomzellen mit etheno-NAD  | 49 |
| Abbildung 18: Konzentrationsabhängigkeit der 1G4 Anfärbung von etheno-NAD bei ART2.2-transfizierten Zellen <sup>50</sup>   |    |
| Abbildung 19: Lineweaver-Burk Diagram der 1G4 Anfärbung nach Inkubation mit etheno-NAD   | 51 |
| Abbildung 20: Einfluss von DTT auf die Aktivität der murinen ART2.1 auf ART-transfizierten Lymphomzellen und T Zellen  | 52 |
| Abbildung 21: Lineweaver-Burk-Diagram der 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD Inkubation ART2.1-transfizierter Zellen mit und ohne DTT   | 52 |
| Abbildung 22: 1G4-Anfärbung von unsortierten und auf ART-Aktivität sortierten MD27 Zellen  | 54 |
| Abbildung 23: Einfluss von PI-PLC auf die ADP-Ribosylierung der Zellmembranproteine von MD27 Zellen  | 54 |
| Abbildung 24: Messung der biotin-ADP-Ribosylierung nach Vorinkubation von MD27 Hybridomzellen mit etheno-NAD oder NAD  | 55 |
| Abbildung 25: Autoradiographie einer Dünnschichtchromatographie nach Inkubation löslicher rekombinanter ART2.2 mit <sup>32</sup> P-NAD und Agmatin in Anwesenheit von Antikörpern gegen ART2.2 | 56 |

---

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 26: 1G4 Anfärbung von MD27 Zellen nach etheno-NAD Inkubation in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren  | 57 |
| Abbildung 27: Autoradiographie nach Inkubation von Zellen mit <sup>32</sup> P-NAD mit anschließender Präzipitation von P2X7                                      | 59 |
| Abbildung 28: Annexin V / PI Anfärbung von NAD behandelten T Zellen  | 60 |
| Abbildung 29: Inhibition der NAD und ATP induzierten Annexin V / PI Anfärbung durch P2X7 Immunsereum, etheno-NAD und KN62  | 61 |
| Abbildung 30: Annexin V / PI Anfärbung nach Behandlung von BALB/c T Zellen mit exogenem NAD sowie mit Erythrozytenlysaten und Jurkat-Zelllysaten                 | 63 |
| Abbildung 31: Verlust der Vitalität nach Inkubation von BALB/c T Zellen mit Erythrozytenlysaten, NAD, ATP und NAD/ATP Mischung                                   | 64 |
| Abbildung 32: L-Selectin (CD62L) Anfärbung nach Inkubation von Zellen mit NAD, ATP und etheno-NAD  | 66 |
| Abbildung 33: NAD und ATP induziertes L-Selectin Shedding nach Vorinkubation mit etheno-NAD  | 43 |
| Abbildung 34: ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Milzzellen der C57BL/6 Maus vor und nach Depletion der CD38 positiven Zellen                    | 69 |
| Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Milzzellen der NZW Maus vor und nach Depletion der CD38 positiven Zellen | 70 |
| Abbildung 36: Vergleich der ART-Aktivität auf CD8 positiven T Zellen von C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out Mäusen mit dem 1G4 Assay                             | 71 |
| Abbildung 37: Western Blot Analyse mit 1G4 nach etheno-NAD-Inkubation von Milzzellen aus C57BL/6 Wildtyp, NOD Wildtyp und NOD CD38 Knock-out Milzzellen          | 72 |
| Abbildung 38: Bioassay zum Vergleich des NAD-Verbrauchs von C57BL/6 Wildtyp mit CD38 Knock-out Zellen  | 74 |
| Abbildung 39: Einfluss von araF-NAD auf die ADP-Ribosylierung von C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out Zellen  | 75 |
| Abbildung 40: Einfluss von araF-NAD auf die ADP-Ribosylierung von Agmatin bei Wildtyp, CD38 Knock-out und ART2 Knock-out Zellen der BALB/c Maus                  | 76 |
| Abbildung 41: NAD und ATP induzierter Zelltod bei T Zellen der BALB/c Wildtyp und CD38 Knock-out Maus  | 77 |
| Abbildung 42: Vergleich der 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD-Inkubation von C57BL/6 und BALB/c Lymphozyten im FACS  | 80 |
| Abbildung 43: ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen des Hamsters  | 81 |
| Abbildung 44: Annexin V / PI Anfärbung von Hamster Lymphozyten nach Inkubation mit NAD und ATP   | 82 |
| Abbildung 45: 1G4 Anfärbung nach Inkubation von lymphatischen Zellen des Kaninchen mit etheno-NAD  | 83 |
| Abbildung 46: Bei Lymphozyten des Kaninchen lässt sich kein NAD induzierter Zelltod feststellen  | 84 |
| Abbildung 47: 1G4 Anfärbung von lymphatischen Zellen aus der Ratte nach Inkubation mit etheno-NAD  | 85 |
| Abbildung 48: 1G4 Anfärbung von humanen lymphatischen Zellen nach Inkubation mit etheno-NAD  | 85 |
| Abbildung 49: 1G4 Anfärbung von lymphatischen Zellen des Huhns   | 87 |
| Abbildung 50: ART-Aktivität und deren GPI-Verankerung von verschiedenen Lymphozytenpopulationen aus der Milz von Hühnern   | 88 |
| Abbildung 51: 1G4 Assay zum Screening von Hühner Zelllinien  | 89 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 52: GPI-Verankerung und DTT-Abhängigkeit der ART auf Hühnerzelllinie 855-19  | 89  |
| Abbildung 53: Hydrophobizitätsprofil beider Splice-Varianten der ART7 des Huhns  | 91  |
| Abbildung 54: Alignment der Proteinsequenzen der murinen ART1, ART2.1, ART2.2 sowie der ART7 vom Huhn                              | 92  |
| Abbildung 55: Alignment der Proteinsequenzen der murinen ART5 mit der ART8 vom Huhn  | 93  |
| Abbildung 56: Pulse-chase Analyse der ADP-Ribosylierung bei einer NZW Maus im 1G4 FACS Assay                                       | 95  |
| Abbildung 57: Einfluss von ARH und NPP Inhibitoren auf die Reversibilität der ADP-Ribosylierung                                    | 96  |
| Abbildung 58: Autoradiographie von Zelllysaten und Überständen von NZW T Zellen nach Inkubation mit 32P-NAD                        | 97  |
| Abbildung 59: 1G4-Anfärbung nach intravenöser Injektion von etheno-NAD   | 98  |
| Abbildung 60: 1G4 Anfärbung von Lymphozyten einer NOD Maus nach i.v. Applikation von etheno-NAD                                    | 99  |
| Abbildung 61: Zeitlicher Verlauf der 1G4 Anfärbung nach intravenöser Applikation von etheno-NAD bei C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen. | 101 |
| Abbildung 62: Errechnete 3D-Darstellung der murinen ART2.1   | 106 |
| Abbildung 63: Schematische Darstellung der möglichen direkten und Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch ADP-Ribosylierung       | 109 |
| Abbildung 64: Durch Elimination von naïven bystander T Zellen könnte NAD den Organismus von Autoimmunreaktionen beschützen         | 121 |
| Abbildung 65: Model der Modifikation von Zelloberflächenproteinen auf T Zellen durch in vivo freigesetztes NAD                     | 122 |

## Zusammenfassung

Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf ein Zielproteinen übertragen. Bekanntermaßen hemmen z.B. Cholera- und Pertussistoxin die Signaltransduktion in Wirtszellen durch ADP-Ribosylierung von G-Proteinen. Ziel dieser Arbeit ist, toxin-verwandte ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, die durch Modifikation von Membranproteinen elementare Zellfunktionen beeinflussen, näher zu charakterisieren. Eine zentrale Rolle spielt bei diesen Untersuchungen ein hier neu etablierter Antikörper-basierter Assay zum Nachweis von ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche. Mit diesem Assay können etheno-ADP-ribosylierte Membranproteine nach Inkubation von vitalen Zellen mit etheno-NAD mit dem monoklonalen etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper 1G4 in FACS-Analysen, in der Immunfluoreszenzmikroskopie und im Western Blot detektiert werden. Analysen der Dosis-Wirkungs-Beziehung und der Kinetik mit ART-transfizierten Lymphomzellen und bei primären Lymphozyten zeigten eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen mikromolaren etheno-NAD-Konzentrationen und eine Sättigung der Reaktion innerhalb weniger Minuten.

Mit dem P2X7 Purinozeptor wurde ein wichtiges Zielprotein der ART2 auf murinen T Zellen identifiziert. Die Aktivierung von P2X7 durch ADP-Ribosylierung induziert die zelluläre Apoptose. Dieser sogenannte NAD-induzierte Zelltod konnte mit endogenem NAD, das von lysierten Zellen freigesetzt wird, ausgelöst werden.

Es wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die Verfügbarkeit von extrazellulärem NAD als Substrat für ART2 durch enzymatischen Abbau des NADs begrenzt wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die von B Zellen exprimierte NADase CD38 in der Tat den Grad der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf T Zellen beeinflusst.

Ferner konnte mit dem 1G4-basierten Assay die Verteilung von ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen verschiedener Spezies bestimmt werden. Bei *in silico* Untersuchungen wurden zudem bisher unbekannte Vertreter der ART-Familie bei Hühnern entdeckt, die wahrscheinlich Verwandte der Säuger-ART1 bzw. ART5 sind.

In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob die ADP-Ribose-Gruppe von Membranproteinen vollständig oder teilweise entfernt wird, z.B. durch ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPPs). Bei murinen T Zellen konnte *in vitro* ein Rückgang der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden, der sich mit Inhibitoren der ARHs und NPPs hemmen ließ. Nach intravenöser Applikation von etheno-NAD bei Mäusen wurde auch *in vivo* reversible etheno-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf T Zellen in FACS-Analysen detektiert.

Zusammengenommen, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass NAD als „danger-signal“ wirkt und bei Entzündungsreaktionen freigesetzt wird, um die ungewollte Aktivierung von naïven „bystander“ T Zellen zu verhindern.

## Abstract

ADP-ribosylation is the transfer of the ADP-ribose moiety from NAD to target proteins. It is well known as the action of mechanism of several bacterial toxins. Cholera- and Pertussis-toxin inhibit intracellular signal transduction by ADP-ribosylation of G-proteins. The aim of this study was to investigate the action of toxin-related ADP-ribosyltransferases (ARTs) on the cell surface of lymphocytes that influence important cellular functions by modification of membrane proteins in more detail.

An antibody-based assay that allows detection of cell surface ADP-ribosylation was established. Upon incubation of vital cells with etheno-NAD, cell surface etheno-ADP-ribosylation of membrane proteins can be detected with monoclonal antibody 1G4 in FACS analysis, immunofluorescence microscopy, and Western blot analysis. Studies of dose-responses and kinetics with ART-transfected cells and primary lymphocytes revealed a maximal velocity of reaction at low micromolare etheno-NAD concentrations and saturation of reaction within a few minutes.

The P2X7 purinoceptor was identified as an important target protein of ART2 on murine T cells. Activation of P2X7 by ADP-ribosylation induces cellular apoptosis. Endogenous NAD that was liberated by lysis of cells was also sufficient to trigger this so called NAD-induced cell death.

Another aim of this study was to investigate if and how availability of the ART2-substrate NAD is limited by enzymatic degradation of extracellular NAD. It was shown that the membrane bound NADase CD38 expressed by B cells could, indeed, influence the level of cell surface ADP-ribosylation of T cells.

The 1G4-based assay was used to determine the distribution of ART-activity on lymphatic cells of different species. Furthermore, *in silico* experiments revealed hitherto unknown members of the ART family in chicken that probably are related to mammalian ART1 and ART5.

In addition the question was raised if the ADP-ribose moiety could be cleaved completely or in parts from membrane proteins, for example by ADP-ribosylhydrolases (ARHs) and nucleotide-pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs). Reduction of cell surface ADP-ribosylation could be detected *in vitro* on murine T cells. This reduction could be blocked by inhibitors of ARHs and NPPs. Reversible etheno-ADP-ribosylation could also be detected *in vivo* on the cell surface of murine T cells upon intravenous application of etheno-NAD.

Taken together, these results support the hypothesis of NAD as a “danger-signal” that is released from damaged cells during inflammation and that suppresses the activation of naïve “bystander” T cells.

---

Schlagwörter: ADP-Ribosyltransferasen, ART, NAD, etheno-NAD, araF-NAD, NADase, CD38, CD296, CD297, ADP-Ribosylhydrolasen, ARH, Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen, NPPs, Apoptose, Immunregulation, T Zellen, P2X7

Keywords: ADP-ribosyltransferases, ART, NAD, etheno-NAD, araF-NAD, NADase, CD38, CD296, CD297, ADP-ribosylhydrolases, ARHs, nucleotide-pyrophosphatases/phosphodiesterases, NPPs, apoptosis, immunoregulation, T cells, P2X7

## Abkürzungsverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| ADP-Ribose | Adenosin-Di-Phospho-Ribose  |
| AESBF      | 4-(2-Aminoethyl)Benzen-Sulfonyl-Fluorid                                     |
| ATP        | Adenosintriphosphat   |
| biotin-NAD | 6-biotin-17-NAD   |
| BSA        | bovine-serum-albumin  |
| cADPR      | zyklische ADP-Ribose  |
| CD         | Cluster of Differentiation  |
| DC         | Dünnschichtchromatographie  |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure  |
| DTT        | Dithiothreitol  |
| ECL        | Enhanced Chemiluminiscent   |
| EDTA       | Disodium Ethylenediamin-Tetraacetat   |
| EST        | Expressed sequence tag  |
| EtBr       | Ethidium Bromid   |
| etheno-NAD | Nikotinamid-1,N6-Etheno-Adenin-Dinukleotid                                  |
| FACS       | Fluorescence-activated cell sorter  |
| FCS        | Fetal calf serum  |
| FITC       | Fluorescein   |
| FSC        | Forward scatter   |
| G418       | Geneticin-Disulfat  |
| GPI        | Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol  |
| HRP        | Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)                             |
| IDDM       | insulinabhängiger Diabetes mellitus   |
| Ig         | Immunglobulin   |
| Igepal     | (Oktylphenoxy)-Polyethoxyethanol  |
| KN62       | 1-(N,O-bis[5-isoquinolinesulphonyl]-N-methyl-L-tyrosyl)-4-phenylpi perazine |
| KO         | Knock-out   |
| LDS        | lithium-dodecyl-sulfate   |
| LK         | Lymphknoten   |
| M          | Konzentrationsangabe (mol/l)  |
| MES        | 2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid  |
| MHC        | Major Histocompatibility Complex  |
| Min        | Minuten   |
| MOPS       | 3-(N-morpholino)propane sulfonic acid                                       |
| MTT        | Dimethylthiazol-Dephenyltetrazolium-Bromid                                  |
| NAD        | Nikotinamid Adenin Dinukleotid  |
| NADase     | NAD-Glykohydrolase  |
| NC         | Nitrozellulose  |
| NGD        | Nikotinamid-Guanidin-Dinukleotid  |
| NHD        | Nikotinamid-Hypoxanthin-Dinukleotid   |
| NICD       | „NAD induced cell death“, NAD induzierter Zelltod                           |
| NK Zelle   | „natural killer“ Zelle (natürliche Killerzelle)                             |
| PARP       | Poly-ADP-Ribosyltransferasen  |
| PBL        | Periphere Blut Lymphozyten  |
| PBS        | Phosphate-Buffered-Saline   |
| PE         | Phycoerythrin   |
| PES        | Penazin-Ethosulfat  |
| PFA        | Paraformaldehyd   |
| PI         | Propidiumiodid  |

|          |  |
|----------|--|
| PI-PLC   | Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen |
| PO       | Peroxidase                                       |
| PVDF     | Polyvinylidendifluorid                           |
| SA       | Streptavidin                                     |
| SDS      | Sodium-Dodecyl-Sulfat                            |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese             |
| slg      | Zelloberflächenimmunglobuline (surface Ig)       |
| SSC      | Side scatter                                     |
| TBS      | Tris-Buffered Saline                             |
| TE       | Tris-EDTA  |

## Anglizismen

|                     |  |
|---------------------|--|
| Buffy coat          | Leukozytenfilm nach der Zentrifugation von Blut  |
| Bystander T Zellen  | Antigen-unspezifische T Zellen, die sich in der Nähe einer Immunreaktion von Antigen-spezifischen T Zellen aufhalten                       |
| Blebbing            | Auflösen einer Zelle durch Bildung von Zellmembranvesikeln   |
| Dot Plot            | Punktwolken-Darstellung von zwei Parametern bei FACS-Analysen  |
| Flag-tag            | Aminosäuresequenz (DYKDDDDK), die zur Markierung rekombinanter Proteine verwendet wird, und an die ein monoklonaler Antikörper (M2) bindet |
| Gaten, Gate setzen  | Eingrenzung einer Zellpopulation bei FACS-Analysen   |
| Histogram Plot      | Histogramm-Darstellung eines Parameters bei FACS-Analysen  |
| Homing, Trafficking | Wanderungsverhalten von Leukozyten im Organismus   |
| Knock-out           | Ausschaltung eines Gens in der Keimbahn  |
| Missense Mutation   | Mutation eines DNA-Basentriplets, die einen Aminosäureaustausch ergibt   |
| Panning             | Zellen eines bestimmten Phänotyps in einer Petri-Schale auffangen, aus dem Englischen von Goldschürfen (engl. pan, Pfanne)                 |
| Screenen, Screening | Durchmusterung   |
| Shedding            | Abschneiden von Zelloberflächenproteinen und deren Freisetzung in den Zellüberstand  |
| Splice              | Verknüpfen (Spleißen) der Exone auf RNA-Ebene  |
| Stop-Codon          | Basentriplet, das das Signal für den Abbruch der Translation vermittelt  |

## 1 Einleitung

Der tierische und menschliche Organismus muss sich ständig mit Krankheitserregern wie Bakterien und Viren auseinandersetzen. Dazu verfügen höher entwickelte Lebewesen über ausgeklügelte Mechanismen, um diese Erreger aufzuspüren bzw. zu eliminieren. Wichtig ist dabei auch, dass der Organismus zwischen „Fremd“ und „Selbst“ unterscheiden kann, damit nicht körpereigene Strukturen Ziel der Immunreaktion werden. Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), die durch Modifikation von Zelloberflächenproteinen zur Inaktivierung von Lymphozyten führen und so zur Feinsteuerung des Immunsystems beitragen.

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem höherer Lebewesen setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Eine gebräuchliche Einteilung gliedert die Körperabwehr in einen zellulären und einen löslichen, humoralen Anteil. Der zelluläre Anteil setzt sich zusammen aus Granulozyten, Makrophagen, NK Zellen, T und B Lymphozyten. Der humorale Anteil besteht aus im Plasma gelösten Proteinen. Diese sind hauptsächlich Antikörper und die Proteine des Komplementsystems (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000; Janeway *et al.* 2001).

|                                  | <i>zellulär</i>                      | <i>humoral</i>   |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| <i>angeborenen, unspezifisch</i> | Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen | Komplementsystem |
| <i>erworben, spezifisch</i>      | B Zellen, T Zellen                   | Antikörper       |

**Tabelle 1: Aufteilung des Immunsystems in zelluläres und humorales Kompartiment sowie in angeborene, unspezifische und erworbene, spezifische Abwehr.**

Man fasst die Granulozyten, Makrophagen und das Komplementsystem als angeborenen und unspezifischen Teil des Immunsystems zusammen. Dieser ist schon von Geburt an vorhanden und ohne vorherigen Kontakt mit einem spezifischen Erreger voll funktionsfähig (Medzhitov and Janeway 2000; Medzhitov and Janeway 2000). Nach dem ersten Kontakt mit Erregern hat das Immunsystem die Fähigkeit, sich spezifisch auf diese einzustellen. Zu diesem spezifischen Teil des Systems gehören B Zellen mit den von ihnen synthetisierten Antikörpern sowie T Zellen mit ihrem membranständigen T Zellrezeptor (TCR). T Zellen lassen sich in T Helferzellen und T Killerzellen unterteilen (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000).

Natürlich ergänzen sich das unspezifische und das spezifische Immunsystem, und beide lassen sich nicht vollständig voneinander trennen. So kann z. B. das Komplementsystem von Antikörpern aktiviert werden (Carroll 2004). B Zellen und T Zellen benötigen die Hilfe von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, um aktiviert zu werden (Scholl and Geha 1994).

#### 1.1.1 Produktion von Antikörpern durch B Zellen

Antikörper werden von B Zellen produziert. Bei der Reifung dieser Lymphozyten wird durch ein ausgeklügeltes System die Spezifität der Antikörper bestimmt und in der DNA der einzelnen Zelle fest

verankert (Feeney *et al.* 2000). So erkennt jede Zelle und alle ihre Nachkommen nur ein spezifisches Antigen. Bei Säugetieren findet die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark statt. Bei Vögeln werden die Zellen in der *Bursa fabricii* gebildet, dieser Drüse verdanken die B-Lymphozyten auch ihren Namen (Weill and Reynaud 1992). In dieser Arbeit wurden unreife Zellen aus dem Knochenmark von Säugetieren und aus der Bursa von Vögeln untersucht.

Die Bindung von Antikörpern an Pathogene führt zur Phagozytose der Erreger oder zur Aktivierung des Komplementsystems, welches dann über den Membranangriffskomplex die Zellmembran des Erregers perforiert (Janeway *et al.* 2001). Antikörper stellen zudem aber auch ein wichtiges Werkzeug in der Proteinbiochemie und Immunologie dar (Bierer 2004). Nach einer Immunisierung enthält das Serum von Tieren eine Reihe von Antikörpern, die an verschiedene Epitope binden. Man spricht von Immunsereen (IS), in denen sich polyklonale Antikörper befinden. Um Antikörper produzierende Zellen zu kultivieren, werden B Zellen aus der Milz eines immunisierten Tiers *in vitro* mit Lymphomzellen fusioniert. Die dabei entstehenden Hybridomzellen können für unbestimmte Zeit in Kultur gehalten werden und geben dabei Immunglobuline in das Kulturmedium ab. Jede Hybridomzelle und ihre Nachkommen produzieren nun Antikörper mit genau der gleichen Spezifität für ein Antigen; solche Antikörper werden als monoklonal bezeichnet. Viele Experimente dieser Arbeit werden durch die Verwendung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern ermöglicht (Bierer 2004). Die Bindung des Antikörpers an das Antigen kann durch verschiedene immunologische Methoden wie Immunofluoreszenzmikroskopie, Western Blot und FACS-Analysen nachgewiesen werden (Bierer 2004).

### 1.1.2 Bedeutung von T Zellen im Immunsystem

T Zellen haben im Immunsystem hauptsächlich zwei Aufgaben. Zum einen unterstützen T-Helferzellen die Aktivierung von B Zellen und Makrophagen bei der Abwehr von Pathogenen. Zum anderen können zytotoxische T Zellen körpereigene Zellen eliminieren, die von einem Virus infiziert oder zu Tumorzellen entartet sind (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000).

#### *Reifung der T Zellen im Thymus*

T Zellen entwickeln sich im Thymus, daher kommt auch der Name (T wie Thymus). Während ihres Reifungsprozess bildet jede T Zelle ihren eigenen T Zellrezeptor (TCR) aus. Mit diesem TCR kann die T Zelle später Antigene erkennen, die ihr auf MHC-Rezeptoren präsentiert werden (Nikolich-Zugich *et al.* 2004). Durch positive und negative Selektion im Thymus wird gewährleistet, dass nur die Zellen den Thymus verlassen, die keine körpereigenen Antigene erkennen und zusätzlich über den TCR suffizient stimuliert werden können (von Boehmer *et al.* 2003). Autoaggressive T Zellen werden hier durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, eliminiert (siehe Kapitel 1.5). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Reihenfolge der Expression von Zelloberflächenantigen während der Zellreifung. Nachdem Zellen mit dem Reifungsprozess beginnen, exprimieren sie zunächst sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Zelloberfläche. Im Verlauf ihrer Entwicklung wird dann festgelegt, ob sie

als CD4 positive T-Helferzellen oder als CD8 positive zytotoxische T Zellen den Thymus verlassen (Germain 2002). In einer späten Phase der Entwicklung im Thymus bilden die Zellen dann auch das CD3 Antigen, durch dieses werden bei Untersuchungen des Thymus in dieser Arbeit reife von unreifen Thymozyten unterschieden (Leclercq and Plum 1996). Die Expression der ADP-Ribosyltransferase 2 (ART2) erfolgt bei der Maus hauptsächlich auf diesen reifen T Zellen (Koch-Nolte *et al.* 1999).

### *Interaktion von T Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen*

Reife T Zellen können nun Antigene erkennen, die Ihnen auf MHC-Rezeptoren präsentiert werden. CD4 positive T-Helferzellen reagieren mit MHC-Molekülen der Klasse II, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie B Zellen und Makrophagen exprimiert werden (Holling *et al.* 2004). Die CD8 positiven zytotoxischen T Zellen erkennen Antigene, die von MHC Klasse I Molekülen auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden (Alexander-Miller 2005). Die Interaktion zwischen den Zellen verläuft im Prinzip so, dass die T Zellen über Zellinteraktionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 an die APC andocken (Anderson and Siahhaan 2003). Wenn der TCR das vom MHC-Rezeptor präsentierte Antigen erkennt, wird die Bindung zwischen LFA-1 und ICAM-1 stabilisiert, und die Zelloberflächenproteine der Zellen ordnen sich in auf bestimmte Weise an. Dabei bildet sich ein äußerer Ring aus LFA-1 und ICAM-1 um einen Komplex aus den Zellinteraktionsmolekülen wie TCR, MHC und CD4 oder CD8. Wichtig ist dabei auch die Interaktion von sog. kostimulatorischen Molekülen (CD28) und den B7 Molekülen (CD80 und CD86), die ein zweites für die Aktivierung der T Zelle essentielles Signal vermitteln. Diese Formation von interagierenden Membranproteinen zwischen T Zelle und APC wird in Analogie zur Interaktion von Nervenzellen auch als immunologische Synapse bezeichnet (Dustin and Shaw 1999; Janeway *et al.* 2001; Sims and Dustin 2002). ARTs modifizieren unter anderem Proteine, die an der Bildung dieser immunologischen Synapse beteiligt sind (CD8, LFA-1) (Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998).

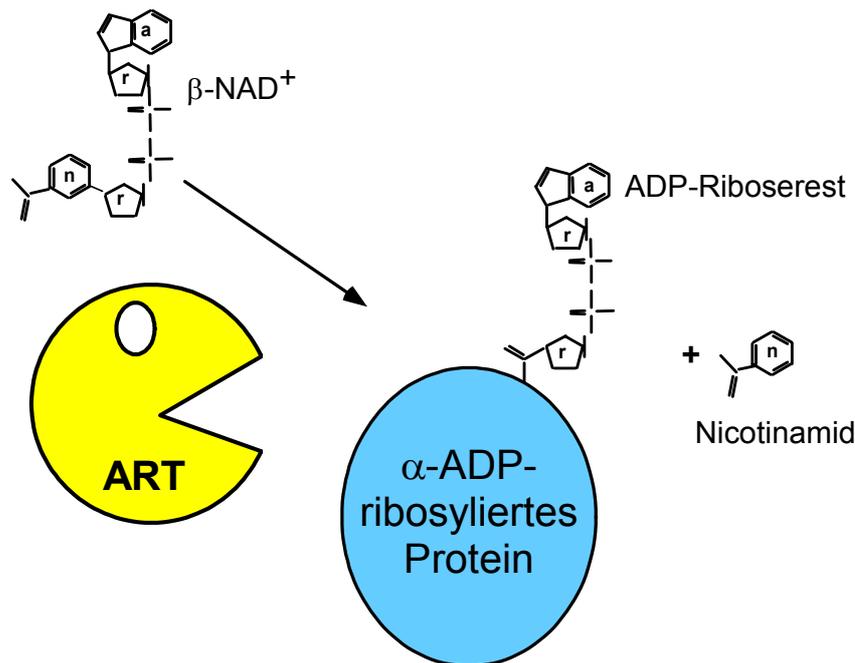
## 1.2 ADP-Ribosylierung

Die vorliegende Dissertation befasst sich hauptsächlich mit ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) auf der Zelloberfläche von T Zellen. Im Folgenden soll zunächst die von ARTs katalysierte Reaktion dargestellt werden. Des Weiteren wird auch ein Überblick über verschiedene ARTs und ihre Bedeutung bei Pro- und Eukaryonten gegeben.

### 1.2.1 Die enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung

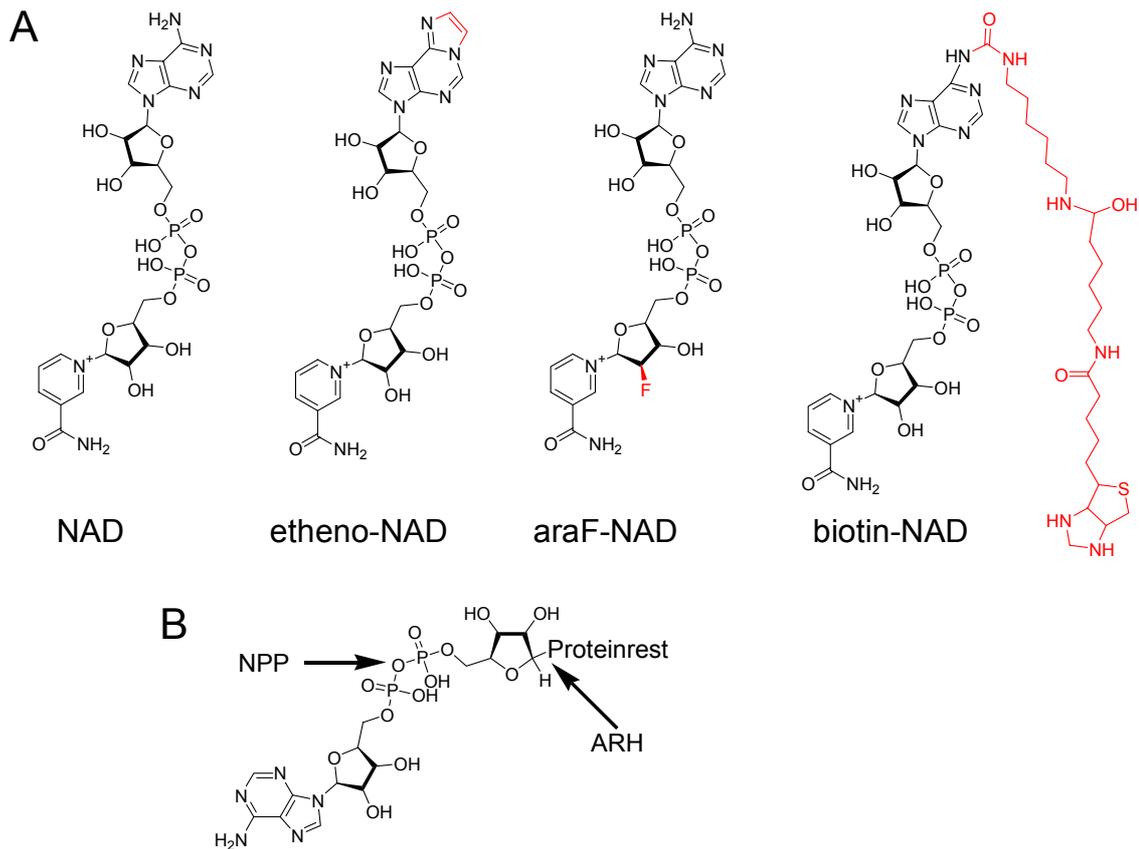
ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation, bei der die ADP-Ribose-Gruppe von  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> auf ein spezifisches Zielprotein übertragen und Nicotinamid freigesetzt wird (Althaus and Richter 1987; Jacobson and Jacobson 1989; Aktories 1991). Als Zielaminosäuren der ADP-Ribosylierung dienen Arginin, Zystein, Asparagin und Diphthamid (modifiziertes Histidin) (Haag and Koch-Nolte 1997). **Abbildung 1** demonstriert die Reaktion schematisch. Auf Grund ihrer Pacman-ähnlichen dreidimensionalen Struktur, die sowohl für einige bakterielle Toxine als auch für

die ART2 der Ratte (RT6) bestimmt wurde, werden die ARTs als Pacman dargestellt (Choe *et al.* 1992; Sixma *et al.* 1993; Stein *et al.* 1994; Mueller-Dieckmann *et al.* 2002). Interessanterweise begann die Geschichte der modernen Immunologie mit einer mono-ADP-Ribosyltransferase, dem Diphtherietoxin. Emil von Behring wusste allerdings noch nichts von der Enzymaktivität, als er Pferde immunisierte und mit dem Serum dieser Tiere die Diphtherie erfolgreich behandelte (Janeway *et al.* 2001). Neben der Modifikation von Aminosäuren in anderen Proteinen ist auch die Automodifikation der ARTs beschrieben (Haag *et al.* 1995; Braren *et al.* 1998). Einige ARTs zeigen neben der Transferaseaktivität auch eine NADase-Aktivität, bei der die ADP-Ribose-Gruppe formell auf die Hydroxylgruppe von Wasser übertragen wird (Koch-Nolte *et al.* 1996).



**Abbildung 1: ADP-Ribosylierung.** Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe von  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> auf das Zielprotein übertragen und dabei Nicotinamid freigesetzt. Der ADP-Ribose-Rest steht an der ADP-ribosylierten Aminosäure in Alpha-Stellung. Die ADP-Ribosyltransferase wird auf Grund ihrer 3D-Struktur als Pacman dargestellt.

Neben den mono-ADP-Ribosyltransferasen, die nur eine ADP-Ribosegruppe auf das Zielprotein übertragen, gibt es auch poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARP) (Koch-Nolte and Haag 1997; Ame *et al.* 2004). Von diesen wird ein Glutamat-Rest ADP-ribosyliert und dann die 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe der ADP-Ribose als Polymerisationskeim benutzt (Ruf *et al.* 1998). PARPs kommen im Zellkern vor und modifizieren verschiedene Proteine, die DNA binden oder erkennen. So können PARPs die DNA-stabilisieren und Tumorgenese unterdrücken (Oei *et al.* 1997; Tong *et al.* 2001; Ame *et al.* 2004).



**Abbildung 2: Strukturformeln von NAD und den hier verwendeten Analoga etheno-NAD, biotin-NAD und araF-NAD sowie der Angriffspunkt von verschiedenen Enzymen am  $\alpha$ -ADP-Ribosyl-Rest. (A)** Die Abbildung zeigt die chemischen Strukturformeln von NAD, etheno-NAD, araF-NAD und biotin-NAD. Bei den NAD Analoga wurden die von NAD abweichenden Strukturen rot eingefärbt. **(B)** Dargestellt ist die Strukturformel der der ADP-Ribose-Gruppe in alpha-Stellung am Zielprotein. Die Pfeile deuten auf den Angriffspunkt der ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPP).

### 1.2.2 ADP-Ribosyltransferasen bei Prokaryonten

Die erste bekannte ADP-Ribosyltransferase war das Diphtherietoxin. Schon Paul Ehrlich und Emil von Behring immunisierten Pferde mit dem Toxin und konnten so Antiserum gewinnen, mit dem vielen an Diphtherie Erkrankten das Leben gerettet werden konnte. Damals hatte man jedoch keine Kenntnis von den molekularen Zusammenhängen. Für diese Arbeiten erhielt von Behring 1901 den ersten Nobel Preis in Medizin. Erst lange Zeit später wurde gezeigt, dass Diphtherietoxin durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor 2 diesen inaktiviert und die Proteinbiosynthese unterbindet (Honjo *et al.* 1968; Tweten *et al.* 1985; Wilson *et al.* 1990). Auch das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* inaktiviert so den Elongationsfaktor 2 (Lukac and Collier 1988; Wick *et al.* 1990; Wick *et al.* 1992).

Eine Reihe anderer bakterieller Toxine wirken ebenso über ADP-Ribosylierung von Proteinen im Zytoplasma des Wirtsorganismus. Unterschiedliche G-Proteine werden von Cholera toxin, Pertussis toxin, dem hitzlabilen Enterotoxin von *Escherichia coli* (Moss *et al.* 1979; Gierschik 1992; Passador and Iglewski 1994), dem C3 Toxin von *Clostridium botulinum* und dem Exoenzym S von *Pseudomonas aeruginosa* (Aktories *et al.* 1992; Knight and Barbieri 1997; Ganesan *et al.* 1998) ADP-

ribosyliert.

Einige bakterielle Toxine ADP-ribosylieren das zytoskelettale Aktin ihres Wirts. Dazu gehören das C2 Toxin von *Clostridium botulinum* (Aktories *et al.* 1986), ein Toxin von *Clostridium spiroforme* (Popoff and Boquet 1988), ein Toxin von *Clostridium difficile* (Popoff and Boquet 1988), das Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* (Schering *et al.* 1988) und das VIP2 Toxin von *Bacillus cereus* (Sakurai *et al.* 2003). Auch das SpvB Gen auf dem *Salmonella enterica* Virulenzplasmid kodiert für eine ADP-Ribosyltransferase, die Aktin modifiziert und so die Aktinpolymerisation stört (Otto *et al.* 2000; Tezcan-Merdol *et al.* 2001).

### 1.2.3 Überblick über die ADP-Ribosyltransferasen höherer Lebewesen

ADP-Ribosylierung lässt sich auch bei Zellen von Vertebraten nachweisen. So wurde bisher ART-Aktivität auf Muskelzellen (Kharadia *et al.* 1992; Zolkiewska *et al.* 1992; McMahon *et al.* 1993), Lymphozyten (Wang *et al.* 1996), neutrophilen Granulozyten (Allport *et al.* 1996), Makrophagen (Hauschildt *et al.* 1994; Pellat-Deceunynck *et al.* 1994), Thrombozyten (Del Principe *et al.* 1986), Fibroblasten (Korohoda *et al.* 1994), Neuronen (Schuman *et al.* 1994), Hepatozyten (Mowbray and Hardy 1996) und Tumorzellen (Tang *et al.* 1995) mit Hilfe von radioaktivmarkiertem  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> nachgewiesen.

Passend zur Enzymaktivität wurden zunächst eine ART aus dem Skelettmuskel des Kaninchens (Zolkiewska *et al.* 1992) und eine ART aus dem Knochenmark des Huhns (Tsuchiya *et al.* 1994) molekular charakterisiert. Seither wurde eine ganze Enzymfamilie kloniert (Glowacki *et al.* 2002). Die Proteine wurden in einer einheitlichen Nomenklatur zusammengefasst (ART1-8). Seit kurzem sind ART1 (CD296) und ART4 (CD297) auch in der CD-Nomenklatur bedacht. ART1-4 sind GPI-verankerte Zellmembranproteine, bei ART5-8 handelt es sich um sezernierte Proteine. Während ART1-5 in verschiedenen Geweben bei Säugetieren gefunden werden, werden die ART6-8 von Hühnern gebildet (Glowacki *et al.* 2002). Neben ART2 (siehe Kapitel 1.2.4) wird von Zellen des Immunsystems auch ART4 exprimiert (Hauschildt *et al.* 1994; Pellat-Deceunynck *et al.* 1994; Glowacki *et al.* 2002).

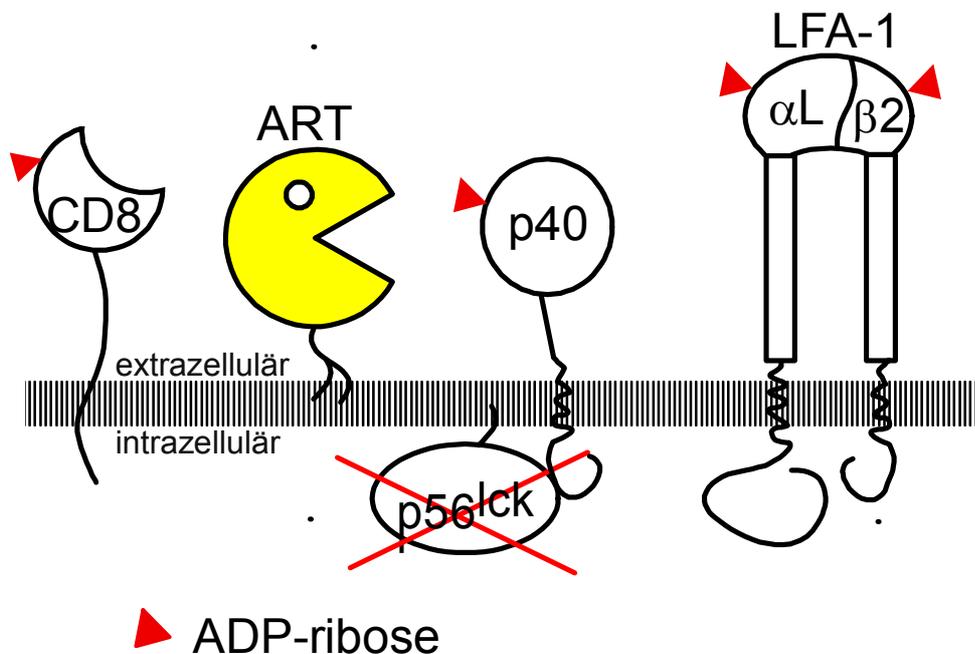
### 1.2.4 Rolle der ART2 im Immunsystem

Ursprünglich wurde die ART2 bei der Ratte entdeckt. Es handelt sich dabei um ein auch als RT6 bekanntes T Zelloberflächenprotein, dessen Funktion lange Zeit unbekannt war (Koch-Nolte *et al.* 1996; Thiele *et al.* 1997). Bei der Ratte existieren auf Chromosom 1 zwei Allele der ART2, namentlich ART2A und ART2B (Butcher *et al.* 1979). Die Ratten-ART2A hat eine NADase-Aktivität, es konnte jedoch noch keine Transferaseaktivität für sie nachgewiesen werden. Die ART2B der Ratte zeigt neben der NADase-Aktivität auch eine Arginin-spezifische Automodifikation (Haag *et al.* 1995; Glowacki *et al.* 2002). Bei der Maus existieren auf Chromosom 7 zwei ART2 Gene (ART2.1 und ART2.2) die durch Genduplikation entstanden sind. Beide Gene teilen eine 80 %

Nukleotidsequenzidentität (Hollmann *et al.* 1996; Koch-Nolte *et al.* 1996). Das Gen der humanen ART2 liegt als Einzelkopie auf Chromosom 11 (11q13) (Koch-Nolte *et al.* 1993). Das Leseraster dieses Gens enthält drei vorzeitige Stop-Codons, so dass es sich bei der humanen ART2 um ein Pseudogen handelt, das nicht exprimiert wird (Koch-Nolte *et al.* 1993; Haag *et al.* 1994).

Die ART2 Proteine sind GPI-verankerte Zelloberflächenproteine. Bei der GPI Verankerung wird das Protein bei der Proteinsynthese kovalent an Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol gebunden und so an der Zellmembran fixiert (Haag 1996; Okazaki *et al.* 1996). Northern Blot und RT-PCR Analysen konnten zeigen, dass ART2.1 und ART2.2 bei der Maus vorwiegend von T Zellen gebildet werden. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Maus-ART2.2 (Nika102) konnte später gezeigt werden, dass ART2.2 hauptsächlich auf der Zelloberfläche von reifen T Zellen zu detektieren ist. CD4 positive Lymphknotenzellen der C57BL/6 Maus exprimieren zu 70 % ART2.2, CD8 positive zu 95 % (Koch-Nolte *et al.* 1999; Kahl *et al.* 2000). Mit Hilfe der ART2 Doppelknock-out Maus konnte gezeigt werden, dass ART2 die einzige ART-Aktivität auf murinen T Zellen ist (Ohlrogge *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird der Zusammenhang von ART2 Expression und ART-Aktivität näher untersucht.

ARTs modifizieren eine Reihe von Zelloberflächenproteinen, dazu gehören das Integrin LFA-1 (Nemoto *et al.* 1996), CD27, CD43, CD44, CD45 (Okamoto *et al.* 1998), und ein Protein (p40), das vermutlich eine Rolle bei der T Zellaktivierung spielt (**Abbildung 3**) (Wang *et al.* 1996; Wang *et al.* 1997; Liu *et al.* 1999). Die ADP-Ribosylierung dieser Zielproteine schränkt die Proliferation der T Zellen ein und hemmt ihre Adhäsion an Zielzellen, ihre Zytotoxizität, ihre Zytokinsekretion sowie die Immunreaktion vom Spättyp (Wang *et al.* 1994; Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998).



**Abbildung 3: Zielproteine der ARTs auf der Zelloberfläche von T Zellen.** Die ADP-Ribosyltransferase-2 (ART2), hier als Pacman dargestellt, katalysiert die ADP-Ribosylierung von Argininresten in Zelloberflächenproteinen auf T Zellen. Zu den Zielproteinen zählen neben LFA-1, CD8 und Protein p40 auch CD27, CD43, CD44 und CD45 (nicht abgebildet).

### 1.2.5 Expression der ART2 bei verschiedenen Mausmodellen

Eine Reihe von verschiedenen Mausstämmen wurde auf die Expression von ART2 auf Lymphozyten untersucht (Koch-Nolte *et al.* 1999). Dabei zeigten sich einige Unterschiede in dem Expressionsniveau der beiden ART2 Gene ART2.1 und ART2.2. Bei der NOD Maus findet bei der T Zell Entwicklung eine verzögerte Expression von ART2.2 auf T Zellen statt. Die NZW Maus ist ein natürlicher Knock-out für ART2.2 (Koch-Nolte *et al.* 1995; Matthes *et al.* 1997), während bei C57BL/6 und BxSB Mäusen das ART2.1 ausgeschaltet ist (Kanaitzuka *et al.* 1997; Matthes *et al.* 1997). Bei Zellen der BALB/c Maus wird ART2 relativ schwach exprimiert (Koch-Nolte *et al.* 1999). Diese Stämme zeigen eine gewisse Neigung zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Die BxSB Maus entwickelt spontan eine Lupus-ähnliche Glomerulonephritis, eine entsprechende Pathologie entwickelt sich auch bei der F1 Generation nach einer Kreuzung von NZW und NZB Mäusen (sog. NZWxB F1 Tiere) (Helyer and Howie 1963). Für C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurde in hohem Alter eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung von autoreaktiven Antikörpern nach Immunisierung mit Pneumokokken-Antigenen festgestellt (Borghesi and Nicoletti 1994).

In dieser Dissertation wurden verschiedene Inzuchtstämme von Mäusen verwendet, die alle einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen (**Tabelle 3**). NZW Mäuse (New Zealand White), die nur als Wildtyp Mäuse zur Verfügung standen, sind weiße Mäuse, die im hohen Lebensalter zur Ausbildung von anti-DNA Antikörpern und einer Nephritis neigen (Kelley and Winkelstein 1980; Koch-Nolte *et al.* 1995; Matthes *et al.* 1997). BALB/c Mäuse sind Tiere mit weißem Fell, die vermehrt Plasmozytome und Mammatumore bilden (Heston and Vlahakis 1971). Der C57BL/6 Mausstamm ist der am weitesten verbreitete Inzuchtstamm. Er wurde als DNA-Quelle zur Sequenzierung des Mausgenoms verwendet (Waterston *et al.* 2002). C57BL/6 Mäuse, die zur Ausbildung von Artherosklerose, Typ 2 Diabetes mellitus und anderen Erkrankungen neigen (Ishida *et al.* 1991). ART2 Knock-out und CD38 Knock-out standen für diese Arbeit auf dem C57BL/6, BALB/c und dem NOD Hintergrund zur Verfügung (**Tabelle 3**). Auf die Anfälligkeit der NOD Mäuse (non-obese diabetic) für Diabetes mellitus Typ I wird ein Kapitel 1.6 eingegangen.

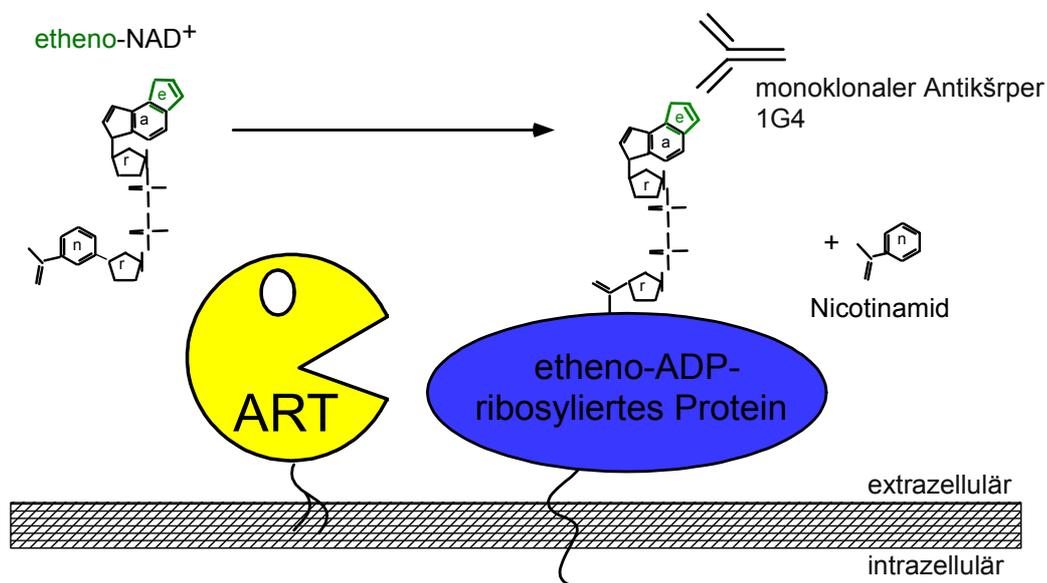
### 1.2.6 Nachweis der ADP-Ribosylierung mit etheno-NAD und dem monoklonalen Antikörper 1G4

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen stehen Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren zur Verfügung, die die Arbeit auf diesem Gebiet enorm erleichtert und bereichert haben. Für die Untersuchung der ADP-Ribosylierung stand bisher kein vergleichbares Werkzeug zur Verfügung. Santella stellte eine Reihe von Antikörpern her, die an modifizierte DNA binden sollten. Dazu gehörte auch ein Antikörper (1G4), der an etheno-Adenosinreste in der DNA, die durch Einwirkung von Anilin entstehen, bindet (Young and Santella 1988). Die etheno-Adenosin Gruppe kommt ebenfalls bei dem NAD-Analogon etheno-NAD vor (siehe **Abbildung 2**). Eine andere Arbeitsgruppe bediente sich dieses Antikörpers und etheno-NAD, um die Aktivität der poly-ADP-Ribosyltransferase (PARP) nach Übertragung der etheno-ADP-Ribose auf Zielproteine zu

untersuchen. Hier wurde der 1G4 Antikörper erfolgreich bei *in situ* Färbungen eingesetzt (Davis *et al.* 1998).

Da sich der Antikörper bewährt hatte, um poly-ADP-Ribosylierung nachzuweisen, wurden von unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen angestrebt, bei denen die mono-ADP-Ribosyltransferasen erforscht werden sollten. In einigen Vorversuchen eignete sich der Antikörper in FACS Untersuchungen von ART-exprimierenden vitalen Zellen. Die Hybridomzelllinie 1G4, die den besagten Antikörper produziert, wurde unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Das experimentelle Vorgehen wird im Methodenteil dieser Dissertation genau beschrieben. Prinzipiell werden Zelloberflächenproteine auf vitalen Zellen von den ARTs etheno-ADP-ribosyliert. Die etheno-ADP-Ribose-Gruppe lässt sich dann im FACS, Western Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen (**Abbildung 4**). Der 1G4 Assay wird im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um ART-Aktivität auf Lymphozyten zu untersuchen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nachweises der etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Assay.** ARTs können anstelle von NAD auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Der monoklonale Antikörper 1G4 bindet spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe. Der 1G4 Antikörper kann mit einem Fluoreszenz- oder einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper detektiert werden. In unserem Labor wurde auch ein 1G4 Antikörper hergestellt, der direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder Alexa 488) markiert ist.

### 1.3 Reversibilität der ADP-Ribosylierung

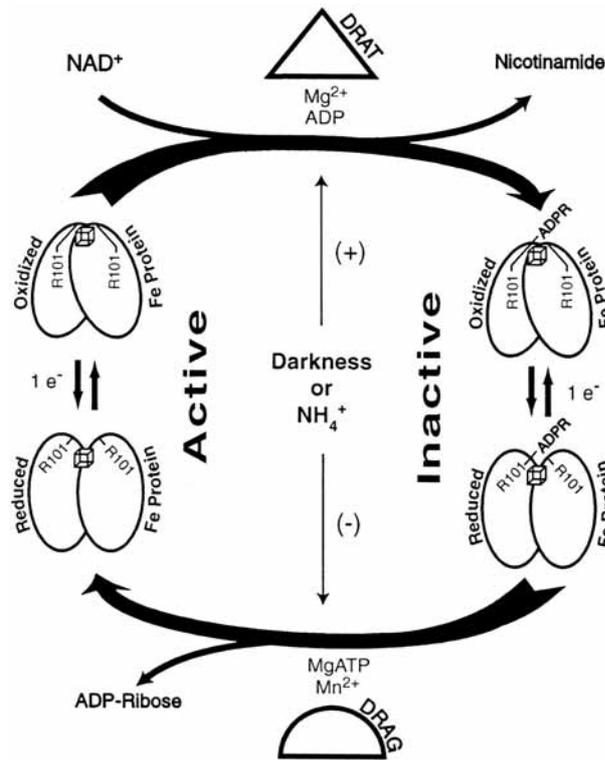
Die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen ist reversibel (Zolkiewska and Moss 1997). Für diese Reversibilität werden zwei Enzymfamilien verantwortlich gemacht. Zum einen die ADP-Ribosylhydrolasen und zum anderen die Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPP). Hydrolasen trennen die ganze ADP-Ribose-Gruppe vom Zielprotein ab (Moss *et al.* 1997). Die NPPs spalten die energiereiche Bindung zwischen den beiden Phosphatgruppen und hinterlassen so eine Ribose-Phosphat-Gruppe am Protein. Die zuvor ADP-ribosylierte Aminosäure ist so vor weiterer Modifikation durch die ARTs geschützt (**Abbildung 2**) (Vollmayer *et al.* 2003).

ADP-Ribosyl-Hydrolase-Aktivität (ARH-Aktivität) wurde bei Ratten und Mäusen vor allem in

Gehirn, Milz und Hoden gefunden. Diese Aktivität war von der Anwesenheit reduzierender Agenzien wie DTT abhängig. Hydrolasen aus Meerschweinchen und Kuh hingegen waren nicht DTT-abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass in der Ratte ARH1 fünf Cysteinreste vorkommen, in der humanen ARH1 jedoch nur vier. Durch Austausch der Aminosäure an Position 108 (C108S) der Ratte, konnte die DTT-Abhängigkeit bei der Ratte aufgehoben werden. Beim Mensch konnte durch Austausch an Position 103 (S103C) eine DTT-Abhängigkeit erreicht werden (Takada *et al.* 1993). Bisher wurden bei Maus und Menschen insgesamt zwei weitere Homologe von ARH1 (ARH2 und ARH3) molekular identifiziert (Takada *et al.* 1993; Okazaki *et al.* 1995; Glowacki *et al.* 2002).

Die Familie der Ekto-Nucleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen besteht bei Säugetieren aus drei Mitgliedern (NPP1-3), die alle als Typ II Transmembranproteine in der Zellmembran verankert sind, d.h. der N-Terminus liegt intrazellulär (Zimmermann 2000). NPP1 gilt als muriner Plasmazell-Differenzierungsmarker (PC-1) (Stearne *et al.* 1985; van Driel and Goding 1987; Goding *et al.* 1998). Bei PD-1 $\alpha$  und Autotaxin handelt es sich um Splice-Varianten der NPP2 (Murata *et al.* 1994; Stracke *et al.* 1995; Clair *et al.* 1997; Kawagoe *et al.* 1997). PD-1 $\beta$ , B10 und pg130<sup>RB13-6</sup> sind verschiedene Namen für die NPP3 (Deissler *et al.* 1995; Jin-Hua *et al.* 1997; Scott *et al.* 1997; Goding *et al.* 1998). Verwandte Proteine wurden auch bei Pflanzen, Hefen und *Caenorhabditis elegans* gefunden (Zimmermann and Braun 1999).

Bei dem phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum* wird die Aktivität eines Schlüsselenzyms der Photosynthese durch ADP-Ribosylierung und De-ADP-Ribosylierung reguliert. Die zytoplasmatische Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase (DRAT) inaktiviert die Dinitrogenase-Reduktase durch ADP-Ribosylierung eines Argininrests. Eine ADP-Ribosylglykohydrolase (DRAG) kann das Enzym durch Abspaltung der ADP-Ribosegruppe wieder aktivieren (Ludden and Roberts 1989; Grunwald *et al.* 1997; Ma and Ludden 2001). Dabei modifiziert die DRAG nur den oxidierten Enzymkomplex, während die DRAT nur den reduzierten verändert (**Abbildung 5**) (Halbleib *et al.* 2000). Dieses ist ein Beispiel für einen Kreislauf von ADP-Ribosylierung und ADP-Ribosyl-Hydrolyse, der zur Steuerung eines komplexen Systems beiträgt.



**Abbildung 5: Modell der Nitrogenase Regulation bei *Rhodospirillum rubrum* durch reversible ADP-Ribosylierung der Nitrogenase.** Die Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase (DRAT) inaktiviert die Nitrogenase durch ADP-Ribosylierung des Fe Proteins am Argininrest 101. Die Dinitrogenase-Reduktase-aktivierende-Glykohydrolase (DRAG) kann den Enzymkomplex durch Abspaltung der ADP-Ribose-Gruppe wieder aktivieren. Bemerkenswert ist, dass die DRAT nur das oxidierte Protein modifiziert, die DRAG hingegen nur das reduzierte verändert (Halbleib *et al.* 2000).

Auch bei Säugetierzellen konnte eine Reversibilität der ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden. Bei ausdifferenzierten Zellen der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 wird das Integrin  $\alpha 7$  NAD-abhängig ADP-ribosyliert. Es konnte ferner gezeigt werden, dass bei diesen Zellen in NAD-freiem Medium die ADP-Ribosylierung schnell rückgängig gemacht wird. Sowohl ADP-Ribose als auch NP-TMP konnten diese Reversibilität hemmen. ADP-Ribose ist als Inhibitor von ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPP) beschrieben, NP-TMP gilt als spezifischer Inhibitor von NPP. Somit deuten diese Ergebnisse auf die Aktivität einer NPP hin (Zolkiewska and Moss 1995).

In dieser Arbeit wird ein solcher Kreislauf für ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten postuliert und untersucht (siehe Kapitel 3.5)

#### 1.4 Die Familie der ADP-Ribosylcyclasen und NADasen

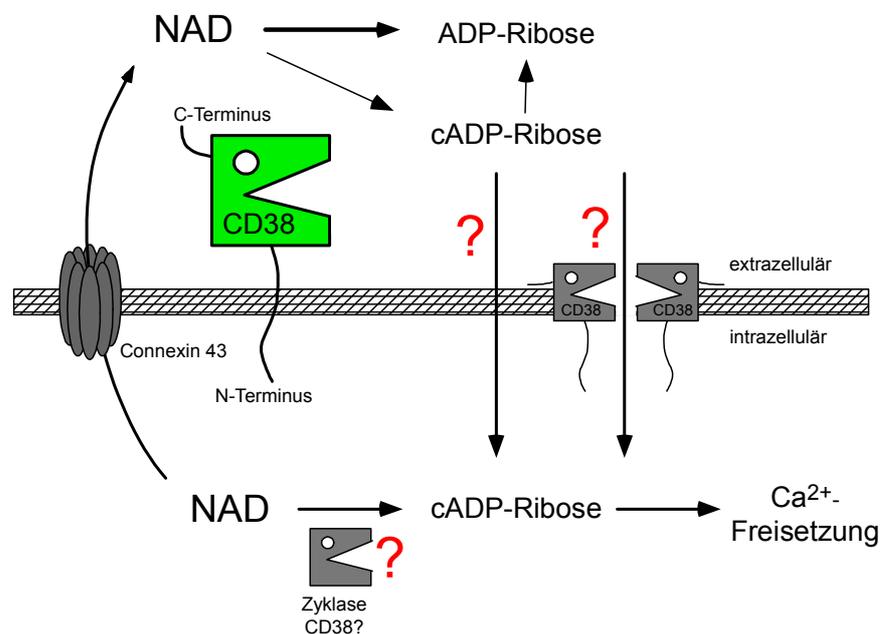
Eine weitere Gruppe von NAD metabolisierenden Enzymen bilden die ADP-Ribosylcyclasen. Zuerst wurde die von der Schnecke *Aplysia californica* gebildete Aplysia-Zyklase entdeckt (Inageda *et al.* 1995).

Ein weiteres Mitglied dieser Enzymfamilie ist das von B Zellen und aktivierten T Zellen exprimierte Typ II Transmembranprotein CD38 (Lund *et al.* 1995; Ferrero *et al.* 2000; Deaglio *et al.* 2001). Während das Hauptprodukt von CD38 die ADP-Ribose ist, wird nur ein geringer Anteil zu

zyklischer ADP-Ribose (cADP-Ribose) umgewandelt (Howard *et al.* 1993; Dong *et al.* 1994; Lee 2001). CD38 katalysiert auch die Hydrolyse von cADP-Ribose zu ADP-Ribose (Muller-Steffner *et al.* 1997). cADP-Ribose aktiviert den Ryanodin Rezeptor und induziert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern sowie den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zellinnere (Guse 1999; Lee 2001). Dabei wirkt die zyklische ADP-Ribose (cADP-Ribose) im Zytoplasma, das Enzym CD38 befindet sich jedoch auf der Außenseite der Zellmembran. Da weder NAD noch cADP-Ribose die Zellmembran direkt passieren können, stellt sich die Frage, wie es zur Signalübermittlung kommt (De Flora *et al.* 1997). Einige Autoren nehmen an, dass NAD und cADP-Ribose die Zellmembran durch bestimmte Kanäle passieren können. In diesem Zusammenhang werden Connexin 43 Hemikanäle (Bruzzone *et al.* 2001) und von CD38 Dimeren geformte Poren (Bruzzone *et al.* 1998) diskutiert. Andere erklären die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation durch intrazellulär gebildete cADP-Ribose (**Abbildung 6**) (da Silva *et al.* 1998).

Bei Säugetieren wurde bisher nur ein Verwandter von CD38 entdeckt. Dabei handelt es sich um das „bone marrow stromal cell surface molecule“ (BST-1, CD157), eine GPI-verankerte NADase (Hirata *et al.* 1994).

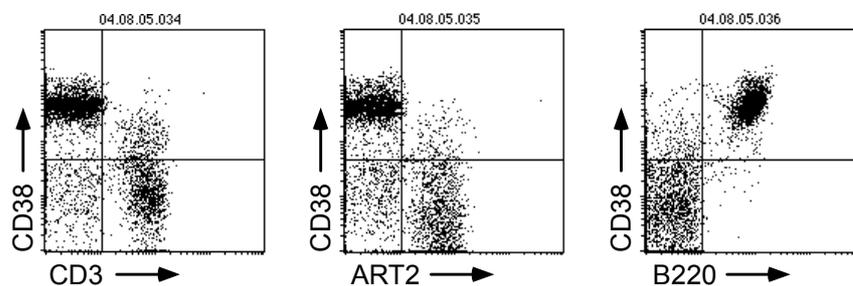
In dieser Dissertation wird der Einfluss von CD38 auf die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen durch ARTs untersucht.



**Abbildung 6: CD38 hydrolysiert NAD.** CD38 katalysiert die Hydrolyse von NAD zu ADP-Ribose und Nicotinamid sowie zu einem geringeren Anteil die Synthese von zyklischer ADP-Ribose (cADP-Ribose), die wiederum von CD38 zu ADP-Ribose gespalten wird. Die Zellmembran ist nicht permeabel für Nukleotide wie NAD, ADP-Ribose und cADP-Ribose, unter Umständen können diese die Membran durch Connexin 43 Hemikanäle oder durch von CD38 Dimeren gebildeten Poren passieren. Möglicherweise ist auch eine intrazelluläre Zyklase für die Synthese von zytosolischer cADP-Ribose Wirkung verantwortlich. Die roten Fragezeichen kennzeichnen noch offene Fragen.

Auf Lymphozyten der Maus zeigen ART2 und CD38 ein weitgehend entgegengesetztes Expressionsverhalten. **Abbildung 7** zeigt typische Anfärbungen von Milzzellen einer C57BL/6 Maus

in einer Untersuchung mit einem „fluorescence activated cell sorter“ (FACS). Dazu wurden Zellen aus der Milz mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert und anschließend im FACS gemessen. Dabei wurden vitale Zellen ausgewertet, die die typische Größe (FSC und SSC im FACS) von Lymphozyten hatten. Die Abbildung zeigt Dot Plots von Milzzellen nach Anfärbung mit verschiedenen Antikörpern. Es wurden die Kombinationen von anti-CD3/anti-CD38, anti-ART2/anti-CD38 und anti-B220/anti-CD38 verwendet. CD3 ist ein Marker für T Zellen und B220 wird typischerweise von B Zellen exprimiert. Die ART2 positiven Zellen sind T Zellen, sie sind hauptsächlich CD38 negativ. Ein Teil der T Zellen ist schwach positiv für CD38. Die relative Verteilung an B- und T Zellen unterscheidet sich bei Lymphknoten und Milz. Im Lymphknoten sind ca.  $\frac{2}{3}$  der Lymphozyten T Zellen und  $\frac{1}{3}$  sind B Zellen. In der Milz ist das Verhältnis genau andersherum (nicht abgebildet).



**Abbildung 7: FACS-Anfärbung von C57BL/6 Milzzellen.** Die Abbildung zeigt eine typische FACS Anfärbung von Milzzellen einer C57BL/6 Maus. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten anti-CD3, anti-CD38, anti-B220 und anti-ART2 Antikörpern angefärbt. Die Antikörper gegen CD38 sind mit Phycoerythrin (PE) konjugiert und die gegen CD3 und B220 mit Fluorescein (FITC) konjugiert kommerziell erhältlich. Der ART2 Antikörper wurde mit Alexa 488 konjugiert. Alexa 488 und FITC haben eine grüne Fluoreszenz, PE hingegen eine rote. Die Intensität der Fluoreszenz beider Farben kann dann mit dem FACS (Fluorescence activated cell sorter) gemessen werden.

## 1.5 Apoptose - der programmierte Zelltod

Man unterscheidet zwei Arten des Zelltods, Apoptose als programmierten Zelltod und Nekrose, bei der Zellen unreguliert zugrunde gehen. Bei der Apoptose kommt es zu bestimmten morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle. Als frühes Zeichen kann man Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran mit Annexin V nachweisen (Bossy-Wetzel and Green 2000). Weiterhin kommt es zum Ausstülpfen von membranumhüllten Bläschen („membrane blebbing“) und zur Fragmentierung der DNA (Nusbaum *et al.* 2004; Rodriguez and Schaper 2005).

### 1.5.1 „Klassische“ Signalwege der Apoptose

Die Apoptose ist für den vielzelligen Organismus ein essentieller Vorgang, da im Laufe der Entwicklung immer wieder Zellen entstehen, die später nicht mehr benötigt werden. Gerade im Bereich des Immunsystems ist es besonders wichtig, dass bei bestimmten Zellen der Zelltod induziert werden kann. Z. B. dürfen autoreaktive T Zellen den Thymus nicht verlassen, da sie sonst dem Körper großen Schaden zufügen könnten (Krammer 2000). Die Signalwege, die zur Apoptose führen, sind komplex und werden intensiv erforscht. Diese Signalwege beginnen meist mit der Bindung eines

Liganden (L) an einen Rezeptor (R). Beispiele sind der CD95(Fas)/CD95L (Krammer 2000), der TNF-R1/TNF $\alpha$  (Gardnerova *et al.* 2000) und der TRAIL/TRAILR-Signalweg (Palazzo *et al.* 2000; Janeway *et al.* 2001), die bei den T Zelfunktionen eine wichtige Rolle spielen. Während die Rezeptoren auf allen Zellen exprimiert werden, kommen die Liganden nur auf Natürlichen Killerzellen und aktivierten T Zellen vor. Die von den T Zellen über diese Liganden ausgelöste Apoptose der Zielzellen ermöglicht eine gezielte Immunantwort bei viralen Infektionen oder führt zur Beseitigung von Tumorzellen. Eine unkontrollierte Immunantwort kann durch Rezeptor-vermittelte Apoptose über den so genannten „activation induced cell death“ (AICD) (Green *et al.* 2003) verhindert werden. Wiederholte Aktivierung der T Zellen löst über den CD95/CD95L-Signalweg die Apoptose von CD4<sup>+</sup> T Zellen aus (Krammer 2000). Bei CD8<sup>+</sup> T Zellen geschieht dies über den TNF-R1/TNF $\alpha$ -Signalweg. Nach der Bindung des Liganden oligomerisiert der Rezeptor und über „death domains“ (DD) assoziieren zytoplasmatische Proteine. Dabei entsteht der (death-inducing signalling complex“ (DISC) (Kischkel *et al.* 1995). Wichtige Effektormoleküle, die die Apoptose induzieren können, sind die Caspasen, eine Familie von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Cystein-Proteasen. Sie werden als inaktive Vorläuferproteine (Procaspase) synthetisiert und können über Autokatalyse oder durch andere Proteasen aktiviert werden. Die proteolytische Aktivierung der ersten Caspasen führt zu einer Kettenreaktion, die zur Aktivierung weiterer Caspasen führt („cascade of caspases“) (Thornberry and Lazebnik 1998).

Zu den Caspase-aktivierenden Proteasen zählen auch die Granzyme B. Zytotoxische T Zellen üben ihre Wirkung nicht nur über die Bindung von Liganden an Zelloberflächenrezeptoren, so genannten Todesrezeptoren, aus, sondern auch durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen. Die Perforine bilden Poren in der Zellmembran der Zielzelle, durch die die Granzyme in das Zytoplasma gelangen können. Granzyme B können dann dort die Apoptose durch proteolytische Aktivierung der Caspasen induzieren (Janeway *et al.* 2001).

### 1.5.2 P2X7-Rezeptor-vermittelter Zelltod

Neben diesen „klassischen“ Signalwegen existieren offensichtlich noch weitere Mechanismen, die Apoptose auslösen. Ein Weg führt z.B. über eine ATP-induzierte Pore in der Zellmembran. Jüngere Untersuchungen, die auch Teil dieser Doktorarbeit sind, deuten an, dass sowohl ATP als auch NAD die Apoptose über den P2X7 Rezeptor induzieren können (Seman *et al.* 2003).

Eine spezifische Klasse von Membranrezeptoren, die purinogenen P2 Rezeptoren, vermitteln die Effekte von ATP, UTP und anderen extrazellulären Nukleotiden auf Zellen des Immunsystems. Von diesen Rezeptoren wird der P2X7 Rezeptor besonders stark im Immunsystem exprimiert. Makrophagen sind das am besten untersuchte Zellmodell für den P2X7 Rezeptor, der aber auch auf Mikroglia (Ferrari *et al.* 1996), dendritischen Zellen (Ferrari *et al.* 2000) sowie auf T- und B Zellen (Baricordi *et al.* 1996; Collo *et al.* 1997) exprimiert wird. Der P2X7 Rezeptor enthält zwei Transmembrandomänen und endet N- und C-terminal auf der zytoplasmatischen Seite. Nach einer Stimulation mit ATP oder pharmakologischen Analoga (Surprenant *et al.* 1996), verhält sich der

Rezeptor wie ein Ionenkanal, der für die Kationen  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  Ionen permeabel ist. Wiederholte oder dauerhafte Stimulation induziert die Bildung einer „nicht-selektiven“ Pore für Moleküle bis zu 900 Da. Durch diese Pore können kleine zytoplasmatische Moleküle wie ATP aus der Zelle austreten, sie ermöglicht aber auch die experimentelle Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen oder Nukleotid-Analoga in das Zellinnere (Steinberg *et al.* 1987; Steinberg and Silverstein 1987). Eine Stimulation mit ATP von über 15 Minuten führt zum Zelltod, während sich nach einer kürzeren Exposition die Pore wieder schließt. Die Behandlung von Zellen mit oxidiertem ATP (o-ATP) oder mit KN62 führt zu einer Blockade des ATP-induzierten Zelltods (Humphreys *et al.* 2000). Die Funktion des humanen P2X7 kann durch einen monoklonalen P2X7-spezifischen Antikörper inhibiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Antikörper die Interleukin-1 $\beta$  Ausschüttung durch humane Makrophagen-Kulturzellen (THP-1) gehemmt wird. Zudem kann dieser Antikörper den Stromfluss über die Zellmembran von P2X7 exprimierenden Zellen hemmen (Buell *et al.* 1998). Weiterhin wurde *in vitro* beobachtet, dass Makrophagen, die P2X7 überexprimieren, eine erhöhte Rate an spontaner Apoptose aufweisen (Chiozzi *et al.* 1996). Abhängig von der Länge der Exposition und der Dosis kann ATP sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen (Di Virgilio *et al.* 1998; Ferrari *et al.* 1999; Sanz and Di Virgilio 2000). Behandlung von Zellen mit ATP kann P2X7-vermittelt auch zum Abspalten (Shedding) von CD23 und L-Selectin (CD62L) führen (Gu *et al.* 1998). Seit Kurzem ist bekannt, dass auch NAD den Zelltod induzieren kann (Adriouch *et al.* 2001). In dieser Arbeit wird untersucht, wie der Effekt von NAD auf den P2X7 Rezeptor vermittelt wird.

### 1.6 Autoimmunerkrankungen und die Rolle von ADP-Ribosyltransferasen

Autoimmunkrankheiten sind Erkrankungen, bei denen das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift. Ein bekanntes Beispiel ist der Typ I Diabetes mellitus, bei dem es zu einer Infiltration des Pankreas mit aktivierten T Zellen und Makrophagen kommt und Insulin-produzierende  $\beta$ -Zellen zerstört werden wodurch der Zuckerhaushalt elementar gestört wird (Rossini *et al.* 1985; Rossini *et al.* 1989). Andere bekannte Autoimmunerkrankungen sind die Multiple Sklerose oder der Systemische Lupus erythematoses (Qin and Duquette 2003; Hoffman 2004). Dabei spielen entweder T Zell-vermittelte (zytotoxisch) oder B Zell-vermittelte (Antikörper) Effektorfunktionen eine entscheidende Rolle. Da die Antikörper-vermittelte humorale Immunantwort abhängig ist von  $CD4^+$  T-Helferzellen, wird den T Zellen die zentrale Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugesprochen. Deshalb ist es verständlich, dass die Mechanismen der T Zell Regulierung Gegenstand intensiver Forschung sind.

Die in dieser Arbeit untersuchten ADP-Ribosyltransferasen wurden in mehreren Tiermodellen mit Autoimmunphänomenen in Zusammenhang gebracht. Ein für Autoimmundiabetes gut charakterisiertes Modell ist das der „diabetes prone Bio Breeding“ (dpBB) Ratten, die spontan eine Krankheit entwickeln, die dem humanen Diabetes mellitus Typ I vergleichbar ist. Mit Hilfe von immunzytochemischen Untersuchungen konnte eine ausgeprägte T Zell-Lymphopenie bei dpBB Ratten nachgewiesen werden. Diese ist durch ein fast vollständiges Fehlen der  $ART2^+$  Zellpopulation

gekennzeichnet (Greiner *et al.* 1986). Im Gegensatz dazu haben die „diabetes resistant Bio Breeding“ (drBB) Ratten, die nicht an Diabetes mellitus erkranken, keine Lymphopenie und eine normal große ART2<sup>+</sup> T Zellpopulation (Greiner *et al.* 1987). Der Transfer ART2 positiver Milzzellen von drBB Ratten auf dpBB Ratten zwischen dem 27. und 46. Lebensstag kann in letzteren den Ausbruch der Krankheit verhindern (Burstein *et al.* 1989; Fowell and Mason 1993). Eine *in vivo* Depletion der ART2<sup>+</sup> T Zellen in jungen und gesunden drBB Ratten führt zu einem starken Anstieg der Diabetes-Inzidenz (Koevary *et al.* 1983; Burstein *et al.* 1989; McKeever *et al.* 1990). Bei der Entwicklung von T Zellen in fetalen Thymus-Organokulturen von dpBB Ratten wurde im Gegensatz zu drBB Ratten ein Fehlen der ART2<sup>+</sup> Zellen festgestellt (Zipris *et al.* 2001). An der Entstehung des Diabetes sind sowohl CD4<sup>+</sup> (Metroz-Dayer *et al.* 1990) als auch CD8<sup>+</sup> (Edouard *et al.* 1993) T Zellen beteiligt, deren Interaktion den Ausbruch der Krankheit auslöst. Die ART2<sup>+</sup> T Zellpopulation nimmt dabei eine regulierende und der Entstehung der Erkrankung entgegenwirkende Rolle ein (Fowell and Mason 1993; Whalen *et al.* 1994).

Ein wichtiges Mausmodell zur Untersuchung des Diabetes mellitus Typ I ist die NOD Maus (non-obese diabetic). Diese Mäuse sind dadurch gekennzeichnet, dass Lymphozyten in die Langerhans-Inseln des Pankreas einwandern und dort zu einer Entzündung (Insulitis) führen, bei der die Insulinproduzierenden Zellen zerstört werden (Ablamunits *et al.* 2001). Die genetisch determinierte Anfälligkeit der NOD Maus für Diabetes manifestiert sich aber nur unter praktisch keimfreien Zuchtbedingungen. Wahrscheinlich führt sonst die Kostimulation über CD28/B7 zur Entwicklung und Homeostase einer regulierenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellpopulation, die prädiabetische Mäuse vor dem Ausbruch der Krankheit schützt. Untersuchungen konnten eine reduzierte Expression von ART2 in jungen NOD Mäusen im Vergleich zu verwandten Diabetes-resistenten Mäusen (NON) zeigen (Prochazka *et al.* 1991). Neuere Ergebnisse wiesen außerdem eine verspätete Expression von ART2.2 in Milzen junger NOD Mäuse gegenüber NON Mäusen nach (Ablamunits *et al.* 2001).

BxSB Mäuse, die ebenfalls keine ART2.1 exprimieren, entwickeln eine dem systemischen Lupus erythematoses ähnlichen Autoimmunkrankheit, die unter Mitbeteiligung der Nieren in Form einer Glomerulonephritis abläuft (Matthes *et al.* 1997).

Zusammengenommen deutet eine Reihe von Indizien darauf hin, dass ART2 die Ausbildung von autoreaktiven Prozessen unterdrückt, indem es auf Apoptose und Inhibition der Zellaktivität einer bestimmten T Zellpopulation wirkt und so Autoimmunerkrankungen entgegenwirkt.

## 1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) auf der Zelloberfläche von Lymphozyten näher zu charakterisieren. Eine zentrale Rolle spielt bei diesen Untersuchungen ein Assay zum Nachweis von ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche. Dabei wird mit Hilfe des etheno-Adenosin-spezifischen monoklonalen Antikörpers 1G4 etheno-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen nach Inkubation von Zellen mit etheno-NAD detektiert. Dieser Assay wird eingesetzt, um Kinetik und Dosis-Wirkungsbeziehung der ADP-Ribosylierung auf ART-transfizierten Kulturzellen zu bestimmen. Das Muster der etheno-ADP-ribosylierten Proteine wird mittels Western Blot untersucht und mit dem Muster von ADP-ribosylierten Proteinen nach Inkubation mit radioaktiv-markiertem NAD verglichen.

Etablierte Kulturzellen werden auf Vorkommen endogener ART-Aktivität untersucht, um die ADP-Ribosylierung unter physiologischeren Bedingungen zu erforschen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des ART2-abhängigen NAD induzierten Zelltods (NICD) bei T Zellen, der über den Purinozeptor P2X7 vermittelt wird. Dabei ist eine wichtige Frage, ob P2X7 selbst ein Zielprotein der ART2 ist. Des Weiteren sollte erforscht werden, ob der NICD durch von Zellen freigesetztes endogenes NAD ausgelöst werden kann.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist, inwiefern ARTs mit anderen NAD und ADP-Ribose verstoffwechselnden Enzymen interagieren. Der Einfluss der NADase CD38 auf die ADP-Ribosylierung wird mit dem CD38 Inhibitor araF-NAD, durch Depletion von CD38-exprimierenden Zellen und durch den Vergleich von Zellen aus CD38 Wildtyp und Knock-out Mäusen bestimmt.

Mit dem 1G4-FACS-Assay wird die ART-Aktivität von Zellen aus verschiedenen lymphatischen Geweben bestimmter Mausstämme untersucht. Neben der Untersuchung von murinen Lymphozyten wurde angestrebt, ART-Aktivität auf Lymphozyten anderer Spezies wie Mensch, Huhn, Hamster, Kaninchen und Ratte zu bestimmen. Das Hühnergenom sollte mit bekannten ART-Sequenzen auf das Vorhandensein weiterer, bisher nicht bekannter Mitglieder der ART-Familie untersucht werden.

Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (CD203) und ADP-Ribosylhydrolasen (ARH1-3) können die ADP-Ribose von Zielproteinen ganz (ARH) oder teilweise (CD203) entfernen. „Pulse-chase“ Analysen sollten die Reversion der ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche von Lymphozyten durch diese Enzyme aufdecken. Die Aktivität dieser Enzyme sollte durch die spezifischen Inhibitoren ADP-Ribose und NP-TMP gehemmt werden. Im Mausmodell wird nach i.v. Injektion von etheno-NAD *in vivo* die etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf Lymphozyten bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

|                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| FACSCalibur                        | Becton Dickinson, Heidelberg        |
| FACSscan                           | Becton Dickinson, Heidelberg        |
| Ultrospec 2000                     | Pharmacia Biotech, Freiburg         |
| Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A | Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf    |
| High Voltage Power Pack P30        | Biometra, Göttingen                 |
| XCell SureLock Mini-Cell           | Invitrogen, Groningen (Niederlande) |
| VarioMACS                          | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| Axiovert S100 Mikroskop            | Zeiss, Jena                         |
| Digitalkamera DP500                | Olympus, Hamburg                    |

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Kodak Biomax MR Röntgenfilm                | Kodak Company, Connecticut (USA)     |
| Hyperfilm ECL                              | Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Kulturplatten                              | Nunc, Roskilde (Dänemark)            |
| Nitrozellulose-Hybond-C                    | Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Polyvinylidendifluorid-ImmobilonP (PVDF)   | Boehringer Ingelheim, Ingelheim      |
| NuPAGE precast Gele                        | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| ZOOM Strip pH 3-10, 4-7 und 6-9            | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| Centricon YM-10 Centrifugal Filter Devices | Billerica, Massachusetts (USA)       |
| MACS AS Säule                              | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach  |
| Nitex Membran (110 µm Maschen)             | Tetko, Kansas City, MO (USA)         |

#### 2.1.3 Mäusstämme

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| C57BL/6J Mäuse | Charles Rivers, Sulzfeld |
| BALB/c/ByJ     | Jackson Laboratory (USA) |
| NZW/LacJ       | Jackson Laboratory (USA) |
| NOD/LacJ       | Jackson Laboratory (USA) |

Die Mäusstämme wurden von der jeweiligen Firma erworben und in der Tierhaltung des UKE's weitergezüchtet. Versuche mit NOD Mäusen wurden an den Jackson Labs in Bar Harbor, Maine, USA durchgeführt. Mit Ausnahme der NZW Mäuse standen alle Mäuse als CD38 Knock-out oder als ART2 Knock-out zur Verfügung (**Tabelle 3**).

#### 2.1.4 Zelllinien

|                                   |                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| DC 27.10 Hybridom                 | B. Fleischer, BNI, Hamburg      |
| EL 4 C57BL/6N Lymphomzelllinie    | C. Stocking, HPI, Hamburg       |
| MD 27 Hybridom                    | M. Neumaier, UKE, Hamburg       |
| HD 11 Makrophagenzelllinie (Huhn) | B. Kaspers, Universität München |
| BM 2 Makrophagenzelllinie (Huhn)  | B. Kaspers, Universität München |
| RP 1 T-Helferzelllinie (Huhn)     | B. Kaspers, Universität München |
| RP 9 B Zelllinie (Huhn)           | B. Kaspers, Universität München |
| HP 9 T-Helferzelllinie (Huhn)     | B. Kaspers, Universität München |

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| MSB T-Helferzelllinie (Huhn) | B. Kaspers, Universität München |
| DT40 B Zelllinie (Huhn)      | B. Kaspers, Universität München |
| 2D8 B Zelllinie (Huhn)       | B. Kaspers, Universität München |
| 855-19 T Zelllinie (Huhn)    | B. Kaspers, Universität München |

### 2.1.5 Antikörper und Streptavidine

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Maus $\alpha$ Mensch CD3 IgG3 $\lambda$ FITC, SP34            | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus ART2. IgG2 $\alpha$ FITC, A102            | Institut für Immunologie, Hamburg |
| Hamster $\alpha$ Maus CD3 $\epsilon$ IgG FITC, 145, 2c11      | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD4 IgG2 $\alpha$ FITC, RM45              | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD8 IgG2 $\beta$ FITC, 536.7              | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD38 IgG2 $\alpha$ FITC/PE, 90            | Pharmingen, Heidelberg            |
| Esel $\alpha$ Maus IgG(H+L) FITC                              | Dianova, Hamburg                  |
| Kaninchen $\alpha$ Huhn IgG (H+L) FITC                        | Perbio, Bonn                      |
| Maus $\alpha$ Mensch CD3 IgG1 $\kappa$ FITC, UCHT1            | Pharmingen, Heidelberg            |
| Maus $\alpha$ Mensch CD4 IgG1 FITC, SK3                       | Pharmingen, Heidelberg            |
| Esel $\alpha$ Kaninchen IgG (H+L) F(ab)2 FITC                 | Dianova, Hamburg                  |
| Esel $\alpha$ Schaf IgG (H+L) F(ab)2 FITC                     | Dianova, Hamburg                  |
| Ziege $\alpha$ syr. Hamster (H+L) F(ab)2 FITC                 | Dianova, Hamburg                  |
| Maus $\alpha$ etheno Adenosin IgG2 $\alpha$ FITC              | Institut für Immunologie, Hamburg |
| Maus $\alpha$ etheno Adenosin IgG2 $\alpha$ Alexa488          | Institut für Immunologie, Hamburg |
| Maus $\alpha$ etheno Adenosin IgG2 $\alpha$                   | Institut für Immunologie, Hamburg |
| Kaninchen $\alpha$ Hamster IgG (H+L) F(ab)2 FITC              | Dianova, Hamburg                  |
| Ziege $\alpha$ Kaninchen IgG (H+L) F(ab)2 FITC                | Dianova, Hamburg                  |
| Ziege $\alpha$ Hamster IgG (H+L) F(ab)2 PE                    | Dianova, Hamburg                  |
| Hamster $\alpha$ Maus CD3 $\epsilon$ IgG2 $\beta$ PE, 1452C11 | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD4 IgG2 $\alpha$ PE, RM45                | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD8 $\alpha$ IgG2 $\alpha$ PE, 536.7      | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD8 $\beta$ IgG1 PE, M1/70                | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD11 $\alpha$ IgG2 $\alpha$ PE, 2D7       | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD25 IgG2 $\beta$ PE, 3C7                 | Pharmingen, Heidelberg            |
| Maus $\alpha$ Ratte IgG (H+L) F(ab)2 PE                       | Dianova, Hamburg                  |
| Esel $\alpha$ Maus IgG (H+L) F(ab)2 PE                        | Dianova, Hamburg                  |
| Maus $\alpha$ FLAG M2 IgG1                                    | Sigma Aldrich, Deisenhofen        |
| Ratte $\alpha$ Maus CD11a IgG2 $\alpha$ , M17/4               | Pharmingen, Heidelberg            |
| Ratte $\alpha$ Maus CD45R/B220 PE IgG2a, RA3-6B2              | Pharmingen, Heidelberg            |
| Kaninchen $\alpha$ Ratte P2X7, polyklonal                     | Alomone Labs, Jerusalem, Israel   |

|                    |                                      |
|--------------------|--------------------------------------|
| Streptavidin FITC  | Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Streptavidin Alexa | Molecular Probes                     |
| Streptavidin PE    | Dianova, Hamburg                     |

|                      |                                     |
|----------------------|-------------------------------------|
| anti FITC Microbeads | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| anti PE Microbeads   | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| pan T cell kit       | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |

Alle hier nicht aufgeführten Antikörper wurden von Pharmingen, Heidelberg bezogen. Bei Alexa-konjugierten Antikörpern handelt es sich stets um eine Konjugation mit Alexa 488.

### 2.1.6 Chemikalien

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| BSA  | New England Biolabs, Schwalbach      |
| NuPAGE Sample Reducing Agent (DTT)         | Invitrogen-Novex, Leek (Niederlande) |
| Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1      | Dynal, Hamburg                       |
| ECL Western Blotting detection reagent     | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| G418                                       | Gibco BRL, Eggenstein                |
| Precision Plus Protein, All Blue Standards | BioRad, München                      |
| <sup>32</sup> P-NAD                        | Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Propidiumiodid                             | Pharmingen, Hamburg                  |
| SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standards        | Novex, San Diego, CA (USA)           |
| MultiMark                                  | Invitrogen-Novex, Leek (Niederlande) |
| StrataClean™ Resin                         | Stratagene, Heidelberg               |
| NuPAGE SDS PAGE MOPS running buffer        | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| NuPAGE SDS PAGE MES running buffer         | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| NuPAGE SDS PAGE transfer buffer            | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| NuPAGE sample reducing agent               | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| NuPAGE LDS sample buffer                   | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| NuPAGE Antioxidant                         | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| Zeocin (25µg/ml)                           | Invitrogen, Groningen (Niederlande)  |
| 6-biotin-17-NAD                            | R&D Systems, Minneapolis (USA)       |
| Aceton, reinst                             | Merck, Darmstadt                     |
| Hoechst 33342                              | Serotec, Düsseldorf                  |
| Ultramount, permanent Mounting Medium      | DakoCytomation, Glostrup, Dänemark   |

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, erworben.

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Kulturmedium: Lymphomzellen und Hybridomzellen wurden in 1640 RPMI (Gibco BRL) + 10 % FCS kultiviert.

Einfrier-Medium: in 1640 RPMI (Gibco BRL) + 20 % FCS + 10 % DMSO

### 2.1.8 Erythrozytenlysepuffer

Puffer A: 35g NH<sub>4</sub>Cl, 1.85g KCl, 1.5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O, 0.119g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0g Glukose, 0.05g Phenol Rot in 1 Liter H<sub>2</sub>O

Puffer B: 4.2g MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 1.4g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 3.4g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O in 1 Liter H<sub>2</sub>O

Puffer C: 22.5g NaHCO<sub>3</sub> in 1 Liter H<sub>2</sub>O

1x Gey's Puffer wurde kurz von Gebrauch angesetzt: 20 % A + 5 % B + 5 % C + 70 % H<sub>2</sub>O

### 2.1.9 MACS-Puffer

PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA

### 2.1.10 SDS-PAGE und Western Blot

Lysispuffer: 1 % TritonX100 oder NP-40, 1mM AEBSF in PBS

MOPS Laufpuffer: 50mM MOPS, 50mM TrisBase, 3.5mM SDS, 1 mM EDTA, pH7.7

MES-Puffer (50mM MES, 50mM TrisBase, 3.5mM SDS, 1mM EDTA, pH 7.3)

1xTransferpuffer: 3.027g TrisBase - 14.4g Glycin - pH8.3 - 20 % Methanol

1xTBS: 8g NaCl - 0.2g KCl - 3g TrisBase - pH7.4

Blocklösung: 1xTBS, 10 % Ziegenserum

Antikörperverdünnungslösung: 1xTBS, 10 % Ziegenserum, 20 % Tween 20

Waschlösung: 1xTBS, 0.5 % Tween 20

Silberlösung: 1xTBS, 20 % AgNO<sub>3</sub>, 40 % Na Citrat, 20 % FeSO<sub>4</sub> (frisch angesetzt)

#### 2.1.11 Puffer für NAD cycling assay

Carbonat-Puffer: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,06g; NaHCO<sub>3</sub> 0,168g; Nicotinamid 0,122g in 100 ml H<sub>2</sub>O

Reaktionspuffer:

TRIS 0,25 pH=8      550 µL

PES 6,68 mg/ml H<sub>2</sub>O   100 µL

MTT 2,07 mg/ml H<sub>2</sub>O   100 µl

ADH 2 mg/ml H<sub>2</sub>O     100 µl

Ethanol 6 M in H<sub>2</sub>O    50 µl

Angegebene Mengen für eine Probe. Der Reaktionspuffer wurde frisch angesetzt und vor Licht mit Aluminiumfolie geschützt.

#### 2.1.12 Puffer für Dünnschichtchromatographie

Puffer 1 (1 M Essigsäure)

Puffer 2 (0,3 M LiCl – 0,9 M Essigsäure, frisch angesetzt durch Mischung von 1 Teil 3 M LiCl und 9 Teilen 1 M Essigsäure)

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Kultivierung und Gewinnung von Lymphomzellen

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend eingesetzt.

#### 2.2.2 Präparation von primären lymphatischen Zellen

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich Zellen von Mäusen präpariert. Die Präparation von lymphatischen Zellen aus den Geweben anderer Tiere erfolgte in analoger Weise.

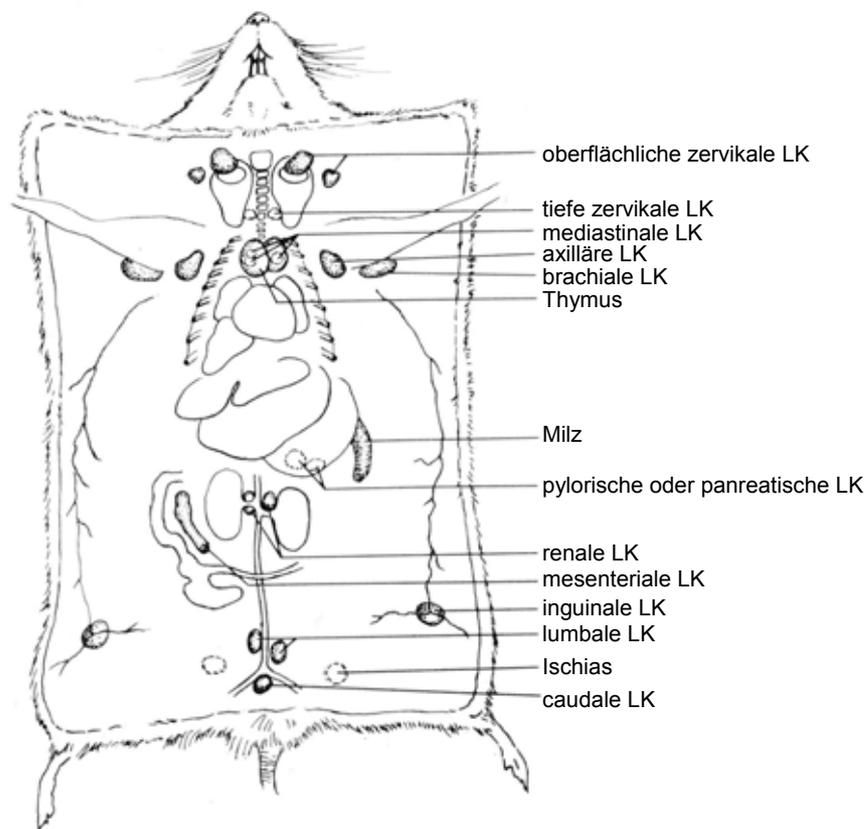
##### *Präparation der Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus*

Mäuse wurden mit 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub> betäubt und mit 100 % CO<sub>2</sub> getötet. Lymphknoten und Thymus wurden präpariert und in eine 10 cm Petrischale mit 10 ml RPMI Medium gelegt. Es wurden axilläre, inguinale, submandibuläre und mesenteriale LK gewonnen (**Abbildung 8**). Die Präparate wurden in Taschen aus Nitex-Membran gegeben. Die Zellen wurden mit einer Pinzette durch die

Maschen dieses Stoffs gedrückt. Dabei wurden die Lymphozyten und Erythrozyten in Einzelzellsuspension gewonnen, die Organhülle und das übrige Bindegewebe wurden von der Nitex-Membran zurückgehalten. Die Zellen wurden 2x mit frischem RPMI Medium gewaschen und die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

#### *Präparation der murinen Milzzellen*

Die Milz wurde aus 6-8 Wochen alten Mäusen entnommen und eine Einzelzellsuspension wie für Thymus und Lymphknoten beschrieben gewonnen (**Abbildung 8**). Nach zweimaligem Waschen mit RPMI Medium wurden die Zellen in 10 ml Gey's Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Leukozyten wurden zweimal gewaschen und so von dem Gey's Puffer und den lysierten Erythrozyten getrennt.



**Abbildung 8: Lage der lymphatischen Organe bei der Maus.** Die Abbildung zeigt eine Zeichnung, die die Lage der lymphatischen Organe einer Maus *in situ* wiedergibt. Für diese Dissertation wurden zervikale, axilläre, brachiale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten (LK) untersucht. Es wurde auch die intraperitoneal liegende Milz, der retrosternal liegende Thymus und Knochenmark präpariert. (modifiziert nach [http://www.eulep.org/Necropsy\\_of\\_the\\_Mouse/printable.php](http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php))

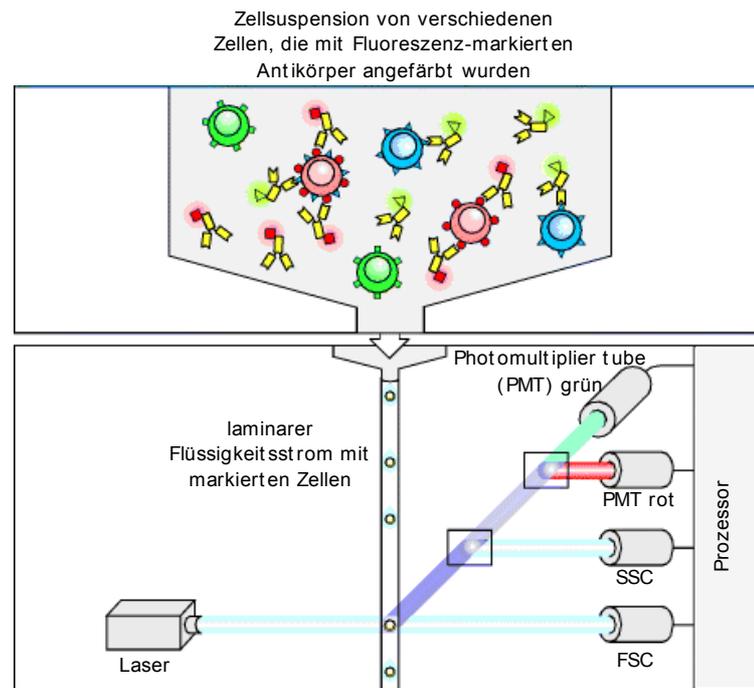
#### 2.2.3 Depletion von CD38 positiven Zellen

Lymphknotenzellen und Leukozyten aus der Milz wurden in MACS-Puffer aufgenommen ( $10^7$  Zellen/ml) und mit anti-CD38<sup>FITC</sup> oder anti-CD38<sup>PE</sup> Antikörper ( $1\mu\text{g}/10^6$  CD38 pos. Zellen) für 15 Minuten bei 6-8°C angefärbt. Danach wurden die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und mit MACS anti-FITC bzw. anti-PE MicroBeads ( $10\mu\text{l}$  pro  $10^7$  CD38 positive Zellen) in MACS-Puffer

markiert. Die CD38 positiven Zellen wurden dann nach Anleitung des Herstellers (Miltenyi, Bergisch Gladbach) mit der MACS AS Säule depletiert. Die CD38 negativen Zellen wurden zweimal mit RPMI Medium gewaschen, gezählt und für die Versuche eingesetzt.

#### 2.2.4 „Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen auf einer großen Anzahl einzelner Zellen, indem diese mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern markiert werden (**Abbildung 9**). In dieser Arbeit wurden FACS-Analysen an Lymphknotenzellen, Milzzellen, Knochenmarkzellen und Thymozyten sowie an Kulturzellen gemacht. Die Färbungen wurden in 96-Loch Platten (V-bottom) oder in FACS-Röhrchen mit jeweils  $2 \cdot 10^5$  -  $10^6$  Zellen pro Ansatz in 100  $\mu$ l Kulturmedium durchgeführt. Für alle Wasch- und Inkubationsschritte wurde auf Eis gekühltes RPMI-Medium verwendet. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1.000 U/min und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt und die Zellen mit dem Primär- und evtl. dem Sekundär-Antikörper für jeweils 30 Minuten bei 4 °C angefärbt. Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschrift. Als Primär-Antikörper wurden die monoklonalen ART2.2- (Nika102), ART2.1- (Bella) und ART2.1-2.2 (Ali) spezifischen Antikörper, die über eine "gene-gun"-Immunisierung hergestellt wurden (Koch-Nolte *et al.* 1999), und der etheno-Adenosin-spezifische monoklonale Antikörper 1G4 eingesetzt (1  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) (Crowe *et al.* 1995). Anschließend wurden mit den Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpern (1  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) sowohl Zweifach- als auch Dreifach-Färbungen durchgeführt. Letztere wurden z.T. durch die gleichzeitige Markierung mit Cy3-konjugierten anti-CD4 und PE-konjugierten anti-CD8 Antikörpern, die mit unterschiedlicher Intensität (PE stärker als Cy3) in demselben Kanal strahlen, ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut einmal gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit dem Durchflußzytometer (FACScan oder FACSCalibur) unter Verwendung der dazugehörigen Software (CellQuest und CellQuestPro, Becton Dickinson, Heidelberg).



**Abbildung 9: Das Prinzip der FACS Untersuchung.** Für Untersuchungen mit dem „Fluorescence activated cell sorter“ (FACS) werden Zellen mit Antikörpern angefärbt. Die Zellen werden dann in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch die Laseroptik geführt. Das Gerät misst für jede einzelne Zelle die Parameter „forward scatter (FCS)“, „side scatter“ (SSC) und die Intensität der Fluoreszenz in verschiedenen Farben. So können Zellen anhand ihrer Größe (FCS), ihrer Granulierung und Zelloberflächenbeschaffung (SSC) und ihres Fluoreszenzmusters unterschieden werden (modifiziert nach (Janeway *et al.* 2001)).

### 2.2.5 Messung der ART2 Aktivität mit dem 1G4 Assay

Die Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit der jeweils angegebenen etheno-NAD-Konzentration bei 37 °C ( $10^6$  Zellen/100  $\mu$ l) inkubiert, anschließend wurden sie zweimal gewaschen und mit 1G4 (1  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) angefärbt (Kapitel 1.2.6 und **Abbildung 4**). Dazu wurde FITC oder Alexa konjugierter 1G4 Antikörper verwendet. In einigen Versuchen wurde die 1G4 Markierung mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper detektiert. Die Antikörper Inkubationen wurden 30 Minuten bei 4 °C durchgeführt.

### 2.2.6 Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen

Die Zellen wurden auf ihre Expression der Markerantigene CD3, CD4, CD8, CD69, CD38, ART2.2, LFA-1, B220 und IgG untersucht. Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers oder in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l verwendet. Es wurden sowohl Zweifach- als auch Dreifach-Färbungen mit FITC-, Cy3-, APC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

### 2.2.7 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

$5 \cdot 10^6$  Zellen wurden für 60 Minuten mit Hoechst 33342 Farbstoff in Calcium- und Magnesiumhaltigem PBS bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden während der letzten 20 Minuten mit 5  $\mu$ M etheno-NAD versetzt. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und mit 2 % PFA 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper angefärbt und erneut

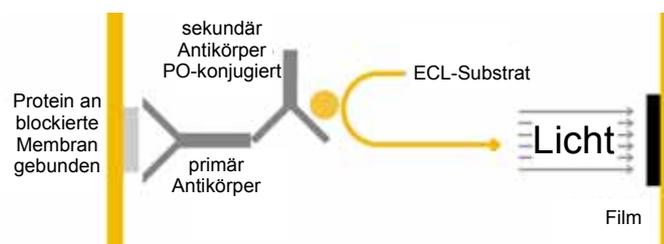
gewaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 3 Tropfen Mounting Medium aufgenommen. Ein Tropfen Zellsuspension wurde auf einen Objektträger gegeben. Die so präparierten Zellen wurden dann mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert S100 Mikroskop, Zeiss, Jena) und einem Ölimmersionsobjektiv bei insgesamt 1000-facher Vergrößerung fotografiert (Digitalkamera DP500, Olympus, Hamburg).

### 2.2.8 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay basiert auf dem Nachweis von Phosphatidylserin (PS), das zu Beginn der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran flippet, wo es bei vitalen Zellen nicht vorkommt. Die PS-Exposition kann mit FITC-konjugiertem Annexin V in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Bereits abgestorbene Zellen färben sich mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid an, welches nur von lebenden Zellen aktiv aus der Zelle entfernt werden kann. Für den Assay wurden aufgereinigte T Zellen mit den angegebenen NAD- und ATP-Konzentrationen für 45 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen, das zusätzlich 2 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt und auch für die folgenden Schritte verwendet wurde. Dies war notwendig, da die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist. Jeder Ansatz enthielt 5 µl FITC-konjugiertes Annexin V und 3 µl Propidiumiodid in 100 µl Medium. Während Annexin V frühe apoptotische Zellen anfärbt, werden durch den DNA-Farbstoff Propidiumiodid alle toten Zellen sichtbar gemacht. Die folgende 20-minütige Inkubation erfolgte lichtgeschützt auf Eis. Die Zellen wurden in einem Volumen von 300 µl im FACS untersucht. In weiteren Versuchsansätzen wurden die Zellen vor der NAD-Behandlung noch mit 20 µM etheno-NAD bei 37 °C oder mit ART2.2-Präimmunsereum (1:100), ART2.2 Immunsereum (1:100), ART2.2 monoklonalen Antikörpern (1 µg/ml) und KN62 (5 µM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und wie oben beschrieben weiter behandelt.

### 2.2.9 Western Blot Analysen

Beim Western Blot werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels Gelelektrophorese größenfraktioniert, auf eine Membran überführt und dort einer für bestimmte Proteine spezifischen Nachweismethode unterzogen (Burnette 1981). In dieser Arbeit sollten auf diese Weise die ADP-ribosylierten Zielproteine von ART2 untersucht werden.



**Abbildung 10: Nachweis von Proteinen im Western Blot mit der ECL-Reaktion.** An eine Membran gebundene Proteine werden mit einem primär Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten (PO) sekundär Antikörper markiert. Die Peroxidase kann dann das ECL-Substrat spalten und emittiert Licht, das mit einem speziellen Film nachgewiesen werden kann (modifiziert nach Amersham-Biosciences Katalog „Powerful solutions for Western Blotting“).

### *Inkubation mit etheno-NAD und Zelllyse*

Lymphozyten oder Lymphomzellen wurden in einem Volumen von 100 µl pro 10<sup>6</sup> Zellen mit etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal gewaschen und in 100 µl Lysispuffer aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die nicht lysierten Zellbestandteile erst 5 Minuten bei 5000 U/min und dann 15 Minuten bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, direkt für Versuche eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### *Immunpräzipitation*

Für die Immunpräzipitation wurde 1 µg Antikörper an 15 µl Protein G Sepharose Matrix in 200 µl PBS 1 % Igepal 60 Minuten bei 4 °C gekoppelt. Dabei wurden ein monoklonaler Antikörper gegen CD11a (M17/4) oder ein polyklonale Antikörper gegen den murinen P2X7 Rezeptor (K1G) verwendet. Anschließend wurde die Matrix mit PBS 1 % Igepal dreimal gewaschen. Die Zelllysate wurden für 60 Minuten mit 15 µl unbehandelter Protein G Sepharose inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aufzufangen. Nachher wurde Protein G Matrix 3 Minuten bei 5000 U/Min abzentrifugiert, der Überstand auf die Antikörper-Protein G Sepharose Matrix gegeben und wiederum 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Matrices wurden fünfmal gewaschen und in SDS Ladepuffer aufgenommen.

### *SDS-PAGE*

Für die SDS-PAGE Analyse wurde das "NuPAGE" System verwendet. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (LDS-Ladepuffer + 1 mM DTT) 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Sie wurden in einem 10 %igen Tricin-Gel (MOPS-Laufpuffer + DTT) neben einem Größenmarker (MultiMark) aufgetragen und ca. 30 Minuten bei 200 V aufgetrennt. Es folgte ein „Wet Blot“ mit dem „X Cell II Blotting“ System. Die PVDF Membran wurde 10 Sekunden mit Methanol aktiviert und zusammen mit den Filterpapieren und der Nitrozellulose- (NC) Membran mit Blotpuffer befeuchtet. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen die NC-Membran (Anoden-Seite) und die PVDF-Membran (Kathoden-Seite) gelegt. Die Proteine wurden erst 1 Minute auf die NC- und dann 90 Minuten auf die PVDF-Membran bei 30V transferiert.

### *Silberfärbung*

Das Muster der größenfraktionierten Proteine konnte mit Hilfe einer Silberfärbung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran überprüft werden. Die Membran wurde dazu 1-2 Minuten in einer 10 ml Silberlösung schwenkend gefärbt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und an der Luft getrocknet.

### *Immunodetektion*

Die Immunodetektion der ADP-ribosylierten Proteine erfolgte auf einer PVDF-Membran, die zuerst 30 Minuten in einer Blocklösung (TBS mit 5% Ziegen Serum) bei RT inkubiert wurde.

Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper in der angegebenen Verdünnung für eine Stunde bei 4 °C (rotierend) und für eine weitere Stunde mit dem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase (HRP) (1:5000) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation folgten drei einminütige und zwei zehnminütige Waschschrte. Dann wurde die Chemilumineszenzreaktion mit dem "ECL Western Blotting detection reagent" durchgeführt (**Abbildung 10**). Die Membran wurde mit einer Plastikfolie bedeckt, ein Hyperfilm ECL (Roche) für wenige Sekunden bis mehrere Minuten aufgelegt und entwickelt.

#### 2.2.10 Radioisotopen-basierte enzymatische Assays

Es sollte die Fähigkeit von Antikörpern untersucht werden, die ART-Aktivität von rekombinant hergestellter ART2 zu blockieren. Dazu wurden 5 µl ART2.2 (0,07 mg/ml) und 1 µl AK mit 10 nM NAD, 0,1 µCi <sup>32</sup>P-NAD, 1mM Agmatin in einem Endvolumen von 25 µl PBS 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden dann an StrataClean Resin Matrix gebunden und abzentrifugiert. Mit je 1 µl Überstand wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

In anderen Experimenten sollte untersucht werden, ob der CD38 Inhibitor araF-NAD in der Lage ist die ART-Aktivität zu erhöhen. Dazu wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen mit araF-NAD in der angegebenen Konzentration, NAD (2 µM, 2 µCi <sup>32</sup>P-NAD) und Agmatin (4 mM) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und 1 µl Überstand in einer Dünnschichtchromatographie untersucht.

#### *Nachweis der Enzymreaktion: Dünnschicht-Chromatographie und Autoradiographie*

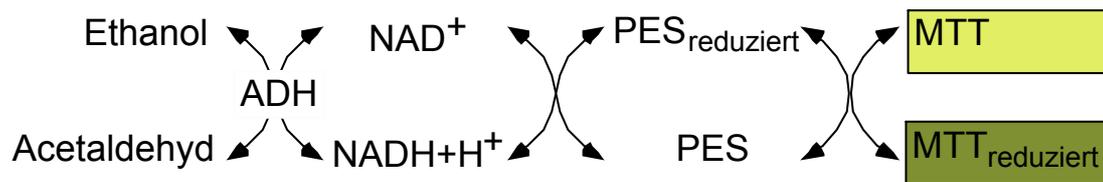
Die Proben wurden nach der Inkubation mit <sup>32</sup>P-NAD abzentrifugiert und je 1 µl des Überstandes auf eine PEI-Cellulose Folie aufgetragen. Die Folie wurde 5 Minuten in Lösung 1 (1 M Essigsäure) in einer Glaskammer gestellt, um die Nukleotide entsprechend ihrer Löslichkeit aufzutrennen. Die Auftrennung mit der Lösung 2 (0,3 M LiCl, 0,9 M Essigsäure) wurde für 50 Minuten durchgeführt. Die Folie wurde luftgetrocknet, eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm bei - 80°C zwischen 3 und 20 Stunden exponiert.

#### 2.2.11 Berechnung von 3D-Strukturen *in silico*

Mit der Aminosäuresequenz der ART2.1 der NZW Maus (Koch-Nolte *et al.* 1995) und der Sequenz der ART2b aus der Ratte (Mueller-Dieckmann *et al.* 2002; Ritter *et al.* 2003) wurde mit dem Computerprogramm T-Coffee (Notredame *et al.* 2000) ein Alignment gemacht. Dabei wurden jeweils die Leader-Sequenz und die GPI-Anker-Sequenz ausgeschlossen. Dieses Alignment wurde in den SWISS-MODEL Server eingegeben und so anhand der bekannten Kristallstruktur der Ratten ART2b ein Modell für die 3D-Struktur der murinen ART2.1 errechnet (Guex and Peitsch 1997; Schwede *et al.* 2003). Die Koordinaten für das NAD wurde den Daten der errechneten Struktur hinzugefügt und so die Moleküle zusammen mit der PyMOL Software visualisiert (DeLano 2002).

### 2.2.12 NAD-Cycling-Assay

Der NAD-Cycling-Assay ist ein sensitiver Assay um NAD qualitativ zu bestimmen (Zocchi *et al.* 1999). NAD dient dabei als Katalysator, der eine Reihe von Redoxreaktionen ermöglicht. Bei dem Assay werden außer NAD alle Reaktionsstoffe im Überschuss eingesetzt, so dass die NAD-Konzentration der Geschwindigkeits-bestimmende Faktor ist. Wie **Abbildung 11** zeigt, führt die Oxidierung von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) indirekt über Reduktion von Phenazin-Ethosulfat (PES) zur Reduktion von Methylthiazoletetrazolium (MTT). Dabei verändert sich das Absorbtionsspektrum von MTT, es bekommt eine höhere Absorbtion bei  $\lambda=570$  nm. Die Farbe des Reaktionspuffers ändert optisch sich von einem klaren Gelb zu einem schmutzigen Schwarzgelb.



**Abbildung 11: NAD dient als Katalysator für die Reduzierung von MTT.**

Beim NAD-Cycling-Assay wurde mit klarem Medium (PBS oder klares DMEM) gearbeitet. Von einer NAD Standardlösung (10  $\mu$ M) wurden für die Standardkurve 0, 10, 20 und 50  $\mu$ l in Messküvetten pipettiert. Von dem Zelllysate wurden 5 - 100  $\mu$ l in Küvetten gegeben und ggf. auf 100  $\mu$ l mit Carbonat Puffer aufgefüllt. Danach wurden 900  $\mu$ l Reaktionspuffer im Abstand von 10 Sekunden in jede Küvette dazugegeben. Die Proben wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Der Reaktionspuffer wurde unmittelbar vor der Durchführung des Assays angesetzt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach der angegebenen Zeit (ca. 15 min) im Abstand von 10 sec. Der Wert ohne NAD wurde als Nullwert verwendet.

Anhand der Standardkurve wurde die Menge von NAD (in pmol) in jeder Küvette errechnet. Die NAD Menge wurde auf die Proteinmenge, die Zellzahl oder auf das errechnete Zellvolumen bezogen. Für die annähernde Ermittlung des Zellvolumens wurde der Durchmesser der Zellen (10  $\mu$ m) in das Zellvolumen umgerechnet. Die Proteinmenge wurde mit dem Bradford-Protein Assay ermittelt (Bradford 1976).

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Dissertation gliedert sich in fünf Kapitel. Das erste Kapitel beginnt mit Untersuchungen zum Nachweis der ADP-Ribosylierung mit Hilfe des 1G4 Antikörpers. Darauf folgen die Untersuchungen zur ART-vermittelten Aktivierung des P2X7 Purinozeptors. Ein weiteres Kapitel behandelt den Einfluss der Ekto-NADase CD38 auf die ARTs. Die Untersuchungen der ART-Aktivität bei verschiedenen Spezies werden in einem weiteren Kapitel dargestellt. Die Ergebnisse zur Reversibilität der ADP-Ribosylierung *in vitro* und *in vivo* werden im letzten Kapitel des Ergebnisteils zusammengefasst.

#### 3.1 Allgemeine Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung und deren Detektion mit dem 1G4 Antikörper

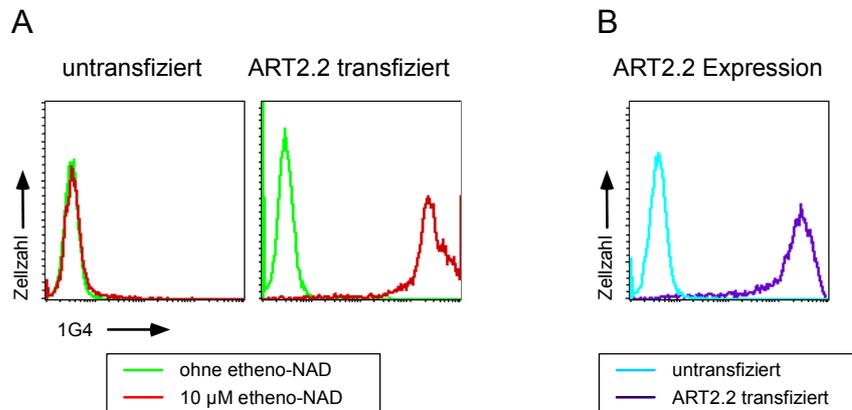
Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein immunologischer Assay zum Nachweis von ADP-Ribosylierung etabliert. Er basiert auf einem monoklonalen Antikörper (1G4), der an etheno-Adenosin bindet (Giovane *et al.* 1985; Young and Santella 1988). Eine etheno-Adenosin Gruppe kommt im NAD-Analogon etheno-NAD und in der etheno-ADP-Ribose-Gruppe vor (**Abbildung 4**). Der 1G4 Antikörper erlaubt es, etheno-ADP-Ribosylierung in FACS-Analysen nachzuweisen, mit deren Hilfe auch enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt wurden. Mittels SDS-PAGE Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich der 1G4 Antikörper auch eignet, in Western Blots etheno-ADP-ribosylierte Proteine zu detektieren. In diesen Experimenten wurden die ARTs auch untereinander verglichen. Dieses Kapitel schließt mit Versuchen, in denen die Hemmung der ADP-Ribosylierung mit Antikörpern untersucht wurde.

##### 3.1.1 Nachweis von etheno-ADP-ribosylierten Membranproteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 auf ART2-transfizierten Lymphomzellen in FACS-Analysen

Zunächst sollte untersucht werden, ob ARTs das NAD Analogon etheno-NAD als Substrat verwenden können und Aminosäurereste von Membranproteinen vitaler Zellen etheno-ADP-ribosyliert werden. Dies sollte anschließend mit dem 1G4 Antikörper in FACS-Analysen nachgewiesen werden (Young and Santella 1988; Davis *et al.* 1998).

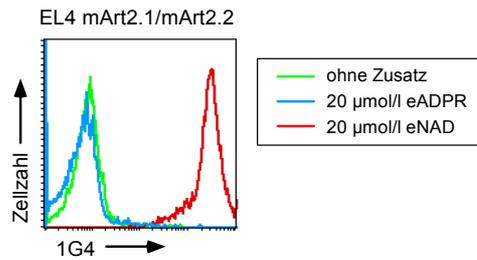
Stabil mit muriner ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden mit 10  $\mu$ M etheno-NAD für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und anschließend in zwei Schritten mit dem 1G4 Antikörper und einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. Bei dem verwendeten Sekundärantikörper handelte es sich um ein anti-Maus Immunglobulin F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub> Fragment, das mit Phycoerythrin (PE) konjugiert war. Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt und konnten so in der Auswertung der FACS-Analyse „ausgegattet“ werden. Im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen ließen sich die ART-transfizierten Zellen nach etheno-NAD Inkubation mit 1G4 anfärben (**Abbildung 12A**). Um zu bestätigen, dass die transfizierten Zellen rekombinante ART2.2 exprimieren, wurden sie mit dem M2 Antikörper und anti-Maus Ig<sup>PE</sup>

angefärbt. Der M2 Antikörper ist gegen den Flag-tag gerichtet, der in dem Konstrukt für rekombinante ART2.2 enthalten ist (Koch-Nolte *et al.* 1999). Dabei konnte die Expression der ART2.2 auf transfizierten Zellen bestätigt werden.



**Abbildung 12: Nachweis der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf ART2.2-transfizierten DC27.10 Lymphomzellen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 in FACS-Analysen. (A)** Untransfizierte und mit muriner ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit (rot) und ohne (grün) 10 µM etheno-NAD inkubiert. Die etheno-ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine wurden erst mit 1G4 und dann mit anti-Maus Ig<sup>PE</sup> Antikörpern angefärbt und im FACS untersucht. **(B)** Untransfizierte und mit muriner ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden mit anti-Flag-tag Antikörper und Fluoreszenz-markiertem sekundär Antikörper (anti-Maus Ig<sup>PE</sup>) angefärbt und im FACS untersucht (untransfiziert: türkis; transfiziert: lila).

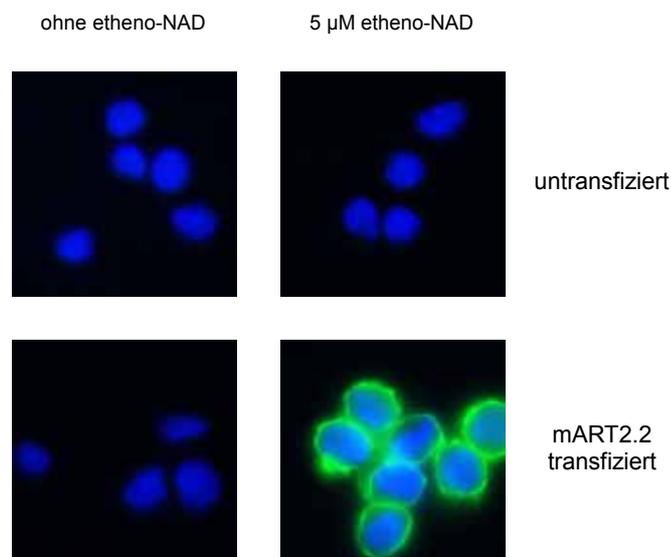
Um auszuschließen, dass etheno-ADP-Ribose nicht-enzymatisch an Zelloberflächenproteine bindet, wurden ART2-transfizierte EL4 Lymphomzellen vergleichend mit etheno-NAD und mit etheno-ADP-Ribose inkubiert. Etheno-ADP-Ribose wurde zuvor durch Hydrolyse von etheno-NAD in etheno-ADP-Ribose und Nicotinamid mit löslichem humanen CD38 aus Seminalplasma hergestellt (Funaro *et al.* 1996). Dafür wurde etheno-NAD mit 10 % Seminalplasma für eine Stunde bei 37°C inkubiert. EL4 Lymphomzellen, die mit muriner ART2.1 und ART2.2 stabil transfiziert waren, wurden mit je 20 µM etheno-NAD oder etheno-ADP-Ribose inkubiert und mit dem 1G4 Antikörper und Sekundärantikörper angefärbt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich mit Hilfe des 1G4 Antikörpers etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine auch auf EL4 Zellen nachweisen lassen (**Abbildung 13**). Die Inkubation mit etheno-ADP-Ribose führt nicht zur Anfärbung der Zellen, was darauf hindeutet, dass keine etheno-ADP-Ribose nicht-enzymatisch an Zelloberflächenproteine bindet.



**Abbildung 13: Inkubation von ART-transfizierten EL4 Lymphomzellen mit etheno-NAD und etheno-ADP-Ribose:** EL4 Lymphomzellen, die mit muriner ART 2.1 und ART 2.2 doppeltransfiziert waren, wurden 30 Minuten bei 37 °C ohne und mit etheno-NAD (20 µM) sowie mit etheno-ADP-Ribose (20 µM) inkubiert. Die Zellen wurden mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS untersucht. Etheno-ADP-Ribose wurde durch enzymatische Spaltung von etheno-NAD durch lösliches CD38 aus humanem Seminalplasma (10 %ige Lösung, 1 Stunde bei 37 °C) hergestellt.

### 3.1.2 Nachweis von etheno-ADP-ribosylierten Membranproteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Da sich etheno-NAD und der 1G4 Antikörper eignen, um ADP-Ribosylierung in FACS-Analysen zu untersuchen, sollte die Zelloberflächenanfärbung auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar sein. Untransfizierte und mit muriner ART2.2-transfizierte Zellen wurden mit etheno-NAD inkubiert und anschließend mit Fluoreszenz-markiertem 1G4 Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 Farbstoff gefärbt (Dive *et al.* 1992). Die Zellen wurden dann unter einem Fluoreszenzmikroskop angesehen und fotografiert (**Abbildung 14**). Nur bei den ART-transfizierten Zellen erkennt man nach etheno-NAD Inkubation eine grüne Zelloberflächenanfärbung. Dementsprechend eignet sich der 1G4 Antikörper zur Untersuchung von Zelloberflächen ADP-Ribosylierung in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

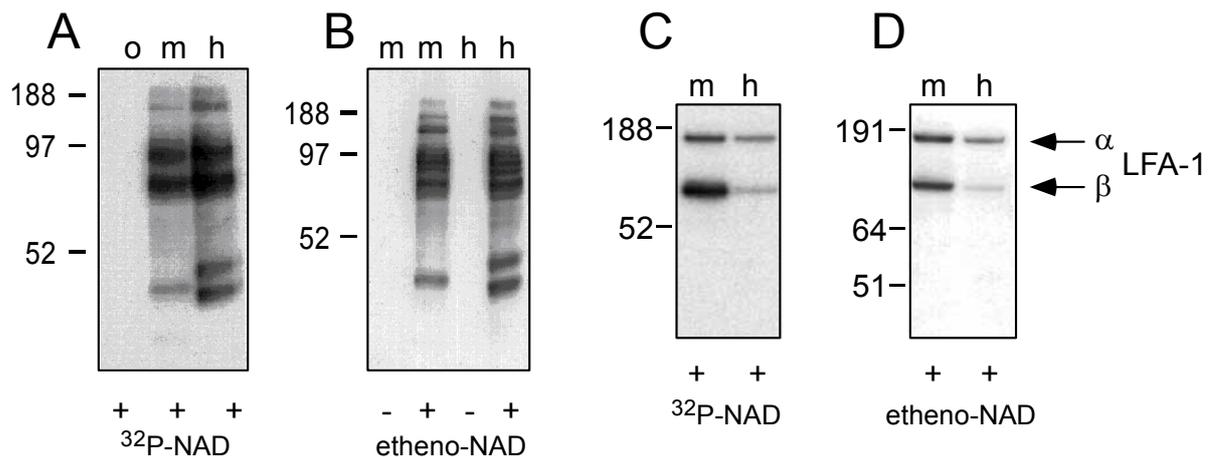


**Abbildung 14: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Inkubation ART-transfizierter DC27.10 Lymphomzellen mit etheno-NAD.** Untransfizierte und mit muriner ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden 60 Minuten mit Hoechst 33342 bei 37 °C inkubiert. Während der letzten 20 Minuten wurden die Zellen mit etheno-NAD versetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 2 % PFA fixiert. Die Zellen wurden mit 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt, mit „Permanent Mounting Medium“ auf Objektträger aufgebracht und bei 640-facher Vergrößerung fotografiert.

### 3.1.3 Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Proteinen mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 im Western Blot

Um zu untersuchen, ob von ARTs dieselben Proteine etheno-ADP-ribosyliert wie ADP-ribosyliert werden, wurden vergleichende SDS-PAGE Untersuchungen mit etheno-NAD und radioaktiv-markiertem NAD ( $^{32}\text{P}$ -NAD) durchgeführt. DC27.10 Lymphomzellen, die mit humaner oder muriner ART1 (CD296) stabil transfiziert waren, wurden mit  $^{32}\text{P}$ -NAD oder etheno-NAD inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1%-iger Igepal Lösung lysiert und die Proteine in einer SDS-PAGE größenfraktioniert. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte bei  $^{32}\text{P}$ -markierten Proteinen über eine Autoradiographie, während etheno-ADP-ribosylierte Proteine mit 1G4 und Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (anti-Maus Ig<sup>PO</sup>) detektiert wurden. **Abbildung 15** zeigt, dass ADP-Ribosylierung sowohl mit  $^{32}\text{P}$ -NAD (**A**) als auch mit etheno-NAD (**B**) in SDS-PAGE Analysen nachgewiesen werden konnte. Humane und murine ART1 ADP-ribosylieren eine Reihe von Proteinen. Das Muster der ADP-ribosylierten Proteine gleicht sich in beiden verwendeten Methoden, was darauf hindeutet, dass murine und humane ART1 die gleichen Zielproteine modifizieren. Es fällt jedoch auf, dass in den Spuren mit muriner ART1 eine Bande bei 30 kDa erkennbar ist, bei den Spuren mit humaner ART1 sind es jedoch zwei Banden (25 und 40 kDa). Bei diesen Banden handelt es sich vermutlich um automodifizierte ART1. Humane ART1 kommt in zwei verschiedenen Glykosylierungsstufen auf den Zellen vor. In den Spuren von untransfizierten DC27.10 Zellen (**A**, Spur o), die mit  $^{32}\text{P}$ -NAD behandelt wurden, sind keine Banden vorhanden. Diese Zellen haben keine Zelloberflächenproteine ADP-ribosyliert. In den Spuren von Zellen, die nicht mit etheno-NAD inkubiert wurden, sind ebenfalls keine Banden zu sehen (**B**, Spuren ohne etheno-NAD), was die Spezifität des 1G4 Antikörpers unterstreicht.

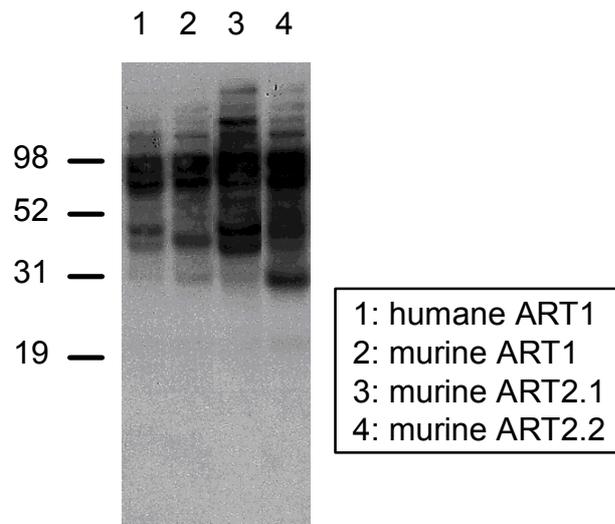
Das Integrin LFA-1 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten ist ein bereits bekanntes Zielprotein der ARTs (Nemoto *et al.* 1996). Ziel der vergleichenden Untersuchungen mit etheno-NAD und  $^{32}\text{P}$ -NAD war es, Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei der Modifikation von LFA-1 durch humane und murine ART1 aufzudecken. Dazu wurde nach Behandlung ART-transfizierter DC27.10 Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -NAD oder etheno-NAD eine Immunpräzipitation mit einem gegen die alpha-Kette von LFA-1 gerichteten monoklonalen Antikörper durchgeführt (anti-CD11a, M17/4) (Okamoto *et al.* 1998). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet. Anschließend wurde eine Immunodetektion mit 1G4 bzw. eine Autoradiographie durchgeführt. In **Abbildung 15** sind nach  $^{32}\text{P}$ -NAD (**C**) und etheno-NAD (**D**) Behandlung je zwei Proteinbanden zu erkennen, bei denen es sich um die alpha-Kette und die co-präzipitierte kleinere beta-Kette von LFA-1 handelt, die beide ADP-ribosyliert wurden. Dies ist sowohl mit radioaktiv markiertem NAD als auch mit etheno-NAD in gleicher Weise nachweisbar. Interessanterweise scheint die murine ART1 die beta Kette des LFA-1 stärker zu ADP-ribosylieren als die alpha Kette. Bei der humanen ART1 verhält es sich umgekehrt.



**Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine von ART-transfizierten DC27.10 Lymphomzellen mittels Autoradiographie oder 1G4-Immunoblot nach SDS-PAGE.** Je  $10^7$  DC 27.10 Lymphomzellen wurden für die Analysen eingesetzt (untransfiziert (o); humane ART1 (h) und murine Art1 (m)). Die Zellen wurden mit  $^{32}\text{P}$ -NAD ( $5\ \mu\text{Ci}$ ,  $2\ \mu\text{M}$ , **(A)**) oder mit  $20\ \mu\text{M}$  etheno-NAD (**(B)**) inkubiert. Die Zellen wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS mit 1 % Igepal und 1 mM ASBSF lysiert.  $5 \times 10^5$  Zelläquivalente wurden in SDS Ladebuffer aufgenommen (**(A)** und **(B)**). Mit den Lysaten nach etheno-NAD (**(C)**) und  $^{32}\text{P}$ -NAD (**(D)**) Inkubation wurde eine Immunpräzipitation mit immobilisierten anti-CD11a Antikörper (M17/4) durchgeführt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet. Radioaktiv markierte Proteine wurden in einer Autoradiographie durch Exposition eines Kodak Xomat Röntgenfilms detektiert. Etheno-ADP-ribosylierte Proteine wurden mittels 1G4, anti-Maus $^{\text{PO}}$  und dem ECL-System detektiert.

Um das Muster der Zielproteine von verschiedenen ARTs näher zu bestimmen, wurden DC27.10 Zellen, die mit humaner ART1, muriner ART1, muriner ART2.1 oder muriner ART2.2 stabil transfiziert waren, mit  $50\ \mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. ART2.1-transfizierte Zellen wurden zusätzlich mit DTT behandelt, um die Enzymaktivität zu erhöhen (siehe auch Abschnitt 3.1.5). Die Zellen wurden daraufhin mit Triton X-100 lysiert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet. Anschließend wurde eine Immunodetektion mit 1G4 und anti-Maus  $\text{Ig}^{\text{PO}}$  durchgeführt. **Abbildung 16** zeigt, dass die untersuchten ARTs etheno-NAD als Substrat verwenden konnten und Zelloberflächenproteine etheno-ADP-ribosylierten. Das Muster der markierten Proteine ist bei allen ARTs ähnlich. Die Banden zwischen 30 und 50 kDa entsprechen den ARTs selbst, die von den transfizierten Zellen überexprimiert werden und sich selbst modifizieren können (siehe oben). Die beiden murinen ART2 scheinen eine stärkere Aktivität zu haben (Spuren 3 und 4), als die anderen untersuchten ARTs.

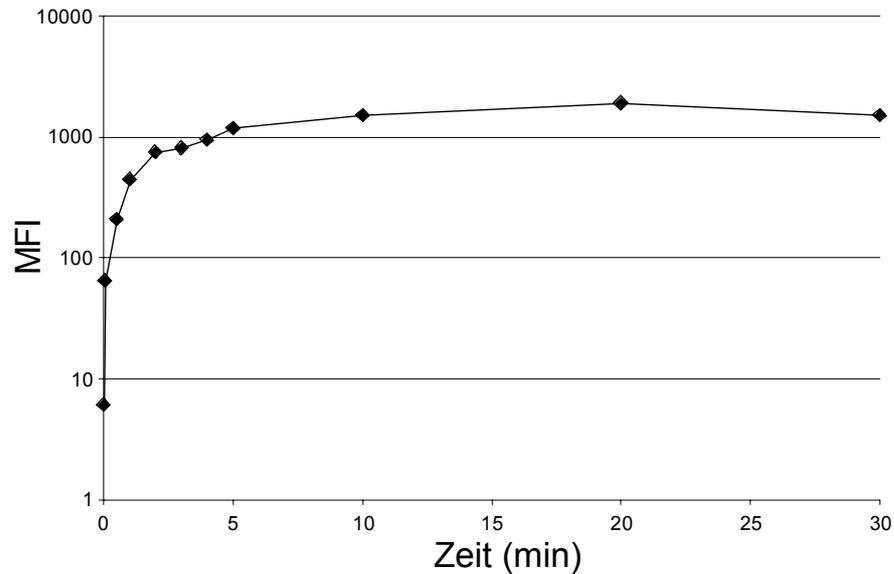
Alle bei diesen Untersuchungen eingesetzten ARTs ADP-ribosylieren nicht ein bestimmtes Membranprotein, sondern eine Reihe von Proteinen. Die ARTs sind im Gegensatz zu vielen bakteriellen Toxinen promiskuitiv und verhalten sich ähnlich wie Toxine von *P. aeruginosa* (ExoS) und von *B. cereus* (MTX) (Barbieri 2000; Schirmer *et al.* 2002).



**Abbildung 16: Vergleichende Western Blot Analyse der modifizierten Proteine nach etheno-NAD-Inkubation von mit verschiedenen ARTs transfizierten DC27.10 Lymphomzellen.** Jeweils  $10^6$  stabil mit ART-transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit 50  $\mu$ M etheno-NAD inkubiert. Mit muriner ART2.1 transfizierte Zellen wurden zusätzlich mit 2 mM DTT behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die löslichen Proteine an StrataClean Resin gebunden. Danach wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine auf eine PVDF Membran geblottet. Etheno-ADP-ribosylierte Proteine wurden mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PO</sup> Antikörpern und dem ECL-System detektiert.

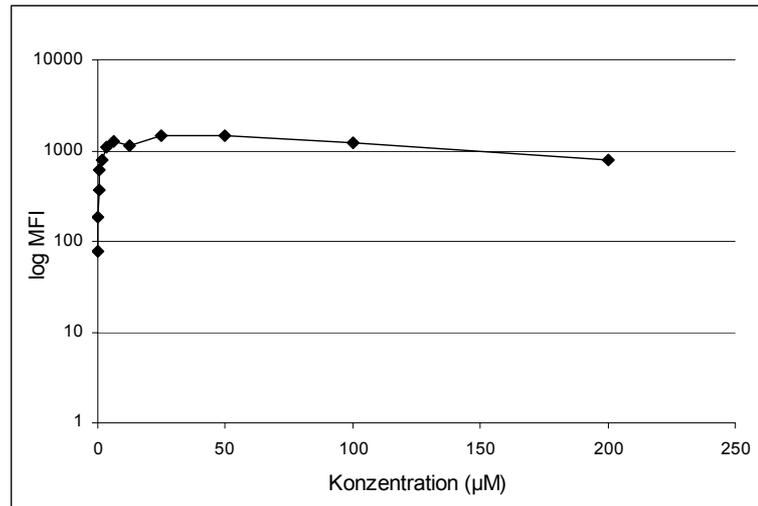
#### 3.1.4 Untersuchungen zur Enzymkinetik der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen

Die Kinetik der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen sollte mit dem 1G4 Assay in FACS-Analysen an ART-transfizierten Lymphomzellen untersucht werden. Dazu wurden stabil mit muriner ART2.2 transfizierte DC27.10 Lymphomzellen bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1  $\mu$ M etheno-NAD versetzt. Alle Zellen wurden am Ende der Reaktion gleichzeitig gewaschen und mit 1G4 angefärbt. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung von Zelloberflächenproteinen auf vitalen Zellen wurde in FACS-Analysen bestimmt. Die etheno-ADP-Ribosylierung erfolgte in diesen Versuchen mit transfizierten Zellen erstaunlich schnell (**Abbildung 17**). Innerhalb von Sekunden waren modifizierte Zelloberflächenproteine nachweisbar und nach 5 Minuten die meisten Zielproteine etheno-ADP-ribosyliert. Das Maximum wurde nach 20 Minuten erreicht, anschließend fiel die Anfärbung wieder leicht ab.



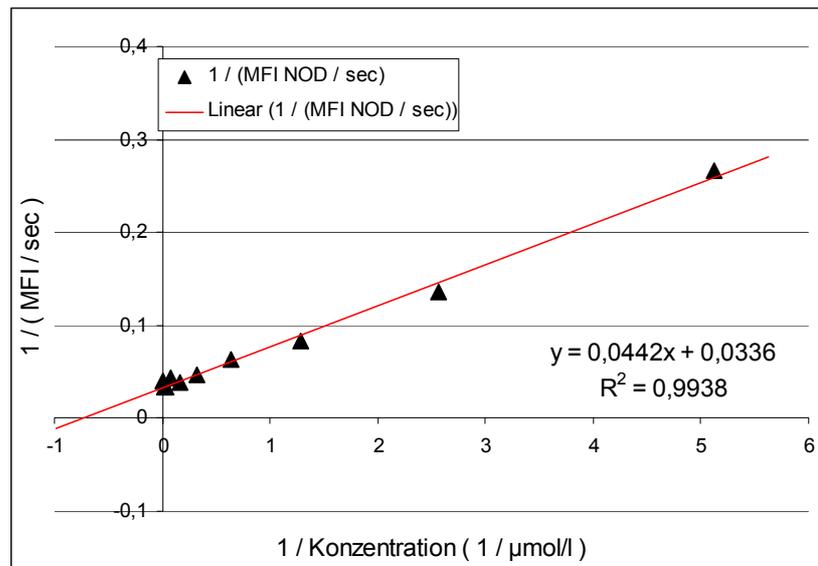
**Abbildung 17: Kinetik der etheno-ADP-Ribosylierung nach Inkubation von ART2.2-transfizierten Lymphomzellen mit etheno-NAD.** Mit muriner ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden für die angegebene Zeit (0-30 Minuten) mit 1  $\mu$ M etheno-NAD inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Verdünnung des Reaktionsansatzens mit einem Überschuss an Medium gestoppt (1:20). Die Zellen wurden dann mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS untersucht. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung wurde mit CellQuest bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen von etheno-NAD erstellt (0-200  $\mu$ M). Damit wurden stabil mit ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen für kurze Zeit inkubiert. Bei dem hier dargestellten Versuch wurden die Zellen nach 50 Sekunden gewaschen und dann für FACS-Analysen mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt (**Abbildung 18**). Die MFI der 1G4-Anfärbung und damit die Menge der etheno-ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine nahm mit steigender etheno-NAD Konzentration zu. Dabei wurden schon bei etheno-NAD Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich Zelloberflächenproteine ADP-ribosyliert. Bei maximalen Konzentrationen von 200  $\mu$ M nahm die Anfärbung wieder ab.



**Abbildung 18: Konzentrationsabhängigkeit der 1G4 Anfärbung von etheno-NAD bei ART2.2-transfizierten Zellen.** DC27.10 ART2.2-transfizierte Lymphomzellen wurden für 50 Sekunden mit etheno-NAD (0 – 200 µM) inkubiert und gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> markiert und die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung im FACS gemessen. Die MFI wurde gegen die etheno-NAD Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

Um die Enzymkinetik der ADP-Ribosylierung näher zu untersuchen, sollten die Michaelis-Menden-Konstante ( $K_M$ -Wert) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) der ADP-Ribosylierung bestimmt werden. Der  $K_M$ -Wert gibt an, bei welcher Substratkonzentration die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, d.h. bei welcher Substratkonzentration die Hälfte der Enzyme das Substrat gebunden haben.  $V_{max}$  wird normalerweise in U/min angegeben. Da hier die MFI aus FACS-Analysen, bzw. die Änderung der MFI in einem Zeitraum gemessen wird, kann man den Wert der maximalen Geschwindigkeit leider nicht mit anderen Ergebnissen vergleichen. Um den  $K_M$ -Wert der etheno-ADP-Ribosylierungsreaktion zu bestimmen, wurden die Werte aus **Abbildung 18** in einem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt (**Abbildung 19**). Dabei werden die reziproken Werte der Substrat-Konzentration ( $1/Konzentration$ ) gegen die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/v$ ) aufgetragen. Die Werte in dem Diagramm liegen auf einer Geraden. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse lässt sich der  $K_M$ -Wert errechnen ( $K_M = -1/x$  für  $y=0$ ). Der  $K_M$ -Wert für ART2.2 und etheno-NAD auf der Zelloberfläche beträgt 1,3 µM. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse kann man die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) errechnen, die hier 30 MFI/sec beträgt.

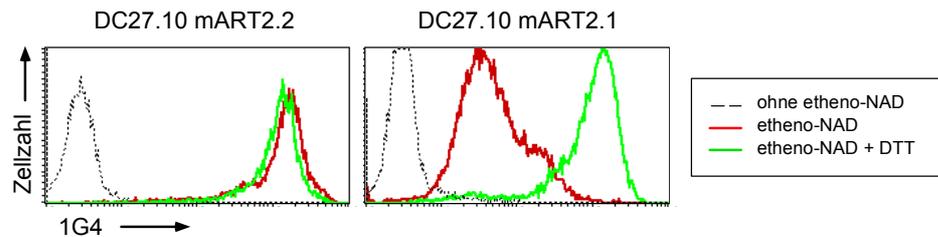


**Abbildung 19: Lineweaver-Burk Diagramm der 1G4 Anfärbung nach Inkubation mit etheno-NAD.** Die Werte aus **Abbildung 18** wurden in ein Lineweaver-Burk Diagramm überführt. Mit Excel wurde eine Ausgleichsgerade durch die Werte gelegt, deren Formel im Diagramm angegeben ist. Die Gerade schneidet die X-Achse bei  $-0,76/\mu\text{M}$ .

### 3.1.5 Einfluss von DTT auf die ART-Aktivität von muriner ART2.1

Im Folgenden soll der Einfluss von Dithiothreitol (DTT) auf die murine ART2.1 dargestellt werden. DTT ist ein reduzierendes Agens, das Disulfidbrücken in Proteinen spalten kann. Von ART2.1 ist bekannt, dass die Aktivität dieses Enzyms durch reduzierende Mittel gesteigert wird (Takada *et al.* 1993). ART2.1 besitzt im Vergleich zu den anderen murinen ARTs ein zusätzliches Cysteinpaar, das wahrscheinlich eine Disulfidbrücke bildet, die durch DTT gespalten wird, und so das Enzym aktiviert (Hara *et al.* 2000; Glowacki *et al.* 2002) (siehe **Abbildung 54** und **Abbildung 62**).

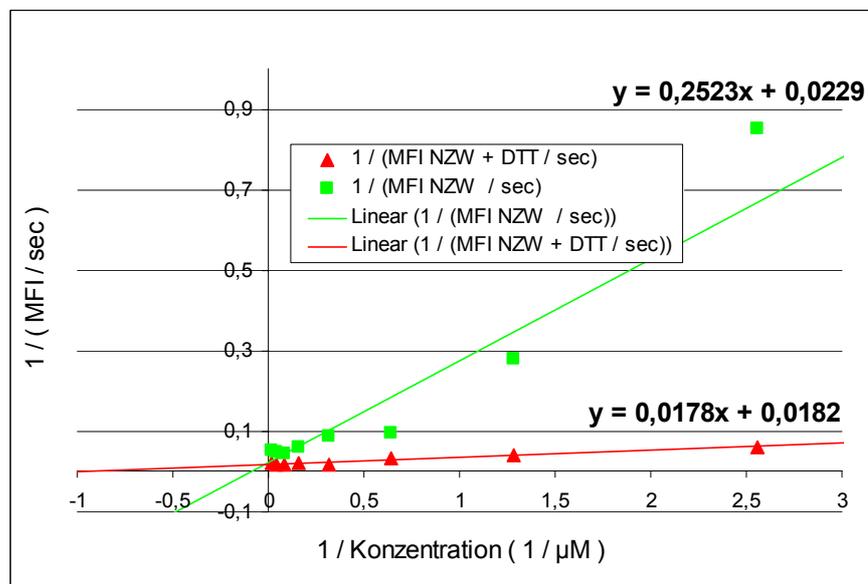
Stabil mit muriner ART2.1 oder ART2.2-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden mit  $3 \mu\text{M}$  etheno-NAD mit und ohne  $1 \text{ mM}$  DTT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für FACS Analysen mit 1G4 und anti-Maus  $\text{Ig}^{\text{PE}}$  markiert. **Abbildung 20** zeigt, dass DTT wie erwartet keinen Einfluss auf die Aktivität von muriner ART2.2 hatte. DTT erhöhte jedoch die Aktivität der ART2.1 um ein Vielfaches.



**Abbildung 20: Einfluss von DTT auf die Aktivität der murinen ART2.1 auf ART-transfizierten Lymphomzellen und T Zellen.** Murine ART2.1-transfizierte DC27.10 Zellen wurden mit  $3 \mu\text{M}$  etheno-NAD für 20 sec. inkubiert, DC27.10 ART2.2-transfizierte Zellen mit  $2 \mu\text{M}$  etheno-NAD ohne DTT oder mit  $20 \mu\text{M}$  etheno-NAD mit  $1 \text{ mM}$  DTT. Daraufhin wurden die Zellen mit 1G4 und anti-Maus  $\text{Ig}^{\text{PE}}$  angefärbt und im FACS gemessen. Die Abbildung zeigt Histogramm Plots von Zellen die ohne etheno-NAD (gestrichelte Linie), mit etheno-NAD (rote Linie) und Zellen, die mit etheno-NAD und DTT (grün) inkubiert wurden.

Der Einfluss von DTT auf die Dosis-Wirkungsbeziehung der ADP-Ribosylierung der murinen ART2.1 sollte bei ART-transfizierten DC27.10 Zellen untersucht werden. Dazu wurden Zellen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DTT mit etheno-NAD ( $0 - 200 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Mit den Daten aus diesen Versuchen wurden Lineweaver-Burk Diagramme erstellt, um die Michaelis-Menden-Konstante ( $K_M$ ) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) zu ermitteln.

**Abbildung 21** zeigt, dass durch DTT die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  nur leicht gesteigert wurde ( $V_{\text{max ohne DTT}}=43,7 \Delta\text{MFI}/\text{sec}$  und  $V_{\text{max mit DTT}}=54,9 \Delta\text{MFI}/\text{sec}$ ). Die Michaelis-Menden-Konstante verringerte sich jedoch durch die Zugabe von DTT ( $K_{M \text{ ohne DTT}}=11 \mu\text{M}$ ;  $K_{M \text{ mit DTT}}=1 \mu\text{M}$ ), d.h. mit DTT wird die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer geringeren Substratkonzentration erreicht.



**Abbildung 21: Lineweaver-Burk-Diagramm der 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD Inkubation ART2.1-transfizierter Zellen mit und ohne DTT.** Stabil mit muriner ART2.1-transfizierte DC27.10 Lymphomzellen wurden für 20 sec mit etheno-NAD-Konzentration ( $0-200 \mu\text{M}$ ) ohne (grün) oder mit  $1 \text{ mM}$  DTT (rot) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, mit 1G4 und anti-Maus  $\text{Ig}^{\text{PE}}$  angefärbt und im FACS untersucht. Die MFI der 1G4 Anfärbung wurde mit CellQuest ermittelt. In dem Diagramm wurde der reziproke Wert der Konzentration gegen den reziproken Wert der  $\Delta\text{MFI}/\text{sec}$  aufgetragen.

### 3.1.6 Untersuchung einer Zelllinie mit endogener ART-Aktivität

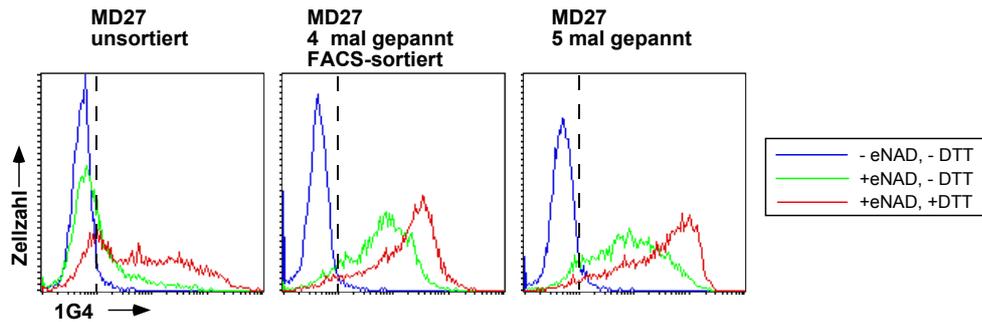
In den bisher vorgestellten Versuchen mit Kulturzellen wurden ART-transfizierte Zellen untersucht. Die dabei in den Kern eingeschleusten Gene werden von den Zellen überexprimiert, d.h. die ARTs auf transfizierten Zellen kommen in einer unphysiologisch hohen Kopienzahl vor. Dies ist zur Untersuchung der qualitativen Funktion eines Enzyms durchaus erwünscht. Um die physiologische Bedeutung eines Enzyms zu erforschen eignen sich jedoch eher Zellen, die das entsprechende Enzym von sich aus in physiologischer Menge exprimieren.

Bei einer Untersuchung von MD27 Zellen, einer Hybridomzelllinie (Eshhar *et al.* 1993), auf Zelloberflächenantigene und ADP-Ribosylierung wurde mit dem 1G4 FACS Assay ART-Aktivität auf ca. 10 % der Zellen entdeckt.

#### *Anreicherung einer Zellpopulation mit hoher ART-Aktivität*

Die Zellen mit hoher ART-Aktivität sollten daraufhin in der Kultur angereichert werden. Als Sortiermethode wurde zunächst das Panning-Verfahren verwendet. Der Name Panning leitet sich von dem englischen Wort für Goldwaschen ab, bei dem in einer Schüssel die Goldteilchen aufgrund ihrer hohen Dichte schneller auf den Boden sinken als Steine. In Analogie dazu werden beim hier verwendeten Panning-Verfahren Zellen mit Hilfe von immobilisierten Antikörpern in einer Zellkulturschale festgehalten. Dafür wurden Zellen mit etheno-NAD inkubiert und mit unkonjugiertem 1G4 Antikörper markiert. Die Zellen wurden dann in eine Petrischale gegeben, die mit Antikörpern gegen anti-Maus Immunglobuline beschichtet war. Zellen ohne ART-Aktivität blieben nicht an der beschichteten Schale haften und konnten ab gespült werden. Die Zellen mit hoher ART-Aktivität wurden von den Antikörpern festgehalten, die an 1G4 und damit indirekt an etheno-ADP-Ribose-Reste gebunden hatten. Auf diese Weise konnte eine Population der MD27 Zellen angereichert werden, die hohe ART-Aktivität besitzt. Diese Prozedur wurde wiederholt, sobald die Zellen wieder hochgewachsen waren. In einem zusätzlich verwendeten Selektionsschritt wurden Zellen nach etheno-NAD Inkubation mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt und mit dem FACS Calibur auf hohe ART-Aktivität sortiert.

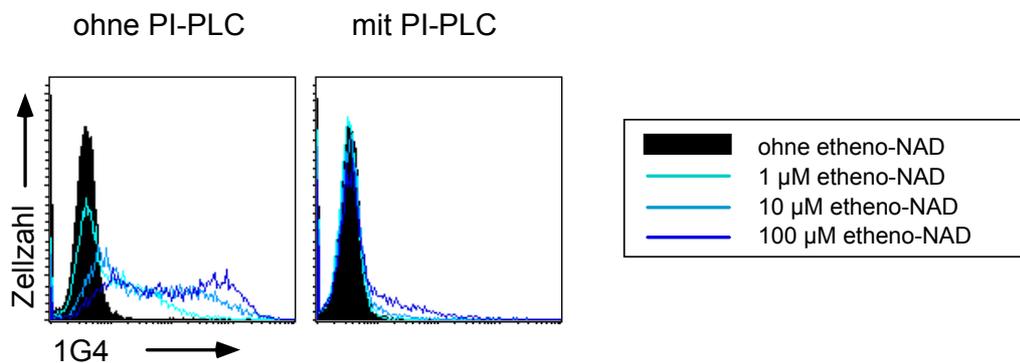
Mit diesen Methoden konnte eine MD27-Zellpopulation mit höherer ART-Aktivität angereichert werden, die als Model für endogen exprimierte ARTs dienen konnte. Interessanterweise konnte bei diesen Zellen auch der NAD induzierte Zelltod ausgelöst werden (Kapitel 3.2). Den Erfolg der Sortierung belegt **Abbildung 22**, in der FACS-Analysen von unsortierten, viermal „gepannten“ und einmal FACS sortierten sowie von fünfmal „gepannten“ MD27 Zellen dargestellt sind. Die ART-Aktivität der Zellen lässt sich durch DTT steigern, ein deutlicher Hinweis darauf, dass diese Zellen ART2.1 exprimieren.



**Abbildung 22: 1G4-Anfärbung von unsortierten und auf ART-Aktivität sortierten MD27 Zellen.** Sortierte und unsortierte MD27 Kulturzellen wurden ohne etheno-NAD (blau), mit 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD (grün) und mit 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD und 5  $\mu\text{M}$  DTT (rot) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt. Die Histogramm Plots zeigen die 1G4 Anfärbung der im FACS gemessenen Zellen.

#### *Untersuchung der Membranverankerung der ART-Aktivität auf MD27 Zellen*

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) spaltet Proteine von ihrem GPI-Anker in der Zellmembran (Wang *et al.* 1997). Da alle bisher bekannten mono-ADP-Ribosyltransferasen, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, GPI verankert sind, sollten auch die ART-Aktivität auf MD27 durch PI-PLC abgespalten werden können. Um dies zu untersuchen, wurden MD27 Zellen für eine Stunde bei 37°C mit oder ohne PI-PLC behandelt und daraufhin mit 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für FACS Analysen mit 1G4 angefärbt. Nach Inkubation mit PI-PLC zeigten eine konzentrationsabhängige Anfärbung mit 1G4 (**Abbildung 23**). Bei Zellen, die mit PI-PLC inkubiert wurden, wurde nur eine schwache Anfärbung eines geringen Teils der Zellen im FACS festgestellt. PI-PLC hat anscheinend die ART-Aktivität von der Zelloberfläche abgespalten. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass die von MD27 Zellen exprimierte ADP-Ribosyltransferase über einen GPI-Anker in der Zellmembran befestigt ist.

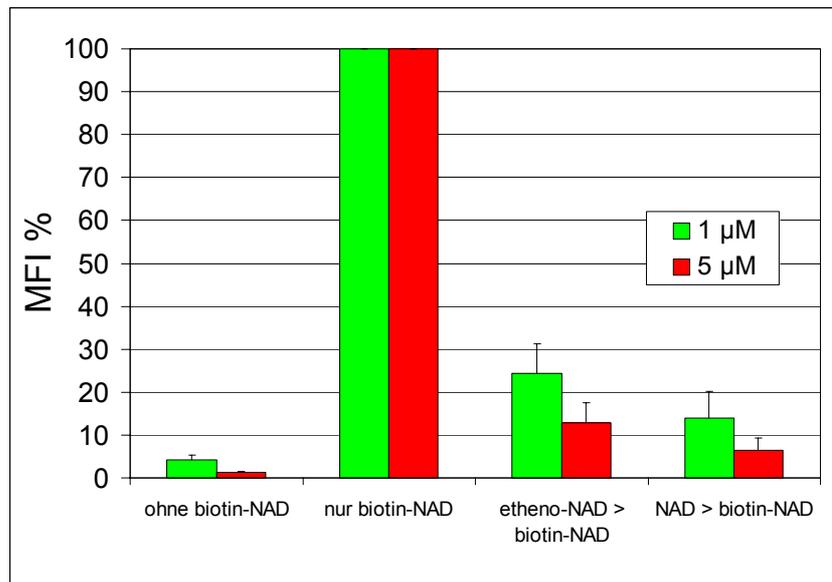


**Abbildung 23: Einfluss von PI-PLC auf die ADP-Ribosylierung der Zellmembranproteine von MD27 Zellen.** Neunfach auf ART-Aktivität sortierte MD27 Zellen (4\*1G4panning, 5\*FACS1G4) wurden für eine Stunde bei 37 °C mit und ohne Phospholipase C (0,2 U PI-PLC, in 200  $\mu\text{l}$  RPMI) behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit etheno-NAD (1, 10 und 100  $\mu\text{M}$ ) bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert und mit 1G4<sup>Alexa</sup> konjugiertem Antikörper angefärbt. Die Abbildung zeigt die Histogramm Auswertung der FACS-Analysen.

### 3.1.7 Untersuchungen zur Inhibition der ADP-Ribosylierung

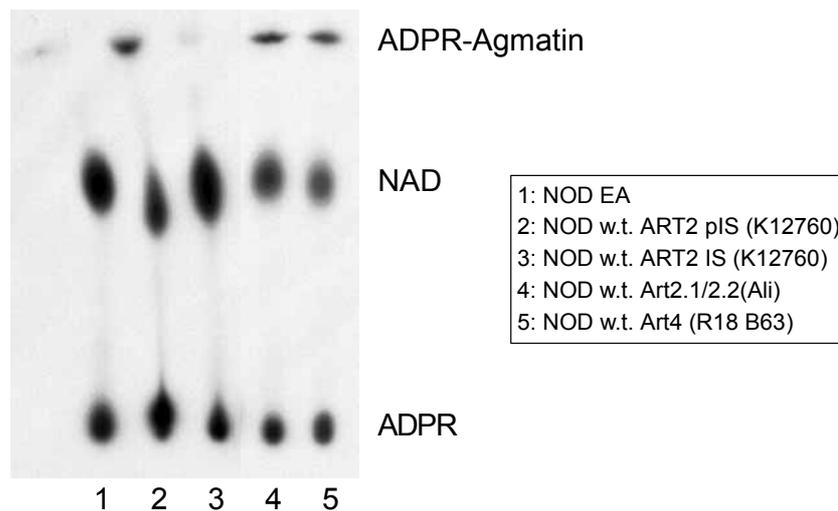
In diesem Abschnitt sollen verschiedene Möglichkeiten der Inhibierung von ADP-Ribosyltransferasen vorgestellt werden.

Neben etheno-NAD eignet sich auch das NAD-Analogon biotin-NAD zum Nachweis von ADP-Ribosyltransferase-Aktivität Oberfläche von Zellen (nicht gezeigt). Dabei kann die biotin-ADP-Ribose-Gruppe mit einem Streptavidin nachgewiesen werden. Mit Hilfe von biotin-NAD sollte untersucht werden, ob die Vorbehandlung von Zellen mit einem Nukleotid die ADP-Ribosylierung mit einem anderen inhibieren kann. Gleichzeitig sollte die Frage beantwortet werden, ob etheno-NAD ein ebenso gutes Substrat der ARTs ist wie NAD. Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten MD27 Hybridomzellen (Kapitel 3.1.6), wurden ohne, mit etheno-NAD (1 und 5  $\mu\text{M}$ ) oder mit NAD (1 und 5  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit biotin-NAD weiterinkubiert und die biotin-ADP-Ribosylierung mit einem FITC konjugierten Streptavidin ( $\text{SA}^{\text{FITC}}$ ) gemessen (**Abbildung 24**). Die SA Anfärbung der biotin-ADP-Ribosylierung konnte durch NAD und etheno-NAD Vorinkubation deutlich vermindert werden. Dies war bei NAD etwas deutlicher als bei etheno-NAD. Beachte, dass für diese Abbildung die MFI auf relative MFI umgerechnet wurde und 100%-MFI der MFI bei 1  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  biotin-NAD ohne Vorinkubation mit etheno-NAD oder NAD entspricht. Die Resultate legen nahe, dass etheno-NAD ein annähernd ähnlich gutes Substrat für die ARTs ist wie NAD.



**Abbildung 24: Messung der biotin-ADP-Ribosylierung nach Vorinkubation von MD27 Hybridomzellen mit etheno-NAD oder NAD.** MD27 Hybridomzellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  (grün) und 5  $\mu\text{M}$  (rot) NAD oder etheno-NAD für 20 min bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden die Zellen zusätzlich mit biotin-NAD in der gleichen Konzentration versetzt und unter den gleichen Bedingungen weiterinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und biotin-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine mit FITC-konjugiertem Streptavidin (SA) markiert. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen wurde daraufhin mit dem FACS gemessen und mit CellQuest Software bestimmt. Die Tabelle zeigt den Mittelwert der MFI aus drei unabhängigen Versuchen. Der Wert für die MFI der nur mit biotin-NAD inkubierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die anderen Werte verstehen sich relativ zu diesem Wert. Die absoluten Werte der MFI betragen für 1  $\mu\text{M}$  4,0 (ohne biotin-NAD); 100,1 (nur biotin-NAD); 23,1 (etheno-NAD>biotin-NAD); 13,7 (NAD>biotin-NAD) und für 5  $\mu\text{M}$  entsprechend 3,3; 264,2; 30,2 und 16,4.

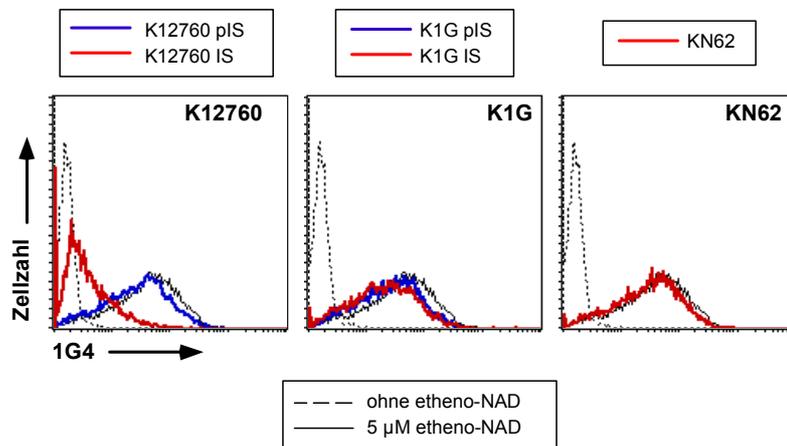
Es sollte in weiteren Versuchen der Frage nachgegangen werden, ob ART2-spezifische Antikörper die Interaktion der ART2.2 mit der löslichen Aminosäure Agmatin beeinflussen können. Agmatin kann von den ARTs als alternatives Substrat zu Arginin verwendet werden (Koch-Nolte *et al.* 1996). Die dem Adenosin zugewandte Phosphat-Gruppe ist bei  $^{32}\text{P}$ -NAD radioaktiv markiert und lässt sich in einer Autoradiographie nachweisen (**Abbildung 2**). Rekombinante ART2.2 wurde mit verschiedenen Antikörpern vorinkubiert. Als Kontrolle wurden Wasser und inaktive ART (ART2.2EA) verwendet. Dem folgend wurden die Ansätze mit  $^{32}\text{P}$ -NAD und Agmatin versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand in einer DC eingesetzt. Die Autoradiographie dieser DC ist in **Abbildung 25** dargestellt. Nur ART2-spezifisches Immunsereum (K12760), nicht aber entsprechendes Präimmunsereum verhinderten in diesem Assay die ADP-Ribosylierung von Agmatin durch ART2.2. Der ART2.1/2.2-spezifische monoklonale Antikörper Ali verhinderte zwar die Apoptose von T Zellen (**Abbildung 28**), er konnte aber die in diesem Versuch untersuchte ADP-Ribosylierung von Agmatin nicht hemmen. Auch der hier verwendete ART4-spezifische monoklonale Antikörper hat keinen Einfluss auf die ADP-Ribosylierung durch ART2.2.



**Abbildung 25: Autoradiographie einer Dünnschichtchromatographie nach Inkubation löslicher rekombinanter ART2.2 mit  $^{32}\text{P}$ -NAD und Agmatin in Anwesenheit von Antikörpern gegen ART2.2.** Rekombinante Art2.2 (NOD FH; 350 ng/Ansatz) bzw. inaktive Art2.2 (NOD EA 150 ng/Ansatz) wurde mit verschiedenen Antikörpern bei 4 °C vorinkubiert. Danach wurden 10 nM NAD (1  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -NAD), 1 mM Agmatin in PBS dazugegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Proteine wurden mit StrataClean Resin gebunden und abzentrifugiert. Je 1  $\mu\text{l}$  Überstand wurde in einer Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Autoradiographie erfolgte für 8 Stunden bei -80 °C.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels soll ein Experiment zur Hemmung der von ART2-katalysierten ADP-Ribosylierung von Zellmembranproteinen durch ART2.2 Immunsereum behandelt werden. Dabei wurde auch der Einfluss von anti-P2X7 Immunsereum (K1G) und KN62 (niedermolekularer P2X7 Inhibitor) auf die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen untersucht. K1G und KN62 können die NAD induzierte Apoptose blockieren (Kapitel 3.2). Für dieses Experiment wurde wieder der 1G4 FACS Assay ausgewählt. MD27 Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern vorinkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Zellen mit etheno-NAD versetzt und

anschließend für FACS Analysen mit 1G4 angefärbt. **Abbildung 26** zeigt, dass das anti-ART2.2 Immunsereum K12760 die Anfärbung von Zellen im 1G4 FACS Assay inhibierte, während Präimmunsereum keinen Einfluss auf die ADP-Ribosylierung hatte. Anti-P2X7 Immunsereum sowie KN62 hatten ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen.



**Abbildung 26: 1G4 Anfärbung von MD27 Zellen nach etheno-NAD Inkubation in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren.** MD27 Zellen wurden 15 Minuten mit Immunsereinen (1:100) oder 5 µM KN62 bei 4 °C vorinkubiert und dann ohne waschen für 10 Minuten mit 5 µM etheno-NAD bei 37 °C weiterinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt und im FACS gemessen. Die Abbildung zeigt Histogramm Plots der 1G4-Anfärbung.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass es unterschiedliche Möglichkeiten zur Beeinflussung der ADP-Ribosylierung gibt. So konnte durch Vorbehandlung von Zellen mit etheno-NAD oder NAD die biotin-ADP-Ribosylierung inhibiert werden. Auch mit ART2-spezifischem Immunsereum konnte die ADP-Ribosylierung in einem enzymatischen Assay und im 1G4 FACS-Assay gehemmt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass P2X7 Inhibitor KN62 die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen nicht beeinflusst.

### 3.2 Untersuchungen zur NAD induzierten Apoptose

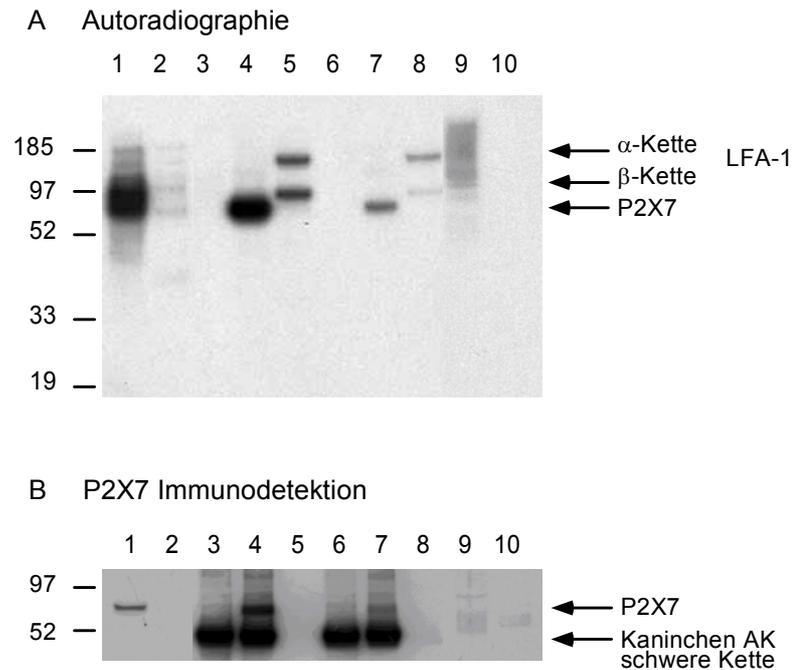
In diesem Kapitel sollen die Untersuchungen zum NAD induzierten Zelltod (NAD induced cell death, NICD) dargestellt werden. Dabei reagieren murine T Zellen auf NAD Behandlung ART-abhängig mit Zeichen des Zelltods (Adriouch *et al.* 2001; Liu *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2002; Seman *et al.* 2003).

#### 3.2.1 Untersuchung der möglichen ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinozeptors

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die molekularen Mechanismen der ART-abhängigen Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch NAD näher bestimmt werden. Dabei stellte sich die Frage, ob der P2X7 Rezeptor direkt oder indirekt aktiviert wird. Die ADP-Ribosylierung von anderen Zelloberflächenproteinen könnte zur Aktivierung dieser Proteine führen, die wiederum ein anderes Signal an den P2X7 Rezeptor wiedergeben. P2X7 könnte auch die ADP-Ribosylierung von anderen Membranproteinen erkennen und dadurch aktiviert werden. Eine andere Erklärung wäre, dass P2X7

selbst ein Zielprotein der ARTs ist und durch diese ADP-Ribosylierung direkt aktiviert wird (**Abbildung 63**). Durch die Herstellung von P2X7 Antiserum mittels DNA-Immunisierung eines Kaninchens in unserer Arbeitsgruppe stand ein wertvolles Werkzeug zur Klärung dieser Frage zur Verfügung. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$ -NAD und Immunpräzipitation von P2X7 mit dem Antiserum sollte festgestellt, ob P2X7 ADP-ribosyliert wird.

MD27 Hybridomzellen und B Zell depletierte Lymphknotenzellen der BALB/c Maus wurden mit  $^{32}\text{P}$ -NAD inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und eine sequenzielle Immunpräzipitation mit der K1G Präimmunserum, K1G Immuneserum und zuletzt LFA-1 durchgeführt. Die Präzipitate sowie Ganzzelllysate wurden dann in einer SDS-PAGE größenfraktioniert, auf eine PVDF-Membran geblottet und ADP-ribosylierte Proteine mit einer Autoradiographie detektiert (**Abbildung 27A**). Sowohl in Ganzzelllysaten von MD27 als auch in Lysaten von BALB/c T Zellen sind ADP-ribosylierte Proteine erkennbar. Mit P2X7 Immuneserum konnte sowohl von MD27 Zellen als auch von BALB/c Zellen ein ca. 75 kDa großes Protein präzipitiert werden, das ADP-ribosyliert ist (Spuren 4 und 7). Die zur Kontrolle durchgeführte Immunpräzipitation von LFA-1 zeigt, dass auch bei den hier verwendeten Zellen beide Ketten dieses Integrins ADP-ribosyliert werden (vergleiche **Abbildung 15**) (Nemoto *et al.* 1996). In den Spuren mit Präimmunserum konnte kein ADP-ribosyliertes Protein immunpräzipitiert werden. Um zu bestätigen, dass es sich bei dem entdeckten Protein tatsächlich um P2X7 handelt, wurde mit derselben PVDF-Membran eine Immunodetektion mit anti-P2X7 Antikörper und anti-Kaninchen Ig<sup>PO</sup> durchgeführt (**Abbildung 27B**). Da P2X7 mit einem Kaninchenserum immunpräzipitiert wurde, und der Blot mit einem anti-Kaninchen Ig<sup>PO</sup> detektiert wurde, sieht man sehr prominente Banden der schweren Ketten des Kaninchenantikörpers bei 50 kDa in den Spuren, in denen Präzipitat mit Kaninchen Serum aufgetragen wurde (Spuren 3, 4, 6 und 7). Darüber erkennt man die Bande des 75 kDa großen P2X7 in den Spuren 4 und 7. Das vorhergesagte Molekulargewicht für den murinen P2X7 Rezeptor liegt bei 68 kDa (EditSeq, DNASTAR). Der Größenunterschied könnte durch Glykosylierungen erklärt werden.



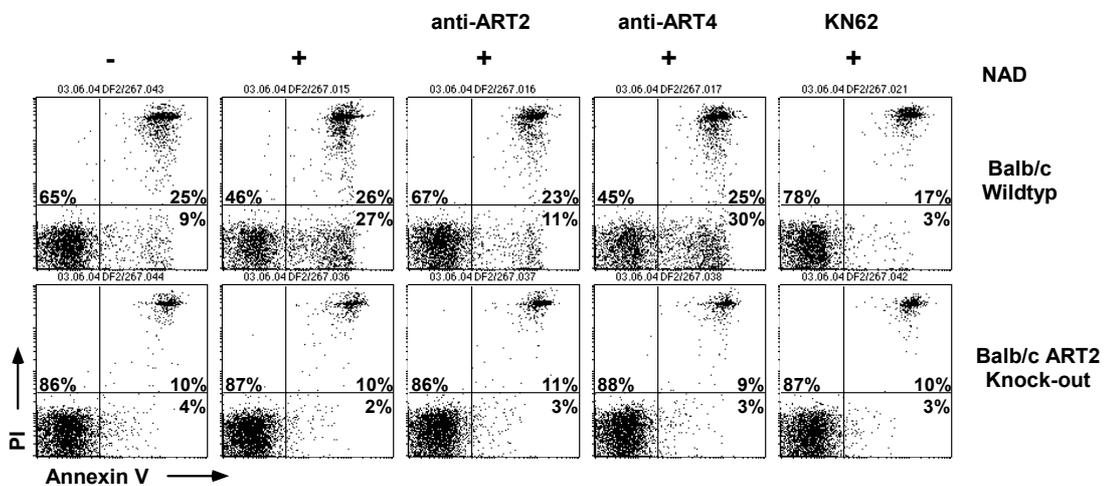
**Abbildung 27: Autoradiographie nach Inkubation von Zellen mit  $^{32}$ P-NAD mit anschließender Präzipitation von P2X7.** (A)  $10^7$  B Zell depletierte BALB/c Lymphknoten-Zellen und  $5 \times 10^6$  mehrfach sortierte MD27 Zellen wurden 15 Minuten mit  $2 \mu\text{M}$  NAD ( $10 \mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -NAD) inkubiert und anschließend gewaschen. Die Zellen wurden 10 Min auf Eis mit PBS, 1 % Igepal, 1 mM AEBSF lysiert und Proteine sequenziell mit K1G anti-P2X7 Präimmunsereum, K1G anti-P2X7 Immunsereum und anti-CD11a (LFA-1 alpha Kette, M17/4) präzipitiert. Nach SDS-PAGE mit einem 10 % BisTris Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und eine Autoradiographie (AR) durchgeführt. AR nach 7 Tagen Exposition. (Ganzzelllysate vor Immunpräzipitation:  $5 \times 10^5$  MD27 Zellen,  $10^6$  T Zellen pro Spur) 1: MD 27 Ganzzelllysate, 2: BALB/c LK T Zellen Ganzzelllysate, 3: MD 27 K1G pIS, 4: MD 27 K1G IS, 5: MD 27 LFA-1, 6: BALB/c LK T Zellen K1G pIS, 7: BALB/c LK T Zellen K1G IS, 8: BALB/c LK T Zellen LFA-1, 9: MD27 Protein G Binder, 10: BALB/c LK T Zellen Protein G Binder. (B) Immunodetektion derselben PVDF Membran wurde mit anti-P2X7 Antikörper (1:1000, 3 Stunden) und anti-Kaninchen<sup>PO</sup> (1:5000) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System.

### 3.2.2 Abhängigkeit des NAD induzierten Zelltods von ART2 und P2X7

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von P2X7 zum Zelltod vulnerabler Zellen führt. Der Zelltod wird in den hier beschriebenen Versuchen durch eine Annexin V und Propidiumiodid Doppelfärbung detektiert. Wenn Zellen sterben, flippen in der Zellmembran Phosphatidylserinreste (PS) von Membranlipiden auf die äußere Seite der Lipiddoppelschicht, wo sie bei vitalen Zellen normalerweise nicht vorkommen. Die Annexin V Anfärbung gilt als frühes Zeichen der Apoptose (Bossy-Wetzel and Green 2000; Wilson *et al.* 2002). Ist der Zelltod weiter fortgeschritten, wird die Zellmembran löchrig, und die Zellen nehmen den DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) auf und können ihn nicht wieder ausschleusen. Die PI Anfärbung wird in anderen FACS-Analysen ausgenutzt, um tote Zellen auszugaten.

Aufgereinigte BALB/c T Zellen wurden mit ART Antikörper oder mit dem P2X7 Antagonisten KN62 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit NAD behandelt, gewaschen und Annexin V<sup>FITC</sup> und Propidiumiodid (PI) angefärbt (**Abbildung 28**). Auch ohne NAD Inkubation sterben Zellen der Wildtyp Maus, erkennbar an der Annexin V und PI Markierung. In diesem Versuch zeigen ca. 35 % der Zellen ohne Behandlung mit Nukleotiden Zeichen des Zelltods. Diese Zahl variiert von

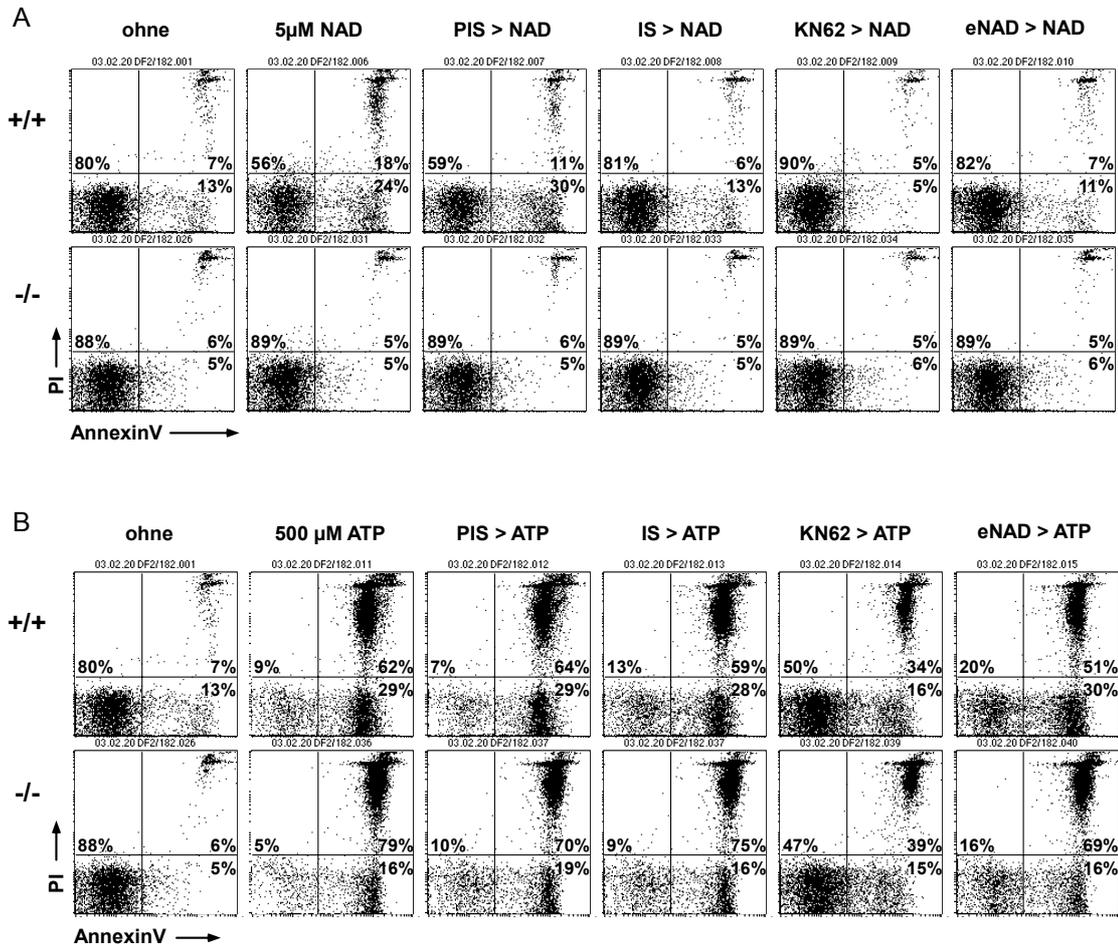
Versuch zu Versuch zwischen 15 und 35 %. Bei allen Untersuchungen fiel auf, dass bei den ART2 Knock-out Zellen deutlich weniger Zellen „spontan“ sterben (5-15 %), in dem abgebildeten Experiment waren es 14 %. Nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  NAD ließen sich deutlich mehr Zellen mit Annexin V anfärben. Vorinkubation der Zellen mit dem anti-ART2-spezifischen Antikörper Ali und mit dem P2X7 Antagonisten KN62 konnte die Zahl den Annexin V positiven Zellen reduzierten. Der zur Kontrolle eingesetzte anti-ART4 Antikörper konnte die Apoptose nicht verhindern. Bei Zellen der ART2 Knock-out Maus ließ sich kein NICD auslösen. Die Ergebnisse mit dem anti-ART2 Antikörper und den ART2 Knock-out Zellen zeigen, dass der NICD ART2 abhängig ist. Die Inhibierbarkeit der Apoptose mit KN62 liefert einen deutlichen Hinweis darauf, dass P2X7 involviert ist. Zellen, die mit KN62 behandelt wurden, sind anscheinend sogar vitaler als unbehandelte Zellen. Diese Beobachtung wurde in mehreren Versuchen bestätigt.



**Abbildung 28: Annexin V / PI Anfärbung von NAD behandelten T Zellen.** B Zell depletierte BALB/c Wildtyp und ART2 Knock-out Lymphknotenzellen ( $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Ansatz) wurden 60 Minuten mit 1  $\mu\text{g}$  Antikörper bzw. mit 5  $\mu\text{M}$  KN62 in RPMI-Medium vorinkubiert. Dann wurden die Zellen ungewaschen mit 5  $\mu\text{M}$  NAD für 30 Minuten bei 37 C weiterinkubiert, 3 mal gewaschen, in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem RPMI-Medium mit Annexin V<sup>FITC</sup> und PI angefärbt und im FACS gemessen.

Um weitere Inhibitoren des NICD zu untersuchen wurden aufgereinigte T Zellen je einer BALB/c Wildtyp und einer ART2 Knock-out Maus mit P2X7-spezifischem Immunsereum und Präimmunsereum (K1G), sowie mit KN62 und etheno-NAD vorbehandelt. Die Zellen wurden dann mit 5  $\mu\text{M}$  NAD bzw. 500  $\mu\text{M}$  ATP inkubiert. Anschließend wurden eine Annexin V / PI Anfärbung durchgeführt und die Zellen im FACS gemessen. Zeichen des Zelltodes nach NAD Inkubation konnten nur bei ART2 exprimierenden Zellen vor, nicht hingegen bei ART2 Knock-out Zellen, nachgewiesen werden (**Abbildung 29**). P2X7 Präimmunsereum konnte den Zelltod nicht verhindern. Vorinkubation von Zellen mit P2X7 Immunsereum, mit KN62 und mit etheno-NAD verhinderte jedoch die NAD-induzierte Annexin V Anfärbung. Auch in diesem Versuch fiel auf, dass nach Behandlung mit KN62 sogar weniger Zellen Annexin V positiv waren als in dem Ansatz mit unbehandelten Zellen. Die untere Hälfte der **Abbildung 29** zeigt den durch ATP ausgelösten Zelltod (Wilson *et al.* 2002). Dieser ist nicht ART2 abhängig und kann auch in ART2 Knock-out Zellen induziert werden, da ATP den

P2X7 Rezeptor direkt aktiviert. P2X7 Immuneserum sowie etheno-NAD haben keinen Effekt auf die Zahl der toten Zellen. KN62 kann jedoch den Zelltod durch ATP hemmen. Um die Apoptose mit ATP auszulösen, werden 100-fach höhere Konzentrationen benötigt, als es bei der NAD induzierten Apoptose der Fall ist, ATP behandelte Zellen nehmen auch viel schneller Propidiumiodid auf. Sie verweilen nicht so lange in dem Zustand, in dem sie nur Annexin V positiv sind aber nicht PI aufnehmen, wie NAD behandelte Zellen.



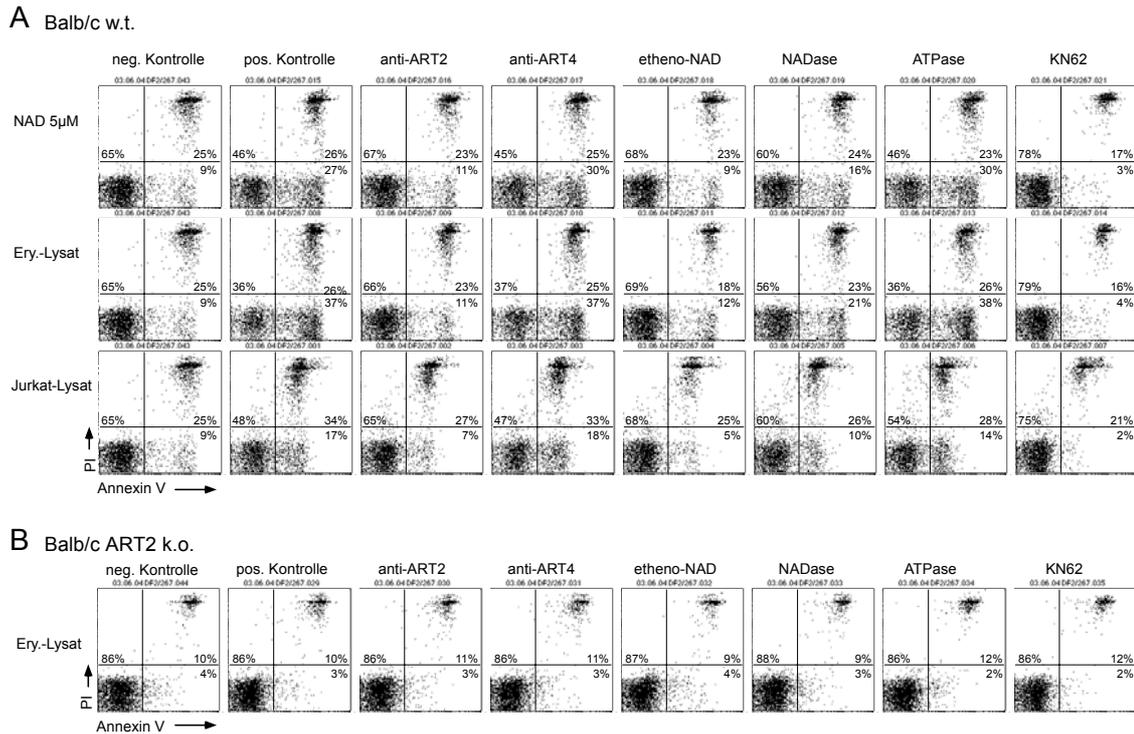
**Abbildung 29: Inhibition der NAD und ATP induzierten Annexin V / PI Anfärbung durch P2X7 Immuneserum, etheno-NAD und KN62.** Lymphknotenzellen je einer BALB/c Wildtyp Maus (+/+) und einer BALB/c ART2 Knock-out Maus (-/-) wurden präpariert und eine B Zelldepletion mit anti-Ig Dynabeads durchgeführt. Die B Zell-depletierten Lymphknotenzellen wurden mit KN62 (2,7  $\mu$ M), etheno-NAD (27  $\mu$ M) oder mit P2X7-spezifischen Präimmuneserum und Immuneserum (Kaninchen, K1G) (1:75) 30 Minuten lang vorinkubiert und anschließend ohne waschen mit 5  $\mu$ M NAD (**A**) oder mit 500  $\mu$ M ATP (**B**) weiterinkubiert. Nach 30 Min wurden die Zellen gewaschen, mit Annexin V<sup>FITC</sup> und PI angefärbt und im FACS gemessen. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen in den entsprechenden Quadranten.

### 3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Zelllysaten auf den NAD induzierten Zelltod

Intrazelluläre NAD Konzentrationen werden mit 200 bis 500  $\mu$ M angegeben (Kirsten *et al.* 1985; Jacobson and Jacobson 1997; Ziegler 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem NAD Cycling Assay intrazelluläre NAD Konzentrationen von 200  $\mu$ M bei Erythrozyten gemessen (nicht gezeigt). Im Extrazellulärraum kommt NAD hingegen nur in submikromolaren Konzentrationen vor (O'Reilly

and Niven 2003). Da NAD die Doppellipidschicht der Zellmembran nicht passieren kann, und die für ART vermittelte ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen benötigten NAD Konzentrationen extrazellulär nicht ausreichend sind (siehe Kapitel 3.1.4), stellt sich die Frage, ob und unter welchen Umständen NAD in den Extrazellulärraum gelangt. Dieses topologische Paradoxon wird auch für andere NAD metabolisierende Enzyme wie CD38 diskutiert (De Flora *et al.* 2000; Sun *et al.* 2002). Möglicherweise kann NAD die Membran durch Kanäle wie Connexin 43 passieren (**Abbildung 6**) (Bruzzone *et al.* 2001). Eine andere Hypothese besagt, dass NAD von nekrotischen Zellen freigesetzt wird und so in ausreichend hohen Konzentrationen im extrazellulären Milieu vorkommen kann (Bortell *et al.* 2001). In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob mit endogenem NAD aus Zelllysaten der NAD induzierte Zelltod bei murinen T Zellen ausgelöst werden kann.

Jurkat Lymphomzellen und murine Erythrozyten wurden mit Ultraschallbehandlung auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Kerne und das Zytoskelett abzentrifugiert. Mit diesen Lysaten wurden dann BALB/c Wildtyp und ART2 Knock-out T Zellen inkubiert. Die Zellen wurden zuvor eine Stunde mit ART-spezifischen Antikörpern, etheno-NAD, NADase, ATPase oder mit KN62 behandelt. Die gleichen Zellen wurden zur Kontrolle auch mit exogenem NAD (Sigma-Aldrich) inkubiert. Dabei konnte sowohl mit Erythrozytenlysaten als auch mit Jurkat-Zelllysaten eine Annexin V Anfärbung erzielt werden (**Abbildung 30**). Die Zahl der Annexin V positiven Zellen nahm nach Inkubation mit exogenem NAD (27%), Erythrozytenlysat (37%) und Jurkat-Zelllysaten (17%) gegenüber der Behandlung ohne NAD (8%) zu. Die Zahl der PI positiven Zellen änderte sich nach Behandlung mit exogenem oder endogenem NAD nicht, dies lag wahrscheinlich an der relativ kurzen Inkubationszeit. Der Zelltod von ART2 Knock-out Zellen ließ sich weder durch Behandlung mit exogenem NAD noch durch die Inkubation mit Erythrozytenlysaten oder Jurkat-Zelllysaten auslösen. Die Annexin V Anfärbung ließ sich in allen hier untersuchten Ansätzen durch Vorbehandlung der Zellen mit ART2 spezifischem Antikörper, etheno-NAD, NADase und KN62 inhibieren. Die Behandlung der Zellen mit ATPase (Apyrase) hatte keinen Einfluss auf die Zahl der Annexin V oder PI positiven Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei der Behandlung von Lymphozyten mit Zelllysaten tatsächlich NAD durch ART vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 zum Zelltod führt.

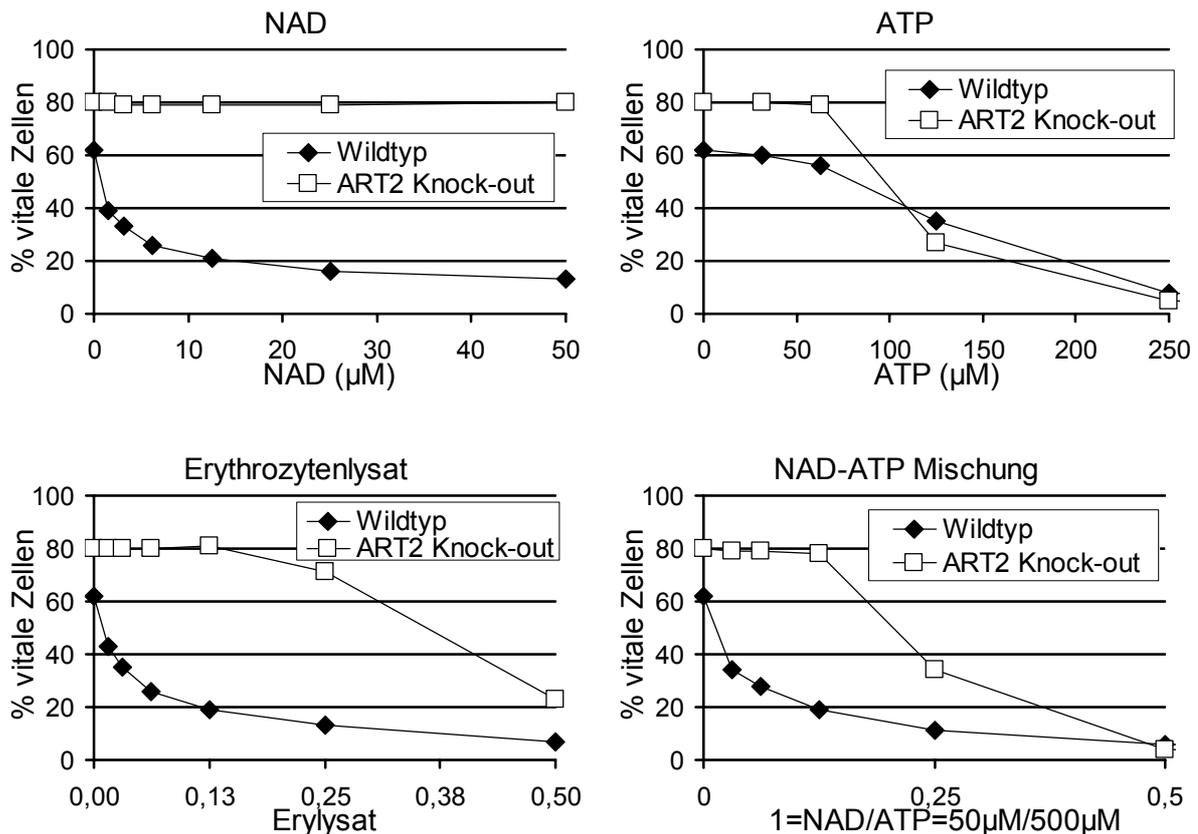


**Abbildung 30: Annexin V / PI Anfärbung nach Behandlung von BALB/c T Zellen mit exogenem NAD sowie mit Erythrozytenlysaten und Jurkat-Zelllysaten.** Erythrozyten aus 500 µl Blut einer BALB/c Maus und  $10^8$  Jurkat Lymphomzellen wurden in 1 ml PBS mit 2 mM ADP-Ribose aufgenommen und mit Ultraschallbehandlung (dreimal 15 Sekunden, 10 microns peek-to-peek) auf Eis lysiert. Zellkerne und Zytoskelett wurden abzentrifugiert (5 Min 6000 rpm, 30 Min 13000 rpm, 4 °C). **(A)** B Zell depletierte BALB/c Lymphknotenzellen ( $4 \cdot 10^5$  pro Ansatz) wurden eine Stunde lang mit 1 µg anti-ART2 und anti-ART4 Antikörpern bzw. mit 5 µM KN62 in 50 µl RPMI vorinkubiert. 5 Min vor NAD und Lysatzugabe wurden NADase (*Neurospora crassa*) und ATPase (*Apyrase*) in die entsprechenden Ansätze gegeben. Dann wurden Zellen ungewaschen mit 5 µM NAD (50 µl 10 µM NAD in RPMI), Erythrozytenlysaten (1:2 Verdünnung) oder Jurkatlysaten (1:2) für 30 Minuten bei 37 °C weiterinkubiert, gewaschen, mit Annexin V<sup>FITC</sup> und PI angefärbt und im FACS gemessen. **(B)** Das gesamte Experiment wurde auch mit Lymphozyten aus einer BALB/c ART2 Knock-out Maus durchgeführt. Hier ist nur die Reihe mit Erythrozytenlysaten gezeigt, auch NAD und Jurkatlysate hatten keine Wirkung auf die ART2 Knock-out Zellen.

Bei den mit Erythrozytenlysaten durchgeführten Experimenten zum NAD induzierten Zelltod (NICD) ist aufgefallen, dass sich bei hohen Lysat-Konzentrationen auch ART2 Knock-out Zellen Annexin V / PI anfärben lassen. Bei Versuchen mit exogenen Nukleotiden ließ sich bei diesen Knock-out Zellen nur durch ATP Behandlung der Zelltod induzieren, während NAD auch in höheren Konzentrationen keinen Effekt hatte (siehe **Abbildung 29**). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass in den Lysaten ATP in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden sein könnte, um den P2X7 Rezeptor zu aktivieren. Um dies näher zu untersuchen wurden Zellen von BALB/c Wildtyp und ART2 Knock-out Mäusen mit verschiedenen Verdünnungen von Erythrozytenlysaten, NAD, ATP und einer NAD-ATP Mischung (100 µM NAD/1000 µM ATP) inkubiert (**Abbildung 31**). NAD führte bei Wildtyp Zellen konzentrationsabhängig zum Zelltod, während es keinen Einfluss auf die ART2 Knock-out Zellen hatte. Im Gegensatz dazu führt ATP sowohl bei Wildtyp als auch bei ART2 Knock-out Zellen zum Verlust der Vitalität. Erythrozytenlysate in geringer Konzentration induzierten bei Wildtypzellen konzentrationsabhängig den Zelltod. Diese Lysate konnten aber auch in

hoher Konzentration zum Verlust der Zellvitalität bei ART2 Knock-out Zellen führen. Entsprechend wie die Erythrozytenlysate verhält sich auch die NAD-ATP-Mischung.

Bei hohen Verdünnungen des Erythrozytenlysates (1/8) wird der Zelltod nur bei Wildtyp Zellen aktiviert, wohingegen bei niedrigen Verdünnungen (1/2) dies auch bei ART2 Knock-out Zellen der Fall ist. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass in den Lysaten sowohl NAD als auch ATP in ausreichender Konzentration vorkommt, um den P2X7 Rezeptor zu aktivieren und den Zelltod auszulösen.



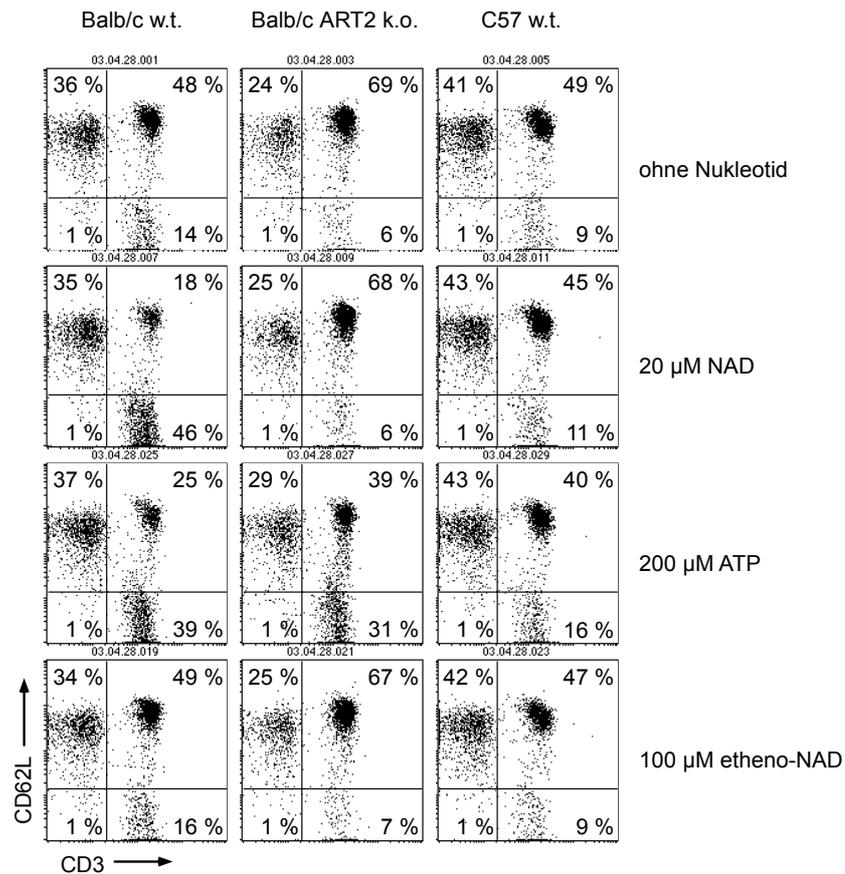
**Abbildung 31: Verlust der Vitalität nach Inkubation von BALB/c T Zellen mit Erythrozytenlysaten, NAD, ATP und NAD/ATP Mischung.** Erythrozyten aus 500  $\mu$ l Blut einer BALB/c Maus wurden in 1 ml PBS mit 2 mM ADP-Ribose aufgenommen und mit Ultraschallbehandlung (dreimal 15 Sekunden, 10 microns peek-to-peek) auf Eis lysiert. Zellkerne und Zytoskelett wurden abzentrifugiert (5 Min 6000 rpm, 30 Min 13000 rpm, 4 °C). Aufgereinigte T Zellen je einer BALB/c Wildtyp sowie einer ART2 Knock-out Maus wurden mit Verdünnungsserien von Erythrozytenlysate, NAD, ATP sowie einer NAD/ATP 1/10-Mischung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei den Erythrozytenlysaten bedeutet 0,5: ein Teil Erythrozytenlysate plus ein Teil T Zell-Suspension. Anschließend wurden Zellen mit Annexin V<sup>FITC</sup> und PI angefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS untersucht und der Prozentsatz der vitalen Zellen (Annexin V/PI) bestimmt.

### 3.2.4 Untersuchung des NAD induzierten L-Selectin Shedding

In diesem Abschnitt soll auf weitere Effekte von P2X7 Aktivierung durch NAD eingegangen werden. Neben der Induktion des Zelltods vermittelt ATP über den P2X7 Rezeptor auch das Abspalten (Shedding) von CD62L (L-Selectin) bei BALB/c Lymphozyten. L-Selectin ist ein Zellinteraktionsprotein, das den Lymphozyten erlaubt, an Endothelzellen der Gefäßwand anzudocken

(Gu *et al.* 1998; Labasi *et al.* 2002; Seman *et al.* 2003). Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob die ADP-Ribosylierung von P2X7 zum L-Selectin Shedding führt. Interessant dabei war auch, ob etheno-NAD, das zwar zur Modifikation von P2X7 führt (Ergebnisse anderer Labormitarbeiter) aber nicht den NICD auslöst, Einfluss auf das Shedding von L-Selectin hat. Bei der C57BL/6 Maus ist ein Aminosäureaustausch im P2X7 Rezeptor (P451L) beschrieben, der bewirkt, dass sich dieser viel schlechter aktivieren lässt (Adriouch *et al.* 2002). In diesen Versuchen sollten daher neben Lymphozyten von BALB/c Wildtyp und ART2 Knock-out Mäusen auch Zellen der C57BL/6 Maus, die eine inaktivierende Punktmutation (P451L) im P2X7 Purinozeptor tragen, eingesetzt werden.

Lymphknotenzellen wurden 30 Minuten bei 37 °C mit 20 µM NAD, 200 µM ATP sowie mit 100 µM etheno-NAD inkubiert. Danach wurden die T Zellen mit CD3<sup>FITC</sup> angefärbt und L-Selectin auf der Zelloberfläche mit anti-CD62L<sup>PE</sup> nachgewiesen (**Abbildung 32**). CD3 negative Lymphozyten und die Mehrzahl der unbehandelten CD3 positiven T Zellen exprimieren L-Selectin. Nach Inkubation der Zellen mit NAD wird L-Selectin von BALB/c Wildtyp T Zellen abgestoßen. ART2 Knock-out und C57BL/6 T Zellen spalten L-Selectin nach einer Behandlung mit 20 µM NAD nicht ab. ATP bewirkt L-Selectin Shedding sowohl bei Wildtyp als auch bei ART2 Knock-out BALB/c T-Lymphozyten, während ATP bei C57BL/6 Zellen keinen Einfluss auf die L-Selectin Anfärbung hat. Die Inkubation mit etheno-NAD hat in keiner Zellpopulation zum Shedding von L-Selectin geführt.



**Abbildung 32: L-Selectin (CD62L) Anfärbung nach Inkubation von Zellen mit NAD, ATP und etheno-NAD.** Lymphknotenzellen von BALB/c Wildtyp und ART2 Knock-out Mäusen sowie einer C57BL/6 Maus wurden präpariert. Die Zellen wurden 30 Min bei 37 °C mit NAD (20 µM), ATP (200 µM) und etheno-NAD (100 µM) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit CD62L<sup>PE</sup> und CD3<sup>FITC</sup> (1 µg / 100 µl Zellsuspension) angefärbt und die Fluoreszenz der Zellen im FACS gemessen. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten.

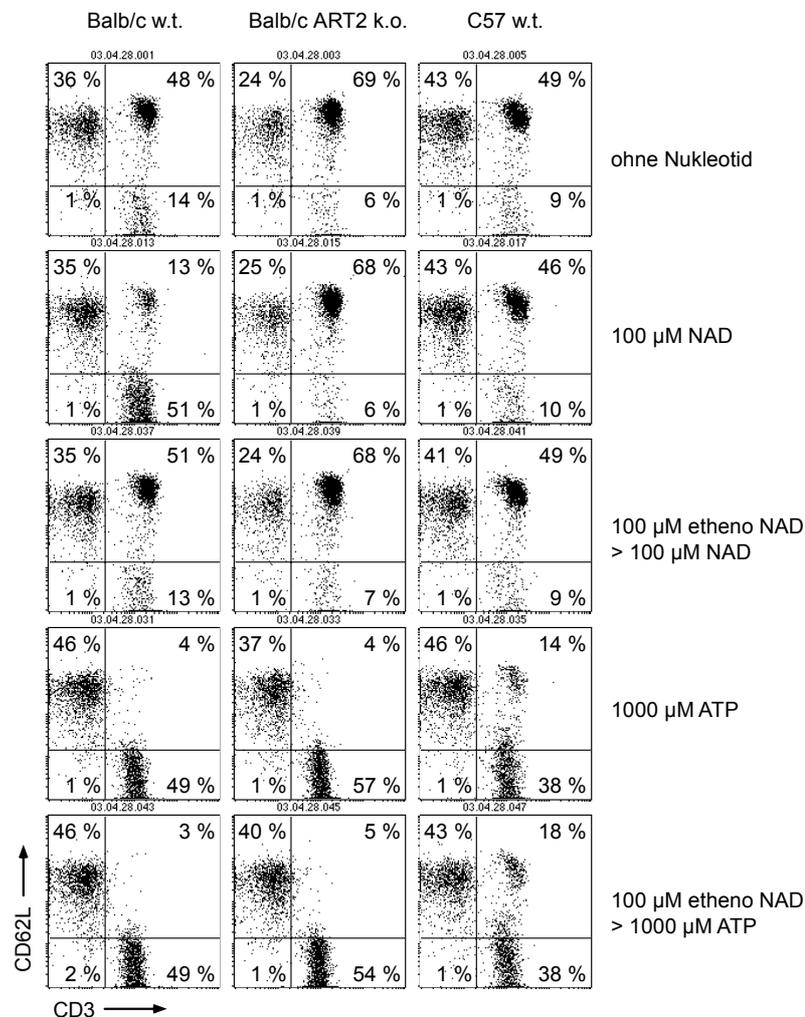
Des Weiteren sollte der Einfluss einer etheno-NAD-Vorinkubation auf das NAD und ATP-induzierte L-Selectin Shedding untersucht werden. Dazu wurden die Lymphozyten von BALB/c Wildtyp, BALB/c ART2 Knock-out und C57BL/6 Wildtyp zunächst ohne oder mit etheno-NAD (100 µM) und anschließend mit NAD (100 µM) bzw. ATP (1000 µM) behandelt, d.h. in diesem Versuch wurden deutlich höhere Nukleotidkonzentrationen verwendet, als im zuvor dargestellten Experiment. Anschließend wurden die Zellen mit CD3<sup>FITC</sup> und CD62L<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS untersucht. Die Inkubation von BALB/c Wildtyp Zellen mit 100 µM NAD bewirkt L-Selectin Shedding auf dem größten Teil der CD3 positiven T Zellen (**Abbildung 33**). Die Vorinkubation dieser Zellen mit etheno-NAD reduziert deutlich den Anteil der T Zellen, die L-Selectin abgestoßen haben. Bei den BALB/c ART2 Knock-out Zellen haben weder NAD noch etheno-NAD einen Einfluss auf die L-Selectin Expression.

Zellen der C57BL/6 Maus exprimieren einen P2X7 Rezeptor mit Mutation in der zytoplasmatischen Domäne, die eine verminderte Aktivierbarkeit bewirkt (Adriouch *et al.* 2002). Die T Zellen dieser Maus reagieren auf eine Inkubation mit 100 µM NAD nicht mit erhöhtem L-Selectin Shedding. Entsprechend hat die Vorinkubation der C57BL/6 Lymphozyten mit etheno-NAD keinen

## Einfluss auf die L-Selectin Expression.

Bei der in diesem Experiment verwendeten ATP-Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) wird L-Selectin von nahezu allen T Zellen der BALB/c abgestoßen. Dabei ist kein Unterschied zwischen BALB/c Wildtyp und BALB/c ART2 Knock-out Zellen zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das ATP-vermittelte L-Selectin Shedding unabhängig von der ART2-Expression ist. Die Vorbehandlung mit etheno-NAD hat weder bei BALB/c Wildtyp noch bei BALB/c ART2 Knock-out Zellen einen erkennbaren Einfluss auf das ATP-vermittelte Shedding. Dieses ist bemerkenswert, weil es andeutet, dass durch etheno-ADP-Ribosylierung des P2X7 Rezeptors die Bindungsstelle für ATP nicht blockiert wird.

Im Gegensatz zur Inkubation von C57BL/6 Lymphozyten mit 200  $\mu\text{M}$  ATP (**Abbildung 32**), bewirkt die Behandlung dieser Zellen mit einer höheren ATP-Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) eine Abspaltung von L-Selectin auf über der Hälfte der T Zellen. Auch auf diesen ATP-Effekt hat die Vorinkubation der Zellen mit etheno-NAD keinen eindeutigen Einfluss.



**Abbildung 33: NAD und ATP induziertes L-Selectin Shedding nach Vorinkubation mit etheno-NAD.** Lymphknotenzellen von BALB/c Wildtyp, BALB/c ART2 Knock-out und C57BL/6 Wildtyp Mäusen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  etheno-NAD für 5 Min vorinkubiert. Die ungewaschenen Zellen wurden dann 30 Min bei 37 °C mit NAD (100  $\mu\text{M}$ ) und ATP (1000  $\mu\text{M}$ ) weiterinkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit CD62L<sup>PE</sup> und CD3<sup>FITC</sup> (1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  Zellsuspension) angefärbt und die Fluoreszenz der Zellen im FACS gemessen.

### 3.3 Untersuchungen zum Einfluss von CD38 auf die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen

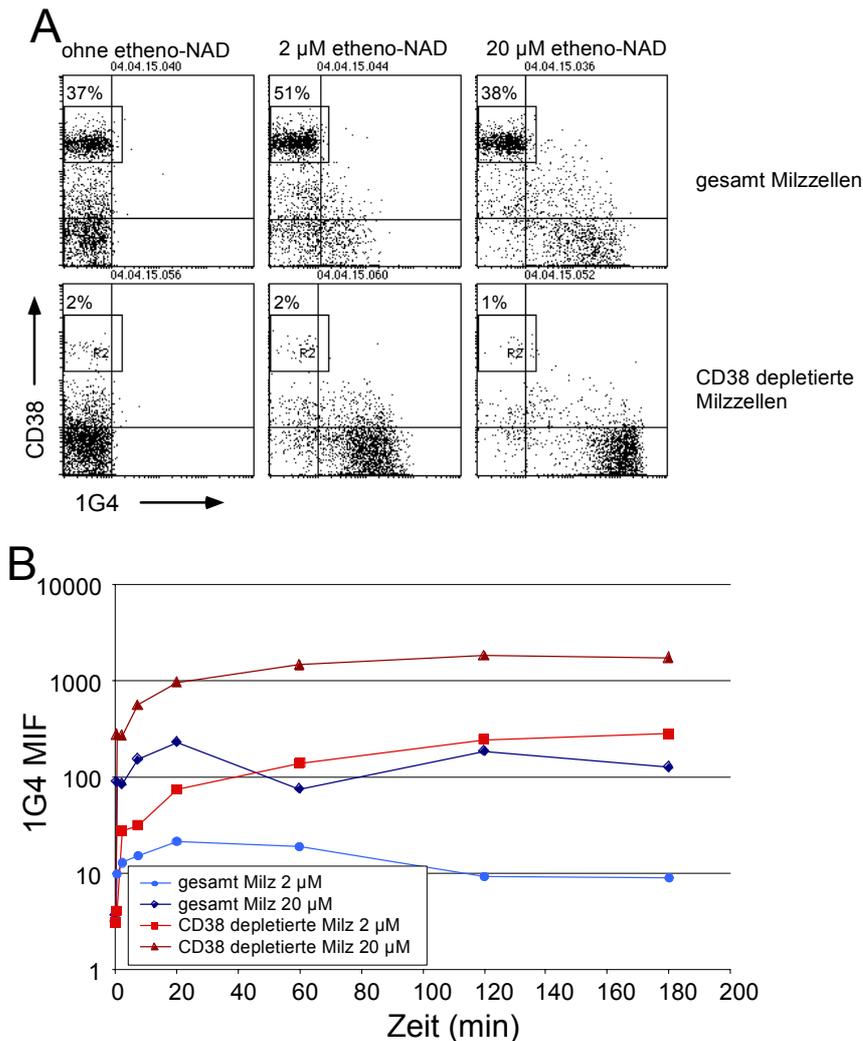
Neben ADP-Ribosyltransferasen gibt es auch andere NAD-verstoffwechselnde Enzyme. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Ekto-NADase/ADP-Ribosylzyklase CD38 auf die ADP-Ribosylierung im Mausmodell zu untersuchen. Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Experimente deuten an, dass CD38 durch die Verstoffwechslung von NAD die Dauer und das Ausmaß der ART-katalysierten ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen begrenzt.

#### 3.3.1 Einfluss von CD38 positiven Zellen auf die ADP-Ribosylierung von CD38 negativen Zellen

Die Ekto-NADase CD38 ist als Marker von B Zellen und aktivierten T Zellen bekannt. Dieses Zellmembranprotein wird somit bevorzugt von jenen Zellen exprimiert, die keine oder nur wenig ART2 auf der Zelloberfläche haben (**Abbildung 7**). Um den Einfluss von CD38 positiven Zellen auf die ADP-Ribosylierung von ART-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde jeweils eine Zellpopulation vor und nach Depletion der CD38 positiven Zellen mit etheno-NAD inkubiert und mit 1G4 angefärbt.

Milzzellen von C57BL/6 Mäusen wurden aufgereinigt und ein Teil der Zellen mit CD38<sup>PE</sup> angefärbt. Die so markierten Zellen wurden über ein magnetisches Depletionsverfahren mit Hilfe von gekoppelten anti-PE Antikörper entfernt (Miltenyi). Die CD38<sup>-</sup> Zellen wurden daraufhin in einer kinetischen Untersuchung für 0-180 Minuten mit 2 oder 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1G4<sup>Alexa</sup> und CD38<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS gemessen. In **Abbildung 34A** sind die FACS Anfärbung von Zellen ohne etheno-NAD Behandlung und nach 20 minütiger Inkubation mit etheno-NAD dargestellt. Ohne etheno-NAD zeigten weder die B Zellen (CD38 positiv) noch die T Zellen (CD38 negativ oder schwach positiv) eine Anfärbung mit 1G4. An der relativen Zahl der CD38 positiven Population ließ sich der Erfolg des Depletionsverfahren abgemessen (ohne Depletion >35%, nach Depletion 1-2 %). Nach Inkubation mit 2 oder 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD konnte die ART-Aktivität der CD38<sup>-</sup> Zellen über die 1G4 Anfärbung bestimmt werden. Dabei war die 1G4 Anfärbung abhängig von der NAD Konzentration. Der Grad der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen war bei CD38-depletierten Milzzellen höher als bei gesamt Milzzellen (vergleiche die beiden unteren Quadranten).

Von den CD38 negativen Zellen (beide unteren Quadranten) wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung ermittelt und in einem Diagramm gegenüber der Zeit aufgetragen (**Abbildung 34B**). Man beachte die logarithmische Skalierung der MFI (Y-Achse). Die MFI war bei CD38 depletierten Zellen (rot) jeweils 10-fach erhöht gegenüber den nicht depletierten Zellen (blau). Die Anwesenheit von CD38 positiven Zellen scheint also die ART-Aktivität auf CD38 negativen Zellen negativ zu beeinflussen.

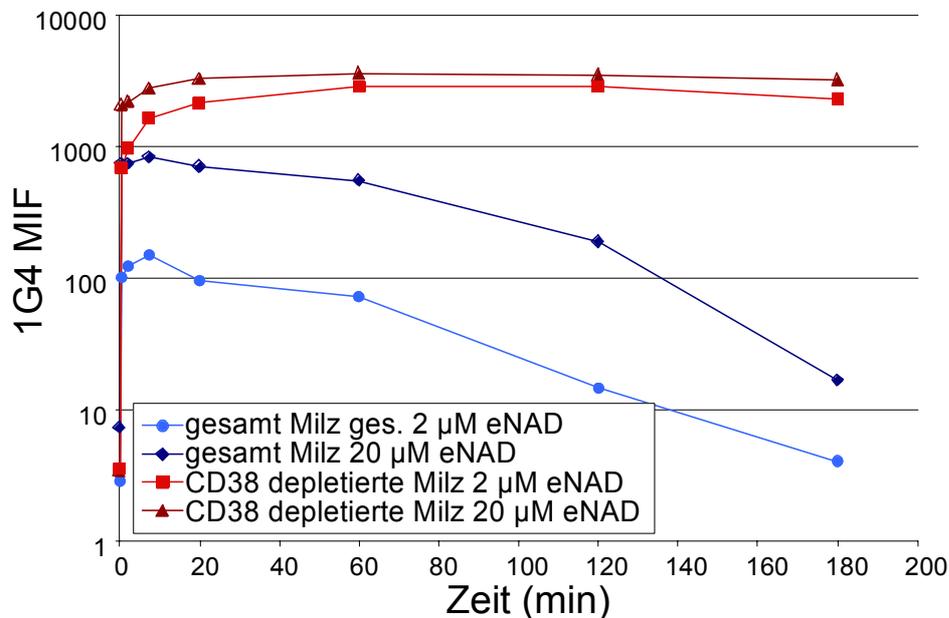


**Abbildung 34: ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Milzzellen der C57BL/6 Maus vor und nach Depletion der CD38 positiven Zellen.** Milzzellen einer C57BL/6 Maus wurden präpariert und eine Erythrozytenlyse mit Gey's Puffer durchgeführt. Die Depletion der CD38 positiven Zellen wurde nach Markierung der Zellen mit CD38<sup>PE</sup> und anti-PE MicroBeads mit einer MACS AS-Säule durchgeführt. CD38<sup>+</sup> depletierte und gesamte Milzzellen wurden mit 2 und 20  $\mu$ M etheno-NAD für die angegebene Zeit (0-180 Minuten) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 1G4<sup>Alexa</sup> und CD38<sup>PE</sup> angefärbt. Daraufhin wurden FACS-Analysen durchgeführt. (A) Dargestellt sind die FACS-Analysen von den gesamten Milzzellen und CD38<sup>+</sup> depletierten Zellen, die 20 Minuten mit und ohne etheno-NAD inkubiert wurden. Es wurde ein „gate“ um die CD38 hoch positiven Zellen gesetzt und ermittelt, wie viel Prozent der Zellen in diesem „gate“ liegen. (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung der CD38 negativen Zellen aus den beiden unteren Quadranten wurde berechnet und gegenüber der Inkubationszeit in einem Diagramm dargestellt.

T Zellen aus C57BL/6 Mäusen können aufgrund einer Missense Mutation im ART2.1 Gen nur ART2.2 exprimieren (Kanaitsuka *et al.* 1997). Umgekehrt bilden T Zellen aus NZW Mäusen aufgrund einer Deletion des ART2.2 Gens nur ART2.1 (Tabelle 3) (Koch-Nolte *et al.* 1999; Adriouch *et al.* 2001). Entsprechende vergleichende Untersuchungen der Kinetik der etheno-ADP-Ribosylierung von gesamt Milzzellen und CD38 depletierten Zellen wurden auch bei Milzzellen aus NZW Mäusen durchgeführt. Im Unterschied zu der Untersuchung von C57BL/6 Zellen wurde hier die etheno-NAD Inkubation in Gegenwart von DTT durchgeführt, da NZW Mäuse keine ART2.2 bilden und die ART2.1 in Gegenwart von Reduktionsmitteln eine höhere Aktivität besitzt. Die MFI der 1G4

Anfärbung von CD38 negativen Zellen ist im zeitlichen Verlauf in **Abbildung 35** dargestellt. Wie bei den Zellen der C57BL/6 Maus war auch bei Zellen der NZW Maus der Grad der ADP-Ribosylierung bei den CD38 depletierten Zellen um ein Vielfaches höher als bei gesamten Milzzellen. Die Anfärbung der depletierten Zellen erreichte nach 20 Minuten ein Plateau. Bei den nicht depletierten Zellen wurde das Maximum schon nach 10 Minuten erreicht. Die Anfärbung der fiel danach bei nicht depletierten Zellen deutlich ab und hatte nach 180 Minuten praktisch wieder das Ausgangsniveau erreicht.

Hier konnte auch in einem anderen Mausmodell die Begrenzung der ART-Aktivität auf CD38 negativen Zellen durch CD38 positive Zellen gezeigt werden. In diesem Experiment war ein steter Rückgang der ADP-Ribosylierung bereits nach 20 Minuten zu beobachten, der bei den Experimenten mit C57BL/6 Zellen nicht so deutlich erkennbar war (**Abbildung 34**). Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Expression von Enzymen (ARH, NPP), die die De-ADP-Ribosylierung katalysieren, oder mit dem bei der NZW Maus verwendeten DTT.

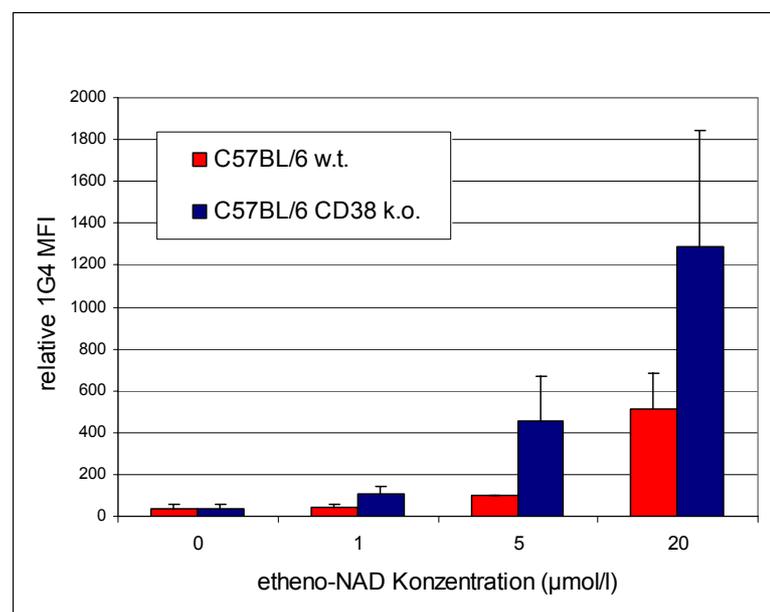


**Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Milzzellen der NZW Maus vor und nach Depletion der CD38 positiven Zellen.** Die CD38 Depletion wurde mit CD38<sup>PE</sup> und MACS anti-PE MicroBeads in einer MACS AS Säule durchgeführt. Danach wurden CD38 depletierte und gesamte Milzzellen für 0-180 Minuten mit 2 oder 20 µM etheno-NAD in Gegenwart von 1 mM DTT behandelt. Der Versuch war so aufgebaut, dass alle Proben gleichzeitig fertig waren und gleichzeitig mit 1G4<sup>Alexa</sup> und CD38<sup>PE</sup> angefärbt werden konnten. In der Auswertung der FACS-Analysen wurde auf die CD38 negativen Zellen gated. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung wurde in ein Diagramm übertragen.

### 3.3.2 Untersuchung der ART-Aktivität von Zellen aus CD38 Knock-out Mäusen

Die bisher in diesem Kapitel vorgestellten Versuche hatten gezeigt, dass die Anwesenheit von CD38 positiven Zellen auf CD38 negativen Zellen die ADP-Ribosylierung begrenzen kann. Unklar blieb jedoch, ob dies durch CD38 selbst vermittelt wird, oder ob über einen völlig von CD38 unabhängiger Mechanismus die ADP-Ribosylierung gehemmt wird. Aus diesem Grund sollten primäre Lymphozyten aus C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out verglichen werden.

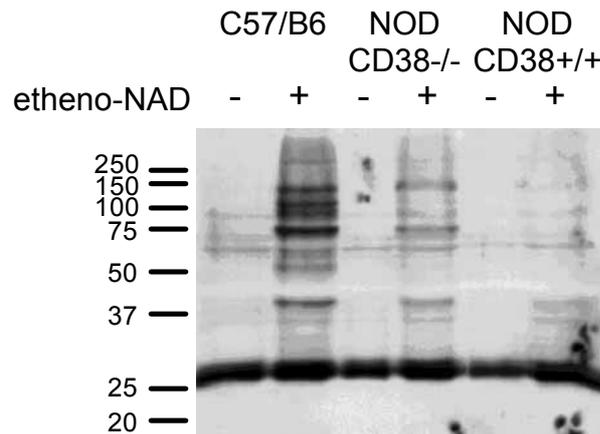
Zunächst wurde die ADP-Ribosylierung von C57BL/6 Wildtyp und C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen bei verschiedenen etheno-NAD Konzentrationen mit Hilfe des 1G4 FACS Assays verglichen. Nach der Inkubation mit etheno-NAD wurden die Zellen mit 1G4 sowie mit CD4 und CD8 angefärbt und im FACS untersucht. Bei der Auswertung der Daten wurde jeweils auf CD8 oder CD4 positive Zellen „gated“ und von diesen die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung bestimmt. **Abbildung 36** zeigt in einem Balkendiagramm die MFI der CD8 positiven Zellen aus vier unabhängigen Versuchen. Bei 1  $\mu\text{M}$  etheno-NAD ist bei Wildtyp Zellen kaum ADP-Ribosylierung nachzuweisen. Die CD38 Knock-out Zellen zeigen bei dieser etheno-NAD Konzentration schon ART-Aktivität. Bei höheren etheno-NAD Konzentrationen (5 und 20  $\mu\text{M}$ ) ist ART-Aktivität auch bei Wildtyp Zellen vorhanden, die bei den CD38 wiederum deutlich stärker ist.



**Abbildung 36: Vergleich der ART-Aktivität auf CD8 positiven T Zellen von C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out Mäusen mit dem 1G4 Assay.** Gesamt Milzzellen je einer C57BL/6 Wildtyp und einer CD38 Knock-out Maus wurden präpariert und mit 0, 1, 5 und 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, mit 1G4<sup>Alexa</sup>, CD4<sup>Cy3</sup> und CD8<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS untersucht. Es wurde mit CellQuest die MFI der 1G4 Anfärbung quantifiziert. Die MFI von Wildtyp Zellen bei 5  $\mu\text{M}$  etheno-NAD wurde gleich 100 gesetzt, die anderen Werte sind relativ dazu zu sehen. Das Diagramm zeigt die durchschnittliche relative MFI mit der Standardabweichung aus 4 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen bei Wildtyp und Knock-out Zellen sollte auch im Western Blot mit 1G4 vergleichend untersucht werden. Dazu wurden Zellen aus NOD Wildtyp und CD38 Knock-out Mäuse sowie einer C57BL/6 Maus untersucht. Die Milzzellen der Mäuse wurden nach etheno-NAD Inkubation lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE größenfraktioniert. Daraufhin wurden die Proteine auf eine NC Membran „geblottet“ und mit 1G4, anti-Maus Ig<sup>PO</sup> und dem ECL System etheno-ADP-ribosylierte Proteine detektiert. Die Kontrollspuren der Zelllysate ohne etheno-NAD Inkubation zeigen einige Hintergrundbanden (**Abbildung 37**). Eine prominente Bande bei 27 kDa wird wahrscheinlich durch die mit dem Sekundärantikörper reagierende leichte Kette der Antikörper auf B Zellen hervorgerufen. In allen Spuren mit etheno-NAD Inkubation erkennt man

spezifische Banden. Bei den Zellen der NOD Wildtyp Maus sind diese sehr schwach. Bei Zellen der NOD CD38 Knock-out Maus sind die Banden deutlicher zu erkennen. Hauptsächlich sieht man Banden bei 40, 60, 75, 100 und 150 kDa. Auch einige größere Proteine scheinen etheno-ADP-ribosyliert worden zu sein, jedoch kann man keine einzelnen Proteinbanden ausmachen. Die Proteine der C57BL/6 Maus wurden insgesamt stärker ADP-ribosyliert als die der NOD Maus. Neben den auch bei NOD CD38 Knock-out beschriebenen Banden, erkennt man bei C57BL/6 Zelllysaten zusätzlich Banden bei 50, 57, 120, und 300 kDa.



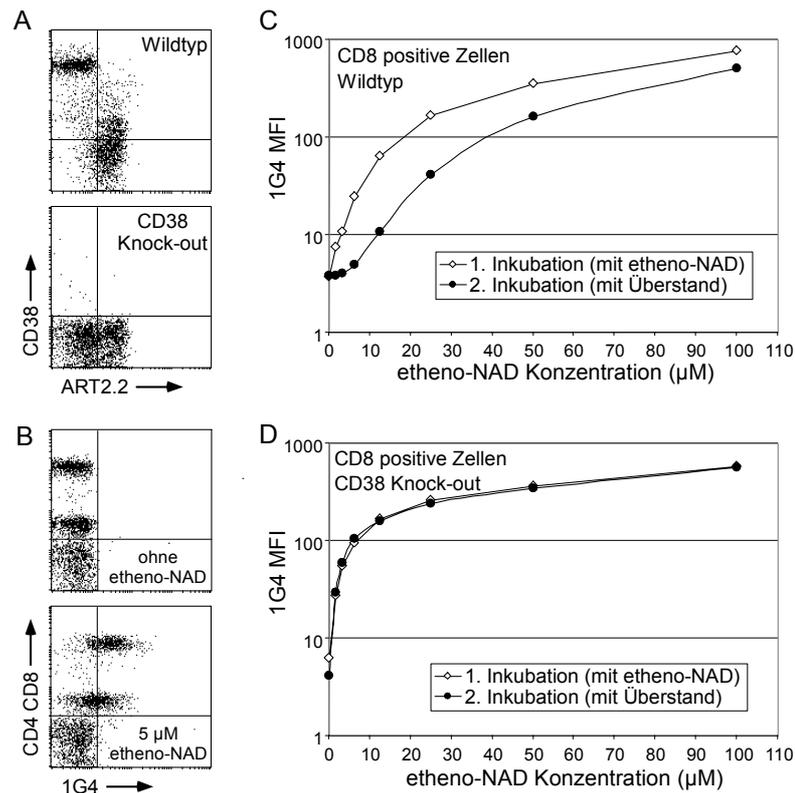
**Abbildung 37: Western Blot Analyse mit 1G4 nach etheno-NAD-Inkubation von Milzzellen aus C57BL/6 Wildtyp, NOD Wildtyp und NOD CD38 Knock-out Milzzellen.** Gesamt Milzzellen je einer C57BL/6 Wildtyp, einer NOD Wildtyp und einer NOD CD38 Knock-out Maus wurden präpariert. Je  $4,5 \cdot 10^7$  Zellen wurden in 5 ml RPMI mit und ohne etheno-NAD (20  $\mu$ M) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 500  $\mu$ l Triton X-100, 2 mM ADP-Ribose und 1 mM PMSF lysiert. Die Proteine von 200  $\mu$ l der Lysate wurden mit Aceton gefällt (entspricht  $1,8 \cdot 10^7$  Zelläquivalenten). Die Proteine wurden in SDS Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Glycin-Gel größenfraktioniert und auf eine PVDF Membran geblottet. Etheno-ADP-ribosylierte Proteine wurden mit 1G4 (1:5000) und anti-Maus Ig<sup>PO</sup> (1:5000) markiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System.

### 3.3.3 Einfluss von CD38 positiven Zellen auf das für ADP-Ribosylierung benötigte extrazelluläre NAD

Die vorangehenden Versuche konnten zeigen, dass die Ekto-NADase CD38 den Grad der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen vermindern kann. Dabei stellte sich die Frage nach dem Grund für diese Beobachtungen. Die einfachste Erklärung war, dass CD38 das NAD schnell zu ADP-Ribose hydrolysiert und so die NAD-Konzentration in der Zellsuspension verringert. Um dies zu untersuchen, wurde ein Bioassay durchgeführt, bei dem NAD-haltiges Medium in zwei Runden mit Zellen inkubiert wurde. Die Idee war, dass CD38 positive Zellen während der ersten Inkubation das NAD verbrauchen, und so in der zweiten Runde weniger Substrat für die ADP-Ribosylierung zur Verfügung steht.

Nachdem sich auf diese Weise in Voruntersuchungen Hinweise dafür fanden, dass CD38 positive Kulturzellen die NAD-Konzentration effektiv verringern können (nicht gezeigt), wurden Milzzellen von C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out Mäusen untersucht. Die Zellen wurden in einem ersten Schritt mit 0-100  $\mu$ M etheno-NAD inkubiert. Der Überstand wurde in einer 2. Inkubation unter

gleichen Bedingungen auf frische Zellen derselben Maus gegeben. Dann wurden alle Zellen mit 1G4 angefärbt und zusätzlich mit CD4<sup>Cy3</sup> und CD8<sup>PE</sup> markiert, um T Zellen in der FACS-Analyse differenziert betrachten zu können. In **Abbildung 38A** ist zunächst eine Kontrollanfärbung mit CD38 und anti-ART2.2 dargestellt, die zeigt, dass bei Wildtyp Zellen die ART2.2 exprimierenden T Zellen CD38 negativ sind oder eine schwache CD38 Expression vorwiesen. Zusätzlich gibt es noch eine Population von Zellen, die CD38 stärker exprimieren, dies sind hauptsächlich B Zellen (**Abbildung 7**). Die Zellen der CD38 Knock-out Maus exprimieren kein CD38. In **Abbildung 38B** ist exemplarisch die 1G4 Anfärbung dargestellt. Ohne etheno-NAD Vorinkubation lassen sich drei Populationen unterscheiden. Die CD4 und CD8 negativen Zellen, bei denen es sich hauptsächlich um B Zellen handelt, sind im linken unteren Quadranten abgebildet. Direkt darüber sieht man die mit CD4<sup>Cy3</sup> schwächer fluoreszierenden T-Helfer Zellen. CD8 positive zytotoxische T Zellen befinden sich ganz oben entlang der Y-Achse. Makrophagen und Granulozyten konnten aufgrund ihrer Größe und Seitwärtsstreuung in FACS-Analysen „ausgegated“ werden. Durch die Vorinkubation mit etheno-NAD ließen sich die T Zellen mit 1G4 anfärben, während die B Zell-Population 1G4 negativ war. Die 1G4 Anfärbung der CD4 und CD8 positiven Zellen zeigt deren ART-Aktivität, die auf den CD8 positiven Zellen deutlich stärker ist. Für die Diagramme in **Abbildung 38C** und **D** wurden ausschließlich CD8 positive Zellen „gegated“. Die ADP-Ribosylierung der Wildtyp Zellen nimmt in der 1. Inkubation Konzentrations-abhängig zu. Die Zellen der 2. Inkubation konnten weniger Zelloberflächenproteine ADP-ribosylieren, besonders deutlich ist dies bei geringen Konzentrationen, bei denen praktisch keine ART-Aktivität nachzuweisen ist. Mit steigender etheno-NAD Konzentration scheint der Unterschied zwischen der 1. und 2. Inkubation abzunehmen. Bei den CD8 positiven Zellen der CD38 Knock-out Maus ist kein Unterschied zwischen 1. und 2. Inkubation zu erkennen. Deutlich wird hier auch, dass die ADP-Ribosylierung bei geringeren etheno-NAD Konzentrationen stärker ansteigt als bei Wildtyp Zellen. Die an CD4 positiven Zellen gemachten Beobachtungen gleichen denen bei CD8 positiven Zellen. Die CD4 positiven haben allerdings passend zum Expressionsniveau weniger ART-Aktivität (nicht gezeigt).



**Abbildung 38: Bioassay zum Vergleich des NAD-Verbrauchs von C57BL/6 Wildtyp mit CD38 Knock-out Zellen.** Milzzellen einer C57BL/6 Wildtyp und einer C57BL/6 CD38 Knock-out Maus wurden präpariert. In (A) sind FACS-Analysen von Zellen abgebildet, die mit ART2.2<sup>FITC</sup> (Nika 102) und CD38<sup>PE</sup> angefärbt. (B) Die Zellen wurden mit 5 µM etheno-NAD für 20 Min inkubiert und mit 1G4<sup>Alexa</sup>, CD4<sup>Cy3</sup> und CD8<sup>PE</sup> angefärbt. Die in (C) und (D) abgebildeten Ansätze wurden gleichzeitig mit Wildtyp und mit CD38 Knock-out Zellen durchgeführt. In der 1. Inkubation wurden Zellen mit 0-100 µM etheno-NAD für 20 Min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand der Zellen erneut für eine etheno-NAD Inkubation von frischen Zellen verwendet (2. Inkubation). Diese Zellen wurden genauso für 20 Min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen aus der 1. Inkubation wurden in dieser Zeit bei 4 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit 1G4<sup>Alexa</sup>, CD4<sup>Cy3</sup> und CD8<sup>PE</sup> angefärbt. Die MFI der 1G4 Anfärbung von Wildtyp (C) und CD38 Knock-out (D) der CD8 positiven Zellen aus der 1. und der 2. Inkubation wurde gegen die etheno-NAD Konzentration aufgetragen.

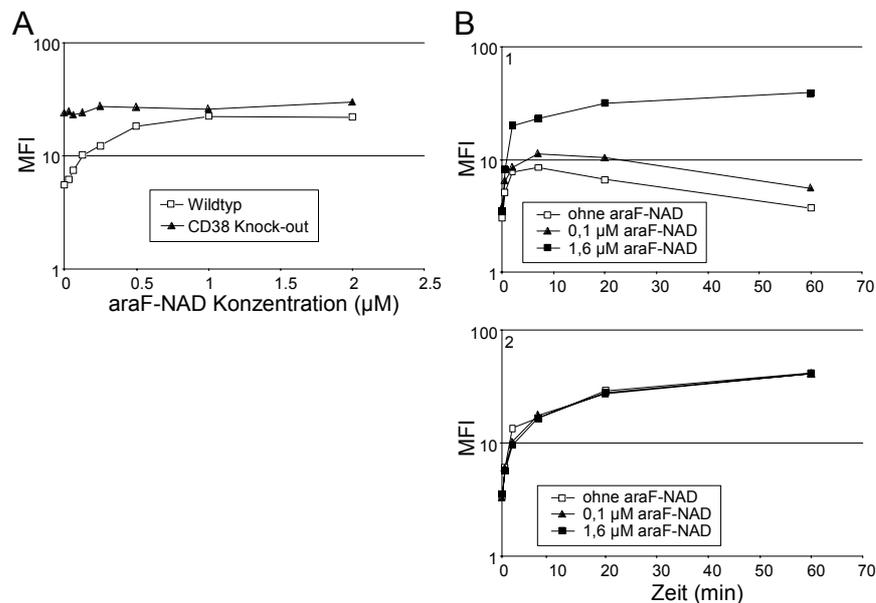
### 3.3.4 Untersuchung des Einflusses von araF-NAD auf die Hemmung der ADP-Ribosylierung durch CD38

Um zu verdeutlichen, dass die Hemmung der ADP-Ribosylierung durch die enzymatische Aktivität von CD38 hervorgerufen wird, sollten Versuche durchgeführt werden, bei denen CD38 durch einen spezifischen Inhibitor gehemmt wird. Dazu eignet sich araF-NAD besonders gut. Dieses NAD-Analogon wird von CD38 so langsam verstoffwechselt, dass sich daraus praktisch eine Blockierung der Enzymaktivität ergibt (Muller-Steffner *et al.* 1992).

Bei CD38 positiven EL4 Kulturzellen konnte ein ART-Aktivität erhöhender Einfluss von araF-NAD nachgewiesen werden, während araF-NAD im Konzentrationsbereich von 0,1-4 µM keinen Einfluss auf CD38 negative DC27.10 und MD27 Kulturzellen hatte (nicht gezeigt).

Um den Einfluss von araF-NAD auf die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei primären Lymphozyten zu untersuchen, wurden Milzzellen einer C57BL/6 Wildtyp Maus mit denen

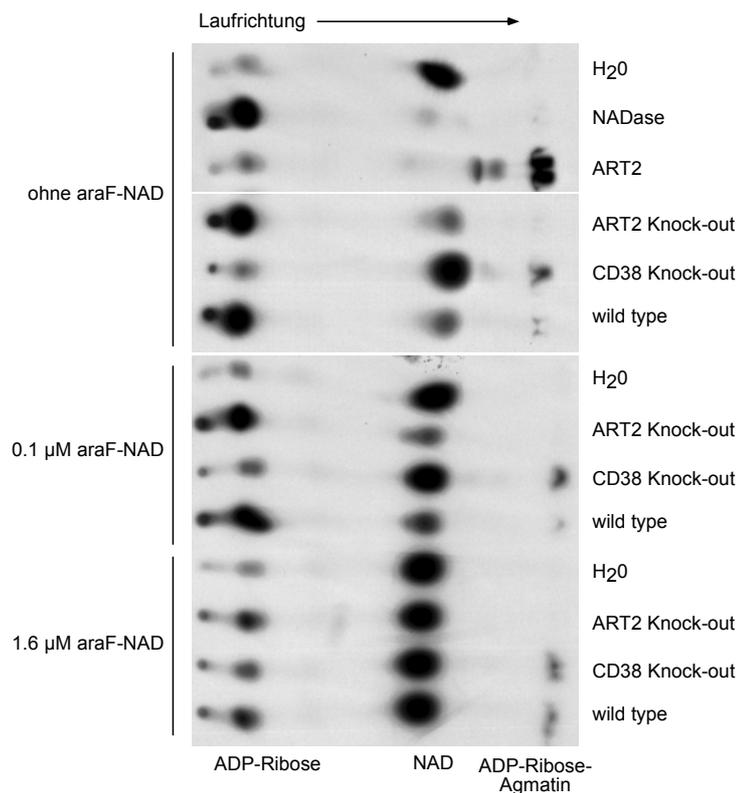
einer C57BL/6 CD38 Knock-out Maus verglichen. Nach Vorbehandlung der Zellen mit araF-NAD (0-2  $\mu\text{M}$ ) wurde die ADP-Ribosylierung mit etheno-NAD und 1G4 untersucht. Um zwischen B und T Zellen differenzieren zu können, wurden die B Zellen mit B220 markiert und konnten so ausgegated werden (**Abbildung 39A**). Im für die CD38 Hemmung relevanten Konzentrationsbereich von 0-1  $\mu\text{M}$  stieg die etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Wildtyp Zellen in Abhängigkeit von der araF-NAD Konzentration an. Bei Zellen einer CD38 Knock-out Maus hatte araF-NAD keinen Einfluss auf die Effektivität der etheno-ADP-Ribosylierung. AraF-NAD wirkte auch auf die Kinetik der ADP-Ribosylierung bei C57BL/6 Milzzellen konzentrationsabhängig (**Abbildung 39B**). Bei CD38 Knock-out Milzzellen (2) stieg die ADP-Ribosylierung im Verlauf von 60 Minuten unabhängig von der araF-NAD Konzentration an. Im Gegensatz dazu war die ADP-Ribosylierung ohne araF-NAD bei Wildtyp Zellen (1) deutlich schwächer und erreichte nach Vorbehandlung mit 1,6  $\mu\text{M}$  araF-NAD das Niveau der ADP-Ribosylierung von CD38 Knock-out Zellen.



**Abbildung 39: Einfluss von araF-NAD auf die ADP-Ribosylierung von C57BL/6 Wildtyp und CD38 Knock-out Zellen.** (A) Milzzellen je einer C57BL/6 Wildtyp und einer CD38 Knock-out Maus wurden mit den angegebenen araF-NAD Konzentrationen (0-2  $\mu\text{M}$ ) 15 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne Waschung für 20 Minuten bei 37 °C mit 5  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. Die Zellen wurden dann mit B220<sup>PE</sup> (CD45RA) und 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt und im FACS gemessen. Die MFI der 1G4 Anfärbung von B220 negativen Zellen (unterer rechter und linker Quadrant in Dot Plots, nicht gezeigt) wurde mit CellQuest bestimmt und gegen die araF-NAD Konzentration aufgetragen. (B) Milzzellen je einer C57BL/6 Wildtyp und einer CD38 Knock-out Maus wurden für 15 Minuten ohne araF-NAD (offene Quadrate), mit 0,1  $\mu\text{M}$  araF-NAD (gefüllte Dreiecke) und mit 1,6  $\mu\text{M}$  araF-NAD (gefüllte Quadrate) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert. Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben weiterbehandelt und die MFI der 1G4 Anfärbung von B220 negativen Zellen gegen die Zeit aufgetragen.

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss von CD38 auf die ADP-Ribosylierung von Agmatin untersucht werden. ART2 kann neben Argininresten in Proteinen die Aminosäure Agmatin ADP-ribosylieren. Dieses kann durch Verwendung von radioaktiv markiertem NAD (<sup>32</sup>P-NAD) in einer Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht werden (siehe auch Kapitel 3.1.7). Dazu wurden vitale

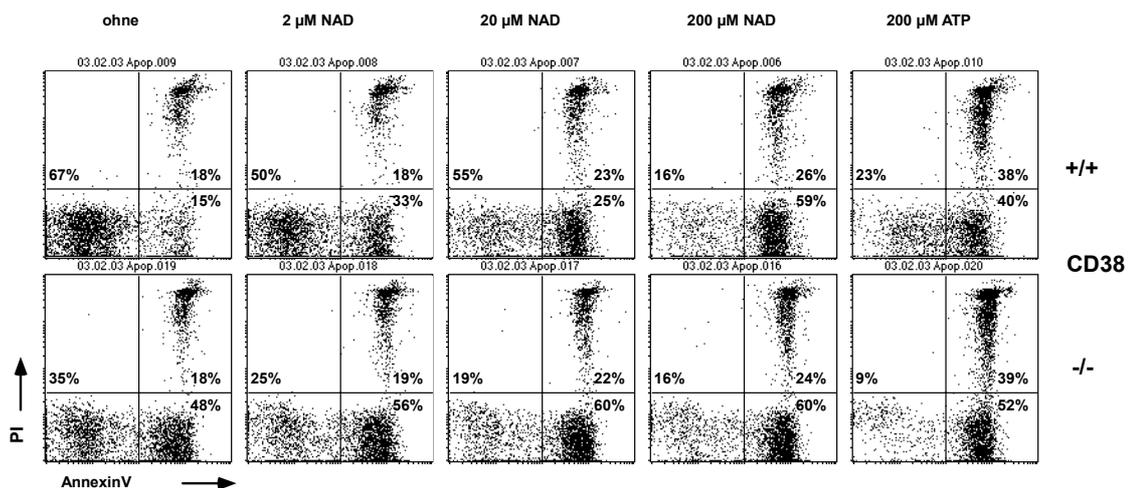
Zellen von Wildtyp BALB/c Mäusen, sowie von BALB/c CD38 Knock-out und BALB/c ART2 Knock-out Mäusen mit Agmatin und  $^{32}\text{P}$ -NAD inkubiert. Die Ansätze wurden zuvor mit 0, 1 und 1,6  $\mu\text{M}$  araF-NAD versetzt. Anschließend wurde der Überstand in einer DC aufgetrennt und eine Autoradiographie durchgeführt (**Abbildung 40**). Nach Inkubation von NAD mit NADase wurde praktisch das gesamte NAD hydrolysiert, während bei der Inkubation von rekombinanter ART2.2 mit Agmatin und  $^{32}\text{P}$ -NAD fast das gesamte NAD zur ADP-Ribosylierung von Agmatin verwendet wurde. Bei Wildtyp Zellen erkennt man allenfalls schwache Agmatin Modifikation und deutliche Hydrolyse von NAD zu ADP-Ribose. Durch Zugabe von araF-NAD konnte die ADP-Ribosylierung von Agmatin konzentrationsabhängig gesteigert und die Spaltung von NAD inhibiert werden. Bei den ART2 Knock-out Zellen und bei den Kontrollen mit Wasser wird Agmatin nicht modifiziert. Auch die Hydrolyse von NAD durch die ART2 Knock-out Zellen wurde durch araF-NAD gehemmt. Zellen der CD38 Knock-out Maus zeigen deutliche Agmatin ADP-Ribosylierung. Hingegen hat die NADase-Aktivität auf diesen Zellen praktisch nur Hintergrundniveau. Bei diesen Zellen hatte araF-NAD keinen Einfluss auf die Agmatin-ADP-Ribosylierung. Die Ergebnisse erhärten die Annahme, dass CD38 die prominenteste NADase im Immunsystem ist, und die Anwesenheit von CD38 über die Hydrolyse von NAD die ADP-Ribosylierung steuern kann.



**Abbildung 40: Einfluss von araF-NAD auf die ADP-Ribosylierung von Agmatin bei Wildtyp, CD38 Knock-out und ART2 Knock-out Zellen der BALB/c Maus.**  $10^6$  Lymphknotenzellen je einer BALB/c Wildtyp, BALB/c CD38 Knock-out und BALB/c ART2 Knock-out Maus wurden für 10 Min ohne araF-NAD, mit 0,1 araF-NAD und mit 1,6  $\mu\text{M}$  araF-NAD vorbehandelt. Danach wurden die Zellen für 30 Min mit 2  $\mu\text{M}$  NAD (2  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -NAD) in Gegenwart von 4 mM Agmatin weiterinkubiert. Als Kontrollen wurden Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ), NADase (*Neurospora crassa*) und rekombinante ART2.2 eingesetzt. Je 1  $\mu\text{l}$  der Überstände wurden für eine Dünnschichtchromatographie verwendet. Die getrocknete Trägerfolie wurde einer Autoradiographie unterzogen ( $-80^\circ\text{C}$ , 10 Stunden).

### 3.3.5 Vergleichende Untersuchungen des NAD induzierten Zelltods bei Zellen von Wildtyp und CD38 Knock-out Mäusen

Zellen der BALB/c Maus reagieren auf die Behandlung mit NAD und ATP mit frühen Zeichen des Zelltods, d.h. sie lassen sich mit Annexin V anfärben und nehmen Propidiumiodid (PI) auf. Die Untersuchungen zur Apoptose wurden ausführlich im Kapitel 3.2 vorgestellt und erläutert. Hier soll dargestellt werden, dass CD38 nicht nur den Grad der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen steuert, sondern dass dies auch Einfluss auf das Überleben der Zelle haben kann. Zellen einer der BALB/c Wildtyp und einer BALB/c CD38 Knock-out Maus wurden mit NAD (0, 2, 20 und 200  $\mu\text{M}$ ) und ATP (200  $\mu\text{M}$ ) behandelt und anschließend Annexin V / PI angefärbt (**Abbildung 41**). Der Versuch zeigt, dass Zellen der CD38 Knock-out Maus empfindlicher gegenüber der NAD induzierten Apoptose sind. Auch ohne NAD Inkubation sind nur noch 35 % der Zellen vital (67 % bei Wildtyp). Bei hohen NAD Konzentrationen (200  $\mu\text{M}$ ) unterscheiden sich Wildtyp und CD38 Knock-out Zellen nicht mehr. Auch auf die Inkubation mit ATP reagieren die CD38 Knock-out Zellen sensibler.



**Abbildung 41: NAD und ATP induzierter Zelltod bei T Zellen der BALB/c Wildtyp und CD38 Knock-out Maus.** Lymphknotenzellen einer BALB/c Wildtyp und einer BALB/c CD38 Knock-out Maus wurden mit anti-Maus Ig DynaBeads von B Zellen depletiert. Je  $2 \cdot 10^5$  Zellen wurden ohne Nukleotid, oder mit je 2, 20 und 200  $\mu\text{M}$  NAD bzw. mit 200  $\mu\text{M}$  ATP für 60 Min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen und mit Annexin V<sup>FITC</sup> und PI angefärbt und im FACS untersucht. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten.

### 3.4 Untersuchung der ART-Aktivität auf Lymphozyten von verschiedenen Tierarten

Der 1G4 Assay sollte genutzt werden, um die ADP-Ribosylierung auf Lymphozytenpopulationen verschiedener Tierarten zu untersuchen. ARTs sind bis heute nur bei Bakterien und bei höher entwickelten Organismen wie Vertebraten beschrieben. Die ersten als mono-ADP-Ribosyltransferasen identifizierten Enzyme waren bakterielle Toxine, zu denen u.a. Cholera- und Pertussistoxin gehören (Aktories 1991; Passador and Iglewski 1994). Die erste mono-ADP-Ribosyltransferase, die bei Säugetieren entdeckt wurde, war das Ratten RT6 (ART2), dessen Funktion lange Zeit nicht bekannt

war (Thiele *et al.* 1983; Koch *et al.* 1986; Thiele *et al.* 1986). Später wurde dieses Enzym auch auf T Zellen der Maus entdeckt (Hollmann *et al.* 1994). ARTs werden nicht ausschließlich von lymphatischen Zellen exprimiert. ART1 wird zum Beispiel von Herz- und Skelettmuskelzellen gebildet und ART4 ist als Dombrock Antigen auf Erythrozyten bekannt (Zolkiewska *et al.* 1992; Koch-Nolte *et al.* 1997; Glowacki *et al.* 2002). Bei Hühnern wurde ART Aktivität von Zellen aus unterschiedlichen Geweben beschrieben (siehe Kapitel 3.4.6) (Mishima *et al.* 1991; Davis *et al.* 1997; Shimoyama *et al.* 1997; Yamada *et al.* 2001).

Untersuchungen des Gens der ART2 bei Primaten und Menschen haben ergeben, dass das ART2 Gen bei hier mehrere prämatüre Stop-Codons enthält, und somit kein funktionstüchtiges Protein produziert wird (Haag *et al.* 1994; Glowacki *et al.* 2002).

Um der Frage nach der Verteilung und dem Vorkommen von ARTs im Immunsystem im Tierreich nachzugehen, sollte der 1G4 FACS-Assay verwendet werden. Er eignet sich besonders gut für solche vergleichenden Untersuchungen über Speziesgrenzen hinweg, da er das Ergebnis der ADP-Ribosylierungsreaktion nachweist und nicht das Enzym selbst.

#### 3.4.1 Untersuchung der ART-Aktivität von Zellen aus verschiedenen lymphatischen Geweben der Maus

In diesem Kapitel soll zunächst auf das Muster der ART-Aktivität im Maus-Modell eingegangen werden. Die Versuche an primären lymphatischen Zellen der Maus bildeten die Grundlage für die Untersuchungen an anderen Tieren. Weitergehende Untersuchungen der ART-Aktivität auf murinen Lymphozyten werden in anderen Abschnitten des Ergebnisteils dargestellt (Kapitel 3.2 , 3.3 und 3.5).

Da der 1G4 Antikörper aus der Maus stammt, gestalteten sich die ersten Versuche mit indirekter Markierung von Lymphozyten in sofern als problematisch, als dass die B Zellen durch den sekundären Antikörper mit angefärbt wurden (nicht gezeigt) (Krebs *et al.* 2003). Aus diesem Grund konnte lange Zeit keine befriedigende Aussage über die ART-Aktivität auf B Zellen gemacht werden. Durch die Konjugation des 1G4 Antikörpers mit den Fluorochromen FITC und Alexa-488 wurden die FACS-Untersuchungen erheblich vereinfacht.

In unserer Arbeitsgruppe haben Untersuchungen zur Expression von ART2.2 auf T Zellen von verschiedenen Mausstämmen mit dem monoklonalen Antikörper Nika 102 ergeben, dass ART2.2 auf Zellen der C57BL/6 Maus stark exprimiert wird (Koch-Nolte *et al.* 1999). Auf Zellen der BALB/c Maus wurde hingegen eine deutlich schwächere Expression der ART2.2 festgestellt. Dabei konnte in allen untersuchten Mausstämmen ART2 nur auf T Zellen und nicht auf B Zellen nachgewiesen werden (Karsten *et al.* 1997; Koch-Nolte *et al.* 1999). Um zu untersuchen ob die ART2.2-Expression mit der ART-Aktivität korreliert, wurden C57BL/6 und BALB/c Lymphozyten aus verschiedenen Geweben isoliert und mit dem 1G4 FACS-Assay analysiert. Vergleichend wurden auch Zellen von ART2 Knock-out Mäusen untersucht, um auszuschließen, dass Zelloberflächenproteine von anderen Enzymen als den beiden ART2 ADP-ribosyliert werden (Ohlrogge *et al.* 2002).

**Abbildung 42** zeigt solche FACS-Analysen von Lymphozyten aus C57BL/6, BALB/c Wildtyp

und BALB/c Knock-out Mäusen. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 10  $\mu$ M etheno-NAD inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1G4<sup>Alexa 488</sup> und CD3<sup>PE</sup> angefärbt. Bei Zellen aus C57BL/6 Mäusen war in den Ansätzen ohne etheno-NAD eine typische organspezifische Verteilung von CD3 positiven T Zellen und CD3 negativen Zellen zu erkennen. Im Knochenmark befanden sich wenige reife T Zellen, die möglicherweise aus dem peripheren Blut kamen, bei den anderen Zellen handelte es sich zum Teil um hämatopoetische Vorläuferzellen. Nach Inkubation mit etheno-NAD wurden nur CD3 positive Zellen mit 1G4 angefärbt, d.h. reife T Zellen hatten hier ART-Aktivität, auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen konnte keine ART-Aktivität nachgewiesen werden.

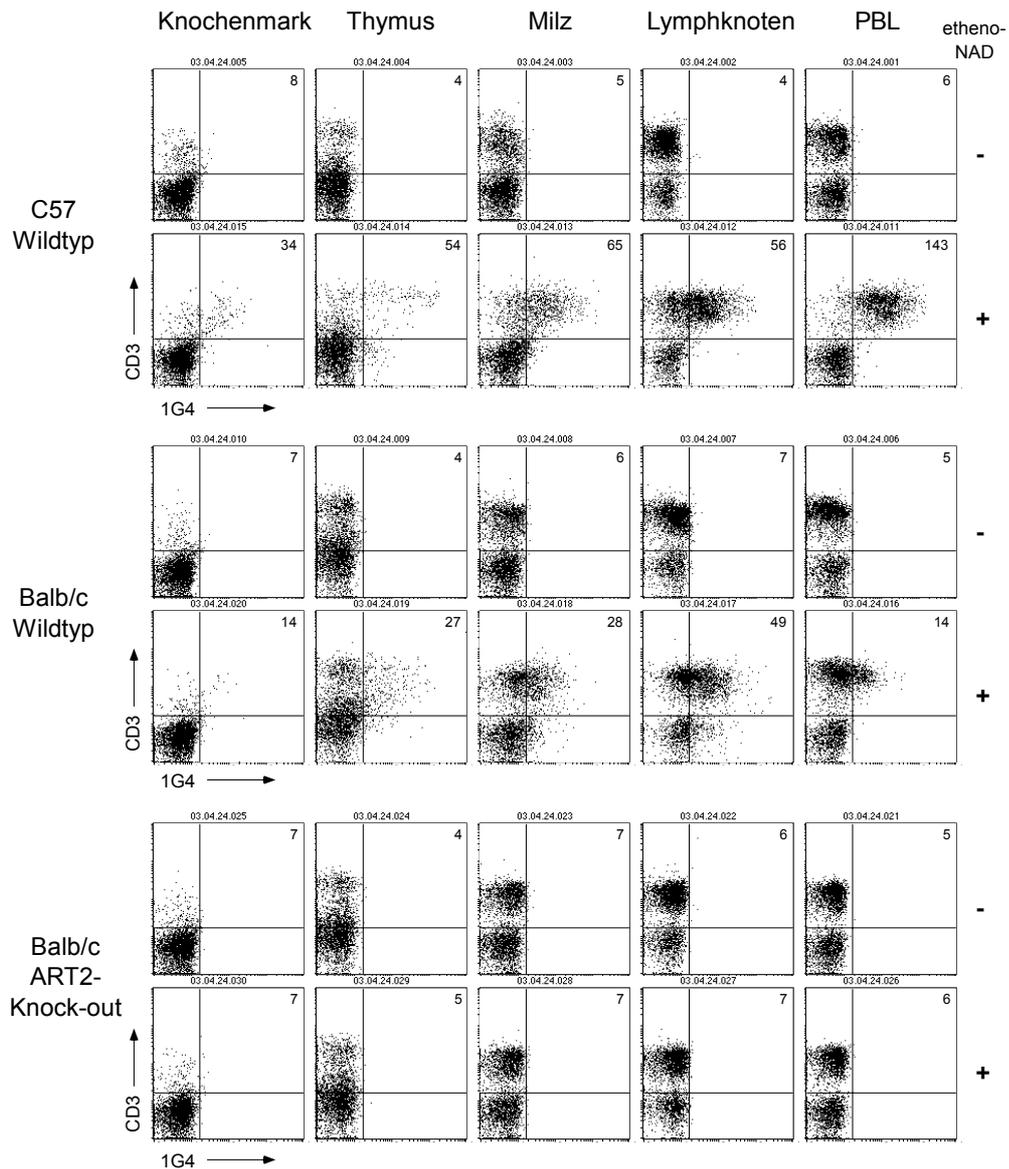
Im der C57BL/6 Thymus befanden sich wenige CD3 positive Zellen, d.h. Zellen, die die Reifungsprozedur im Thymus abgeschlossen hatten. Die anderen Zellen waren unreife Thymozyten. Ohne etheno-NAD Inkubation ließen sich keine Thymozyten mit 1G4 anfärben, während nach Inkubation mit etheno-NAD ca. 50 % der CD3 positiven Zellen mit 1G4 markiert wurden. Auch bei einigen CD3 negativen und CD3 schwach exprimierenden Zellen konnte sich geringe ART-Aktivität mit dem 1G4 Assay nachgewiesen werden.

In PBL, Milz und Lymphknoten aus der C57BL/6 Maus glich sich das Bild; in diesen Organen ist die 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD Inkubation auf CD3 positive Zellen beschränkt. Die relative Anzahl der T Zellen in diesen Organen spiegelt die typischen Verhältnisse bei der C57BL/6 Maus wider; im peripheren Blut sind etwa 50 % der Leukozyten T Zellen, in der Milz sind es ungefähr  $\frac{1}{3}$  und im Lymphknoten  $\frac{2}{3}$ .

Bei Zellen der BALB/c Maus konnten qualitativ die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Hauptsächlich konnte bei reifen T Zellen nach Inkubation mit etheno-NAD ART-Aktivität nachgewiesen werden. Bei den BALB/c Zellen war die 1G4 Anfärbung jedoch schwächer als bei C57BL/6 Zellen.

Die hier verwendeten Mausstämme unterschieden sich auch hinsichtlich der relativen Anzahl an T Zellen. Bei BALB/c waren in der Milz etwa die Hälfte, im Lymphknoten  $\frac{1}{4}$  und im peripheren Blut  $\frac{2}{3}$  der Zellen T Zellen.

Die Zellen der BALB/c ART2 Knock-out Maus zeigen auch nach Inkubation mit etheno-NAD keine Anfärbung mit dem 1G4 Antikörper, so dass sich zusammenfassend sagen lässt, dass mit dem 1G4 FACS Assay ART-Aktivität auf CD3 positiven T Zellen nachgewiesen werden konnte, die mit dem Expressionsniveau der ART2 korreliert.



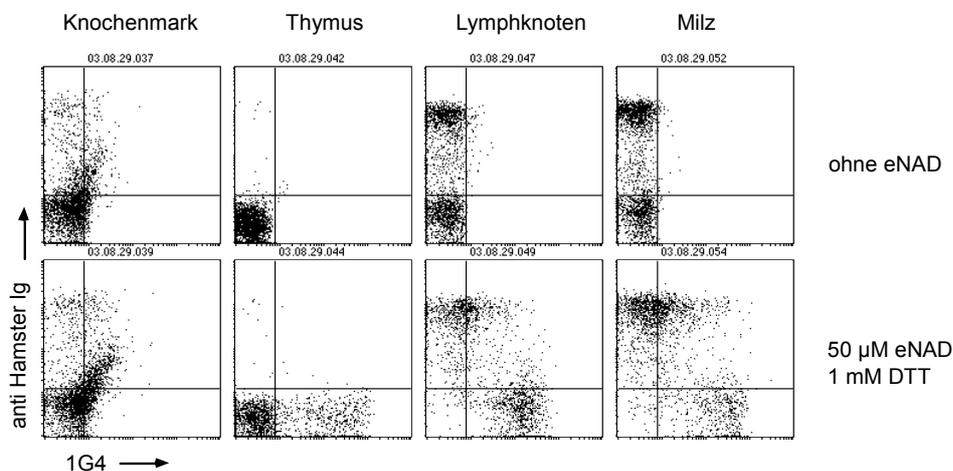
**Abbildung 42: Vergleich der 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD-Inkubation von C57BL/6 und BALB/c Lymphozyten im FACS.** Aus je einer C57BL/6, BALB/c Wildtyp und BALB/c ART2 Knock-out Maus wurden Knochenmark-, Thymus-, Milz-, Lymphknoten- und Blutzellen (PBL) präpariert. Erythrozyten aus PBL, Milz und Knochenmark wurden mit Gey's Puffer lysiert. Je  $10^6$  Zellen wurden mit oder ohne etheno-NAD ( $10 \mu\text{M}$ ) für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit  $1\text{G4}^{\text{Alexa}}$  und  $\text{CD3}^{\text{PE}}$  angefärbt. Danach wurden die Zellen im FACS untersucht. Bei der Auswertung der Daten wurden sowohl Lymphozyten als auch Monozyten/Makrophagen gated. Tote Zellen wurden durch eine PI Anfärbung ausgeschlossen. Angegeben ist die MFI der Zellen aus den oberen beiden Quadranten.

### 3.4.2 Untersuchung der ART-Aktivität und des NAD induzierten Zelltods bei Hamster Lymphozyten

Eine intrazelluläre ART-Aktivität war beim Hamster bei einer renalen Zelllinie nachgewiesen worden (pyBHK) (Lee and Iglewski 1984). Über die ART-Aktivität im lymphatischen System gab es bisher noch keine Untersuchungen. Um die ART-Aktivität von Lymphozyten des Hamsters zu untersuchen, wurden Zellen aus Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz eines syrischen Goldhamsters aufgearbeitet und in FACS Analysen nach Inkubation mit etheno-NAD  $50 \mu\text{M}$  und 1G4

Anfärbung untersucht. B Zellen wurden zur Abgrenzung von T Zellen mit Antikörpern gegen Hamster Immunglobulin markiert (anti-Hamster Ig<sup>PE</sup>).

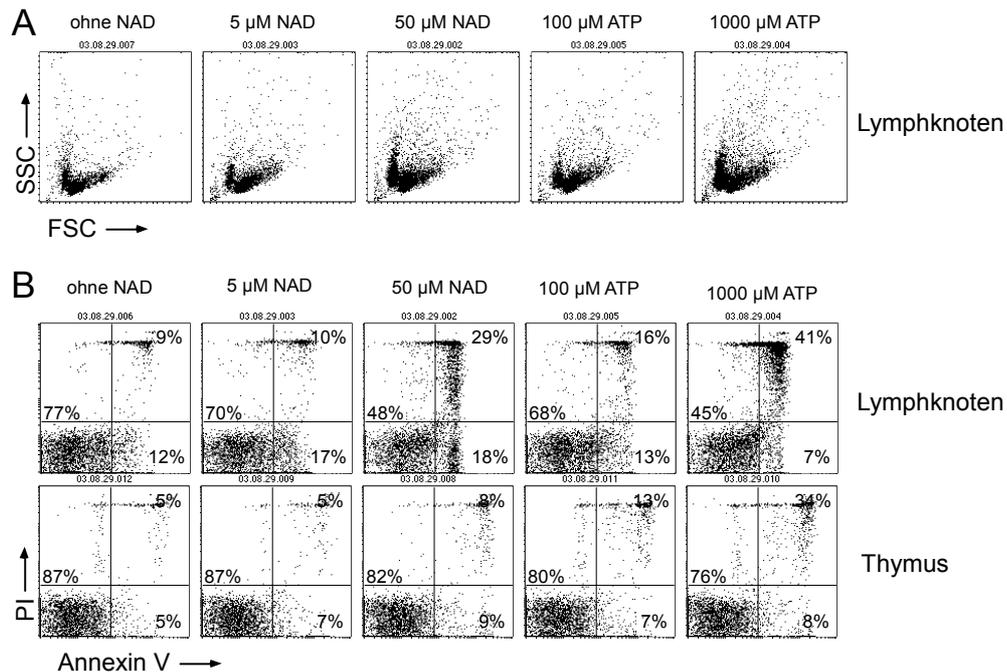
Die in **Abbildung 43** dargestellten FACS-Analysen zeigen ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen. Bei Knochenmarkszellen zeigt sich eine leichte Verschiebung entlang der X-Achse ausgemacht werden. Ob es sich dabei um „echte“ 1G4 Anfärbung nach etheno-ADP-Ribosylierung muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Bei den anderen hier untersuchten Geweben wurde das Gate nur auf die Lymphozytenpopulation gesetzt. Im Thymus befanden sich im Gegensatz zu den anderen Geweben keine Zelloberflächen-Ig positiven B Zellen. Ein Teil der Thymozyten war nach Inkubation mit etheno-NAD 1G4 positiv. Über das Reifestadium dieser Zellen lässt sich leider keine Aussage treffen. In Lymphknoten und Milz zeigten jeweils die T Zellen starke ART-Aktivität. B Zellen ließen sich nach Inkubation mit etheno-NAD mit dem 1G4 Antikörper schwach anfärben. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine ART-Aktivität auf reifen T Zellen.



**Abbildung 43: ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen des Hamsters.** Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz eines syrischen Goldhamsters wurden präpariert. Die Erythrozyten aus Knochenmark und Milz wurden mit Gey's Puffer lysiert. Die Zellen wurden mit und ohne 50 µM etheno-NAD für 30 Minuten mit 1 mM DTT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, mit 1G4<sup>Alexa</sup> und anti-Hamster Ig<sup>PE</sup> angefärbt und mit dem FACS gemessen.

Bei T Zellen der BALB/c Maus lässt sich sowohl mit NAD als auch mit ATP der Zelltod einleiten (siehe Kapitel 3.2) (Ohlrogge *et al.* 2002; Seman *et al.* 2003). In diesem Zusammenhang sollte der Frage nachgegangen werden, ob NAD und ATP auch Einfluss auf lymphatische Zellen anderer Tierarten haben. Dazu wurden Lymphknotenzellen und Thymozyten eines syrischen Goldhamsters mit je 5 µM NAD, 50 µM NAD, 100 µM ATP und 1000 µM ATP inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Annexin V und PI angefärbt und im FACS analysiert. **Abbildung 44A** zeigt die Zellen im FSC gegen den SSC. Wenn Zellen in Apoptose gehen, werden sie kleiner. Dies ist im FACS am verringerten FSC zu erkennen. Das Blebbing der Membranen von apoptotischen Zellen spiegelt sich im vergrößerten SSC wider (Seman *et al.* 2003). Die hier untersuchten Zellen schrumpften nach Inkubation mit 50 µM NAD und 1000 µM ATP, und der SSC dieser Zellen wurde größer. Dies waren erste Anzeichen für programmierten Zelltod durch die Nukleotide NAD und ATP. **Abbildung 44B** zeigt die Annexin V / PI Anfärbung der Zellen. Nach Inkubation ohne Nukleotide waren 12 % der

Zellen Annexin V positiv und 9 % hatten PI aufgenommen. Nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  NAD gingen etwas mehr Zellen in Apoptose (17%/10 %). Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  NAD führte deutlich zur Apoptose der Zellen, 18 % waren Annexin V und 29 % PI positiv. Auch ATP induzierte den Zelltod, nach Inkubation mit 1000  $\mu\text{M}$  ATP waren 41 % der Zellen PI positiv. Wie im Mausmodell ließ sich bei Hamsterzellen der NAD-induzierte Zelltod auslösen, und auch eine Inkubation mit ATP führte zum Zelltod. Interessant ist, dass genau wie bei Zellen der Maus, auch beim Hamster die Behandlung der Zellen mit hohen ATP-Konzentrationen eher zur PI Aufnahme führte als die Inkubation mit NAD (siehe **Abbildung 29**).

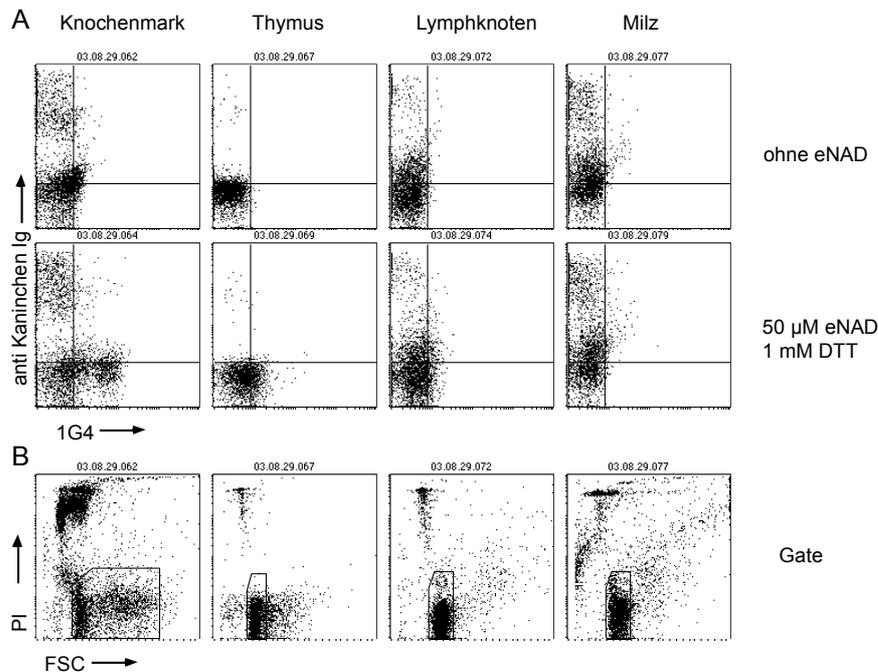


**Abbildung 44: Annexin V / PI Anfärbung von Hamster Lymphozyten nach Inkubation mit NAD und ATP.** Je  $10^6$  Lymphknotenzellen und Thymozyten wurden mit 5 oder 50  $\mu\text{M}$  NAD, bzw. 100 oder 1000  $\mu\text{M}$  ATP für 30 Minuten bei 37 °C mit 2 mM ADP-Ribose inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium gewaschen, Annexin V<sup>FITC</sup>/PI angefärbt und mit dem FACS gemessen. **(A)** zeigt FSC und SSC der nicht gegateten Zellen. **(B)** zeigt die Annexin V und PI angefärbten Zellen.

### 3.4.3 Untersuchung von Lymphozyten des Kaninchens auf ART-Aktivität und NAD induzierten Zelltod

Von andere Arbeitsgruppen wurde in mehreren Arbeiten die ART1 auf Skelettmuskelzellen des Kaninchens charakterisiert (Zolkiewska *et al.* 1992; Zolkiewska and Moss 1997), jedoch lagen keine Daten über der ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen vor. Der 1G4 Assay sollte auch hier zur Untersuchung von Lymphozyten auf ART-Aktivität im FACS verwendet werden. Dazu wurden Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz eines Kaninchens mit und ohne etheno-NAD (50  $\mu\text{M}$ ) und 1 mM DTT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1G4 und einem Antikörper gegen Kaninchen Immunglobulin angefärbt. Im Knochenmark konnte eine Population mit ART-Aktivität entdeckt werden (**Abbildung 45A**), die sich im forward scatter (FCS) als große Zellen

auswiesen, die hier ins Gate eingeschlossen wurden (**Abbildung 45B**). Im Thymus war eine leichte Zunahme der 1G4 Anfärbung nach etheno-NAD Inkubation erkennbar, die für schwache ART-Aktivität stehen könnte. In Lymphknoten und Milz konnte keine ART-Aktivität mit dem 1G4 Antikörper gemessen werden. Reife Lymphozyten scheinen beim Kaninchen keine ART-Aktivität zu exprimieren. Diesbezüglich verhalten sich die Kaninchenzellen anders als Zellen von Maus und Hamster, bei denen ART-Aktivität auf reifen Zellen nachgewiesen wurde.

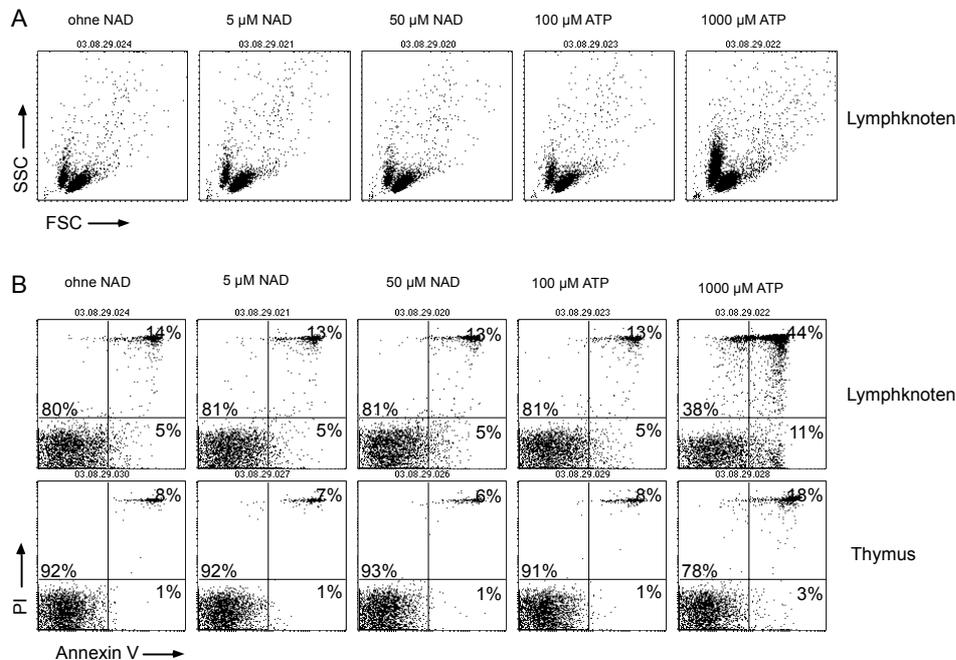


**Abbildung 45: 1G4 Anfärbung nach Inkubation von lymphatischen Zellen des Kaninchen mit etheno-NAD.** Zellen aus Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz eines Kaninchens wurden präpariert und Erythrozyten aus Knochenmark und Milz mit Gey's Puffer lysiert. Die Zellen wurden mit oder ohne 50 µM etheno-NAD für 30 Minuten inkubiert (1 mM DTT). Die Zellen wurden anschließend gewaschen, mit 1G4<sup>Alexa</sup> und anti-Kaninchen Ig<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS gemessen. Der obere Teil (**A**) zeigt die Auswertungen der 1G4 und anti-Kaninchen Ig Anfärbung. (**B**) zeigt FSC und PI Anfärbung der Zellen, sowie das Gate, in dem sich die in (**A**) abgebildeten Zellen befinden.

Der NAD und ATP induzierte Zelltod sollte auch bei Kaninchenlymphozyten untersucht werden. Dazu wurden Lymphozyten eines Kaninchens aus Lymphknoten und Thymus präpariert und mit 5 oder 50 µM NAD sowie mit 100 oder 1000 µM ATP für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde eine Annexin V / PI Anfärbung durchgeführt und die Zellen im FACS gemessen. **Abbildung 46A** zeigt die FACS-Analysen in der Dot Plot Darstellung, bei denen FSC gegen SSC aufgetragen ist. Durch Inkubation mit NAD verändern die Zellen ihre Größe und Granulierung nicht, wie man an unveränderten FSC und SSC erkennen kann. Nach Inkubation mit einer hohen (1000 µM) ATP Konzentration vergrößert sich der SSC, und der FSC wird kleiner, was als früher Hinweis auf Apoptose gilt.

In **Abbildung 46B** ist die Annexin V und PI Anfärbung der gleichen FACS-Analysen dargestellt. Ohne NAD oder ATP Behandlung waren im Lymphknoten 5 % der Zellen Annexin V positiv und 14 % PI positiv. Nach Inkubation mit NAD oder 100 µM ATP blieben immer gleich viele Zellen vital

(80-81 %), während die Inkubation der Lymphknotenzellen mit 1000  $\mu\text{M}$  ATP bei einem Teil der Zellen zu einem Verlust der Zellvitalität führte (38 %). Bei Thymozyten führte die Behandlung mit 1000  $\mu\text{M}$  ATP zu einem Verlust der Zellintegrität (91-93 % vitale Zellen vs. 78 % bei 1000  $\mu\text{M}$  ATP). Die lymphatischen Zellen des Kaninchens reagieren unter den hier untersuchten Bedingungen nicht auf eine Behandlung mit NAD. ATP kann in hoher Konzentration hingegen den Zelltod zumindest bei Lymphozyten eindeutig induzieren.

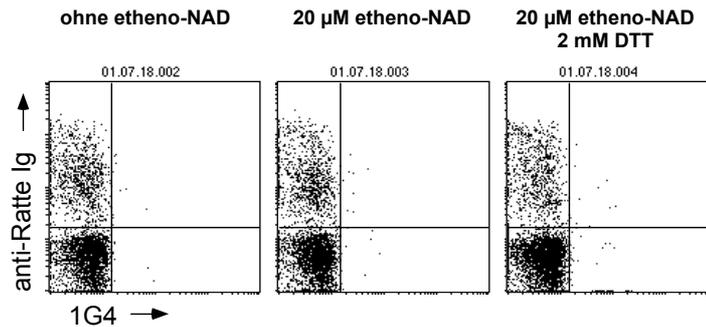


**Abbildung 46: Bei Lymphozyten des Kaninchens lässt sich kein NAD induzierter Zelltod feststellen.** Je  $10^6$  Lymphknotenzellen (LK) und Thymozyten wurden mit 5 und 50  $\mu\text{M}$  NAD, bzw. mit 100 und 1000  $\mu\text{M}$  ATP 30 Min bei 37 °C mit 2 mM ADP-Ribose inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium gewaschen, und es wurde eine Annexin V<sup>FITC</sup>/PI Anfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem FACS gemessen. **(A)** zeigt FSC gegen SSC der nicht gegateten Zellen. **(B)** zeigt die Annexin V und PI angefärbten Zellen.

#### 3.4.4 Untersuchung von ART-Aktivität auf Lymphozyten der Ratte

Von der ART2 der Ratte ist bekannt, dass es starke NADase aber nur schwache ADP-Ribosyltransferase-Aktivität hat. Die einzige bisher bekannte Transferase-Aktivität der ART2 der Ratte führt zur mit  $^{32}\text{P}$ -NAD nachgewiesenen Automodifikation (Haag *et al.* 1997; Karsten *et al.* 1997).

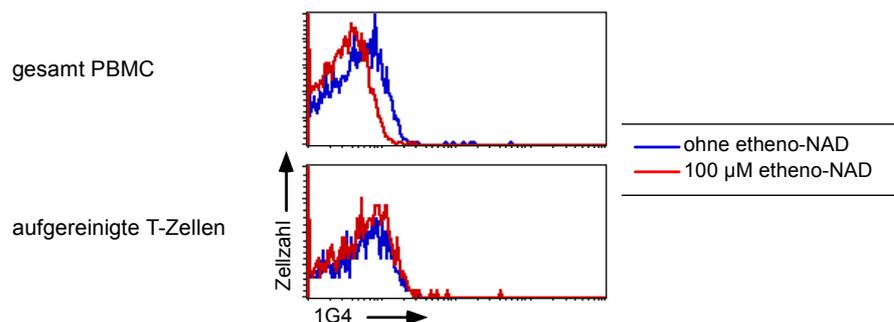
Lymphknotenzellen einer Ratte wurden präpariert und mit 20  $\mu\text{M}$  etheno-NAD +/- für 30 Minuten inkubiert. Da von der ART2.1 der Maus bekannt ist, dass ihre Aktivität durch DTT gesteigert wird, wurde der Versuch mit und ohne 2 mM DTT durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit 1G4 und einem Antikörper gegen Ratten Immunoglobulin angefärbt und im FACS untersucht. Wie in **Abbildung 47** dargestellt, ließen sich mit anti-Ratte Ig B Zellen von anderen Zellen, hauptsächlich T Zellen, unterscheiden. Nach Inkubation mit etheno-NAD konnte keine 1G4 Anfärbung nachgewiesen werden. Der Versuch zeigt, dass Rattenlymphozyten keine messbare ART-Aktivität auf der Zelloberfläche exprimieren.



**Abbildung 47: 1G4 Anfärbung von lymphatischen Zellen aus der Ratte nach Inkubation mit etheno-NAD.** Lymphknotenzellen einer Wistar Ratte wurden in An- und Abwesenheit von 5 mM DTT mit 20 µM etheno-NAD für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1G4<sup>FITC</sup> und anti-Ratte Ig<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS untersucht.

### 3.4.5 Untersuchung von humanen Leukozyten auf ART-Aktivität

Auf murinen T Zellen sind die beiden ART2 Proteine die einzigen Enzyme, die Zelloberflächenproteine ADP-ribosylieren (Ohlrogge *et al.* 2002). Von humaner ART2 ist jedoch bekannt, dass sie vorzeitige Stop-Codons enthält, die die Expression des Proteins verhindern (Haag *et al.* 1994). Um zu untersuchen, ob beim Menschen ein anderes Enzym die ART2-Funktionen übernommen hat, oder ob die Zellen keine ART-Aktivität haben, wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC, d.h. Monozyten und Lymphozyten) aufgereinigt und T Zellen angereichert. PBMC und aufgereinigte T Zellen wurden dann mit 100 µM etheno-NAD inkubiert, in zwei Schritten mit 1G4 und anti-Maus Ig angefärbt und im FACS gemessen. Wie die FACS Histogramm Plots in **Abbildung 48** zeigen, konnte weder bei Lymphozyten noch bei Monozyten aus humanem Blut ART-Aktivität mit dem 1G4 Assay nachgewiesen werden.



**Abbildung 48: 1G4 Anfärbung von humanen lymphatischen Zellen nach Inkubation mit etheno-NAD.** Aus humanem peripherem Blut wurden Mononukleäre Zellen (PBMC) mit Accuspin Histopaque von Erythrozyten getrennt. T-Lymphozyten wurden mit dem MACS pan T-cell kit aufgereinigt. Die Zellen wurden mit (rot) und ohne (blau) etheno-NAD (100 µM) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> und im FACS untersucht.

### 3.4.6 Untersuchung von ADP-Ribosyltransferasen bei Hühnern

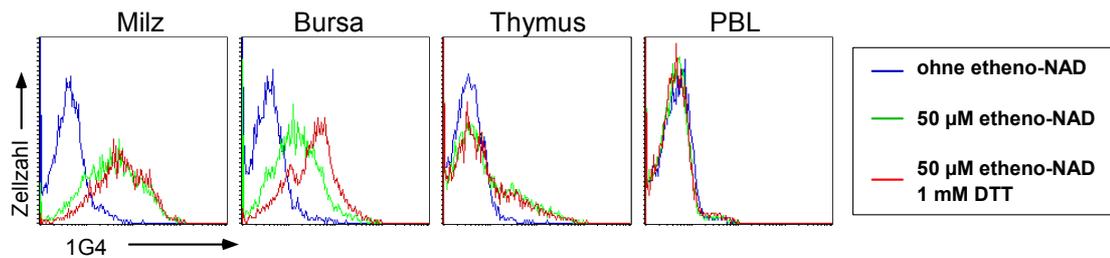
Bei allen bisher in dieser Arbeit untersuchten Arten handelt es sich um Säugetiere. Um das Vorkommen von ARTs und die Aktivität dieser Enzyme bei anderen Vertebraten zu untersuchen, wurden Experimente mit Hühnerzellen und Datenbankrecherchen im Hühnergenom vorgenommen.

Beim Huhn war bereits über ART-Aktivität bei Zellen aus unterschiedlichen Geweben berichtet worden, u.a. bei polymorphkernigen Granulozyten („Heterophile“), Erythroblasten sowie bei Zellen aus Knochenmark, Milz, Skelettmuskel und Muskelmagen („gizzard“) (Terashima *et al.* 1996; Davis *et al.* 1997; Graves *et al.* 1997; Shimoyama *et al.* 1997; Tsuchiya *et al.* 1997; Yamada *et al.* 2001). Bei heterophilen Granulozyten wurde sowohl DTT-unabhängige als auch DTT-abhängige ART-Aktivität beschrieben (Ohno *et al.* 1994; Terashima *et al.* 1998).

#### *Untersuchung von ART-Aktivität auf Lymphozyten des Huhns*

Wir wollten den 1G4 Assay nutzen, um beim Huhn ART-Aktivität auf Zellen aus lymphatischen Organen zu untersuchen. Kurz sollen hier noch einige anatomische und funktionelle Besonderheiten des Immunsystems von Vögeln erwähnt werden. Der Thymus ist nicht als Organ mit zwei Lappen unter dem Sternum gelegen, wie dies bei Säugetieren der Fall ist. Vielmehr gibt es mehrere paarig angelegte Thymi im Hals. Im Gegensatz zu Säugetieren werden bei Vögeln die B Zellen in der *Bursa fabricii* gebildet. Wenn man Vögeln frühzeitig die Bursa fabricii entnimmt, können sie keine B Zellen und keine Antikörper bilden. Aufgrund dieser Entdeckung wurden diese Zellen nach der Bursa B Zellen genannt. Zudem haben Vögel interessanterweise keine Lymphknoten.

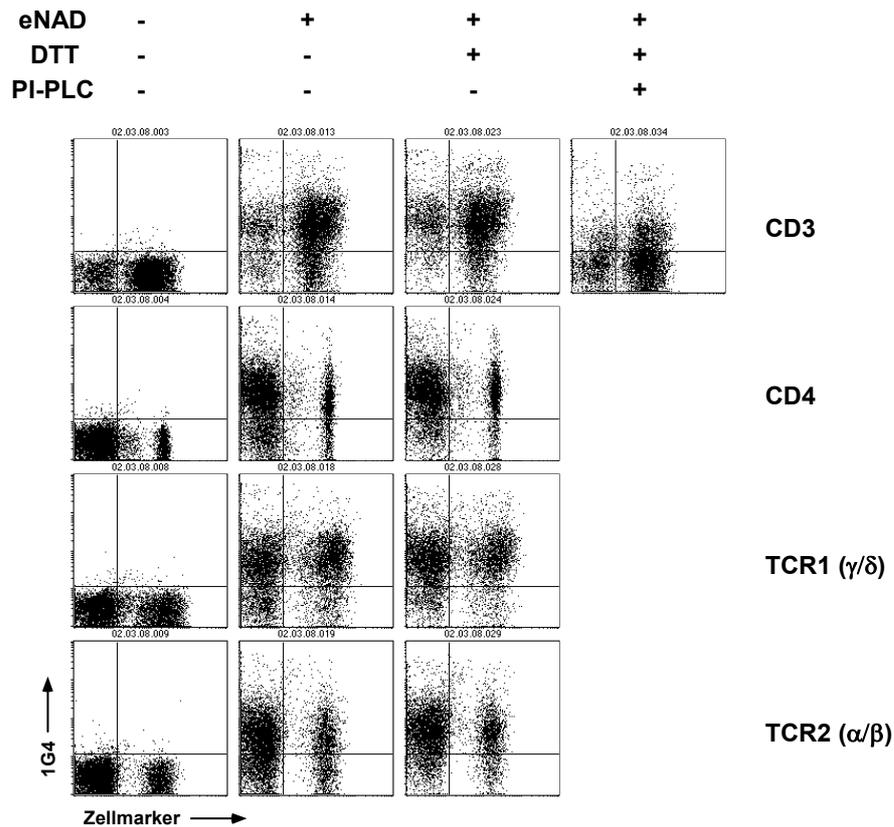
Lymphatische Zellen aus Milz, Thymus, peripherem Blut und Bursa fabricii wurden aus einem acht Wochen alten Huhn entnommen. Lymphozyten aus der Milz wurden mit Ficoll aufgereinigt, die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) wurden als „buffy coat“ nach niedertourigem Abzentrifugieren von Erythrozyten und Granulozyten gewonnen. Die Zellen wurden mit 50  $\mu$ M etheno-NAD mit und ohne 1 mM DTT inkubiert und anschließend mit 1G4 und anti-Maus Ig als Zweitantikörper angefärbt (**Abbildung 49**). Die Zellen ließen sich nach Inkubation ohne etheno-NAD nicht mit 1G4 anfärben. Nach Inkubation mit etheno-NAD waren die meisten Milz-Zellen angefärbt. Die Behandlung mit DTT während der Inkubation führte nicht bzw. nur zu einer schwachen Steigerung der 1G4 Anfärbung. Auch Zellen aus der *Bursa fabricii* ließen sich nach Inkubation mit etheno-NAD mit 1G4 anfärben, hier steigerte DTT die Anfärbung. Unter den Thymozyten ließ sich nur ein kleiner Teil der Zellen nach etheno-NAD Inkubation mit 1G4 anfärben, dies lässt sich durch DTT nicht steigern. Die PBL ließen sich nicht mit 1G4 anfärben. Die Zellen aus den verschiedenen lymphatischen Geweben zeigen also auffällige Unterschiede in ihrer membranständigen ART-Aktivität. Während Zellen aus der Milz und der Bursa deutliche ART-Aktivität haben, ist diese bei Thymozyten schwach ausgeprägt. Lymphozyten aus dem peripheren Blut haben keine messbare ART-Aktivität. Im Gegensatz zu den Zellen aus Milz und Thymus kann die Aktivität auf den Bursazellen mit DTT erhöht werden.



**Abbildung 49: 1G4 Anfärbung von lymphatischen Zellen des Huhns.** Peripheres Blut, Milz, Bursa fabricii und Thymus von einem acht Wochen alten Huhn wurden präpariert. Lymphozyten aus der Milz wurden mit Ficoll aufgereinigt. Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus buffy coat gewonnen. Die Zellen wurden ohne etheno-NAD (blau), mit 50 µM etheno-NAD (grün) und mit etheno-NAD und 1 mM DTT (rot) 30 Min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt und mit dem FACS Scan gemessen.

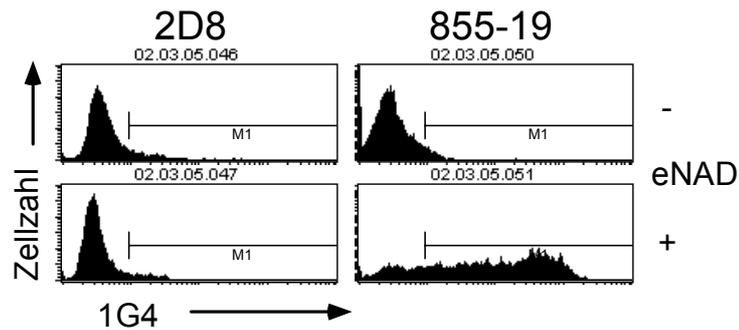
Nachdem wir ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen mit dem 1G4 Assay nachweisen konnten, wollten wir die Zellpopulation mit ART-Aktivität näher eingrenzen und charakterisieren. Dazu standen eine Reihe von Antikörpern gegen Antigene auf reifen T und B Zellen zur Verfügung, die Doppelanfärbungen zusammen mit dem 1G4 Antikörper erlaubten. Da auf Blutzellen keine ART-Aktivität gefunden wurde, und für Bursa- und Thymuszellen keine Antikörper zur Verfügung standen, die Zellen in ihrer Differenzierungsstufe unterscheiden konnten, wurden für diesen Ansatz Milzzellen ausgewählt. Um die Membranverankerung der ART zu bestimmen, sollte ein Teil der Zellen mit GPI-Anker-spaltender PI-PLC vorbehandelt werden.

Milzlymphozyten aus einem acht Wochen alten Huhn wurden mit Ficoll von den Erythrozyten getrennt. Ein Teil der Zellen wurde mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 50 µM etheno-NAD mit und ohne DTT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 1G4 und verschiedenen Antikörpern gegen T Zell Antigene markiert. Die Antigene dieser Antikörper waren CD3, CD4, TCR1 und TCR2. Bei TCR1 handelt es sich um den  $\gamma/\delta$  T Zell Rezeptor (Sowder *et al.* 1988) und bei TCR2 um den  $\alpha/\beta$  T Zell Rezeptor (Chen *et al.* 1988; George and Cooper 1990). Bei allen Antikörpern handelt es sich um Maus IgG 2b Antikörper. Da der 1G4 Antikörper ein Maus IgG 2a Antikörper ist, konnten die Zellen mit isotypspezifischen anti-Maus IgG 2a<sup>PE</sup> und anti-Maus IgG 2b<sup>FITC</sup> Zweitantikörpern angefärbt werden. Die Auswertungen der FACS-Analysen in **Abbildung 50** zeigen, dass in den Ansätzen ohne etheno-NAD keine Zellen mit 1G4 und anti-Maus IgG<sup>PE</sup> positiv sind. Nach Inkubation mit etheno-NAD zeigen sowohl CD3 positive T Zellen, als auch CD3 negative Zellen eine deutliche Anfärbung mit 1G4. Die Zellen lassen sich nach PI-PLC Behandlung sehr viel schlechter mit 1G4 anfärben. Immer noch können jedoch Zellen schwach angefärbt werden. Nach der Behandlung sind möglicherweise noch nicht alle GPI-verankerten Proteine abgeschnitten, sind schon wieder neue ARTs auf die Zelloberfläche gelangt oder ein Teil der ARTs ist anders als über einen GPI-Anker mit der Zellmembran assoziiert. Die DTT Behandlung hat, wie schon bei dem in **Abbildung 50** dargestellten Experiment (**Abbildung 49**), wenn überhaupt nur einen geringfügig steigernden Effekt auf die 1G4 Anfärbung von Milzzellen des Huhns.



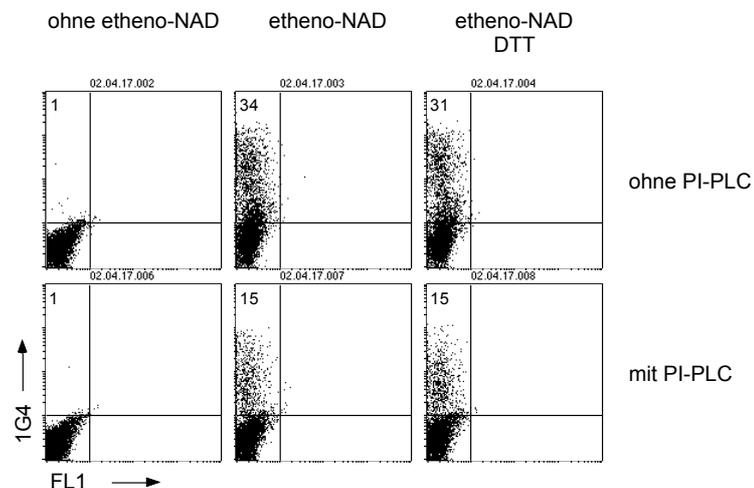
**Abbildung 50: ART-Aktivität und deren GPI-Verankerung von verschiedenen Lymphozytenpopulationen aus der Milz von Hühnern.** Je  $10^6$  Milzzellen wurden mit  $50 \mu\text{M}$  etheno-NAD in An- und Abwesenheit von  $1 \text{ mM}$  DTT  $30 \text{ Min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für  $60 \text{ Minuten}$  mit PI-PLC ( $0,1 \text{ U}/100 \mu\text{l}$ ) vorbehandelt. Die Zellen wurden dann gewaschen und mit  $1\text{G}4$  und isotypspezifischem anti-Maus  $\text{IgG}2\text{a}^{\text{PE}}$  angefärbt. Die Zellen wurden zusätzlich mit unterschiedlichen T Zell Marken und isotypspezifischem anti-Maus  $\text{IgG}2\text{b}^{\text{FITC}}$  angefärbt (CD3, CD4, TCR1, TCR2), die mit PI-PLC behandelten Zellen wurden nur mit CD3 angefärbt. Die Zellen wurden mit einem FACS Scan gemessen.

Mit etheno-NAD und  $1\text{G}4$  wurden in FACS-Analysen ferner verschiedene Zelllinien, die aus Hühnern isoliert wurden, auf ART-Aktivität untersucht. Ziel dieses Screenings war es, eine oder mehrere Zelllinie zu finden, die endogene ART exprimieren und sich so als Modell für Untersuchungen dieses Enzyms eignet. Folgende Kulturzellen wurden verwendet: die T Zelllinien 855-19, RP-1, HP9, MSB und 2D8, RP-9, die B Zelllinie DT-40, die Makrophagenlinien HD-11 und BM2 sowie die Fibroblastenzelllinie CEC32. Die Zellen wurden für FACS Analysen jeweils mit etheno-NAD ( $50 \mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend mit  $1\text{G}4$  angefärbt. Nur die T Zelllinie 855-19 zeigte nach etheno-NAD Inkubation eine starke Anfärbung mit  $1\text{G}4$ , alle anderen Zellen waren negativ (nicht gezeigt und **Abbildung 51**). Die B Zelllinie 2D8 wurde in **Abbildung 51** stellvertretend für die anderen negativen Zelllinien mit abgebildet.



**Abbildung 51: 1G4 Assay zum Screening von Hühner Zelllinien.** Hühner-Lymphomzellen wurden bei 37° C mit 50  $\mu$ M etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1G4 und anti-Maus IgPE angefärbt. Die Zellen wurden im FACS Scan gemessen.

Um eine eventuelle GPI-Verankerung der ART auf 855-19 Zellen festzustellen, wurden die Zellen mit PI-PLC behandelt und anschließend mit etheno-NAD inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit DTT behandelt, um der Frage nachzugehen, ob die ART auf den 855-19 Zellen DTT-abhängig ist. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1G4 angefärbt (**Abbildung 52**). Dabei waren 34 % der Zellen nach Inkubation mit etheno-NAD mit 1G4 angefärbt. Die Behandlung mit DTT hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Intensität der Anfärbung. Nach Inkubation mit PI-PLC hat sich die Zahl der angefärbten Zellen auf 15 % reduziert. 855-19 Zellen exprimieren also offensichtlich eine DTT-unabhängige GPI-verankerte ART auf der Zelloberfläche.



**Abbildung 52: GPI-Verankerung und DTT-Abhängigkeit der ART auf Hühnerzelllinie 855-19.** 855-19 Zellen wurden eine Stunde mit oder ohne Phospholipase C (0,15 U/100  $\mu$ l RPMI) bei 37 °C behandelt. Danach wurden die Zellen mit 50  $\mu$ M etheno-NAD, mit und ohne 1 mM DTT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1G4 und anti-Maus Ig PE angefärbt und im FACS gemessen. Angegeben ist die Prozentzahl der Zellen, die im linken oberen Quadranten liegen.

#### *In silico Analysen von Hühner-ARTs*

Das Huhn ist derzeit der einzige Modellorganismus aus der Familie der Vögel, dessen Genom vollständig entschlüsselt wird. Nach Abschluss der hier beschriebenen experimentellen Daten wurde eine große Sammlung von Hühnchen ESTs (expressed sequence tags = partielle Gentranskripte) sowie

die erste Fassung („draft“) des kompletten Hühnergenoms publiziert (Boardman *et al.* 2002; Hillier *et al.* 2004)

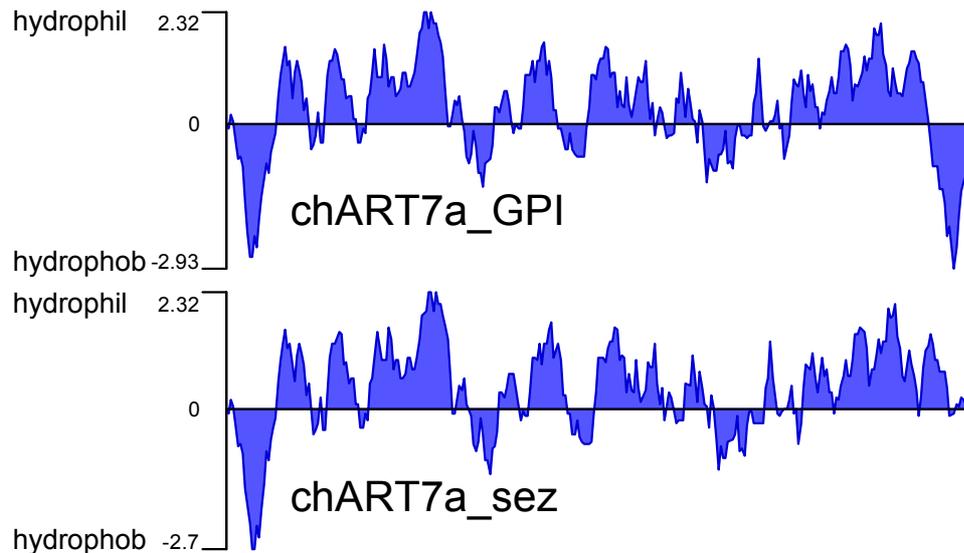
Um neben den bereits bekannten, sezernierten ARTs des Huhns (ART6a, ART6b, ART7) mögliche GPI-verankerte ARTs zu identifizieren, wurden die EST und Genom Datenbanken regelmäßig auf Vorkommen von ART-kodierenden cDNAs bzw. Genabschnitten durchmustert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. In der EST-Datenbank sind bisher keine ESTs für die bekannten ART6a, ART6b oder ART7 enthalten. Es wurden drei ESTs identifiziert, die offensichtlich aus Transkripten von zwei bisher unbekanntem ART-kodierenden Genen stammen (s.u.).

| <i>Gen</i> | <i>Accession (Protein)</i> | <i>Chr. Lokalisation</i> | <i>EST (mRNA)</i>     |
|------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| ART6a      | D31864                     | unbekannt                |                       |
| ART6b      | D31865                     | Chr. 3, unbekannt        |                       |
| ART7a_sez  | X82397                     | Chr. 1                   |                       |
| ART7a_GPI  | XP_425680                  | Chr. 1                   |                       |
| ART7b      | XP_425681                  | Chr.1                    |                       |
| ART7c      | XP_425682                  | Chr.1                    | BG712472              |
| ART8       | XM_427780                  | Chr. 3, unbekannt        | CB017922,<br>BU297503 |

**Tabelle 2: Identifizierte ART-kodierende Gene im Hühnergenom und in EST-Datenbanken.** Die Datenbanken des Hühnergenoms und von „expressed sequence tags“ (EST) wurden mit einer TBLASTN Suche auf das Vorhandensein von ART-kodierenden Sequenzen hin untersucht (TBLASTN 2.2.10) (Altschul *et al.* 1997). Die Tabelle gibt den Namen des Gens, die Genbank „accession number“ des Genprojekts, die chromosomale Lage und die Genbank Nummern von gefundenen ESTs an.

In dem veröffentlichten Entwurf des Hühner-Genoms findet sich das für ART6a kodierende Gen auf einem noch nicht kartierten Chromosomenabschnitt, das ART6b Gen auf Chromosom 3 und das ART7 Gen auf Chromosom 1. In unmittelbarer Nachbarschaft von ART7 finden sich im Hühnergenom zwei weitere ART-kodierende Gene. Diese zeigen eine deutlich höhere Sequenzidentität zu ART7 als zu ART6 und wurden deshalb ART7b und ART7c genannt (wobei ART7a dem bereits bekannten ART7 Gen entspricht) (Davis *et al.* 1997). Weitere Fragmente eines ART-kodierenden Gens fanden sich in Nachbarschaft zu dem ART6b Gen (das in der Datenbank einmal auf Chromosom 3 und ein zweites Mal auf einem nicht-lokalisierten Genomabschnitt vorkommt). Vergleiche mit den EST Sequenzen deuten an, dass es sich dabei um ein weiteres ART Gen handelt, dem zwei partiell überlappende ESTs zugeordnet werden konnten. Dieses Gen wurde mit ART8 bezeichnet.

Der erste Entwurf des Hühnchen Genoms enthält ferner Sequenzen für vorhergesagte Proteine (predicted proteins), die nach automatisierter Identifizierung von möglichen Introns und längeren offenen Leserastern vorhergesagt wurden. Dazu gehört auch ein vorhergesagtes Protein (XP\_425680), das aus einer alternativen Spleißvariante des bereits bekannten ART7a Gens entstehen würde. Dieses vorhergesagte Protein enthält interessanterweise ein C-terminales GPI-Verankerungssignal (**Abbildung 53**).



**Abbildung 53: Hydrophobizitätsprofil beider Splice-Varianten der ART7 des Huhns.** Mit den Proteinsequenzen der Hühner ART7a\_GPI und ART7a\_sez (sezerniert) wurden mit dem Computerprogramm Protean (DNASTAR) Kyte-Doolittle-Hydrophobizitätsprofile erstellt (Plasterer 1997).

Hydrophobe Signalsequenzen, die sowohl für N-terminale Leader wie auch für C-terminale GPI-Verankerungssignale typisch sind, können mit dem Kyte-Doolittle Algorithmus vorhergesagt werden (Plasterer 1997). **Abbildung 53** zeigt die Ergebnisse einer entsprechenden Hydrophobizitätsanalyse für die beiden Varianten des ART7a Proteins. Es zeigt sich, dass beide Proteinsequenzen mit einem hydrophoben Abschnitt beginnen, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Signal-Peptid handelt, das die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum bewirkt. Die Sequenz der ART7a\_GPI endet mit einem hydrophoben Abschnitt, der wahrscheinlich eine GPI-Verankerung und somit die Lokalisation auf der Zelloberfläche vermittelt. Bei der ART7a\_sez Variante fehlt ein solcher hydrophober Bereich am Ende, was am ehesten dafür spricht, dass es sich um ein lösliches Protein handelt, das von den Zellen sezerniert wird. Die Sequenzen wurden ferner mit Signalpeptid- und GPI-Anker Vorhersageprogrammen (SignalP 3.0 und DGPI) auf das Vorhandensein möglicher Signalpeptide überprüft (Bendtsen *et al.* 2004). Die Ergebnisse bestätigen die der Hydrophobizitätsanalysen. In **Abbildung 55** und **Abbildung 54** sind diese Signalpeptide am Beginn und am Ende der Proteinsequenzen rot markiert.



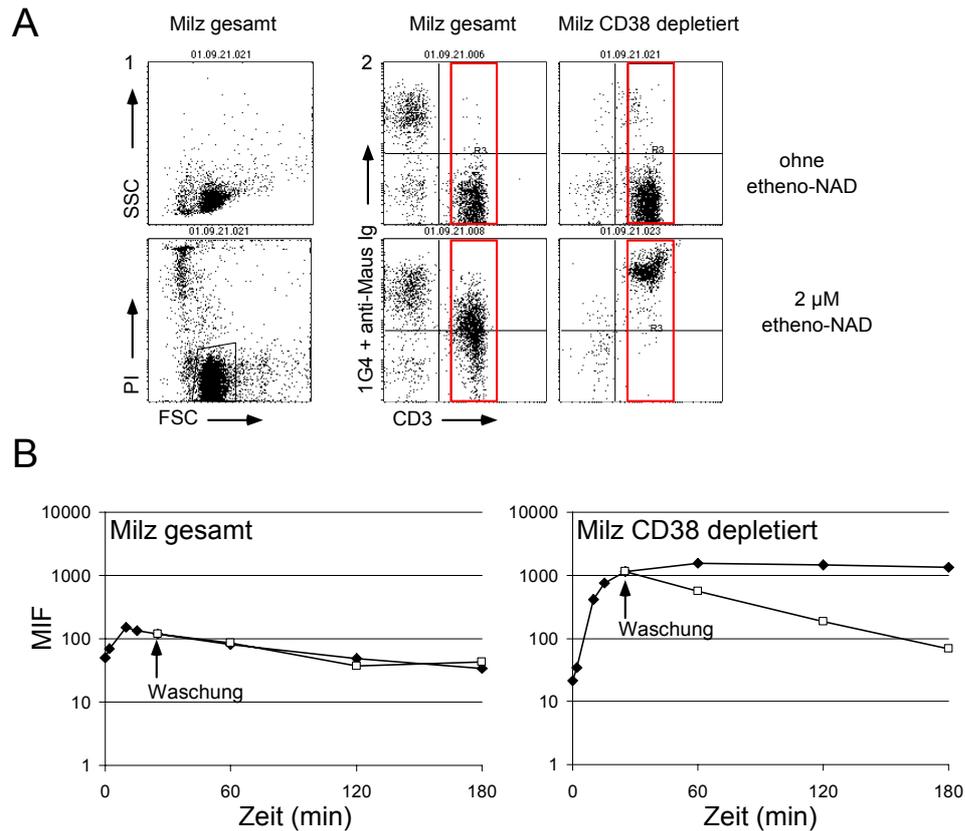


ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen beschäftigten, fiel auf, dass die 1G4 Anfärbung der Zellen nach längerer Inkubationszeit rückläufig war. Durch Zugabe von Enzyminhibitoren (ADP-Ribose und NP-TMP) konnte der Rückgang der Zelloberflächenanfärbung mit 1G4 gehemmt werden und so eine Reversibilität der ADP-Ribosylierung gezeigt werden. Es wurden zudem Experimente durchgeführt, bei denen nach intravenöser Gabe von etheno-NAD ADP-Ribosylierung *in vivo* nachgewiesen werden konnte, die ebenso reversibel war.

### 3.5.1 Pulse-chase Analysen mit etheno-NAD bei primären Lymphozyten der Maus

Wenn ADP-Ribosylierung tatsächlich dazu dient, die Zellfunktion zu regulieren, sollte sie auch reversibel sein und somit einem Kreislauf unterliegen. Bei Skelettmuskelzellen konnte eine Reversibilität der ADP-Ribosylierung des Integrin alpha 7 mit Hilfe von  $^{32}\text{P}$ -NAD nachgewiesen werden (Zolkiewska and Moss 1995; Zolkiewska and Moss 1997). In dieser Arbeit sollte der 1G4 Assay genutzt werden, um in „pulse-chase“ Analysen die mögliche Reversibilität der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf Lymphozyten im FACS zu untersuchen.

Für diese Experimente wurden zunächst Milzzellen von NZW Mäusen verwendet. Neben gesamt Milzzellen wurde in einem Parallelansatz auch eine Zellpopulation untersucht, aus der CD38 (Ekto-NADase) exprimierende Zellen wurden, da bei der CD38-depletierten Population die ADP-Ribosylierung stärker ist (Kapitel 3.3). Nach einer 20-minütigen Inkubation dieser Lymphozyten mit 2  $\mu\text{M}$  etheno-NAD (pulse) wurden die Zellen gewaschen. Darauf folgte eine weitere Inkubationsphase in Abwesenheit von etheno-NAD (chase). Vergleichend dazu wurden andere Zellen mit etheno-NAD weiterinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1G4 und CD3 markiert. Die 1G4 Markierung wurde in diesem Versuch mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (anti-Maus Ig) im FACS nachgewiesen (**Abbildung 56A**). Vitale Lymphozyten lassen sich in FACS-Analysen mit Hilfe des forward scatters (FSC) gut anhand ihrer Größe und durch die fehlende Aufnahme von Propidiumiodid (PI) erkennen. Bei der CD3 positiven Population dieser Lymphozyten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung ermittelt (**Abbildung 56B**). Die Diagramme geben den zeitlichen Verlauf der 1G4 Anfärbung von gesamt Milzzellen und CD38 depletierten Zellen wieder. Die Anfärbung von gesamt Milzzellen ist schwach und es wird kein Unterschied in der 1G4 Anfärbung zwischen gewaschenen und ungewaschenen Zellen deutlich. Diese Beobachtung lässt sich durch die Hydrolyse von NAD durch CD38 auf der Zelloberfläche der CD38 positiven B Zellen erklären (Kapitel 3.3). Anders verhält es sich bei CD38 depletierten Milzzellen. Nach 60 Minuten erreicht die 1G4 Anfärbung von ungewaschenen Zellen ein Maximum und fällt danach wieder leicht ab (geschlossene Rauten). Die MFI der nach 20 Minuten etheno-NAD Inkubation gewaschenen Zellen (offene Quadrate) fällt mit einer Halbwertszeit von ca. 40 Minuten wieder ab (beachte die logarithmische Skalierung der Y-Achse).



**Abbildung 56: Pulse-chase Analyse der ADP-Ribosylierung bei einer NZW Maus im 1G4 FACS Assay.** Bei Milzzellen einer NZW-Maus wurden die CD38 positiven Zellen mit anti-CD38 FITC und MACS anti-FITC MicroBeads in einer MACS AS Säule depletiert. Danach wurden je  $10^6$  gesamt Milzzellen und CD38 depletierte Zellen für die angegebene Zeit mit  $2 \mu\text{M}$  etheno-NAD in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$  DTT inkubiert (geschlossene Rauten). Parallel wurden Zellen für 20 Minuten mit  $2 \mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert und nach 2-maligem Waschen mit RPMI ohne etheno-NAD weiterinkubiert (offene Quadrate). Der Versuch wurde so aufgebaut, dass alle Proben gleichzeitig fertig waren. Die Zellen wurden zuerst mit 1G4 und dann mit  $\text{CD3}^{\text{FITC}}$  und anti-Maus  $\text{Ig}^{\text{PE}}$  angefärbt. **(A)** Dot Plot Darstellung von FSC/SSC und FSC/PI (1) und der 1G4 Anfärbung (2). **(B)** Zeitlicher Verlauf der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung von CD3 positiven Zellen von gesamt Milzzellen und CD38 depletierten Milzzellen (Gate R3 (rot) aus (A)).

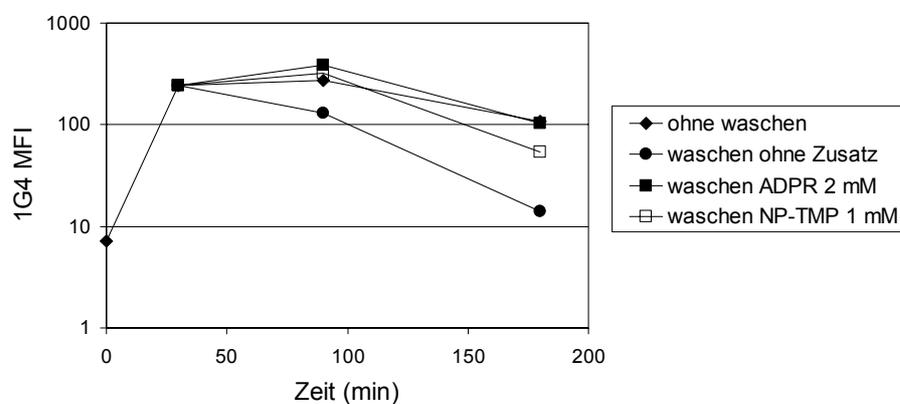
### 3.5.2 Hemmung der Reversibilität durch Inhibitoren von ADP-Ribosylhydrolasen und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen

Wenn die ADP-Ribosylierung reversibel ist, stellt sich automatisch die Frage, wie die ADP-Ribose-Gruppe von der Zelloberfläche entfernt wird. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar. Die Zellen könnten die ADP-ribosylierten Proteine von der Zelloberfläche abspalten oder die Zelloberflächenproteine in Form von kleinen Membranvesikeln internalisieren bzw. abstoßen. Eine andere Möglichkeit ist, dass ADP-Ribose-Gruppen durch bestimmten Enzymen abgespalten werden. Zu möglichen Kandidaten für die Abspaltung der ADP-Ribose gelten ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) und Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPP) (Zolkiewska and Moss 1995; Zolkiewska and Moss 1997). ARHs spalten die ganze ADP-Ribose-Gruppe vom Protein hydrolytisch ab, so dass ADP-Ribose in den Überstand abgegeben wird, der zuvor modifizierte Aminosäurerest wäre wieder frei für eine erneute ADP-Ribosylierung. NPP hingegen spalten die Phosphodiester-Bindung, dabei

wird AMP freigesetzt und es bleibt eine Ribose-Phosphat-Gruppe am Argininrest, die eine erneute ADP-Ribosylierung verhindert (**Abbildung 2B**). NP-TMP gilt als ein spezifischer Inhibitor für Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen. ADP-Ribose hingegen hemmt sowohl NPP als auch ARH (Zolkiewska and Moss 1993; Moss *et al.* 1997).

Um die Hemmbarkeit der De-ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribose und NP-TMP zu erforschen, wurden weitere „pulse-chase“ Analysen durchgeführt (**Abbildung 57**). Milzzellen einer NZW Maus wurden für 20 Minuten in Anwesenheit von etheno-NAD inkubiert, gewaschen und mit etheno-NAD-freiem Medium weiterinkubiert. Zum Vergleich wurde ein Teil der Zellen nicht gewaschen (geschlossene Rauten). Die gewaschenen Zellen wurden mit einfachem Medium (geschlossene Kreise), mit ADP-Ribose (geschlossene Quadrate) oder mit NP-TMP (offene Quadrate) weiterinkubiert. Die 1G4 Anfärbung der mit normalem Medium weiterinkubierten Zellen fällt im Verlauf von 160 Minuten praktisch wieder auf das Hintergrundniveau ab. ADP-Ribose und NP-TMP können jedoch diesen Effekt deutlich (NP-TMP) bzw. fast vollständig (ADP-Ribose) inhibieren.

In den hier gezeigten Versuchen fällt die 1G4 Anfärbung nach waschen der gesamt Milzzellen deutlich ab (10  $\mu\text{M}$  etheno-NAD, **Abbildung 57**) bzw. sie ist von vornherein kaum nachweisbar (2  $\mu\text{M}$  etheno-NAD, **Abbildung 56B**). Im Gegensatz dazu fällt die ADP-Ribosylierung der Zelloberflächenproteine bei CD38 depletierten Zellen nur nach Entfernung des etheno-NAD ab (**Abbildung 56B**). Die Ekto-NADase CD38 hydrolysiert NAD, so dass die gesamt Milzzellen weniger NAD als Substrat zur Verfügung steht (Kapitel 3.3).

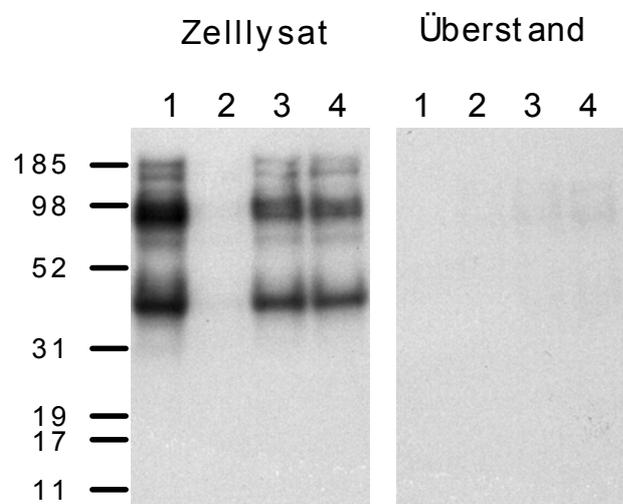


**Abbildung 57: Einfluss von ARH und NPP Inhibitoren auf die Reversibilität der ADP-Ribosylierung.** Je  $10^6$  Milzzellen einer NZW Maus wurden 30 Minuten bei 37 °C mit 10  $\mu\text{M}$  etheno-NAD inkubiert und ein Teil der Zellen gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden ohne Zusatz (geschlossener Kreis), mit 2 mM ADP-Ribose (geschlossene Kästchen) oder mit 1 mM NP-TMP (offene Kästchen) weiterinkubiert. Ein Teil der Zellen wurde ungewaschen weiterinkubiert (geschlossene Rauten). Die Zellen wurden dann mit CD38<sup>FITC</sup> sowie mit 1G4 und anti-Maus Ig<sup>PE</sup> angefärbt und im FACS gemessen. In der Auswertung wurde auf CD38 negative Zellen gegatet. Die MFI der 1G4 Anfärbung wurde bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

Der vorangegangene Versuch belegt die Inhibition der Reversibilität durch ADP-Ribose und NP-TMP, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine abgestoßen oder internalisiert werden. Um dies zu erforschen, wurde ein Versuch mit radioaktiv markiertem NAD ( $^{32}\text{P}$ -NAD) durchgeführt, der zeigen sollte, ob sich die ADP-ribosylierten Proteine im Überstand der Zellen oder

im Zelllysate nachweisen lassen. Gleichzeitig sollte bei diesem Versuch die Hemmung mit ADP-Ribose bzw. NP-TMP untersucht werden.

Lymphknoten- und Milzzellen einer NZW Maus wurden mit  $^{32}\text{P}$ -NAD inkubiert und dann in vier Ansätze aufgeteilt. Vom ersten Ansatz wurde direkt Überstand gewonnen und die Zellen lysiert. Die anderen Ansätze wurden mit Medium, ADP-Ribose bzw. NP-TMP weiterinkubiert und nach 150 Minuten wurden auch hier Überstand und Zelllysate gewonnen. **Abbildung 58** zeigt eine Autoradiographie von Zelllysaten und Überständen nach Größenfraktionierung der Proteine mittels SDS-PAGE und Übertragen auf eine PVDF Membran. Im Zelllysate von direkt lysierten Zellen erkennt man ca. fünf Banden von ADP-ribosylierten Proteinen, von denen bei 90 und bei 40 kDa zwei Banden besonders prominent sind (1). Bei den Lysaten von Zellen, die ohne Inhibitor inkubiert wurden, sind keine ADP-ribosylierten Proteine auszumachen (2). Sowohl in den Lysaten von Zellen, die mit ADP-Ribose (3) weiterinkubiert wurden, als auch in denen mit NP-TMP (4) sind noch Banden von ADP-ribosylierten Proteinen in der Autoradiographie zu erkennen. In den Überständen aller vier Ansätze sind praktisch keine ADP-ribosylierten Proteine zu detektieren. Dies zeigt, dass ADP-ribosylierte Proteine weder in den Überstand abgegeben noch von den Zellen internalisiert werden. Es ist also anzunehmen, dass ADP-Ribose-Gruppen ganz oder teilweise von den Zelloberflächenproteinen abgespalten werden.

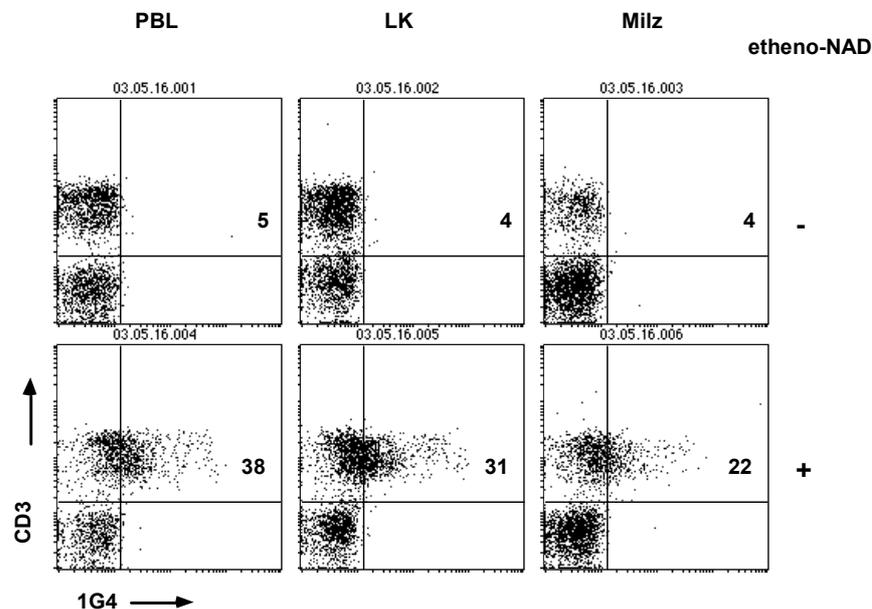


**Abbildung 58: Autoradiographie von Zelllysaten und Überständen von NZW T Zellen nach Inkubation mit  $^{32}\text{P}$ -NAD.** Lymphknoten- und Milzzellen einer NZW-Maus wurden präpariert. Dabei wurden Erythrozyten mit Gey's Puffer lysiert und B Zellen mit anti-Maus Ig DynaBeads entfernt.  $4 \cdot 10^7$  Zellen wurden dann mit  $1 \mu\text{M}$  NAD ( $40 \mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -NAD;  $1 \text{ mM}$  DTT) 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit RPMI mit ADP-Ribose ( $2 \text{ mM}$ ) und 2-mal mit RPMI gewaschen und auf 4 Ansätze verteilt. Zellen wurden in  $100 \mu\text{l}$  RPMI aufgenommen: (1) und (2) nur RPMI, (3) RPMI mit  $2 \text{ mM}$  ADP-Ribose und (4) RPMI mit  $2 \text{ mM}$  NP-TMP. Zellen wurden direkt (1), bzw. nach 150 Minuten (2 – 4), abzentrifugiert und der ÜS aufgehoben. Das Zellpellet wurde in  $200 \mu\text{l}$  PBS ( $1\%$  Igepal,  $1 \text{ mM}$  AEBSF) aufgenommen und die Zellen lysiert. Proteine der Zelllysate und aus dem Überstand wurden mit Aceton gefällt. Mit den Proteinen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblotet und eine Autoradiographie durchgeführt.

### 3.5.3 Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung *in vivo*

Nachdem sich der 1G4 Assay bei *in vitro* Experimenten gut bewährt hatte, stellten wir uns die Frage, ob es auch möglich sei, mit Hilfe dieses Systems ADP-Ribosylierung *in vivo* am Mausmodell zu untersuchen. Dazu sollte Mäusen etheno-NAD verabreicht werden und anschließend lymphatisches Gewebe *ex vivo* mit Hilfe des 1G4 Antikörpers in FACS-Analysen auf etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen untersucht werden.

C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen wurden jeweils PBS bzw. PBS mit 1,2 mg etheno-NAD in die Schwanzvene injiziert. Dieses entspricht einer sehr hohen Dosis von etheno-NAD, die bei einem Blutvolumen von ca. 2 ml zu einer etheno-NAD Konzentration von 850  $\mu\text{M}$  im Blut bzw. zu einer Konzentration von ungefähr 85  $\mu\text{M}$  bezogen auf das gesamte Flüssigkeitsvolumen der Maus von 20 ml führen sollte. Nach 60 Minuten wurden Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL), Lymphknoten und Milz präpariert. Anschließend wurden die Zellen mit CD3<sup>PE</sup> und 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt (**Abbildung 59**). Ein Teil der CD3 positiven T Zellen ließ sich nach intravenöser Applikation von mit dem 1G4 Antikörper anfärben. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung von T Zellen (CD3+) wurde quantifiziert. Demnach zeigen T Zellen aus peripherem Blut die stärkste etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mit einer MFI von 38. Bei T Zellen aus Lymphknoten und Milz ist die 1G4 Anfärbung mit einer MFI von 31 bzw. 22 etwas schwächer.

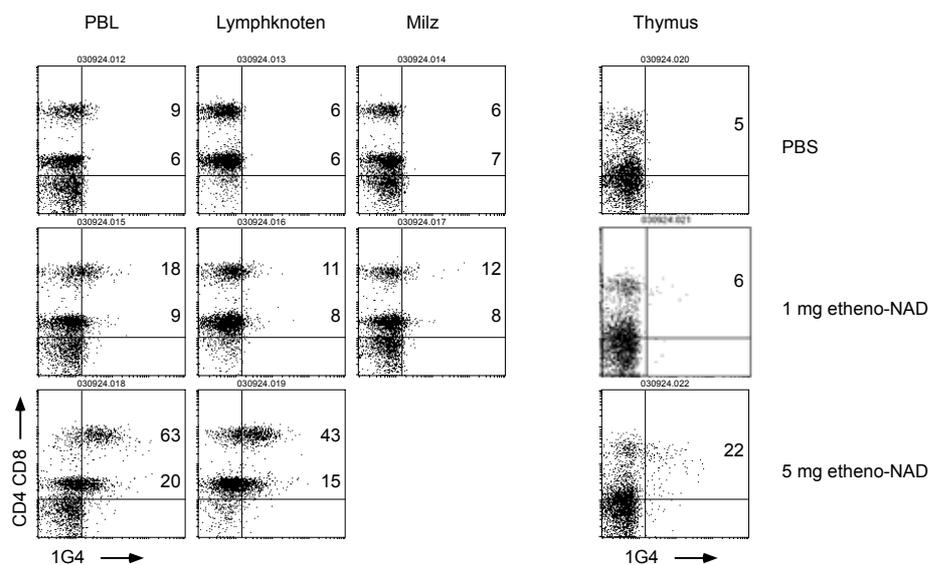


**Abbildung 59: 1G4-Anfärbung nach intravenöser Injektion von etheno-NAD.** C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen wurden 200  $\mu\text{l}$  PBS +/- 8,5 mM etheno-NAD (1,2 mg etheno-NAD) in die Schwanzvene appliziert. Nach 60 Minuten wurden PBL, Lymphknotenzellen und Milzzellen präpariert und mit 1G4<sup>Alexa</sup> und CD3<sup>PE</sup> angefärbt. Die Zellen wurden daraufhin im FACS gemessen. Angegeben ist die MFI der 1G4 Anfärbung von CD3 positiven Zellen.

Es wurden weitere Versuche zur etheno-ADP-Ribosylierung *in vivo* bei NOD Mäusen durchgeführt. Diese Tiere neigen zur Ausbildung von Typ 1 Diabetes mellitus, einer Autoimmunerkrankung, bei der Insulin produzierende Inselzellen im Pankreas angegriffen werden.

Von diesen Mäusen stand im Labor von Dr. Edward Leiter an den Lackson Labs eine CD38 Knock-out Variante zur Verfügung, die für *in vivo* Versuche eingesetzt wurde.

Bei dem in **Abbildung 60** demonstrierten Experiment wurden 40 Minuten nach intravenöser Injektion von etheno-NAD periphere Blutlymphozyten (PBL), Thymozyten, Lymphknotenzellen und Milzzellen gewonnen, die in FACS-Analysen mit 1G4 auf etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen untersucht wurden. Bei diesen Zellen von NOD Mäusen sieht man nach Injektion von 1 mg etheno-NAD eine schwache Anfärbung der CD4 und CD8 positiven Zellen mit 1G4. Auf den Thymozyten ist bei dieser etheno-NAD Menge keine etheno-ADP-Ribosylierung nachweisbar. Nach Applikation von 5 mg etheno-NAD zeigen die T Zellen von Blut, Lymphknoten und Milz eine stärkere 1G4 Anfärbung. Diese ist auf den CD8 positiven T Zellen höher als auf CD4 positiven. CD4 und CD8 negative Zellen zeigen keine etheno-ADP-Ribosylierung. Dies entspricht der hier nicht abgebildeten Expression von ART2 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten der NOD Maus. Im Thymus erkennt man auf einigen reifen T Zellen (CD3 hoch positiv) 1G4 Anfärbung nach Injektion von 5 mg etheno-NAD.



**Abbildung 60: 1G4 Anfärbung von Lymphozyten einer NOD Maus nach i.v. Applikation von etheno-NAD.** NOD CD38 Knock-out Mäusen wurden jeweils 200 µl PBS ohne etheno-NAD, PBS mit 1 mg etheno-NAD und PBS mit 5 mg etheno-NAD intravenös in die Schwanzvene appliziert. Nach 40 Minuten wurden Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL), Lymphknoten, Milz und Thymus präpariert. Die Zellen aus dem Thymus wurden mit CD3<sup>PE</sup> und 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt, die Zellen aus den übrigen Organen wurden mit CD4<sup>Cy3</sup>, CD8<sup>PE</sup> und 1G4<sup>Alexa</sup> angefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit dem FACS gemessen.

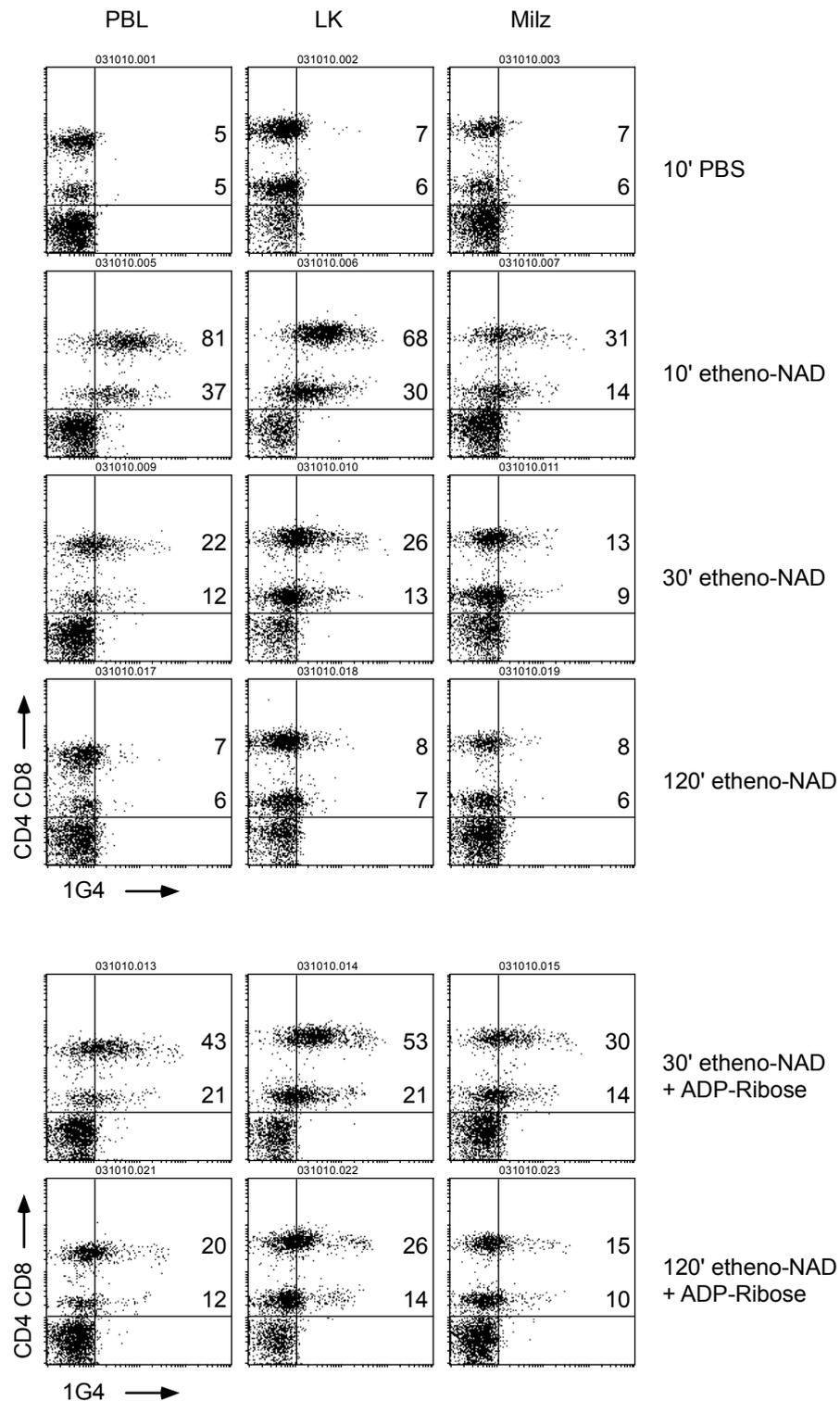
#### *Zeitlicher Verlauf der etheno-ADP-Ribosylierung und Reversibilität in vivo*

In den vorangehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch intravenöse Gabe von NAD *in vivo* ADP-Ribosylierung zu induzieren. Die dazu benötigten etheno-NAD Mengen sind jedoch recht hoch. So führt z.B. eine Injektion von 1,2 mg etheno-NAD zu einer Konzentration von etwa 850 mM bezogen auf 2 ml Blutvolumen. In einem hier nicht abgebildeten Versuch, bei dem parallel zur *in vivo* Applikation von etheno-NAD eine *in vitro* etheno-ADP-Ribosylierung von

Lymphozyten mit unterschiedlichen etheno-NAD Konzentrationen durchgeführt wurde, entsprach die 1G4 Anfärbung 60 Minuten nach i.v. Applikation von 1,2 mg etheno-NAD etwa der nach *in vitro* Inkubation mit 2  $\mu$ M etheno-NAD.

Hinweise für eine schnelle Reversion der etheno-ADP-Ribosylierung *in vivo* als auch für den Abbau von etheno-NAD wurden in einer *in vivo* Kinetik gewonnen. Dabei wurde C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen je 1 mg etheno-NAD i.v. injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach etheno-NAD Injektion (10, 30 und 120 Minuten) die Organe von individuellen C57BL/6 Mäusen präpariert. Zusätzlich wurde zwei Mäusen neben etheno-NAD (1 mg) auch 27 mg ADP-Ribose injiziert, um eventuell aktive ADP-Ribosylhydrolasen oder Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit 1G4 angefärbt und im FACS untersucht (**Abbildung 61**). Nach 10-minütiger *in vivo* Behandlung mit etheno-NAD zeigten CD8 sowie CD4 positive Zellen deutliche 1G4 Anfärbung im Vergleich zur Kontrolle, die nur PBS erhalten hatte. Der Grad der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen nahm mit der Zeit ab. 30 Minuten nach der Applikation von etheno-NAD war die 1G4 Anfärbung schon deutlich schwächer und hatte nach 120 Minuten fast das Ausgangsniveau erreicht. Bei Zellen von Mäusen, die neben etheno-NAD auch ADP-Ribose erhalten hatten, nahm die 1G4 Anfärbung relativ weniger ab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auch *in vivo* induziert werden kann und reversibel ist. Das im Vergleich zu *in vitro* Versuchen deutlich niedrigere Ausmaß der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung deutet auf eine rasche Metabolisierung oder Ausscheidung des extrazellulären NAD *in vivo* selbst bei CD38 Knock-out Mäusen hin, denen das wesentliche NAD verstoffwechselnde Ekto-Enzym fehlt. Bei Wildtyp Mäusen ist zu erwarten, dass extrazelluläre NAD Mengen noch schneller abgebaut werden. Hinzu kommt, dass im Körper wahrscheinlich physiologischerweise nur niedrigere NAD Konzentrationen lokal für kurze Zeit erreicht werden.



**Abbildung 61: Zeitlicher Verlauf der 1G4 Anfangung nach intravenöser Applikation von etheno-NAD bei C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen.** C57BL/6 CD38 Knock-out Mäusen wurde 200  $\mu$ l PBS mit und ohne 1 mg etheno-NAD sowie mit und ohne 2,24 mg ADP-Ribose (20 mM in 200  $\mu$ l; MG: 559,32) i.v. in die Schwanzvene verabreicht. Nach der angegebenen Zeit wurden periphere Blutlymphozyten (PBL), Lymphknotenzellen und Milzzellen gewonnen. Der Versuch war so aufgebaut, dass alle Zellen zur gleichen Zeit fertig waren. Die Zellen wurden dann mit 1G4<sup>Alexa</sup>, CD4<sup>Cy3</sup> und CD8<sup>PE</sup> markiert und im FACS untersucht. Bei der Auswertung wurde auf vitale Lymphozyten gegatet. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfangung von CD4<sup>+</sup> Zellen (unten) und CD8<sup>+</sup> Zellen (oben) wurde bestimmt und in der Abbildung angegeben.

## 4 Diskussion

Der im Rahmen dieser Dissertation etablierte Antikörper-basierte Assay zur Detektion der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen erwies sich als ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung der eukaryonten ADP-Ribosyltransferasen (ARTs).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass ARTs an der Feinsteuerung des Immunsystems beteiligt sind. So kann NAD durch lytische und nicht-lytische Prozesse in den Extrazellulärraum gelangen und dort durch ART-katalysierte ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen naive „bystander“ T Zellen inaktivieren oder über den Purinozeptor P2X7 vermittelt zur Induktion des Zelltods bei diesen Zellen führen (Scheuplein *et al.* 2003; Seman *et al.* 2003). Die Aktivität der ARTs wird durch verschiedene Mechanismen beeinflusst. GPI-verankerte ARTs werden bei der T Zell-Aktivierung von der Zellmembran abgespalten (Kahl *et al.* 2000). Reduzierende Agenzien verstärken die Aktivität der murinen ART2.1 (Kapitel 3.1.5), wie sie z.B. von APC freigesetzt werden (Rubartelli *et al.* 1992; Angelini *et al.* 2002). Durch Abbau des freigesetzten NAD kann die NADase CD38 die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen vermindern (Kapitel 3.3) (Krebs *et al.* 2005). Diese Vorgänge könnten durch spezifische Inhibitoren der ARTs oder des P2X7 Rezeptors modifiziert werden (Kapitel 3.1.7). Die folgende Diskussion hält sich grob an die Gliederung des Ergebnisteils.

### 4.1 Der 1G4 Assay ist ein nützliches und vielseitiges neues Werkzeug zur Untersuchung der ART-Aktivität

Die Untersuchung der ADP-Ribosylierung als posttranslationale Proteinmodifikation wurde lange durch das Fehlen von Antikörpern gegen ADP-ribosylierte Aminosäuren erschwert. Bisher war es nur möglich ADP-Ribosylierung mit radioaktivmarkiertem NAD ( $^{32}\text{P}$ -NAD oder  $^{14}\text{C}$ -NAD) nachzuweisen (Zolkiewska and Moss 1995). Der in dieser Arbeit etablierte Assay ermöglicht es erstmals, (etheno)-ADP-Ribosylierung mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers zu untersuchen. Dazu wird an Stelle von NAD das Analogon etheno-NAD verwendet. Der 1G4 Antikörper eignet sich zur Detektion der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen in FACS-Analysen (**Abbildung 12** und **Abbildung 13**), im Western Blot Verfahren (**Abbildung 14**) und in der Immunfluoreszenz (**Abbildung 15**).

#### *Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Antikörper bei Lymphomzellen*

Das Vorhandensein von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an bestimmte phosphorylierte Aminosäuren binden, eröffnete neue Wege für die Untersuchung der Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen (Glenney *et al.* 1988). Eine plausible Erklärung für das Fehlen entsprechender Antikörper gegen ADP-ribosylierte Aminosäuren ist, dass ADP-Ribosylierung im extrazellulären Milieu vielfach vorkommt, und deshalb eine immunologische Toleranz gegenüber dieser Proteinmodifikation besteht. Im Gegensatz dazu macht das ausschließlich intrazelluläre Vorkommen von phosphorylierten Proteinen eine Toleranzbildung nicht notwendig.

Der monoklonale Antikörper 1G4 bindet an etheno-Adenosin und wurde ursprünglich zur Detektion von DNA-Mutationen hergestellt (Young and Santella 1988). Dieser Antikörper bewährte sich schon zur Untersuchung der im Zellkern lokalisierten Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARP) (Davis *et al.* 1998). In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass bakterielle mono-ADP-Ribosyltransferasen etheno-NAD verstoffwechseln können (Giovane *et al.* 1985; Hingorani and Ho 1988). Wir wollten den 1G4 Antikörper nutzen, um mono-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen von Eukaryonten zu untersuchen. In der Immunfluoreszenzmikroskopie (**Abbildung 14**) und in FACS Analysen (**Abbildung 12**) mit Lymphomzellen konnte die Annahme bestätigt werden, dass ARTs auch das an der Adenin-Gruppe modifizierte etheno-NAD verstoffwechseln können und Zellmembranproteine etheno-ADP-ribosyliert werden.

ART-transfizierte Lymphomzellen wurden nur nach Behandlung mit etheno-NAD markiert. Die Inkubation der Zellen mit etheno-ADP-Ribose an Stelle von etheno-NAD führte nicht zur Modifikation der Membranproteine (**Abbildung 13**). Etheno-ADP-Ribose ist also weder Substrat für die ARTs noch bindet es in messbarem Ausmaß nicht-enzymatisch an Zelloberflächenproteine. Bei der Markierung von Zellen nach etheno-NAD Behandlung handelt es sich also offensichtlich um eine enzymatisch katalysierte Proteinmodifikation (etheno-ADP-Ribosylierung).

Zur näheren Charakterisierung der Zielproteine von ARTs wurde der 1G4 Antikörper auch im Western Blot eingesetzt. Durch parallel durchgeführte Versuche mit  $^{32}\text{P}$ -NAD und Detektion von modifizierten Proteinen in der Autoradiographie konnte nachgewiesen werden, dass sich die Muster der modifizierten Proteine durch ART-katalysierte ADP-Ribosylierung (Autoradiographie) und etheno-ADP-Ribosylierung (Western Blot) ähnelt (**Abbildung 15A** und **B**). Ein deutlicher Unterschied zwischen muriner und humaner ART1 ist, dass bei Lysaten von mit muriner ART1 transfizierten Zellen eine Bande bei ca. 35 kDa erkennbar ist, bei Lysaten von mit humaner ART1 transfizierten Zellen sind es hingegen zwei Banden (ca. 32 und 40 kDa) (**Abbildung 15**). Diese Banden stellen wahrscheinlich automodifizierte ARTs dar. Im Fall von humaner ART1 spiegeln die zwei Banden wahrscheinlich unterschiedliche Glykolysierungsmuster wider (Krebs *et al.* 2003). Die Frage, ob es sich bei der Auto-ADP-ribosylierung um ein physiologisches Phänomen handelt, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Es könnte sich auch um die ADP-Ribosylierung eines Arginin-Restes am Übergang zum Flag-tag der rekombinanten ART handeln (Koch-Nolte *et al.* 1999).

Die Ergebnisse der Western Blot Analysen belegen, dass es sich bei der etheno-ADP-Ribosylierung um eine SDS-resistente, d.h. kovalente, Proteinmodifikation handelt, die mit dem 1G4 Antikörper detektiert werden kann. Ferner unterstützen sie die Annahme, dass durch Behandlung von ART-transfizierten Zellen mit etheno-NAD die gleichen Proteine modifiziert werden, wie bei durch Behandlung mit NAD (**Abbildung 15A** und **B**).

Ein bekanntes Zielprotein der ARTs ist LFA-1 (Zolkiewska and Moss 1993; Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998). Durch Immunpräzipitation von LFA-1 konnte gezeigt werden, dass LFA-1 durch Inkubation von ART-transfizierten Zellen mit etheno-NAD in gleicher Weise modifiziert wird,

wie durch Inkubation mit  $^{32}\text{P}$ -NAD (**Abbildung 15C und D**). LFA-1 scheint durch murine ART1 etwas stärker modifiziert zu werden als durch humane ART1. Murine ART1 modifiziert die  $\beta$ -Kette stärker als die  $\alpha$ -Kette, wohingegen humane ART1 die  $\alpha$ -Kette stärker modifiziert.

LFA-1 ist ein wichtiges Lymphozytenantigen, das in hohem Maße am Trafficking der Zellen beteiligt ist. Durch die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 kann die Zelle fest an den Endothelzellen in Blutgefäßen binden und anschließend ins Interstitium wandern (Zen and Parkos 2003). Ein Versuch zur Therapie der Psoriasis, der gegenwärtig Erfolg versprechend in klinischen Studien erprobt wird, bedient sich eines Antikörpers gegen LFA-1 (Efaluzimab). Dabei sollen letztlich die Lymphozyten daran gehindert werden, in die Epidermis zu wandern (Pietrzak *et al.* 2003). ADP-Ribosylierung von LFA-1 inhibiert die Bindung von Antikörpern an LFA-1 und unterdrückt so die Antikörper-induzierte Inositol-Phosphat-Bildung und die anti-LFA-1-induzierte homotypische Zelladhäsion (Nemoto *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998). Die Bindung eines anderen Integrins ( $\alpha 7/\beta 1$ ) an Laminin-1 wird durch ADP-Ribosylierung stark beeinträchtigt (Zolkiewska *et al.* 1998; Zhao *et al.* 2004). Diese Studien lassen vermuten, dass durch ADP-Ribosylierung von LFA-1 und anderen Integrinen das Homing und Trafficking von Lymphozyten beeinflusst werden kann.

Durch ART-katalysierte ADP-Ribosylierung wird eine Vielzahl von weiteren Membranproteinen modifiziert (**Abbildung 16**). Hierbei unterscheiden sich die eukaryonten Zelloberflächen ARTs von den meisten sezernierten bakteriellen Toxinen, die mit wenigen Ausnahmen (ExoS, MTX) (Barbieri 2000; Schirmer *et al.* 2002) spezifisch für ein Zielprotein sind (Honjo *et al.* 1968; Aktories *et al.* 1986; Gierschik 1992; Tezcan-Merdol *et al.* 2001). Die eukaryonten ARTs verhalten sich auf der Zelloberfläche eher wie promiskuitive intrazelluläre Phosphotyrosinkinasen ( $\text{p}56^{\text{lck}}$  oder ZAP-70), die verschiedene Zielproteine modifizieren können (Veillette *et al.* 1988; Montixi *et al.* 1998). Davon ist die ART2b der Ratte abzugrenzen, die außer sich selbst, im Sinne einer Automodifikation, keine anderen bekannten Zielproteine hat (Haag *et al.* 1995).

#### *Kinetik und Dosiswirkungsbeziehung der (etheno)-NAD abhängigen ADP-Ribosylierung*

In FACS Analysen kann die genaue Intensität der Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle bzw. die mittlere Intensität einer Zellpopulation bestimmt werden. Durch die Quantifizierung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung von ART-transfizierten Lymphomzellen nach Inkubation mit etheno-NAD konnten der zeitliche Verlauf und die Konzentrationsabhängigkeit der ADP-Ribosylierung dargestellt werden. Die halbmaximale 1G4 Anfärbung wurde schon nach zwei- bis dreiminütiger etheno-NAD Inkubation erreicht, wobei schon innerhalb der ersten Sekunden eine große Zahl von Zielproteinen modifiziert wurde. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 1G4 Anfärbung hatte nach 10-20 Minuten ihr Maximum (**Abbildung 17**).

Das Maximum der 1G4 Anfärbung wurde bei ART2.2-transfizierten DC27.10 Zellen nach Inkubation mit 20-40  $\mu\text{M}$  etheno-NAD erreicht. Die MFI der 1G4 Anfärbung nahm im Bereich von 0,1 – 3  $\mu\text{M}$  etheno-NAD rasch zu. Bei höheren etheno-NAD Konzentrationen (50-200  $\mu\text{M}$ ) fiel die Anfärbung allmählich wieder ab (**Abbildung 18**). Gründe dafür könnten sein, dass durch

Automodifikation der ARTs die Aktivität gehemmt wird, oder dass ein Überschuss an Substrat die Reaktion bremste. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die hohen etheno-NAD Mengen durch die Waschprozedur nicht ausreichend entfernt wurden, und freie etheno-Adenosin-Gruppen den 1G4 Antikörper abfangen haben könnten.

Anhand der Werte für die MFI bei bestimmten etheno-NAD Konzentrationen wurden Lineweaver-Burk Diagramme angefertigt. In dieser für die Enzymkinetik wichtigen Darstellungsform liegen alle Punkte auf einer Linie, durch die eine Ausgleichsgerade gelegt werden kann (**Abbildung 19**). Bei den Untersuchungen mit ART2.2-transfizierten Zellen wurde die Y-Achse bei  $0,76/\mu\text{M}$  geschnitten. Der Kehrwert ( $1/0,76/\mu\text{M}$ ) ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $1,3 \mu\text{M}$ , d.h. bei dieser Konzentration von extrazellulärem etheno-NAD wird die halbmaximale Geschwindigkeit der ART-abhängigen etheno-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf lebenden Zellen erreicht.

Vorausgegangene Studien mit aufgereinigter, löslicher ART aus Muskelzellen des Kaninchens und etheno-NAD haben einen  $K_M$ -Wert von  $287 \mu\text{M}$  ergeben (Klebl and Pette 1996). Ein ähnlich hoher  $K_M$ -Wert wurde bei Untersuchungen von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A gefunden; auch hier wurde etheno-NAD verwendet (Armstrong and Merrill 2001). Wir schließen aus unseren Daten, dass die nötige etheno-NAD Konzentration für suffiziente ADP-Ribosylierung von Zellmembranproteinen bedingt durch die räumliche Nähe von Enzym und Zielprotein (Substrat) an der Zelloberfläche deutlich niedriger liegt als die Konzentration, die für in Lösung befindliche Proteine nötig ist. Dies könnte in sofern wichtig sein, als dass die Konzentration von NAD im extrazellulären Milieu (z.B. im Serum) im submikromolaren Bereich liegt, während intrazelluläre NAD-Konzentrationen Werte zwischen  $200$  und  $500 \mu\text{M}$  erreichen (Jacobson and Jacobson 1997; Ziegler 2000; O'Reilly and Niven 2003).

#### *Einfluss von DTT auf die ART2.1*

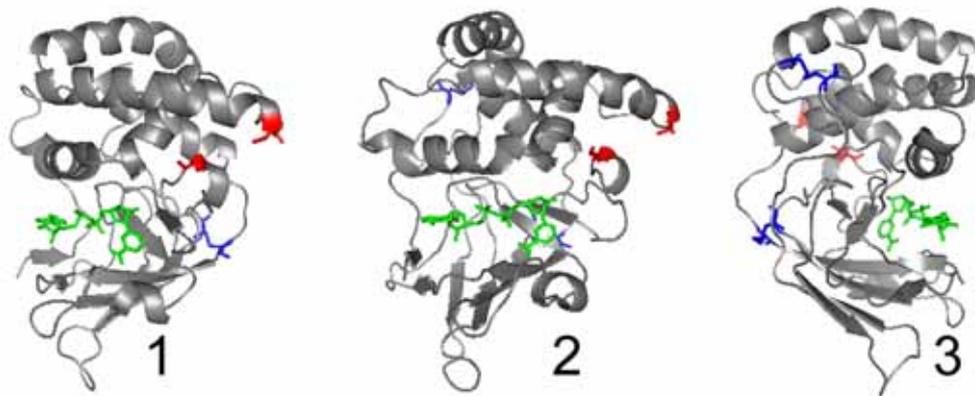
Aus Studien anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass die murine ART2.1 DTT-abhängig ist, d.h. durch Zugabe von reduzierenden Agenzien wie DTT wird die Aktivität des Enzyms verstärkt (Takada *et al.* 1993; Hara *et al.* 1999; Hara *et al.* 2000). Auch bei Untersuchungen mit dem 1G4 Assay konnte die Aktivität der murinen ART2.1 durch Zugabe von DTT zu vitalen Zellen deutlich gesteigert werden, während die Aktivität der ART2.2 nicht beeinflusst wurde (**Abbildung 20**).

Um die enzymkinetischen Daten der murinen ART2.1 in An- und Abwesenheit von DTT zu ermitteln, wurden ART2.1-transfizierte DC27.10 Zellen mit verschiedenen etheno-NAD Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass sich der  $K_M$ -Wert durch Zugabe von DTT von  $11,0 \mu\text{M}$  auf  $1,0 \mu\text{M}$  verringert (**Abbildung 21**), in Anwesenheit von DTT ist also nur ungefähr ein Zehntel des etheno-NAD nötig, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bleibt durch Zugabe von DTT hingegen weitgehend unverändert. Dies ist am Schnittpunkt der beiden Geraden in **Abbildung 21** mit der Y-Achse ersichtlich ( $0,0229/(\text{MFI}/\text{sec})$  ohne DTT und  $0,0182/(\text{MFI}/\text{sec})$  mit DTT).

Die murine ART2.1 hat im Gegensatz zu den bisher bekannten anderen ARTs der Säugetiere ein

zusätzliches Zysteinpaar, das unter Umständen eine Disulfidbrücke bilden kann (Glowacki *et al.* 2002). Die Kenntnis dieser möglichen zusätzlichen Disulfidbrücke legt die Überlegung nahe, dass diese Brücke nach Zugabe von reduzierenden Agenzien gespalten wird, und so das enzymatische Zentrum der ART2.1 für NAD zugänglich wird, oder die ART2.1 besser an Zielproteine binden kann (Hara *et al.* 1999; Hara *et al.* 2000).

Um die Lage der Zysteine im gefalteten Protein zu lokalisieren, wurde die 3D-Struktur der ART2.1 anhand der bekannten Kristallstruktur von der ART2b der Ratte mit SWISS-MODEL berechnet (Guex and Peitsch 1997; Schwede *et al.* 2003). Die 3D-Struktur der ART2.1 zeigt, dass die beiden zusätzlichen Zysteine tatsächlich in räumlicher Nähe zueinander vorhergesagt werden (**Abbildung 62**, rot). Man kann sich vorstellen, dass durch die mögliche kovalente Verbindung dieser Aminosäuren das Protein seine Struktur verändert, was eine Veränderung der enzymatischen Eigenschaften erklären würde.



**Abbildung 62: Errechnete 3D-Darstellung der murinen ART2.1.** Anhand der bekannten Kristallstruktur der ART2b aus der Ratte wurde mit SWISS-MODEL die wahrscheinliche 3D-Struktur der murinen ART2.1 (NZW-Maus) errechnet. Die Abbildung zeigt die murine ART2.1 mit ihren sekundär Strukturen (grau) und dem Substrat NAD (grün) aus drei verschiedenen Blickwinkeln. Die beiden konservierten Disulfidbrücken sind blau eingefärbt, und das bei der murinen ART2.1 vorkommende zusätzliche Zysteinpaar ist in rot dargestellt.

Auch die Funktion anderer Membranproteine wird durch Reduktion und Oxidation reguliert. So ist z.B. eine nicht-kanonische Disulfidbrücke in der zweiten Immunglobulin-domäne des CD4 Moleküls redox-aktiv. Diese Disulfidbrücke liegt an einer für Immunglobulin-domänen ungewöhnlichen Position. Die Reduktion und Oxidation dieser Disulfidbrücke spielt möglicherweise für die Bindung an und den Eintritt des HIV Virus in die Wirtszelle ein Rolle (Matthias *et al.* 2002). Diese Disulfidbrücke in CD4 kann, ähnlich wie redox-aktive Brücken in anderen Zelloberflächenproteinen, durch das 12 kDa kleine Protein Thioredoxin reduziert werden. Thioredoxin kann von aktivierten CD4+ Zellen selbst sowie von anderen Zellen sezerniert werden. Auch Antigen-präsentierende Zellen (APC) sezernieren Thioredoxin, das benötigt wird, um T Zellen zu aktivieren (Angelini *et al.* 2002). Die Bedeutung der Abhängigkeit der ART2.1 von reduzierenden Stoffen bleibt weiterhin unklar, doch die wichtige Rolle von Thioredoxin und andern Thiolen lässt einen Einfluss dieser Stoffe auf die ADP-Ribosylierung von

Zelloberflächenproteinen erahnen. So könnten von APC freigesetzte Thiole durch Erhöhung der Aktivität der ART2.1 zur Feinsteuerung der Lymphozytenfunktionen *in trans* beitragen. Ebenso ist denkbar, dass von T Zellen selbst sezernierte Thiole die ADP-Ribosylierung *in cis* steuern.

#### *Sortierung von Zellen mit endogener ART-Aktivität*

Der 1G4 Antikörper erwies sich ferner als nützliches Werkzeug für die Sortierung von Zellen nach ART-Aktivität. Bei der Untersuchung von etablierten Zellkulturlinien auf endogene ART-Aktivität zeigten nur wenige Zelllinien eine detektierbare, wenngleich auch schwache ART-Aktivität (Krebs *et al.* 2003). Es ist denkbar, dass die inhibitorischen Effekte von ARTs auf Zellfunktionen auch einen selektionierenden Einfluss auf kultivierte Zellen ausüben (Jacobson and Jacobson 1997; Okamoto *et al.* 1998; Adriouch *et al.* 2001; Liu *et al.* 2001). Bei MD27 Hybridomzellen konnten wir bei einem Teil der Klone DTT-abhängige ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Assay im FACS nachweisen (**Abbildung 22**, unsortiert). Durch Selektion von 1G4 positiven Zellen nach etheno-NAD Behandlung konnten mit Panning-Verfahren oder mit FACS Sortierungen Zellen mit höherer ART-Aktivität angereichert werden (**Abbildung 22**). Beide Sortierungsverfahren haben sich in ihrer Effektivität als vergleichbar erwiesen. Bemerkenswert ist neben der Anreicherung von Zellen mit verstärkter ART-Aktivität in Gegenwart von DTT die Selektion von Zellen, die auch ohne DTT-Behandlung ART-Aktivität besitzen. Die DTT-Abhängigkeit war ein Indiz dafür, dass zumindest ein Teil der ART-Aktivität der murinen ART2.1 zuzuschreiben war. Durch Behandlung der Zellen mit einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) konnte die Aktivität der ART von den MD27 Zellen größtenteils entfernt werden (**Abbildung 23**) (Stiernberg *et al.* 1987; Okazaki *et al.* 1996). Das deutete darauf hin, dass die ART-Aktivität der MD27 wie alle bekannten Zelloberflächen ARTs (Glowacki *et al.* 2002) über einen GPI-Anker in der Zellmembran befestigt ist. Die Restaktivität kann entweder durch neu gebildete ARTs oder durch nicht vollständiges Entfernen aller ARTs durch PI-PLC erklärt werden. In Folgeversuchen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den selektionierten ARTs auf MD27 Zellen in der Tat um ART2.1 und ART2.2 handelt.

Die Hybridomzelllinie MD27 stammt aus der Fusion einer Lymphomlinie aus der AKR Maus (BW5147 Lymphomzellen) mit cytotoxischen T Zellen aus der Milz einer BALB/c Maus, die mit EL4 Lymphomzellen immunisiert wurden (Kaufmann *et al.* 1981; Eshhar *et al.* 1993). Die Herkunft aus der BALB/c Maus kann erklären, dass die daraus abstammende Zelllinie sowohl ART2.1 als auch ART2.2 exprimiert (Koch-Nolte *et al.* 1996; Kanaitsuka *et al.* 1997).

#### *Inhibition der ADP-Ribosylierung*

Enzyminhibitoren können nützliche Werkzeuge zur Untersuchung von Zell- und Enzymfunktionen *in vitro* und *in vivo* sein. So kann in einem bestimmten Setting die Funktion eines bestimmten Enzyms direkt inhibiert werden, während andere Enzyme weitgehend unbeeinflusst bleiben. Für diese Aufgaben können niedermolekulare Substanzen und monoklonale wie polyklonale Antikörper

eingesetzt werden. Zu den Anwendungsgebieten von Inhibitoren gehört auch der therapeutische Ansatz, wie zum Beispiel der Einsatz des kleinmolekularen Thyrosinkinasehemmers Imatinib bei bestimmten Leukämieformen (Pindolia and Zarowitz 2002; Mohindru and Verma 2004), oder die Verwendung eines Antikörpers gegen LFA-1 (Efaluzimab) bei der Behandlung der Psoriasis (Pietrzak *et al.* 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige „proof of principle“ Versuche zur Inhibition der ADP-Ribosylierung durch ART-spezifische Antikörper durchgeführt.

Die Hemmung der ARTs durch spezifische Antikörper wurde durch Dünnschichtchromatographie (DC) und FACS-Analysen untersucht. **Abbildung 25** zeigt die Autoradiographie einer DC, bei der die ADP-Ribosylierung der löslichen Aminosäure Agmatin durch die murine ART2.2 durch polyklonales ART2-Immunsereum (K12760) inhibiert wurde. Präimmunsereum (PIS) und ein monoklonaler Antikörper gegen humanes ART4 inhibieren die Agmatin-ADP-Ribosylierung nicht. Auch der monoklonale ART2-Antikörper (Ali) hemmte die ADP-Ribosylierung von Agmatin nicht (**Abbildung 30**). In **Abbildung 26** sind FACS-Analysen dargestellt, die belegen, dass sich auch die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen durch das ART2-spezifische Immunsereum (K12760) inhibieren lässt (**Abbildung 28** und **Abbildung 29**).

Antikörper sind gute Werkzeuge, um bei *in vitro* Versuchen Enzyme wie die ARTs spezifisch zu inhibieren. Sie könnten auch bei *in vivo* Versuchen die Aktivität der ARTs kurzfristig blockieren. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Verwendung von Antikörpern gegen Zelloberflächenproteine verschiedene Auswirkungen auf die Zielzelle haben kann. Zum Beispiel wird nach Bindung von anti-CD38 Antikörpern an die Zelle das Membranprotein CD38 internalisiert (Funaro *et al.* 1998). Die Bindung von Antikörpern kann aber auch zur Zerstörung der Zielzellen durch Komplement oder zur Phagozytose durch Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES) führen. Ein Antikörper gegen TNF- $\alpha$  (Infliximab) führt bei Monozyten und T Zellen Komplement-unabhängig zur Apoptose (Shen *et al.* 2005). Die in der Tumorthherapie eingesetzten Antikörper gegen das B Zell Antigen CD20 (Rituximab, 2F2 und 7D8) wirken über Aktivierung von Komplement zytotoxisch (Teeling *et al.* 2004; Maloney 2005). Bei der autoimmunen thrombozytopenischen Purpura werden Antikörper gegen Thrombozyten gebildet, wodurch letztlich die Antikörper-beladenen Thrombozyten Fc-Rezeptor-vermittelt von Zellen des RES phagozytiert werden (Coopamah *et al.* 2003). Diese Zusammenhänge müssen bedacht werden, wenn eine experimentelle oder therapeutische Anwendung von Antikörpern gegen ARTs erwogen wird.

#### 4.2 Der zytolytische P2X7 Purinozeptor wird durch ADP-Ribosylierung aktiviert

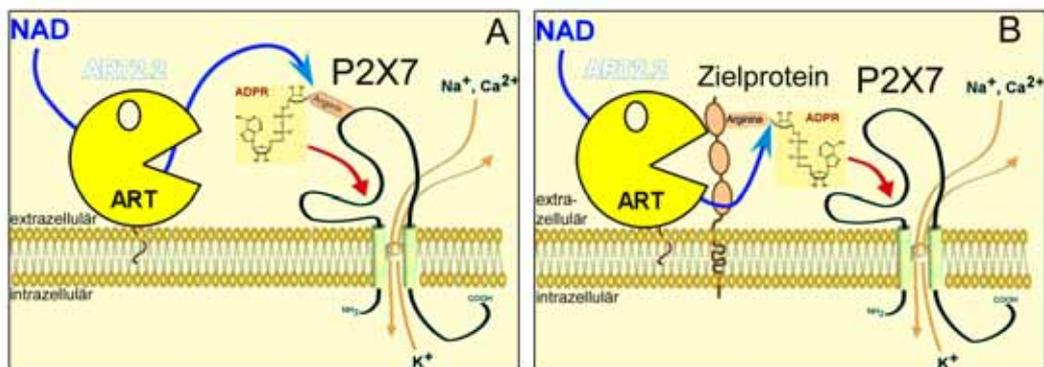
Der NAD induzierte Zelltod (NICD) wird durch NAD-abhängige ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen vermittelt (Adriouch *et al.* 2001; Liu *et al.* 2001). Sowohl Zellen aus ART2 Knock-out Mäusen auf dem BALB/c Hintergrund (**Abbildung 28**) als auch Wildtyp Zellen aus der C57BL/6 Maus, die eine Punktmutation im P2X7 Gen (P451L) haben, sind resistent gegenüber dem NAD-vermittelten Zelltod (Adriouch *et al.* 2002; Ohlrogge *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass der Purinozeptor P2X7 selbst ein Zielprotein der ART2 ist, und dass

die Aktivierung des P2X7 durch ADP-Ribosylierung sowohl mit exogenem NAD als auch mit aus Zellen freigesetztem endogenem NAD induziert werden kann.

*Der Purinozeptor P2X7 wird ADP-ribosyliert*

Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, wie die ART2 den Purinozeptor P2X7 auf Lymphozyten aktiviert. Es gibt im Prinzip mehrere plausible Erklärungen. P2X7 könnte selbst Ziel der ADP-Ribosylierung sein und durch diese Modifikation direkt aktiviert werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die ADP-Ribosylierung von anderen Zelloberflächenproteinen indirekt durch Bereitstellung eines Liganden zur Aktivierung von P2X7 führt (**Abbildung 63**).

Nach Inkubation von MD27 Kulturzellen und primären BALB/c Lymphozyten mit  $^{32}\text{P}$ -NAD konnte durch Immunpräzipitation mit P2X7-spezifischem Immunsereum (K1G) und anschließender Größenfraktionierung mittels SDS-PAGE ein ADP-ribosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa in der Autoradiographie nachgewiesen werden. Der Größenunterschied zum errechneten Molekulargewicht von P2X7 (68,4 kDa) kann durch Glykosylierungen erklärt werden (**Abbildung 27**). Da dieses Protein mit Präimmunsereum nicht präzipitiert werden konnte, und mit einer Immunodetektion ein Protein in der entsprechenden Größe nachgewiesen wurde, schließen wir aus diesen Ergebnissen, dass der P2X7 Purinozeptor Ziel der Proteinmodifikation durch ADP-Ribosyltransferasen ist.



**Abbildung 63: Schematische Darstellung der möglichen direkten und indirekten Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch ADP-Ribosylierung.** (A) Der Purinozeptor P2X7 wird ADP-ribosyliert und direkt aktiviert. (B) P2X7 wird indirekt durch die ADP-Ribose-Gruppe auf anderen Zelloberflächenproteinen aktiviert. Modifiziert nach (Adriouch 2003).

*P2X7 Aktivierung kann durch spezifische Inhibition von ART2 oder P2X7 gehemmt werden*

Um die Abhängigkeit des NAD induzierten Zelltods (NICD) von der ADP-Ribosyltransferase ART2 und vom Purinozeptor P2X7 weiter zu untermauern, haben wir untersucht, ob Antikörper gegen ART2 (**Abbildung 28**) oder gegen P2X7 (**Abbildung 29**) den NICD hemmen könnten. Tatsächlich gelang dies mit einem monoklonalen ART2-spezifischer Antikörper (Ali) (**Abbildung 28**), mit dem polyklonalen ART2-spezifischen Immunsereum K12760 (nicht gezeigt) und mit dem polyklonalen P2X7-spezifischen Immunsereum K1G (**Abbildung 29**). Interessanterweise blockiert der monoklonale anti-ART2 Antikörper aber nicht die Modifikation des löslichen ART-Substrats Agmatin (**Abbildung**

25). Möglicherweise verhindert dieser Antikörper sterisch die Interaktion zwischen ART2 und den Zielproteinen (siehe auch Kapitel 3.1.7). Das P2X7 Immuneserum kann entweder die Modifikation des Purinozeptors verhindern oder die durch ADP-Ribosylierung ausgelöste Aktivierung unterbinden.

Der P2X7 Antagonist KN62 (Chessell *et al.* 1998) konnte sowohl die ATP-induzierte als auch die durch ADP-Ribosylierung ausgelöste P2X7-Aktivierung blockieren (**Abbildung 28** bis **Abbildung 31**). Mit dem 1G4 Assay konnten wir ausschließen, dass KN62 die ADP-Ribosylierung von Proteinen hemmt (**Abbildung 26**). Bei genauer Betrachtung der AnnexinV/PI-Anfärbungen in **Abbildungen 29-31** fällt auf, dass ein gewisser Anteil (10-30%) von ART2-wildtype Zellen „spontan“, d.h. auch ohne Zugabe von exogenem NAD mit Annexin V und/oder PI angefärbt wird. Der Anteil von spontan apoptotischen Zellen ist bei ART2 Knock-out Zellen - sowie bei den mit KN62 behandelten ART2-wildtyp Zellen deutlich kleiner. Denkbar ist, dass bei der Präparation von Zellen endogenes NAD freigesetzt wird, das von Wildtyp Zellen zur ADP-Ribosylierung von Membranproteinen verwendet wird und P2X7 aktiviert. Möglicherweise kann KN62 den bereits ADP-ribosylierten P2X7 deaktivieren.

#### *Endogenes NAD kann den P2X7 Rezeptor aktivieren*

Im Kontext von Entzündungs-Reaktionen stellt von lysierten Zellen freigesetzte NAD eine mögliche Quelle des ART Substrates NAD im Extrazellulärraum dar. Um zu untersuchen ob aus zerstörten Zellen freigesetztes NAD und/oder ATP den P2X7 Rezeptor aktivieren kann, wurden Versuche mit durch Ultraschallbehandlung lysierten Erythrozyten und Lymphomzellen durchgeführt (Abb. 30-31). Die Ergebnisse zeigen, dass bei ART2-Wildtypzellen durch Inkubation mit diesen Lysaten konzentrationsabhängig der Zelltod ausgelöst wurde, was durch Vorinkubation der Zellen mit monoklonalem ART2-spezifischen Antikörper, etheno-NAD, NADase und KN62 verhindert werden konnte (**Abbildung 30A**). ATPase und monoklonaler Antikörper gegen humane ART4 hatten hingegen keinen Einfluss auf diesen Zelltod. In Versuchen mit ART2 Knock-out Mäusen konnte mit verdünnten Lysaten kein Zelltod ausgelöst werden (**Abbildung 30B**). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem den Zelltod auslösenden Stoff um NAD handelt.

Hohe Lysat-Konzentrationen konnten jedoch auch bei ART2 Knock-out Zellen den Zelltod induzieren. (Abb. 31). Unter der Annahme, dass in den Lysaten auch ATP vorhanden ist, stellten wir eine Mischung von NAD und ATP her (1 Teil NAD auf 10 Teile ATP), in etwa entsprechend dem physiologischerweise im intrazellulären Milieu gefundenen Verhältnis. Durch den Vergleich des Effekts dieser NAD/ATP-Mischung mit dem Effekt von Zelllysaten in verschiedenen Verdünnungen auf die Aktivierung des P2X7 Purinozeptors bei BALB/c T Zellen, konnten wir die Vermutung untermauern, dass in den Lysaten NAD und ATP den Zelltod induzieren (**Abbildung 31**). Bei verdünnten Lysaten scheint nur NAD den Zelltod ausgelöst zu haben, so dass anzunehmen ist, dass in der Umgebung von Gewebsdestruktionen eher Effekte durch NAD-abhängige ADP-Ribosylierung auf T Zellen vermittelt werden als durch ATP.

Diese Resultate zeigen, dass bei der Zellyse freigesetztes NAD in der Lage ist den NAD

abhängigen Zelltod vulnerabler Zellen auszulösen. Das NAD könnte *in vivo* durch verschiedene lytische und nicht-lytische Mechanismen in den Extrazellulärraum gelangen (**Abbildung 65**) (Bruzzone *et al.* 2001; Seman *et al.* 2003).

#### *ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinozeptors induziert L-Selectin Shedding*

Über L-Selectin (CD62L) können B Zellen und T Zellen an bestimmten Kohlehydratstrukturen auf Endothelzellen binden, was letztlich zum Wandern der Zellen ins Interstitium führen kann (Delves and Roitt 2000). L-Selectin wird von naiven T Zellen exprimiert und führt über Bindung an CD34 und GlyCAM-1 zur Extravasation durch „high endothelial venules“ (HEV) in den Lymphknoten oder über MAdCAM-1 zur Migration in das Mukosa-assoziierte Lymphatische Gewebe (MALT) (Girard and Amalric 1998; Hiraoka *et al.* 1999; Janeway *et al.* 2001). Bekannt war, dass die Aktivierung des Purinozeptors P2X7 durch ATP zur Abstoßung (Shedding) von L-Selectin führt und so das Wanderungsverhalten von Lymphozyten beeinflusst (Gu *et al.* 1998; Labasi *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von NAD auf das L-Selectin Shedding untersucht werden.

In den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch NAD über ART-vermittelte ADP-Ribosylierung und Aktivierung von P2X7 bei T Zellen aus Lymphknoten von BALB/c Wildtyp Mäusen zum Shedding von L-Selectin führt (**Abbildung 32**) (Seman *et al.* 2003). Durch Behandlung der Zellen mit etheno-NAD wurde das L-Selectin-Shedding nicht induziert, vielmehr konnte es durch Vorinkubation mit etheno-NAD sogar blockiert werden. Wie der Zelltod von T Zellen war das Shedding von L-Selectin abhängig von der Expression von ART2 und konnte bei ART2 Knock-out Mäusen nicht induziert werden. Auch C57BL/6 Zellen, die eine inaktivierende Punktmutation im P2X7 Gen tragen (Adriouch *et al.* 2002), waren resistent gegenüber dem NAD induzierten L-Selectin-Shedding.

Von dem NAD-induzierten L-Selectin-Shedding lässt sich auch ein therapeutischer Nutzen der Behandlung mit etheno-NAD ableiten. Wenn man systemisch das NAD und ATP vermittelte Shedding von CD62L verhindern wollte, um so Einfluss auf das „Trafficking“ und „Homing“ von Leukozyten zu nehmen, könnte man durch eine intravenöse Applikation von etheno-NAD die Bindungsstelle des Purinozeptors P2X7 für ATP bzw. die ADP-Ribose-Gruppe blockieren. Die Behandlung von Mäusen mit NAD könnte zur Verhinderung der Migration von T Zellen in den Lymphknoten oder das MALT führen (siehe oben), während die Behandlung der Mäuse mit den Inhibitoren der ART2 oder des P2X7 Rezeptors wiederum die Zellen vor diesem Effekt schützen könnte (Gu *et al.* 1998; Seman *et al.* 2004).

#### 4.3 CD38 beeinflusst durch Hydrolyse von NAD das Ausmaß der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen

Lymphozyten exprimieren eine Reihe von Ekto-Enzymen, die Nukleotide verstoffwechseln. Dazu gehören NTPasen (CD39), Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (CD203), 5'-Nucleotidase (CD73), NADasen (CD38, CD157) und ARTs (ART2, ART3, ART4) (Deterre *et al.* 1996; Goding

and Howard 1998). Eine Vermutung über die Rolle dieser Ekto-Enzyme ist, dass von ihnen ATP, NAD und andere Nukleotide, die in entzündetem Gewebe von sterbenden Zellen in die Umgebung abgegeben wurden, degradiert werden, um so Nukleotid-Vorläufer für Lymphozyten zur Verfügung zu stellen (Deterre *et al.* 1996). Für ATP deuten immer mehr Hinweise darauf hin, dass die genannten Enzyme die Verfügbarkeit von ATP und seinen Metaboliten ADP, AMP und Adenosin als Liganden für bestimmte Rezeptoren (P1-, P2X- und P2Y-Rezeptoren) beeinflussen (Sneddon *et al.* 1999; Zimmermann and Braun 1999; la Sala *et al.* 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Verlust des ATP-induzierten Kalziumsignals von P2X7 positiven Lymphomzellen auf eine starke Aktivität der ATPase CD39 zurückzuführen ist (Nie *et al.* 2005).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Frage nachgegangen, ob CD38 ähnliche Effekte auf die Verfügbarkeit von NAD als Signalmolekül hat und durch den Abbau von NAD dessen Substratverfügbarkeit für andere Ekto-Enzyme beeinflusst. So könnte CD38 die von ART2 katalysierte ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenmolekülen auf Lymphozyten regulieren (Krebs *et al.* 2005).

CD38 beeinflusst den Grad der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Lymphozyten und T Zellen. So zeigen Lymphozyten aus CD38 Knock-out Mäusen besonders nach Inkubation mit etheno-NAD in niedrigeren und vermutlich eher physiologischen Konzentration (1-10  $\mu\text{M}$ ) ein höheres Maß an ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen als Zellen von Wildtyp Mäusen (**Abbildung 36** bis **Abbildung 38**). In entsprechenden Experimenten mit CD38 positiven und negativen Lymphomzellen konnte gezeigt werden, dass Expression von CD38 die ADP-Ribosylierung *in cis*, d.h. auf der Zelloberfläche derselben Zelle, beeinflussen kann (nicht gezeigt).

CD38 und ART2 werden auf Lymphozytenpopulationen invers exprimiert (**Abbildung 7**). Durch Depletion von CD38 positiven Zellen konnte das Niveau der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung von ART2 positiven Zellen in einer Zellsuspension von Milzzellen einer Wildtyp Maus deutlich erhöht werden (**Abbildung 34** und **Abbildung 35**). Diese Resultate deuten darauf hin, dass CD38 die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auch *in trans*, d.h. auf CD38 negativen Zellen, beeinflusst.

NAD wird von CD38 in einer Zellsuspension von Wildtyp Milzzellen rasch verstoffwechselt und steht somit nicht mehr für ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu Verfügung. Im Gegensatz dazu haben CD38 Knock-out Milzzellen keinen erkennbaren Einfluss auf die NAD Konzentration (**Abbildung 38** und **Abbildung 40**). Dies ist in Einklang mit den Beobachtungen anderer, dass CD38 die stärkste NADase im lymphatischen Geweben ist (Cockayne *et al.* 1998; Partida-Sanchez *et al.* 2001). Der schnelle Abbau von exogen hinzugefügtem NAD zu einer Zellsuspension von CD38 exprimierenden Zellen ist umso bemerkenswerter, wenn man die geringe Konzentration der Zellen im Medium bedenkt ( $10^7$  Zellen/ml). Konservative Schätzungen des Extrazellulärraums (20% des gesamten Milzvolumens) und der Zellmenge in der Milz ( $2,5 \cdot 10^7$  Zellen) lassen mutmaßen, dass die NAD enthaltende extrazelluläre Flüssigkeit *in vivo* kleiner ist und

NAD in der Milz in der Umgebung von CD38 exprimierenden Zellen noch deutlich schneller abgebaut wird, als unter den experimentellen Bedingungen „im Reagenzglas“.

Wenn CD38 das Substrat der ARTs verstoffwechselt, sollte es möglich sein, durch spezifische Hemmung von CD38 die Substratverfügbarkeit der ARTs und damit die Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung zu erhöhen. In der Tat konnte durch Inhibition von CD38 mit dem bekannten CD38 Inhibitor araF-NAD (**Abbildung 2**) (Muller-Steffner *et al.* 1992), die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Zellen von CD38 Wildtyp Mäusen gesteigert werden, während die ADP-Ribosylierung bei CD38 Knock-out Zellen durch araF-NAD nicht beeinflusst wurde (**Abbildung 39** und **Abbildung 40**).

Diese Beobachtung ist von potentieller Relevanz für Studien, die das Ziel haben, CD38 Inhibitoren experimentell oder therapeutisch einzusetzen, um Immunfunktionen zu beeinflussen (Partida-Sanchez *et al.* 2004). Die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse demonstrieren, dass solche Inhibitoren durch Erhöhung der extrazellulären NAD-Konzentration indirekt die ADP-Ribosylierung durch die ART2 verstärken können.

Wie bereits oben erwähnt (s.S. 110) fiel bei Untersuchungen zur Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch ADP-Ribosylierung wiederholt auf, dass ein Teil der frisch präparierten ART2 Wildtyp T Zellen „spontane“ PS-Exposition aufweist (**Abbildung 28**, Kapitel 3.2) (Seman *et al.* 2003). Dieses Phänomen ist bei CD38 Knock-out Zellen noch deutlich verstärkt zu beobachten - der Anteil Annexin V positiver Zellen ist auch ohne Zugabe von exogenem NAD gegenüber Zellen von Wildtyp Mäusen erhöht (**Abbildung 41**). Dies unterstützt die Hypothese, dass bei der Präparation der Zellen, z.B. durch mechanische Lyse einzelner Zellen NAD freigesetzt wird.

Die hier mit CD38 Knock-out Zellen erhobenen Ergebnisse sind von Relevanz auch für andere Studien mit CD38 Knock-out Mäusen. Einige der CD38 zugeschriebenen Effekte könnten indirekt durch ineffiziente Entfernung von extrazellulärem NAD und dadurch bedingte verstärkte ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei diesen Knock-out Mäusen hervorgerufen worden sein (Cockayne *et al.* 1998; Kato *et al.* 1999; Fukushi *et al.* 2001; Mitsui-Saito *et al.* 2003; Partida-Sanchez *et al.* 2003; Partida-Sanchez *et al.* 2004).

Wenn man den Effekt von CD38 auf die ADP-Ribosylierung durch ART2 bedenkt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass CD38 auch die Aktivität von anderen Mitgliedern der ART Familie beeinflussen könnte. CD38 wird z.B. auch in Geweben wie Herz und Fortpflanzungsorganen gebildet, von denen bekannt ist, dass sie Mitglieder der ART Familie exprimieren (Glowacki *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2003; Zielinska *et al.* 2004).

#### 4.4 Verschiedenen Tierarten unterscheiden sich stark in der ART-Aktivität auf Lymphozyten

Die Expression von ARTs bzw. die Aktivität dieser Enzyme auf der Zelloberfläche ist im Tierreich unterschiedlich ausgeprägt (Glowacki *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des 1G4 Assays der Frage nachgegangen werden, wie die Aktivität der ARTs auf lymphatischen Zellen

verschiedener Tiere verteilt ist. Der 1G4 Antikörper eignete sich für diese Fragestellung besonders gut, da er nicht an ein bestimmtes Enzym oder Zelloberflächenprotein bindet, sondern an die Produkte der ART-katalysierten Reaktionen, den etheno-ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteinen. Durch die Verwendung von Antikörpern als Marker für B Zellen und T Zellen sollte die ART-Aktivität diesen Lymphozytenpopulationen zugeordnet werden.

Erwartungsgemäß konnte bei Zellen von Mäusen ART-Aktivität nachgewiesen werden. Auch bei lymphatischen Zellen des Hamsters und des Huhns wurde ART-Aktivität auf der Zelloberfläche entdeckt. Die Versuche bestätigten zudem, dass Lymphozyten von Ratten und Menschen keine messbare Zelloberflächen-ART-Aktivität aufweisen (Haag *et al.* 1994; Glowacki *et al.* 2002).

#### *ART-Aktivität lymphatischen Zellen der Maus*

Zunächst wurde ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen verschiedener Mausinzuchtstämme untersucht (**Abbildung 42**). Dabei entspricht die Verteilung der ART-Aktivität weitgehend der bekannten Expression von ART2.1 und ART2.2 (**Abbildung 7**) (Koch-Nolte *et al.* 1999; Kahl *et al.* 2000). Im Thymus ist ART-Aktivität auf CD3 negativen Zellen sehr schwach ausgeprägt, während reife periphere Zellen die stärkste Aktivität aufweisen. ART-Aktivität ist auf CD8<sup>+</sup> Zellen deutlich stärker als auf CD4<sup>+</sup> Zellen (**Abbildung 38**). Bei ART2 Doppelknock-out Mäusen ließ sich auf Lymphozyten keine ART-Aktivität nachweisen, was die Annahme unterstützt, dass ART2.1 und ART2.2 die einzigen ARTs auf Lymphozyten der Maus sind (**Abbildung 42**). Entsprechend dem Expressionsniveau von ART2 bei Lymphozyten von C57BL/6 und BALB/c Mäusen ist auch die ART-Aktivität bei Zellen von C57BL/6 Mäusen stärker ausgeprägt als bei Lymphozyten von BALB/c Mäusen (**Abbildung 34** und **Abbildung 35**).

Bei einigen Experimenten mit Lymphozyten von Mäusen fiel bei höheren NAD Konzentrationen (um 50 µM) auch eine schwache 1G4 Anfärbung von B Zellen auf (nicht gezeigt). In Folgeversuchen konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Diese schwache Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung könnte durch ARTs auf B Zellen, trans-ADP-Ribosylierung durch ARTs auf T Zellen oder die Anlagerung von löslichen ADP-ribosylierten Proteinen an die Zelloberfläche der B Zellen hervorgerufen werden.

#### *ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen des Hamsters und des Kaninchens*

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in Pilotversuchen die ART-Aktivität auf Zellen von Hamstern und Kaninchen untersucht. Bisher war bei diesen Tieren nur die ART1 auf Skelettmuskelzellen des Kaninchens beschrieben (Zolkiewska *et al.* 1992; Zolkiewska and Moss 1993).

Beim Hamster ließ sich ART-Aktivität überwiegend auf slg<sup>+</sup>, d.h. hauptsächlich auf T Zellen, nachweisen (**Abbildung 43**). Interessanterweise findet sich beim Hamster schwache ART-Aktivität auf B Zellen, dabei muss man die bei diesem Versuch verwendete hohe etheno-NAD Konzentration von 50 µM beachten, die auch bei murinen B Zellen zu einer schwachen 1G4 Anfärbung geführt hatte.

Die peripheren lymphatischen Zellen des Kaninchens haben keine mit dem 1G4 Assay messbare ART-Aktivität (**Abbildung 45**). Eine Zellpopulation im Knochenmark scheint ART-Aktivität zu haben. Durch „gaten“ der verschiedenen Zellpopulationen nach FCS und SCS konnte die detektierte ART-Aktivität großen Knochenmarkzellen zugeordnet werden. Bei diesen Zellen könnte es sich um Stammzellen handeln.

In Pilotexperimenten wurde auch die NAD induzierte Apoptose bei Hamstern und Kaninchen untersucht (siehe auch Kapitel 3.2). Bei Zellen des Hamsters konnte der Zelltod sowohl durch NAD als auch durch ATP ausgelöst werden (**Abbildung 44**). Diese Zellen verhalten sich wie Zellen der BALB/c Maus, bei denen durch ADP-Ribosylierung der P2X7 Purinozeptor aktiviert wird (**Abbildung 28**).

Bei Zellen des Kaninchens ließ sich der Zelltod mit ATP auslösen, sie sind jedoch resistent gegenüber der NAD induzierten Apoptose (**Abbildung 46**). Diese Zellen verhalten sich eher wie Zellen einer BALB/c ART2 Knock-out Maus, bei denen der P2X7 Rezeptor nur direkt durch ATP aktiviert wird (**Abbildung 29**). Möglicherweise exprimieren die reifen Kaninchenzellen einen intakten P2X7 Rezeptor aber keine enzymatisch aktive ART.

#### *ART-Aktivität auf Lymphozyten der Ratte*

Die von Lymphozyten der Ratte exprimierte ART2 hat neben einer NADase-Aktivität auch auto-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität. Modifikation von anderen Membranproteinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Haag *et al.* 1995; Maehama *et al.* 1995). Mit dem 1G4 Assay konnte bei Lymphozyten aus der Ratte jedoch keine ART-Aktivität detektiert werden (**Abbildung 47**). Dieses gelang auch nicht durch die Zugabe von DTT. Die Ergebnisse zeigen, dass die sehr niedrige (Auto)-ADP-Ribosylierungs-Aktivität auf Ratten Lymphozyten unterhalb der Detektionsgrenze des 1G4-Assays liegt.

#### *ART-Aktivität auf humanen Leukozyten*

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass das ART2-Gen bei Menschen und anderen Primaten vorzeitige Stop-Codons enthält und deshalb kein funktionstüchtiges Protein gebildet wird (Haag *et al.* 1994). In anderen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass Monozyten eine wenngleich auch schwache ART-Aktivität besitzen und andere Mitglieder der ART Genfamilie transkribieren: ART3 und nach Aktivierung auch ART4 (Hauschildt *et al.* 1997; Grahnert *et al.* 2002). Mit dem 1G4 FACS-Assay konnten wir jedoch weder bei mononukleären Zellen (PBMC) noch bei aufgereinigten T Zellen aus dem peripheren Blut ART-Aktivität nachweisen (**Abbildung 48**). Möglicherweise liegt die ART-Aktivität auf diesen Zellen, ähnlich wie bei Lymphozyten von Ratten, unter der Nachweisgrenze des 1G4-Assays.

#### *ART-Aktivität auf lymphatischen Zellen des Huhns*

ART-Aktivität wurde bei Hühnern bereits in mehreren Geweben einschließlich der Milz und bei

Granulozyten (Heterophile) aus dem Blut beschrieben (siehe Kapitel 4.4) (Terashima *et al.* 1996; Tsuchiya *et al.* 1997). Die ART-Aktivität in polymorphkernigen Granulozyten konnte durch die reduzierenden Eigenschaften von DTT verstärkt werden (Ohno *et al.* 1994).

Im Rahmen eines Gastaufenthaltes bei Prof. Kaspers an der Universität München habe ich den 1G4 Assay verwendet, um ART-Aktivität auf Lymphozyten von Hühnern aus Milz, Thymus, Blut und der *Bursa fabricii*, dem Entwicklungsorgan der B Zellen, näher zu untersuchen (Abbildung 49). Bei lymphatischen Zellen aus dem peripheren Blut (PBL) konnte keine ART-Aktivität nachgewiesen werden, während sich im Thymus wenige Zellen mit schwacher, DTT-unabhängiger ART-Aktivität fanden. Bei Zellen aus der Bursa ließ sich die vorhandene ADP-Ribosylierung durch den Zusatz von DTT steigern. Auch Milzzellen hatten ART-Aktivität, die sich jedoch nicht mit DTT steigern ließ. Die Aktivität der ART bei Milzzellen konnte nicht einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden. ARTs auf CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, TCRα/β<sup>+</sup> und TCRλ/δ<sup>+</sup> Zellen schienen in vergleichbarem Maße Zelloberflächenproteine zu modifizieren. Die Aktivität konnte mit PI-PLC abgespalten werden, so dass man von einem GPI-verankerten Enzym ausgehen kann (Abbildung 50). Der Unterschied in der DTT-Abhängigkeit legt nahe, dass auf Bursazellen eine andere ART als auf Thymus- und Milzzellen exprimiert wird. Die Unterschiede könnten auch durch unterschiedliche Splicevarianten einer ART hervorgerufen werden.

Von acht mit dem 1G4 Assay untersuchten Hühnchen Zelllinien konnte bei einer, der T Zelllinie 855-19, eine wenngleich auch schwache ART-Aktivität belegt werden (**Abbildung 51**). Die von diesen Zellen exprimierte ART erwies sich als DTT unabhängig und konnte erstaunlicherweise nur partiell mit PI-PLC abspalten werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Zellen noch eine weitere, nicht GPI-verankerte ART exprimieren, oder die ART schnell nachgebildet bzw. nicht vollständig entfernt wurde.

Bisher waren von anderen Arbeitsgruppen drei Hühnchen-ART cDNAs kloniert und molekular charakterisiert (ART6a, ART6b, ART7) (Davis *et al.* 1997; Tsuchiya *et al.* 1997). Diese ähneln der Säuger-ART5 mit N-terminalem Leader und C-terminal fehlendem GPI-Signal und kodieren damit offensichtlich für sezernierte Proteine. Bei Datenbankrecherchen im kürzlich fast vollständig sequenzierten Hühnergenom konnten wir drei weitere ART-kodierende Gene identifizieren, von denen zwei auch in der EST Datenbank als fragmentarische cDNAs repräsentiert sind (**Tabelle 2**). Zwei dieser ARTs ähneln stark der ART7 (>85 % Sequenzidentität) und sind vermutlich - ähnlich wie ART6a und ART6b - aus jüngeren, lokalen DNA-Duplikationen entstanden. Wir haben sie deshalb ART7b, ART7c genannt. Interessanterweise könnte das bereits zuvor bekannte ART7a durch alternatives Spleißen ein C-terminales GPI-Signalpeptid kodieren (**Abbildung 53**). Zudem enthält die genomische Sequenz der ART7a, ähnlich wie Säuger ART1 (Braren *et al.* 1998), ein potentiell spleißbares kleines Exon zwischen dem C-terminalen GPI-Signalpeptid und dem Hauptexon. Diese Miniexone kodieren bei ART7a und ART1 für ein zusätzliches Cystein-Paar (Abbildung 54). Die dritte bisher nur fragmentarisch im sequenzierten Genom vorhandene ART ähnelt in Sequenz und

Exon / Intron Struktur der Säuger-ART5 (**Abbildung 55**). Diese auffälligen Ähnlichkeiten deuten an, dass ART7 und ART1, sowie ART8 und ART5 jeweils Spezies-Orthologe darstellen könnten.

Diese Ergebnisse liefern die Basis für weiterführende Untersuchungen, mit denen (z.B. über RT-PCR Untersuchungen), ermittelt werden könnte, welche dieser ARTs von Milzzellen, von Bursazellen und von 855-19 Zellen exprimiert werden.

#### *Zusammenfassende Überlegungen zur Expression von ARTs auf Lymphozyten verschiedener Spezies*

Die hier erzielten funktionellen Ergebnisse spiegeln die Unterschiede der ARTs auf genomischer Ebene wider. Während bei Mäusen die ART2 als dupliziertes Gen vorliegt (Ohlrogge *et al.* 2002), existiert die ART2 beim Menschen nur als Pseudogen (Haag *et al.* 1994). Bei Kaninchen, Ratte und Mensch konnte keine ART-Aktivität auf Lymphozyten nachgewiesen werden. Während die Aktivität bei Hamster und Maus hauptsächlich auf reifen T Zellen gefunden wurde, konnte bei Hühnern ART-Aktivität auf peripheren T Zellen und nicht-T Zellen nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, warum bei einigen Tierarten die ART-Aktivität auf Lymphozyten so wichtig ist, dass sich die entsprechenden Gene duplizieren und diversifizieren konnten (siehe DTT-Abhängigkeit der Maus ART2.1), während sie bei anderen Spezies zumindest auf Lymphozyten abhanden gekommen ist. Möglicherweise haben andere Proteine die regulatorischen Eigenschaften der ARTs übernommen.

Einige der bakteriellen ARTs binden an die Zellmembran, um in die Wirtszelle einzudringen (Pertussis-Toxin). Auch Viren wie HIV und Rhinoviren binden an Zelloberflächenproteine (CD4, ICAM-1) (Stein *et al.* 1994; Kolatkar *et al.* 1999; Matthias *et al.* 2002). Eventuell wurde auch die ART2 beim Mensch von einem Toxin oder Virus als Rezeptor zum Eintritt in die Zelle genutzt. Durch den daraus entstandenen Selektionsdruck hätte sich das Pseudogen durchsetzen können.

#### 4.5 ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei primären Lymphozyten ist reversibel

Reversible posttranslationale Proteinmodifikationen können Proteinfunktionen steuern. Bei der intrazellulären Signalübertragung in T Zellen kommt es z.B. durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung zur Aktivierung und Inaktivierung von Enzymen (Wang *et al.* 1996). Auch ADP-Ribosylierung trägt zur Regulierung von Enzymaktivitäten bei. So wird die Aktivität der Dinitrogenase-Reduktase bei *Rhodospirillum rubrum* durch ADP-Ribosylierung und Hydrolyse der ADP-Ribose reguliert (**Abbildung 5**) (Halbleib *et al.* 2000).

Ein solcher ADP-Ribosylierungszyklus wurde auch für eukaryote Zellen postuliert, jedoch werden mono-ARTs an der Zelloberfläche exprimiert, während die bekannten ADP-Ribosyhydrolasen (ARH) eine intrazelluläre Lokalisation aufweisen (Okazaki *et al.* 1995; Moss *et al.* 1997). Dennoch konnte die Reversion der Automodifikation durch ART2 der Ratte auf der Zelloberfläche von vitalen Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde ADP-Ribose freigesetzt, was als Hinweis auf eine

Hydrolase-Aktivität an der Zellmembran gewertet wurde (Maehama *et al.* 1995). Die Reversibilität der ADP-Ribosylierung des Integrin alpha7 auf differenzierten Muskelzellen wurde hingegen einer ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (NPP) zugeschrieben (**Abbildung 2**) (Zolkiewska and Moss 1997).

In dieser Arbeit wurde der 1G4 Assay verwendet werden, um Reversibilität der ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche zu untersuchen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass ADP-Ribosylierung bei primären Lymphozyten aus der Maus *in vitro* und *in vivo* reversibel ist, und dass Inhibitoren von ARHs oder NPPs diese De-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen beeinträchtigen.

*Reversibilität der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei primären Lymphozyten in vitro*

Um die Beständigkeit der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu untersuchen, wurden „pulse-chase“ Analysen durchgeführt. Durch Inkubation von CD38<sup>+</sup> T Zellen mit etheno-NAD und anschließender Weiterinkubation in Abwesenheit von etheno-NAD konnte gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung mit einer Halbwertszeit von ungefähr 40 Minuten abnimmt (**Abbildung 56**). Bei Zellen, die mit etheno-NAD weiterinkubiert wurden, stieg der Grad der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächen über 60 Minuten an und fiel danach nur langsam ab.

In weiteren „pulse-chase“ Analysen konnte dargestellt werden, dass die Enzyminhibitoren ADP-Ribose und NP-TMP beide die Reversibilität der ADP-Ribosylierung von Proteinen auf der Zelloberfläche partiell hemmen können (**Abbildung 57**). ADP-Ribose inhibiert sowohl ARHs als auch NPPs, wohingegen NP-TMP als spezifischer Inhibitor von NPP gilt (Zolkiewska and Moss 1995). Die in **Abbildung 57** dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass eine NPP die ADP-Ribose-Gruppe an den Zielproteinen zwischen den beiden Phosphaten spaltet. Sofern die dabei am Argininrest hinterlassene Ribose-Phosphat-Gruppe nicht durch eine weitere Enzymaktivität entfernt wird, sollte es bei anschließender Inkubation der Zellen mit frischem etheno-NAD nicht zu einem erneuten Anstieg der 1G4 Anfärbung kommen. Entsprechende Experimente ergaben jedoch eine erneute Steigerung der etheno-ADP-Ribosylierung (nicht dargestellt), ein indirekter Hinweis auf die vollständige Entfernung der ADP-Ribosegruppe von zugängigen Argininresten.

Um zu ermitteln, ob ADP-ribosylierte Membranproteine von der Zelloberfläche abgespalten werden, wurde der Überstand von Zellen nach Behandlung mit <sup>32</sup>P-NAD und anschließender Inkubation ohne NAD untersucht (**Abbildung 58**). Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die ADP-Ribosylierung wie die etheno-ADP-Ribosylierung reversibel ist.

Die in **Abbildung 57** und **Abbildung 58** abgebildeten Experimente wurden mit Zellen von NZW Mäusen in Anwesenheit von DTT durchgeführt, da NZW Zellen nur die DTT-abhängige ART2.1 exprimieren (Matthes *et al.* 1997). Untersuchungen mit Zellen von C57BL/6 Mäusen, die nur die DTT-unabhängige ART2.2 exprimieren, zeigten zunächst nur schwachen Rückgang der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung. Interessanterweise ergaben Folgeexperimente mit diesen

C57BL/6 Zellen, dass durch Zusatz des reduzierenden Agens DTT die Reversibilität „aktiviert“ wird. Die Aktivität der ARH1 bei Ratte und Maus ist DTT-abhängig und durch den Austausch eines Zysteins gegen Serin (C108S) konnte diese DTT-Abhängigkeit aufgehoben werden (Takada *et al.* 1993). Die Ergebnisse deuten an, dass eine DTT-abhängige ARH auf der Zelloberfläche von T Zellen exprimiert werden könnte.

#### *ADP-Ribosylierung und deren Reversibilität in vivo*

In den bisher vorgestellten Experimenten wurde die ADP-Ribosylierung *ex vivo* an Lymphomzellen und primären Lymphozyten untersucht. In Pilotexperimenten wurde im Rahmen dieser Dissertation mit dem 1G4 Assay ART-Aktivität auf Lymphozyten auch *in vivo* erforscht. Nach intravenöser Applikation von 1,2 mg etheno-NAD bei CD38 Knock-out Mäusen kam es zur nachweisbaren etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf CD3<sup>+</sup> T Zellen im Blut, in Lymphknoten und in der Milz (**Abbildung 59**). Dabei war die mit dem 1G4 Antikörper gemessene etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei Zellen aus dem peripheren Blut (PBL) am stärksten.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich durch Applikation höherer NAD Dosen (5 mg etheno-NAD) die etheno-ADP-Ribosylierung weiter steigern lässt (**Abbildung 60**). Der Grad der etheno-ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche von C57BL/6 CD38 Knock-out T Zellen war bei kurzen Inkubationszeiten (10 Minuten) am höchsten, während nach 30 Minuten die etheno-ADP-Ribosylierung stark zurückgegangen und nach 120 Minuten kaum noch nachweisbar war (**Abbildung 61**). Im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten, bei denen die ADP-Ribosylierung mit einer Halbwertszeit von 40 Minuten abnahm, war bei *in vivo* Versuchen die Reversion deutlich schneller. Möglicherweise haben im Plasma gelöste Proteine oder andere Zellen im Gewebe Einfluss auf die Reversion der ADP-Ribosylierung.

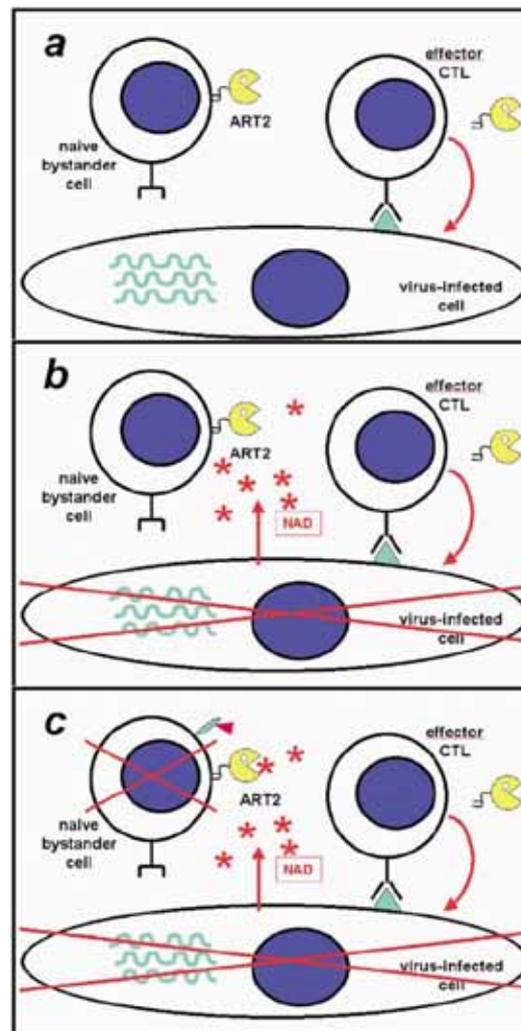
Bei diesen Untersuchungen wurden CD38 Knock-out Mäuse verwendet, die im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen NAD nicht so rasch verstoffwechseln und somit stärkere ART-Aktivität haben (Kapitel 3.3) (Krebs *et al.* 2005). Dabei wurden 1,2 mg etheno-NAD bzw. 200 µl mit 8,5 mM etheno-NAD appliziert. Wenn man davon ausgeht, dass Mäuse ein Blutvolumen von 2 ml haben, verdünnt sich das etheno-NAD im Blut zunächst auf 850 µM. Man kann davon ausgehen, dass sich das etheno-NAD noch weiter im Organismus verteilt. Bei einem Gesamtvolumen der Maus von ca. 20 ml sollte zum Zeitpunkt der Injektion eine etheno-NAD Konzentration von >50 µM *in vivo* erreicht werden. Kontrollanfärbungen *in vitro* zeigten jedoch, dass die Anfärbungen von Zellen mit 1G4 nach *in vivo* Injektion von etheno-NAD eher einer Inkubation mit ca. 2 µM etheno-NAD entspricht (nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen für diese starke Diskrepanz sind rasche Elimination von etheno-NAD durch andere NAD verstoffwechselnde Ektoenzyme (CD157, NPP und andere), renale Filtration oder Aufnahme von etheno-NAD in Zellen und dadurch Verringerung von extrazellulärem etheno-NAD. Da CD38 wahrscheinlich die stärkste NADase Aktivität auf Lymphozyten ist (**Abbildung 40**) (Cockayne *et al.* 1998; Partida-Sanchez *et al.* 2001), sollte erwartungsgemäß bei Experimenten mit

Wildtyp Mäusen die ADP-Ribosylierung *in vivo* noch schwächer ausfallen.

Auch eine starke Reversibilität durch Enzyme auf der Zellmembran oder durch lösliche Enzyme im Plasma kann den relativ geringen Grad der ADP-Ribosylierung erklären. Bei einem Versuch mit zusätzlicher Applikation von ADP-Ribose mit etheno-NAD konnte eine leicht erhöhte etheno-ADP-Ribosylierung im Vergleich zu etheno-NAD Gabe ohne ADP-Ribose nachgewiesen werden. Möglicherweise ist ein Teil der schwachen *in vivo* ADP-Ribosylierung durch enzymatisch katalysierte Reversibilität begründet (**Abbildung 61**).

#### 4.6 Mögliche Bedeutung des NICD für Immunreaktionen

Es stellt sich die Frage, warum T Zellen über einen Mechanismus verfügen, durch den die Nukleotide NAD und ATP zur Zellinaktivierung führen oder den Zelltod auslösen. Eine mögliche Erklärung ist, dass im akut entzündeten Gewebe, in dem viel NAD und andere Nukleotide aus nekrotischen Zellen freigesetzt wird, naive T Zellen vor einer ungewollten Aktivierung geschützt werden sollen (**Abbildung 64** und **Abbildung 65**). Diese naiven T Zellen könnten unter Umständen autoaggressiv sein und aufgrund von unkontrollierter Aktivierung zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen. Bei der Aktivierung von T Zellen kommt es zur Abspaltung der Zelloberflächen-ARTs (Kahl *et al.* 2000). Diese aktivierten T Zellen werden durch das freigesetzte NAD nicht beeinflusst und können ihren spezifischen Aufgaben bei der Eliminierung von körperfremden Organismen nachkommen. Für die Abspaltung der ARTs sind Metalloproteasen verantwortlich. Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als dass Matrix-Metalloproteasen in entzündetem Gewebe wie z.B. in atheromatösen Plaques vermehrt nachweisbar sind (Jones *et al.* 2003). Diese Metalloproteasen könnten durch Abspaltung der ARTs von der Zellmembran Einfluss auf den Grad der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen der T Zellen haben und so möglicherweise an der Feinregulation der Immunantwort teilhaben.

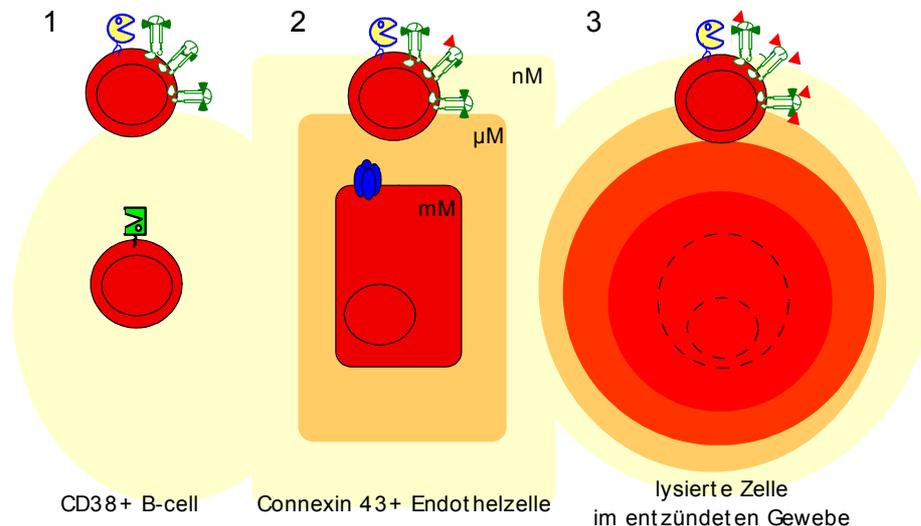


**Abbildung 64: Durch Elimination von naiven bystander T Zellen könnte NAD den Organismus von Autoimmunreaktionen beschützen.** (a) Eine viral infizierte Zelle wird von einer zytotoxischen T Zelle (CTL) zerstört. Dabei wird NAD freigesetzt (b) und bewirkt die Ausschaltung von naiven bystander T Zellen (c). Die aktivierte CTL ist von der Apoptose geschützt, da sie die ART2 von ihrer Zelloberfläche bei der Aktivierung abgestoßen hat und kann so die spezifische Immunantwort aufrechterhalten. Aus (Haag *et al.* 2002).

Die Tatsache, dass CD38 die Aktivität der ART2 *in trans* auf der Zelloberfläche von anderen Zellen steuert, ist besonders vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Expression von CD38 und ART2 auf Lymphozyten wichtig (**Abbildung 7**). Während B Zellen CD38 stark exprimieren, bilden die meisten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> positiven T Zellen ART2 aber kaum CD38. Diese starken Differenzen in der Expression von CD38 und die Tatsache, dass CD38 Knock-out Zellen praktisch kein NAD hydrolysieren, implizieren, dass sich *in vivo* die extrazellulären NAD Konzentrationen in verschiedenen Organen deutlich unterscheiden. Gewebsabschnitte wie Keimzentren, die reich an B Zellen sind (Park and Choi 2005), werden wahrscheinlich nur sehr geringe Konzentrationen von extrazellulärem NAD aufweisen, da NAD schnell von CD38 abgebaut wird. Umgekehrt lässt sich annehmen, dass in entzündetem Gewebe oder bei starker Gewebszerstörung freigesetztes NAD besonders in den Gebieten, in denen wenige CD38<sup>+</sup> Zellen vorkommen, nur langsam abgebaut wird. Das könnte zu einem hohen Grad an ADP-Ribosylierung auf Zelloberflächen von ART

exprimierenden Zellen führen.

In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass bestimmte Bakterien Einfluss auf die lokale NAD Konzentration haben können. Die meisten Stämme von *Haemophilus influenzae* sind abhängig von exogenen NAD Quellen (Coleman *et al.* 2003). *Staphylokokkus aureus* hingegen sezerniert NAD in die Umgebung (Niven and Le Blanc 1992). Dieses sezernierte NAD könnte unter Umständen zu einem erhöhten Grad an Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf T Zellen führen.



**Abbildung 65: Model der Modifikation von Zelloberflächenproteinen auf T Zellen durch *in vivo* freigesetztes NAD.** In der Umgebung von CD38 exprimierenden Zellen wie B Zellen ist die NAD Konzentration im submikromolaren Bereich und es finden sich keine ADP-ribosylierten Zellmembranproteine auf T Zellen (1). Durch spezielle Membranporen wie Connexin 43 (2) (Bruzzone *et al.* 2001) oder durch Zellyse (3) (Seman *et al.* 2003) kann NAD freigesetzt werden und in konzentrationsabhängiger Weise zur ADP-Ribosylierung von T Zell Membranproteinen führen. Modifiziert nach (Scheuplein *et al.* 2003).

Wenn man einerseits die erhöhte Fraktion von „spontan“ apoptotischen Zellen aus frisch präparierten Lymphknoten und andererseits die Beobachtung, dass in lymphatischen Geweben von CD38 Knock-out Mäusen erhöhte NAD Konzentrationen gefunden werden (Cockayne *et al.* 1998; Partida-Sanchez *et al.* 2001), bedenkt, kann man einen Einfluss von NAD auf die Homöostase von T Zellen erwarten. In diesem Zusammenhang ist auch die Feststellung interessant, dass erhöhte T Zell Proliferation und Homöostase mit einer gesteigerten Anfälligkeit von NOD Mäusen für die Autoimmunkrankheit Diabetes mellitus Typ I in Zusammenhang gebracht werden konnten (King *et al.* 2004). Spannend bleibt hierbei die Frage, ob Knock-out Mäuse für CD38 und ART2 auf dem NOD Hintergrund eine veränderte T Zell Homöostase und veränderte Krankheitsverläufe haben. Erste Experimente mit CD38 Knock-out Mäusen auf dem NOD Hintergrund ergaben interessanterweise, dass diese Mäuse anfälliger gegenüber Diabetes waren. Treffen CD38 Knock-out und ART2 Doppelknock-out zusammen, scheinen diese „Trippel“-Knock-out Tiere wiederum von Diabetes geschützt zu sein (Ed Leiter, persönliche Kommunikation). Unter Umständen werden bei einem erhöhten Zellumsatz gerade autoregulatorische T Zellen über ADP-Ribosylierung eliminiert, die sonst den Körper von autoreaktiven Zellen schützen können.

Es wurde postuliert, dass von Zellen freigesetzte Nukleotide als „danger signals“ (Botenstoffe für Gefahren) wirken (la Sala *et al.* 2003; Hanley *et al.* 2004). Die hier vorgestellten Ergebnisse stimmen mit dieser Hypothese überein und unterstützen die Annahme, dass NAD die Funktionen eines extrazellulären Botenstoffes aufweist. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich spekulieren, ob ART2 ein Sensor für extrazelluläres NAD ist und diese lokalen NAD Konzentrationen in entsprechende ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen überträgt. ARTs könnten möglicherweise das kurz anhaltende Signal wie die Freisetzung von NAD aus rupturierten Zellen in lang anhaltende Signale, d.h. in kovalente Proteinmodifikationen im Sinne der ADP-Ribosylierung, übersetzen (**Abbildung 64**). Die Dauer und Intensität der Exposition von Zellen gegenüber NAD könnte dabei u.a. von der lokalen Expression von CD38 auf der Zelloberfläche oder der Konzentration von CD38 in extrazellulären Flüssigkeiten abhängen. In diesem Szenario würden die NAD metabolisierenden Ektoenzyme CD38 und ART2 Informationen über die Anwesenheit von NAD als extrazellulärem Botenstoff an Lymphozyten weiterleiten und so in die Feinsteuerung des Immunsystems eingreifen.

## 5 Perspektiven für weiterführende Untersuchungen

Die in dieser Arbeit etablierte Antikörper-basierte Methode zum Nachweis von Zelloberflächen ART-Aktivität eröffnet neue Möglichkeiten zur Beantwortung interessanter Fragen. Dazu gehört z.B. die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehung und Kinetik der ADP-Ribosylierung bei anderen Mitgliedern der ART Familie. Der 1G4 Antikörper könnte sich auch zur Identifizierung weiterer Zielproteine der ARTs eignen, etwa nach Immunpräzipitation von etheno-ADP-ribosylierten Proteinen mit 1G4 und Identifizierung einzelner Proteinbanden mittels Massenspektroskopie.

Die hier gewonnene Erkenntnis, dass der P2X7 Purinozeptor ein Zielprotein der ARTs ist, ebnet den Weg zu spannenden Betrachtungen des P2X7 Rezeptors. In unserem Labor wird zurzeit untersucht, welches Arginin ADP-ribosyliert wird, und welche Auswirkungen Mutationen der einzelnen Arginine auf die Aktivität des P2X7 Purinozeptors haben. Auch andere P2X Purinozeptoren oder die P1 und P2Y Rezeptoren könnten Zielproteine der ARTs sein.

Die auf ART-Aktivität sortierten MD27 Hybridomzellen sind ein wertvolles experimentelles Modell zur Erforschung der molekularen Mechanismen des NAD induzierten Zelltods. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass nur ca. 30-50% der Zellen unter NAD Phosphatidylserin exponieren obwohl alle Zellen ART-Aktivität haben und den P2X7 Rezeptor exprimieren.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Interaktion von CD38 und ART2 eröffnet interessante Perspektiven. Durch Verstoffwechselung des Substrats begrenzt CD38 offensichtlich die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen und die Apoptose von T Zellen. Umgekehrt, führt das Fehlen von CD38 zu einer erhöhten ADP-Ribosylierung und spontanen Apoptose von T Zellen. Interessant ist nun z.B. die Frage, ob CD38 Knock-out Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen unter bestimmten Umständen zur Ausprägung von Krankheiten neigen, die durch die erhöhte ADP-Ribosylierung bei diesen Tieren erklärt werden könnte.

Im Rahmen von Pilotexperimenten gelang es, ADP-Ribosylierung auf lymphatischen Zellen verschiedener Tierarten zu detektieren. Im Knochenmark von Kaninchen konnten große Zellen mit ART-Aktivität ausgemacht werden, bei denen es sich um Stammzellen handeln könnte. In weiteren Versuchen müssten diese Zellen nach Möglichkeit noch genauer differenziert werden. Interessant könnte sich auch die weitere Charakterisierung der bei Hühnern beobachteten ART-Aktivitäten gestalten: Die bei Bursazellen gefundenen Zellen mit DTT-abhängiger ART-Aktivität exprimieren möglicherweise eine andere ART oder ein anderes Splice-Produkt derselben ART als die Zellen aus Milz. Die Ergebnisse der *in silico* Analysen der Hühnchen ARTs bilden eine gute Basis für die Klonierung, rekombinante Expression und biochemische Charakterisierung dieser ARTs.

Der 1G4 Antikörper eignet sich nicht nur zur Untersuchung der ADP-Ribosylierung lymphatischer Zellen. ARTs werden auch auf Zellen anderer Gewebe exprimiert. ART1 wird z.B. von Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert. Nach Inkubation muriner Herzmuskelzellen mit etheno-NAD und anschließender 1G4 Anfärbung konnte inzwischen ADP-Ribosylierung auf diesen Zellen

nachgewiesen werden. Dabei wird es auch wichtig sein, mögliche Effekte von NAD auf diese Zellen näher zu bestimmen und Zellaktivierung oder -inaktivierung nach NAD Behandlung zu ermitteln.

Die *in vivo* Versuche bei Mäusen ebnen den Weg zur Beantwortung interessanter Fragestellungen. Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass etheno-ADP-Ribosylierung *in vivo* stattfindet, wäre es interessant, mehr über den Verbleib von Zellen nach ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu erfahren. Dabei ist es wichtig, zwischen Behandlung mit etheno-NAD und NAD zu unterscheiden. Die Applikation von NAD führt zur Aktivierung des P2X7 Purinozeptor durch ADP-Ribosylierung und induziert den Zelltod. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass dies die Zellen verstärkt für die Phagozytose durch Makrophagen vorbereitet. Behandlung mit etheno-NAD führt hingegen nicht zur Induktion des Zelltods und könnte das Wanderungsverhalten der Zellen verändern.

## Literaturverzeichnis

- Ablamunits, V., M. Bridgett, T. Duffy, F. Haag, M. Nissen, F. Koch-Nolte and H. Leiter (2001). "Changing patterns of cell surface mono (ADP-ribosyl) transferase antigen ART2.2 on resting versus cytopathically-activated T cells in NOD/Lt mice." Diabetologia **44**(7): 848-58.
- Adriouch, S. (2003). "Immunorégulation par le NAD extracellulaire : activation via les ADP-ribosyl transférases du récepteur cytolitique P2X7." UNIVERSITE DENIS DIDEROT - PARIS VII.
- Adriouch, S., C. Dox, V. Welge, M. Seman, F. Koch-Nolte and F. Haag (2002). "Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor." J. Immunol. **169**(8): 4108-4112.
- Adriouch, S., W. Ohlrogge, F. Haag, F. Koch-Nolte and M. Seman (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**(1): 196-203.
- Aktories, K. (1991). ADP-ribosylating toxins. Berlin, Springer Verlag.
- Aktories, K., M. Barmann, I. Ohishi, S. Tsuyama, K. H. Jakobs and E. Habermann (1986). "Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin." Nature **322**(6077): 390-2.
- Aktories, K., C. Mohr and G. Koch (1992). "Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase." Curr Top Microbiol Immunol **175**(115): 115-31.
- Alexander-Miller, M. A. (2005). "High-Avidity CD8+ T Cells: Optimal Soldiers in the War Against Viruses and Tumors." Immunol Res **31**(1): 13-24.
- Allport, J. R., L. E. Donnelly, P. Kefalas, G. Lo, A. Nunn, M. Yadollahi-Farsani, N. B. Rendell, S. Murray, G. W. Taylor and J. MacDermot (1996). "A possible role for mono (ADP-ribosyl) transferase in the signalling pathway mediating neutrophil chemotaxis." Br J Clin Pharmacol **42**(1): 99-106.
- Althaus, F. R. and C. Richter (1987). "ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance." Mol Biol Biochem Biophys **37**: 1-237.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Ame, J. C., C. Spenlehauer and G. de Murcia (2004). "The PARP superfamily." Bioessays **26**(8): 882-93.
- Anderson, M. E. and T. J. Siahaan (2003). "Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors." Peptides **24**(3): 487-501.
- Angelini, G., S. Gardella, M. Ardy, M. R. Ciriolo, G. Filomeni, G. Di Trapani, F. Clarke, R. Sitia and A. Rubartelli (2002). "Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1491-6.
- Armstrong, S. and A. R. Merrill (2001). "Application of a fluorometric assay for characterization of the catalytic competency of a domain III fragment of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A." Anal. Biochem. **292**(1): 26-33.
- Barbieri, J. T. (2000). "Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin." Int J Med Microbiol **290**(4-5): 381-7.
- Baricordi, O. R., D. Ferrari, L. Melchiorri, P. Chiozzi, S. Hanau, E. Chiari, M. Rubini and F. Di Virgilio (1996). "An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes." Blood **87**(2): 682-90.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J Mol Biol **340**(4): 783-95.
- Bierer, B. C., J.E.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M.; Strober W. (2004). Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.

- Boardman, P. E., J. Sanz-Ezquerro, I. M. Overton, D. W. Burt, E. Bosch, W. T. Fong, C. Tickle, W. R. Brown, S. A. Wilson and S. J. Hubbard (2002). "A comprehensive collection of chicken cDNAs." Curr Biol **12**(22): 1965-9.
- Borghesi, C. and C. Nicoletti (1994). "Increase of cross(auto)-reactive antibodies after immunization in aged mice: a cellular and molecular study." Int J Exp Pathol **75**(2): 123-30.
- Bortell, R., J. Moss, R. C. McKenna, M. R. Rigby, D. Niedzwiecki, L. A. Stevens, W. A. Patton, J. P. Mordes, D. L. Greiner and A. A. Rossini (2001). "Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface NAD glycohydrolase and pyrophosphatase activities." J. Immunol. **167**(4): 2049-2059.
- Bossy-Wetzel, E. and D. R. Green (2000). "Detection of apoptosis by annexin V labeling." Methods Enzymol **322**: 15-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braren, R., G. Glowacki, M. Nissen, F. Haag and F. Koch-Nolte (1998). "Molecular characterization and expression of the gene for mouse NAD<sup>+</sup>:arginine ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase, Art1." Biochem J **336** ( Pt 3): 561-8.
- Bruzzone, S., L. Franco, L. Guida, E. Zocchi, P. Contini, A. Bisso, C. Usai and A. De Flora (2001). "A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD<sup>+</sup> and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts." J Biol Chem **276**(51): 48300-8.
- Bruzzone, S., L. Guida, L. Franco, E. Zocchi, G. Corte and A. De Flora (1998). "Dimeric and tetrameric forms of catalytically active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells." FEBS Lett **433**(3): 275-8.
- Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco and A. De Flora (2001). "Connexin 43 hemi channels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells." Faseb. J. **15**(1): 10-12.
- Buell, G., I. P. Chessell, A. D. Michel, G. Collo, M. Salazzo, S. Herren, D. Gretener, C. Grahames, R. Kaur, M. H. Kosco-Vilbois and P. P. Humphrey (1998). "Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody." Blood **92**(10): 3521-8.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Burstein, D., J. P. Mordes, D. L. Greiner, D. Stein, N. Nakamura, E. S. Handler and A. A. Rossini (1989). "Prevention of diabetes in BB/Wor rat by single transfusion of spleen cells. Parameters that affect degree of protection." Diabetes **38**(1): 24-30.
- Butcher, E., J. Howard, C. W. DeWitt, R. D. Guttman, H. Kunz, T. J. Gill III, D. Cramer, D. L. Greiner, D. Lubaroff, K. Wonigeit and E. Günther (1979). "Second international workshop on alloantigenic systems in the rat: combined report on reference testing of anti-T-lymphocyte alloantisera." Transpl. Proc. **XI**: 1648-1649.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in regulation of adaptive immunity." Nat Immunol **5**(10): 981-6.
- Chen, C. L., J. Cihak, U. Losch and M. D. Cooper (1988). "Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes." Eur J Immunol **18**(4): 539-43.
- Chessell, I. P., A. D. Michel and P. P. Humphrey (1998). "Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor." Br J Pharmacol **124**(6): 1314-20.
- Chiozzi, P., M. Murgia, S. Falzoni, D. Ferrari and F. Di Virgilio (1996). "Role of the purinergic P2Z receptor in spontaneous cell death in J774 macrophage cultures." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 176-81.
- Choe, S., M. J. Bennett, G. Fujii, P. M. Curmi, K. A. Kantardjieff, R. J. Collier and D. Eisenberg (1992). "The crystal structure of diphtheria toxin." Nature **357**(6375): 216-22.
- Clair, T., H. Y. Lee, L. A. Liotta and M. L. Stracke (1997). "Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities." J Biol Chem **272**(2): 996-1001.

- Cockayne, D. A., T. Muchamuel, J. C. Grimaldi, H. Muller-Steffner, T. D. Randall, F. E. Lund, R. Murray, F. Schuber and M. C. Howard (1998). "Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses." *Blood* **92**(4): 1324-33.
- Coleman, H. N., D. A. Daines, J. Jarisch and A. L. Smith (2003). "Chemically defined media for growth of Haemophilus influenzae strains." *J Clin Microbiol* **41**(9): 4408-10.
- Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R. A. North and G. Buell (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." *Neuropharmacology* **36**(9): 1277-83.
- Coopamah, M. D., M. B. Garvey, J. Freedman and J. W. Semple (2003). "Cellular immune mechanisms in autoimmune thrombocytopenic purpura: An update." *Transfus Med Rev* **17**(1): 69-80.
- Crowe, P. D., B. N. Walter, K. M. Mohler, C. Otten-Evans, R. A. Black and C. F. Ware (1995). "A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes." *J. Exp. Med.* **181**(3): 1205-1210.
- da Silva, C. P., K. Schweitzer, P. Heyer, F. Malavasi, G. W. Mayr and A. H. Guse (1998). "Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca<sup>2+</sup>-signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related." *FEBS Lett* **439**(3): 291-6.
- Davis, R. E., V. Mysore, J. C. Browning, J. C. Hsieh, Q. A. Lu and P. D. Katsikis (1998). "In situ staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue." *J Histochem Cytochem* **46**(11): 1279-89.
- Davis, T., J. S. Sabir, M. Tavassoli and S. Shall (1997). "Purification, characterisation, and molecular cloning of a chicken erythroblast mono(ADP-ribosyl)transferase." *Adv Exp Med Biol* **419**: 145-54.
- De Flora, A., L. Franco, L. Guida, S. Bruzzone, C. Usai and E. Zocchi (2000). "Topology of CD38." *Chem Immunol* **75**: 79-98.
- De Flora, A., L. Guida, L. Franco and E. Zocchi (1997). "The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(10): 1149-66.
- Deaglio, S., K. Mehta and F. Malavasi (2001). "Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors." *Leuk. Res.* **25**(1): 1-12.
- Deissler, H., F. Lottspeich and M. F. Rajewsky (1995). "Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine PC-1." *J Biol Chem* **270**(17): 9849-55.
- Del Principe, D., A. Menichelli, A. Casini, G. S. Di, G. Mancuso and A. A. Finazzi (1986). "A surface NAD-glycohydrolase of human platelets may influence their aggregation." *Febs Lett* **205**(1): 66-70.
- DeLano, W. L. (2002). "The PyMOL Molecular Graphics System." *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA*. <http://www.pymol.org>.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. First of two parts." *N Engl J Med* **343**(1): 37-49.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. Second of two parts." *N Engl J Med* **343**(2): 108-17.
- Deterre, P., L. Gelman, H. Gary-Gouy, C. Arrieumerlou, V. Berthelie, J. M. Tixier, S. Ktorza, J. Goding, C. Schmitt and G. Bismuth (1996). "Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites." *J Immunol* **157**(4): 1381-8.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J. M. Sanz, V. Venketaraman and O. R. Baricordi (1998). "Cytolytic P2X purinoceptors." *Cell Death Differ* **5**(3): 191-9.
- Dive, C., C. D. Gregory, D. J. Phipps, D. L. Evans, A. E. Milner and A. H. Wyllie (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." *Biochim. Biophys. Acta* **1133**(3): 275-285.
- Dong, C., J. Wang, P. Neame and M. D. Cooper (1994). "The murine BP-3 gene encodes a relative of the CD38/NAD glycohydrolase family." *Int. Immunol.* **6**(9): 1353-1360.

- Dustin, M. L. and A. S. Shaw (1999). "Costimulation: building an immunological synapse." Science **283**(5402): 649-50.
- Edouard, P., J. C. Hiserodt, C. Plamondon and P. Poussier (1993). "CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome." Diabetes **42**(3): 390-7.
- Eshhar, Z., T. Waks, G. Gross and D. G. Schindler (1993). "Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 720-4.
- Feeney, A. J., A. Tang and K. M. Ogwaro (2000). "B-cell repertoire formation: role of the recombination signal sequence in non-random V segment utilization." Immunol Rev **175**: 59-69.
- Ferrari, D., A. La Sala, P. Chiozzi, A. Morelli, S. Falzoni, G. Girolomoni, M. Idzko, S. Dichmann, J. Norgauer and F. Di Virgilio (2000). "The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release." Faseb J **14**(15): 2466-76.
- Ferrari, D., M. Los, M. K. Bauer, P. Vandenabeele, S. Wesselborg and K. Schulze-Osthoff (1999). "P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death." FEBS Lett **447**(1): 71-5.
- Ferrari, D., M. Villalba, P. Chiozzi, S. Falzoni, P. Ricciardi-Castagnoli and F. Di Virgilio (1996). "Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP." J Immunol **156**(4): 1531-9.
- Ferrero, E., F. Saccucci and F. Malavasi (2000). "The making of a leukocyte receptor: origin, genes and regulation of human CD38 and related molecules." Chem. Immunol. **75**: 1-19.
- Fowell, D. and D. Mason (1993). "Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential." J. Exp. Med. **177**(3): 627-636.
- Fukushi, Y., I. Kato, S. Takasawa, T. Sasaki, B. H. Ong, M. Sato, A. Ohsaga, K. Sato, K. Shirato, H. Okamoto and Y. Maruyama (2001). "Identification of cyclic ADP-ribose-dependent mechanisms in pancreatic muscarinic Ca(2+) signaling using CD38 knockout mice." J Biol Chem **276**(1): 649-55.
- Funaro, A., A. L. Horenstein, L. Calosso, M. Morra, R. P. Tarocco, L. Franco, A. De Flora and F. Malavasi (1996). "Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids." Int Immunol **8**(11): 1643-50.
- Funaro, A., M. Reinis, O. Trubiani, S. Santi, R. Di Primio and F. Malavasi (1998). "CD38 functions are regulated through an internalization step." J Immunol **160**(5): 2238-47.
- Ganesan, A. K., D. W. Frank, R. P. Misra, G. Schmidt and J. T. Barbieri (1998). "Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites." J Biol Chem **273**(13): 7332-7.
- Gardnerova, M., R. Blanque and C. R. Gardner (2000). "The use of TNF family ligands and receptors and agents which modify their interaction as therapeutic agents." Curr Drug Targets **1**(4): 327-64.
- George, J. F. and M. D. Cooper (1990). "Gamma/delta T cells and alpha/beta T cells differ in their developmental patterns of receptor expression and modulation requirements." Eur J Immunol **20**(10): 2177-81.
- Germain, R. N. (2002). "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision." Nat Rev Immunol **2**(5): 309-22.
- Gierschik, P. (1992). "ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin." Curr Top Microbiol Immunol **175**: 69-96.
- Giovane, A., C. Balestrieri, L. Quagliuolo and L. Servillo (1985). "1-N6-Etheno-ADP-ribosylation of elongation factor-2 by diphtheria toxin." FEBS Lett **191**(2): 191-194.
- Girard, J. P. and F. Amalric (1998). "Biosynthesis of sulfated L-selectin ligands in human high endothelial venules (HEV)." Adv Exp Med Biol **435**: 55-62.
- Glenney, J. R., Jr., L. Zokas and M. P. Kamps (1988). "Monoclonal antibodies to phosphotyrosine." J Immunol Methods **109**(2): 277-85.

- Glowacki, G., R. Braren, K. Firner, M. Nissen, M. Kuhl, P. Reche, F. Bazan, M. Cetkovic-Cvrlje, E. Leiter, F. Haag and F. Koch-Nolte (2002). "The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse." Protein Sci **11**(7): 1657-70.
- Goding, J. W. and M. C. Howard (1998). "Ecto-enzymes of lymphoid cells." Immunol. Rev. **161**: 5-10.
- Goding, J. W., R. Terkeltaub, M. Maurice, P. Deterre, A. Sali and S. I. Belli (1998). "Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family." Immunol. Rev. **161**: 11-26.
- Grahner, A., M. Friedrich, M. Pfister, F. Haag, F. Koch-Nolte and S. Hauschildt (2002). "Mono-ADP-ribosyltransferases in human monocytes: regulation by lipopolysaccharide." Biochem J **362**(Pt 3): 717-23.
- Graves, D. J., T. W. Huiatt, H. Zhou, H. Y. Huang, S. W. Sernett, R. M. Robson and K. K. McMahon (1997). "Regulatory role of arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase in muscle cells." Adv. Exp. Med. Biol. **419**: 305-313.
- Green, D. R., N. Droin and M. Pinkoski (2003). "Activation-induced cell death in T cells." Immunol Rev **193**: 70-81.
- Greiner, D. L., E. S. Handler, K. Nakano, J. P. Mordes and A. A. Rossini (1986). "Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats." J. Immunol. **136**(1): 148-151.
- Greiner, D. L., J. P. Mordes, E. S. Handler, M. Angelillo, N. Nakamura and A. A. Rossini (1987). "Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats." J. Exp. Med. **166**(2): 461-475.
- Grunwald, S., Y. Zhang, C. Halbleib, G. P. Roberts and P. W. Ludden (1997). A proposed role for protein:protein complexes in the regulation of the reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)Transferases and Related Enzymes. F. Haag and F. Koch-Nolte. New York, Plenum Press. **419**: 61-69.
- Gu, B., L. J. Bendall and J. S. Wiley (1998). "Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases." Blood **92**(3): 946-51.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- Guse, A. H. (1999). "Cyclic ADP-ribose: a novel Ca<sup>2+</sup>-mobilising second messenger." Cell Signal **11**(5): 309-16.
- Haag, F. (1996). Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6: ein polymorphes System GPI-verankerter Oberflächenproteine mit Verwandtschaft zu bakteriellen ADP-ribosylierenden Toxinen, Universität Hamburg.
- Haag, F., V. Andresen, S. Karsten, F. Koch-Nolte and H. Thiele (1995). "Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD." Eur J Immunol **25**(8): 2355-61.
- Haag, F., D. Freese, F. Scheublein, W. Ohlrogge, S. Adriouch, M. Seman and F. Koch-Nolte (2002). "T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD." Dev Immunol **9**(4): 197-202.
- Haag, F. and F. Koch-Nolte (1997). ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes. New York, Plenum Press.
- Haag, F., F. Koch-Nolte, A. Gerber, J. Schröder and H. G. Thiele (1997). "Rat T cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD(+)-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities." Transplant. Proc. **29**(3): 1699-700.
- Haag, F., F. Koch-Nolte, M. Kuhl, S. Lorenzen and H.-G. Thiele (1994). "Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species." J. Mol. Biol. **243**: 537-546.

- Halbleib, C. M., Y. Zhang and P. W. Ludden (2000). "Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein." *J Biol Chem* **275**(5): 3493-500.
- Hanley, P. J., B. Musset, V. Renigunta, S. H. Limberg, A. H. Dalpke, R. Sus, K. M. Heeg, R. Preisig-Muller and J. Daut (2004). "Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9479-84.
- Hara, N., M. Badruzzaman, T. Sugae, M. Shimoyama and M. Tsuchiya (1999). "Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase." *Eur. J. Biochem.* **259**(1-2): 289-294.
- Hara, N., M. Terashima, M. Shimoyama and M. Tsuchiya (2000). "Mouse T-cell antigen rt6.1 has thiol-dependent NAD glycohydrolase activity." *J Biochem (Tokyo)* **128**(4): 601-7.
- Hauschildt, S., P. Scheipers, W. Bessler, K. Schwarz, A. Ullmer, H. D. Flad and H. Heine (1997). "Role of ADP-ribosylation in activated monocytes/macrophages." *Adv Exp Med Biol* **419**: 249-52.
- Hauschildt, S., P. Scheipers and W. G. Bessler (1994). "Lipopolysaccharide-induced change of ADP-ribosylation of a cytosolic protein in bone-marrow derived macrophages." *Biochem. J.* **297**: 17-20.
- Helyer, B. J. and J. B. Howie (1963). "Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice." *Nature* **197**: 197.
- Heston, W. E. and G. Vlahakis (1971). "Mammary tumors, plaques, and hyperplastic alveolar nodules in various combinations of mouse inbred strains and the different lines of the mammary tumor virus." *Int J Cancer* **7**(1): 141-8.
- Hillier, L. W., W. Miller, E. Birney, W. Warren, R. C. Hardison, C. P. Ponting, P. Bork, D. W. Burt, M. A. Groenen, M. E. Delany, J. B. Dodgson, A. T. Chinwalla, P. F. Cliften, S. W. Clifton, K. D. Delehaunty, C. Fronick, R. S. Fulton, T. A. Graves, C. Kremitzki, D. Layman, V. Magrini, J. D. McPherson, T. L. Miner, P. Minx, W. E. Nash, M. N. Nhan, J. O. Nelson, L. G. Oddy, C. S. Pohl, J. Randall-Maher, S. M. Smith, J. W. Wallis, S. P. Yang, M. N. Romanov, C. M. Rondelli, B. Paton, J. Smith, D. Morrice, L. Daniels, H. G. Tempest, L. Robertson, J. S. Masabanda, D. K. Griffin, A. Vignal, V. Fillon, L. Jacobsson, S. Kerje, L. Andersson, R. P. Crooijmans, J. Aerts, J. J. van der Poel, H. Ellegren, R. B. Caldwell, S. J. Hubbard, D. V. Grafham, A. M. Kierzek, S. R. McLaren, I. M. Overton, H. Arakawa, K. J. Beattie, Y. Bezzubov, P. E. Boardman, J. K. Bonfield, M. D. Croning, R. M. Davies, M. D. Francis, S. J. Humphray, C. E. Scott, R. G. Taylor, C. Tickle, W. R. Brown, J. Rogers, J. M. Buerstedde, S. A. Wilson, L. Stubbs, I. Ovcharenko, L. Gordon, S. Lucas, M. M. Miller, H. Inoko, T. Shiina, J. Kaufman, J. Salomonsen, K. Skjoedt, G. K. Wong, J. Wang, B. Liu, J. Yu, H. Yang, M. Nefedov, M. Koriabine, P. J. Dejong, L. Goodstadt, C. Webber, N. J. Dickens, I. Letunic, M. Suyama, D. Torrents, C. von Mering, E. M. Zdobnov, K. Makova, A. Nekrutenko, L. Elnitski, P. Eswara, D. C. King, S. Yang, S. Tyekucheva, A. Radakrishnan, R. S. Harris, F. Chiaromonte, J. Taylor, J. He, M. Rijnkels, S. Griffiths-Jones, A. Ureta-Vidal, M. M. Hoffman, J. Severin, S. M. Searle, A. S. Law, D. Speed, D. Waddington, Z. Cheng, E. Tuzun, E. Eichler, Z. Bao, P. Flicek, D. D. Shteynberg, M. R. Brent, J. M. Bye, E. J. Huckle, S. Chatterji, C. Dewey, L. Pachter, A. Kouranov, Z. Mourelatos, A. G. Hatzigeorgiou, A. H. Paterson, R. Ivarie, M. Brandstrom, E. Axelsson, N. Backstrom, S. Berlin, M. T. Webster, O. Pourquie, A. Reymond, C. Ucla, S. E. Antonarakis, M. Long, J. J. Emerson, E. Betran, I. Dupanloup, H. Kaessmann, A. S. Hinrichs, G. Bejerano, T. S. Furey, R. A. Harte, B. Raney, A. Siepel, W. J. Kent, D. Haussler, E. Eyraes, R. Castelo, J. F. Abril, S. Castellano, F. Camara, G. Parra, R. Guigo, G. Bourque, G. Tesler, P. A. Pevzner, A. Smit, L. A. Fulton, E. R. Mardis and R. K. Wilson (2004). "Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution." *Nature* **432**(7018): 695-716.
- Hingorani, V. N. and Y. K. Ho (1988). "Fluorescent labeling of signal-transducing G-proteins. Pertussis toxin-catalyzed etheno-ADP ribosylation of transducin." *J. Biol. Chem.* **263**(36): 19804-19808.
- Hiraoka, N., B. Petryniak, J. Nakayama, S. Tsuboi, M. Suzuki, J. C. Yeh, D. Izawa, T. Tanaka, M. Miyasaka, J. B. Lowe and M. Fukuda (1999). "A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34." *Immunity* **11**(1): 79-89.

- Hirata, Y., N. Kimura, K. Sato, Y. Ohsugi, S. Takasawa, H. Okamoto, J. Ishikawa, T. Kaisho, K. Ishihara and T. Hirano (1994). "ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1." Febs Lett **356**(2-3): 244-8.
- Hoffman, R. W. (2004). "T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." Clin Immunol **113**(1): 4-13.
- Holling, T. M., E. Schooten and P. J. van Den Elsen (2004). "Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men." Hum Immunol **65**(4): 282-90.
- Hollmann, C., F. Haag, M. Schlott, A. Damaske, H. Bertuleit, M. Matthes, M. Kühl, H. G. Thiele and F. Koch-Nolte (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**(9): 807-817.
- Hollmann, C., F. Haag, H.-G. Thiele and F. Nolte (1994). "Murine Rt6 is encoded by two functional genes with significant homology to GPI-anchored  $\beta$ -NAD-mono-ADPribosyltransferases." Immunobiol. **191**: 82.
- Honjo, T., Y. Nishizuka, O. Hayaishi and I. Kato (1968). "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis." J. Biol. Chem. **243**: 3553-3555.
- Howard, M., J. C. Grimaldi, J. F. Bazan, F. E. Lund, A. L. Santos, R. M. Parkhouse, T. F. Walseth and H. C. Lee (1993). "Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38." Science **262**(5136): 1056-9.
- Humphreys, B. D., J. Rice, S. B. Kertesy and G. R. Dubyak (2000). "Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor." J Biol Chem **275**(35): 26792-8.
- Inageda, K., K. Takahashi, K. Tokita, H. Nishina, Y. Kanaho, I. Kukimoto, K. Kontani, S. Hoshino and T. Katada (1995). "Enzyme properties of Aplysia ADP-ribosyl cyclase: comparison with NAD glycohydrolase of CD38 antigen." J Biochem (Tokyo) **117**(1): 125-31.
- Ishida, B. Y., P. J. Blanche, A. V. Nichols, M. Yashar and B. Paigen (1991). "Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H." J Lipid Res **32**(4): 559-68.
- Jacobson, E. L. and M. K. Jacobson (1997). "Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans." Methods Enzymol. **280**: 221-230.
- Jacobson, E. L. and M. K. Jacobson (1997). "Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans." Methods Enzymol **280**: 221-30.
- Jacobson, M. K. and E. L. Jacobson (1989). ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and Biological Significance. New York, Springer Verlag.
- Janeway, C., P. Travis, W. M. and S. M. (2001). Immunobiology. New York, Garland Publishing.
- Jin-Hua, P., J. W. Goding, H. Nakamura and K. Sano (1997). "Molecular cloning and chromosomal localization of PD-Ibeta (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes." Genomics **45**(2): 412-5.
- Jones, C. B., D. C. Sane and D. M. Herrington (2003). "Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome." Cardiovasc Res **59**(4): 812-23.
- Kahl, S., M. Nissen, R. Girisch, T. Duffy, E. H. Leiter, F. Haag and F. Koch-Nolte (2000). "Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation." J. Immunol. **165**(8): 4463-9.
- Kanaitzuka, T., R. Bortell, L. A. Stevens, J. Moss, D. Sardinha, T. V. Rajan, D. Zipris, J. P. Mordes, D. L. Greiner and A. A. Rossini (1997). "Expression in BALB/c and C57BL/6 mice of Rt6-1 and Rt6-2 ADP- ribosyltransferases that differ in enzymatic activity: C57BL/6 Rt6-1 is a natural transferase knockout." J. Immunol. **159**(6): 2741-9.
- Karsten, S., J. Schröder, C. da Silva, D. Kahlke, H. G. Thiele, F. Koch-Nolte and F. Haag (1997). "Expression and comparative analysis of recombinant rat and mouse RT6 T cell mono(ADP-ribose)transferases in E. coli." Adv. Exp. Med. Biol. **419**: 175-80.

- Kato, I., Y. Yamamoto, M. Fujimura, N. Noguchi, S. Takasawa and H. Okamoto (1999). "CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and insulin secretion." J Biol Chem **274**(4): 1869-72.
- Kaufmann, Y., G. Berke and Z. Eshhar (1981). "Cytotoxic T lymphocyte hybridomas that mediate specific tumor-cell lysis in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2502-6.
- Kawagoe, H., M. L. Stracke, H. Nakamura and K. Sano (1997). "Expression and transcriptional regulation of the PD-1/alpha/autotaxin gene in neuroblastoma." Cancer Res **57**(12): 2516-21.
- Kelley, V. E. and A. Winkelstein (1980). "Age- and sex-related glomerulonephritis in New Zealand white mice." Clin Immunol Immunopathol **16**(2): 142-50.
- Kharadia, S. V., T. W. Huiatt, H. Y. Huang, J. E. Peterson and D. J. Graves (1992). "Effect of an arginine-specific ADP-ribosyltransferase inhibitor on differentiation of embryonic chick skeletal muscle cells in culture." Exp Cell Res **201**(1): 33-42.
- King, C., A. Ilic, K. Koelsch and N. Sarvetnick (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." Cell **117**(2): 265-77.
- Kirsten, E., G. Jackowski, J. McLick, A. Hakam, K. Decker and E. Kun (1985). "Cellular regulation of poly(ADP) ribosylation of proteins. I. Comparison of hepatocytes, cultured cells and liver nuclei and the influence of varying concentrations of NAD." Exp Cell Res **161**(1): 41-52.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.
- Klebl, B. M. and D. Pette (1996). "A fluorometric assay for measurement of mono-ADP-ribosyltransferase activity." Anal. Biochem. **239**(2): 145-152.
- Knight, D. A. and J. T. Barbieri (1997). "Ecto-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S." Infect Immun **65**(8): 3304-9.
- Koch, F., H. G. Thiele and M. Low (1986). "Release of the rat T cell alloantigen RT6.2 from cell membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C." J. Exp. Med. **164**: 1338-1343.
- Koch-Nolte, F., T. Duffy, M. Nissen, S. Kahl, N. Killeen, V. Ablamunits, F. Haag and E. H. Leiter (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**(11): 6014-22.
- Koch-Nolte, F. and F. Haag (1997). "Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families." Adv. Exp. Med. Biol. **419**: 1-13.
- Koch-Nolte, F., F. Haag, R. Braren, M. Kuhl, J. Hoovers, S. Balasubramanian, F. Bazan and H. G. Thiele (1997). "Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins." Genomics **39**(3): 370-6.
- Koch-Nolte, F., F. Haag, M. Kuhl, V. van Heyningen, J. Hoovers, K. H. Grzeschik, S. Singh and H. G. Thiele (1993). "Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and *in situ* hybridization." Genomics **18**: 404-406.
- Koch-Nolte, F., J. Klein, C. Hollmann, M. Kuhl, F. Haag, H. R. Gaskins, E. H. Leiter and H. G. Thiele (1995). "Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZB x NZW)F1 mice." Internat. Immunol. **7**: 883-890.
- Koch-Nolte, F., D. Petersen, S. Balasubramanian, F. Haag, D. Kahlke, T. Willer, R. Kastelein, F. Bazan and H. G. Thiele (1996). "Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins." J. Biol. Chem. **271**(13): 7686-7693.
- Koevary, S., A. A. Rossini, W. Stoller, W. Chick and R. M. Williams (1983). "Passive transfer of diabetes in the BB/W rat." Science **220**: 727 - 728.
- Kolatkar, P. R., J. Bella, N. H. Olson, C. M. Bator, T. S. Baker and M. G. Rossmann (1999). "Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor." Embo J **18**(22): 6249-59.

- Korohoda, W., M. Michalik and M. Pierzchalska (1994). "Benzamide-induced changes in the actin cytoskeleton in human skin fibroblasts." Cell Biol Int **18**(8): 791-6.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-95.
- Krebs, C., S. Adriouch, F. Braasch, W. Koestner, E. H. Leiter, M. Seman, F. E. Lund, N. Oppenheimer, F. Haag and F. Koch-Nolte (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol **174**(6): 3298-305.
- Krebs, C., W. Koestner, M. Nissen, V. Welge, I. Parusel, F. Malavasi, E. H. Leiter, R. M. Santella, F. Haag and F. Koch-Nolte (2003). "Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine." Anal Biochem **314**(1): 108-15.
- la Sala, A., D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer and G. Girolomoni (2003). "Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides." J Leukoc Biol **73**(3): 339-43.
- Labasi, J. M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. M. Payette, W. Brissette, J. R. Wicks, L. Audoly and C. A. Gabel (2002). "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response." J. Immunol. **168**(12): 6436-6445.
- Leclercq, G. and J. Plum (1996). "Thymic and extrathymic T cell development." Leukemia **10**(12): 1853-9.
- Lee, H. and W. J. Iglewski (1984). "Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and Pseudomonas toxin A." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(9): 2703-7.
- Lee, H. C. (2001). "Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 317-45.
- Liu, Z. X., O. Azhipa, S. Okamoto, S. Govindarajan and G. Dennert (2001). "Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces T cell apoptosis in vivo and in vitro." J. Immunol. **167**(9): 4942-7.
- Liu, Z. X., Y. Yu and G. Dennert (1999). "A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling." J. Biol. Chem. **274**(25): 17399-17401.
- Ludden, P. W. and G. P. Roberts (1989). "Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation." Curr Top Cell Regul **30**(23): 23-56.
- Lukac, M. and R. J. Collier (1988). "Pseudomonas aeruginosa exotoxin A: effects of mutating tyrosine-470 and tyrosine-481 to phenylalanine." Biochemistry **27**(20): 7629-32.
- Lund, F., N. Solvason, J. C. Grimaldi, R. M. Parkhouse and M. Howard (1995). "Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme." Immunol. Today **16**(10): 469-73.
- Ma, Y. and P. W. Ludden (2001). "Role of the dinitrogenase reductase arginine 101 residue in dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase binding, NAD binding, and cleavage." J Bacteriol **183**(1): 250-6.
- Maehama, T., H. Nishina, S. Hoshino, Y. Kanaho and T. Katada (1995). "NAD(+)-dependent ADP-ribosylation of T lymphocyte alloantigen RT6.1 reversibly proceeding in intact rat lymphocytes." J Biol Chem **270**(39): 22747-51.
- Maloney, D. G. (2005). "Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets." Semin Oncol **32**(1 Suppl 1): S19-26.
- Matthes, M., C. Hollmann, H. Bertuleit, M. Köhl, H. G. Thiele, F. Haag and F. Koch-Nolte (1997). ""Natural" RT6-1 and RT6-2 "knock-out" mice." Adv. Exp. Med. Biol. **419**: 271-4.
- Matthias, L. J., P. T. Yam, X. M. Jiang, N. Vandegraaff, P. Li, P. Pombourios, N. Donoghue and P. J. Hogg (2002). "Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1." Nat Immunol **3**(8): 727-32.
- McKeever, U., J. P. Mordes, D. L. Greiner, M. C. Appel, J. Rozing, E. S. Handler and A. A. Rossini (1990). "Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7618-22.
- McMahon, K. K., K. J. Piron, V. T. Ha and A. T. Fullerton (1993). "Developmental and biochemical characteristics of the cardiac membrane-bound arginine-specific mono-ADP-ribosyltransferase." Biochem J **293**: 789-793.

- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.
- Metroz-Dayer, M. D., A. Moulant, C. Brideau, D. Duhamel and P. Poussier (1990). "Adoptive transfer of diabetes in BB rats induced by CD4 T lymphocytes." Diabetes **39**(8): 928-32.
- Mishima, K., M. Terashima, S. Obara, K. Yamada, K. Imai and M. Shimoyama (1991). "Arginine-specific ADP-ribosyltransferase and its acceptor protein p33 in chicken polymorphonuclear cells: co-localization in the cell granules, partial characterization, and in situ mono(ADP-ribosylation)." J Biochem Tokyo **110**(3): 388-94.
- Mitsui-Saito, M., I. Kato, S. Takasawa, H. Okamoto and T. Yanagisawa (2003). "CD38 gene disruption inhibits the contraction induced by alpha-adrenoceptor stimulation in mouse aorta." J Vet Med Sci **65**(12): 1325-30.
- Mohindru, M. and A. Verma (2004). "Kinase inhibitors translate lab discoveries into exciting new cures for cancers." Indian J Pediatr **71**(8): 713-8.
- Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel, J. P. Chauvin, M. Pierres and H. T. He (1998). "Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains." Embo J **17**(18): 5334-48.
- Moss, J., S. Garrison, N. J. Oppenheimer and S. H. Richardson (1979). "NAD-dependent ADP-ribosylation of arginine and proteins by Escherichia coli heat-labile enterotoxin." J Biol Chem **254**(14): 6270-2.
- Moss, J., A. Zolkiewska and I. Okazaki (1997). "ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles." Adv Exp Med Biol **419**: 25-33.
- Mowbray, J. and D. L. Hardy (1996). "Direct thyroid hormone signalling via ADP-ribosylation controls mitochondrial nucleotide transport and membrane leakiness by changing the conformation of the adenine nucleotide transporter." FEBS Lett **394**(1): 61-5.
- Mueller-Dieckmann, C., H. Ritter, F. Haag, F. Koch-Nolte and G. Schulz (2002). "Structure of the Ecto-ADP-ribosyl Transferase ART2.2 from Rat." J. Mol. Biol. **322**(4): 687-696.
- Muller-Steffner, H., A. Augustin and F. Schuber (1997). "Involvement of bovine spleen NAD+ glycohydrolase in the metabolism of cyclic ADP-ribose-mechanism of the cyclization reaction." Adv Exp Med Biol **419**: 399-409.
- Muller-Steffner, H. M., O. Malver, L. Hosie, N. J. Oppenheimer and F. Schuber (1992). "Slow-binding inhibition of NAD+ glycohydrolase by arabino analogues of beta-NAD." J Biol Chem **267**(14): 9606-11.
- Murata, J., H. Y. Lee, T. Clair, H. C. Krutzsch, A. A. Arestad, M. E. Sobel, L. A. Liotta and M. L. Stracke (1994). "cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases." J Biol Chem **269**(48): 30479-84.
- Nemoto, E., Y. Yu and G. Dennert (1996). "Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function- associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells." J. Immunol. **157**(8): 3341-3349.
- Nie, K., G. G. Zheng, X. J. Zhang, Y. M. Lin, L. Wang, G. Li, Y. H. Song and K. F. Wu (2005). "CD39-associated high ATPase activity contribute to the loss of P2X7-mediated calcium response in LCL cells." Leuk Res.
- Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka and I. Messaoudi (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." Nat Rev Immunol **4**(2): 123-32.
- Niven, D. F. and L. Le Blanc (1992). "Identity of V factor in culture medium used for prior growth of two strains of Staphylococcus aureus." Int J Syst Bacteriol **42**(4): 642-4.
- Notredame, C., D. G. Higgins and J. Heringa (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-17.
- Nusbaum, P., C. Laine, S. Seveau, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli (2004). "Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 477-9.

- Oei, S. L., J. Griesenbeck and M. Schweiger (1997). "The role of poly(ADP-ribosyl)ation." Rev Physiol Biochem Pharmacol **131**: 127-73.
- Ohlrogge, W., F. Haag, J. Lohler, M. Seman, D. R. Littman, N. Killeen and F. Koch-Nolte (2002). "Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice." Mol. Cell. Biol. **22**(21): 7535-7542.
- Ohno, T., M. Badruzzaman, Y. Nishikori, M. Tsuchiya, J. Jidoi and M. Shimoyama (1994). "Vortex-mixing-induced inactivation of arginine-specific ADP-ribosyltransferase activity and re-activation of the less-active form by dithiothreitol plus NaCl under anaerobic conditions." Biochem Mol Biol Int **32**(2): 213-20.
- Okamoto, S., O. Azhipa, Y. Yu, E. Russo and G. Dennert (1998). "Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function." J. Immunol. **160**(9): 4190-4198.
- Okazaki, I. J., H. J. Kim, N. G. McElvaney, E. Lesma and J. Moss (1996). "Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP- ribosyltransferase from lymphocytes." Blood **88**(3): 915-921.
- Okazaki, I. J., A. Zolkiewska, T. Takada and J. Moss (1995). "Characterization of mammalian ADP-ribosylation cycles." Biochimie **77**(5): 319-25.
- O'Reilly, T. and D. F. Niven (2003). "Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*." Can J Vet Res **67**(3): 229-31.
- Otto, H., D. Tezcan-Merdol, R. Girisch, F. Haag, M. Rhen and F. Koch-Nolte (2000). "The spvB gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase." Mol Microbiol **37**(5): 1106-15.
- Palazzo, F. F., L. J. Hammond, A. W. Goode and R. Mirakian (2000). "Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump?" Thyroid **10**(7): 561-72.
- Park, C. S. and Y. S. Choi (2005). "How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre?" Immunology **114**(1): 2-10.
- Partida-Sanchez, S., D. A. Cockayne, S. Monard, E. L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T. D. Randall and F. E. Lund (2001). "Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo." Nat Med **7**(11): 1209-16.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, K. Kusser, N. Oppenheimer, T. D. Randall and F. E. Lund (2004). "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity." Immunity **20**(3): 279-91.
- Partida-Sanchez, S., P. Iribarren, M. E. Moreno-Garcia, J. L. Gao, P. M. Murphy, N. Oppenheimer, J. M. Wang and F. E. Lund (2004). "Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose." J Immunol **172**(3): 1896-906.
- Partida-Sanchez, S., T. D. Randall and F. E. Lund (2003). "Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity." Microbes Infect **5**(1): 49-58.
- Passador, L. and W. Iglewski (1994). "ADP-ribosylating toxins." Methods Enzymol **235**: 617-31.
- Pellat-Deceunynck, C., J. Wietzerbin and J. C. Drapier (1994). "Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages." Biochem J.
- Pietrzak, A., M. Podhorecka, G. Chodorowska, J. Rolinski and J. Urban (2003). "Efalizumab in the treatment of psoriasis." Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med] **58**(2): 174-8.
- Pindolia, V. K. and B. J. Zarowitz (2002). "Imatinib mesylate, the first molecularly targeted gene suppressor." Pharmacotherapy **22**(10): 1249-65.
- Plasterer, T. N. (1997). "PROTEAN. Protein sequence analysis and prediction." Methods Mol Biol **70**: 227-39.
- Popoff, M. R. and P. Boquet (1988). "Clostridium spiroforme toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin." Biochem Biophys Res Commun **152**(3): 1361-8.

- Prochazka, M., H. R. Gaskins, E. H. Leiter, F. Koch-Nolte, F. Haag and H. G. Thiele (1991). "Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6." *Immunogenetics* **33**(2): 152-6.
- Qin, Y. and P. Duquette (2003). "B-cell immunity in MS." *Int MS J* **10**(4): 110-20.
- Ritter, H., F. Koch-Nolte, V. E. Marquez and G. E. Schulz (2003). "Substrate binding and catalysis of ecto-ADP-ribosyltransferase 2.2 from rat." *Biochemistry* **42**(34): 10155-62.
- Rodriguez, M. and J. Schaper (2005). "Apoptosis: measurement and technical issues." *J Mol Cell Cardiol* **38**(1): 15-20.
- Rossini, A. A., J. P. Mordes and D. L. Greiner (1989). "The pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus." *Curr Opin Immunol* **2**(4): 598-603.
- Rossini, A. A., J. P. Mordes and A. A. Like (1985). "Immunology of Insulin-dependent Diabetes mellitus." *Ann. Rev. Immunol.* **3**: 289 - 320.
- Rubartelli, A., A. Bajetto, G. Allavena, E. Wollman and R. Sitia (1992). "Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway." *J Biol Chem* **267**(34): 24161-4.
- Ruf, A., V. Rolli, G. de Murcia and G. E. Schulz (1998). "The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis." *J Mol Biol* **278**(1): 57-65.
- Sakurai, J., M. Nagahama, J. Hisatsune, N. Katunuma and H. Tsuge (2003). "Clostridium perfringens iota-toxin, ADP-ribosyltransferase: structure and mechanism of action." *Adv Enzyme Regul* **43**: 361-77.
- Sanz, J. M. and F. Di Virgilio (2000). "Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells." *J Immunol* **164**(9): 4893-8.
- Schering, B., M. Barmann, G. S. Chhatwal, U. Geipel and K. Aktories (1988). "ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by Clostridium perfringens iota toxin." *Eur J Biochem* **171**(1-2): 225-9.
- Scheuplein, F., S. Adriouch, G. Glowacki, F. Haag, M. Seman and F. Koch-Nolte (2003). "Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2." *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 296-9.
- Schirmer, J., I. Just and K. Aktories (2002). "The ADP-ribosylating mosquitocidal toxin from Bacillus sphaericus: proteolytic activation, enzyme activity, and cytotoxic effects." *J Biol Chem* **277**(14): 11941-8.
- Schirmer, J., H. J. Wieden, M. V. Rodnina and K. Aktories (2002). "Inactivation of the elongation factor Tu by mosquitocidal toxin-catalyzed mono-ADP-ribosylation." *Appl Environ Microbiol* **68**(10): 4894-9.
- Scholl, P. R. and R. S. Geha (1994). "MHC class II signaling in B-cell activation." *Immunol Today* **15**(9): 418-22.
- Schuman, E. M., M. K. Meffert, H. Schulman and D. V. Madison (1994). "An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11958-11962.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex and M. C. Peitsch (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3381-5.
- Scott, L. J., D. Delautier, N. R. Meerson, G. Trugnan, J. W. Goding and M. Maurice (1997). "Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral plasma membrane surfaces of rat hepatocytes." *Hepatology* **25**(4): 995-1002.
- Seman, M., S. Adriouch, F. Haag and F. Koch-Nolte (2004). "Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling." *Curr Med Chem* **11**(7): 857-72.
- Seman, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag and F. Koch-Nolte (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor." *Immunity* **19**(4): 571-82.

- Shen, C., P. Maerten, K. Geboes, G. Van Assche, P. Rutgeerts and J. L. Ceuppens (2005). "Infliximab induces apoptosis of monocytes and T lymphocytes in a human-mouse chimeric model." Clin Immunol **115**(3): 250-9.
- Shimoyama, M., M. Tsuchiya, N. Hara, K. Yamada and H. Osago (1997). "Molecular cloning and characterization of arginine-specific ADP-ribosyltransferases from chicken bone marrow cells." Adv Exp Med Biol **419**: 137-44.
- Sims, T. N. and M. L. Dustin (2002). "The immunological synapse: integrins take the stage." Immunol Rev **186**: 100-17.
- Sixma, T. K., K. H. Kalk, B. A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt and W. G. Hol (1993). "Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin." J Mol Biol **230**(3): 890-918.
- Sneddon, P., T. D. Westfall, L. D. Todorov, S. Mihaylova-Todorova, D. P. Westfall and C. Kennedy (1999). "Modulation of purinergic neurotransmission." Prog Brain Res **120**: 11-20.
- Sowder, J. T., C. L. Chen, L. L. Ager, M. M. Chan and M. D. Cooper (1988). "A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor." J Exp Med **167**(2): 315-22.
- Stearne, P. A., I. R. van Driel, B. Grego, R. J. Simpson and J. W. Goding (1985). "The murine plasma cell antigen PC-1: purification and partial amino acid sequence." J Immunol **134**(1): 443-8.
- Stein, P. E., A. Boodhoo, G. D. Armstrong, S. A. Cockle, M. H. Klein and R. J. Read (1994). "The crystal structure of pertussis toxin." Structure **2**(1): 45-57.
- Steinberg, T. H., A. S. Newman, J. A. Swanson and S. C. Silverstein (1987). "ATP<sub>4</sub>- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes." J Biol Chem **262**(18): 8884-8.
- Steinberg, T. H. and S. C. Silverstein (1987). "Extracellular ATP<sub>4</sub>- promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line." J Biol Chem **262**(7): 3118-22.
- Stiernberg, J., M. G. Low, L. Flaherty and P. W. Kincade (1987). "Removal of lymphocyte surface molecules with phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on mitogen responses and evidence that ThB and certain Qa antigens are membrane-anchored via phosphatidylinositol." J Immunol **138**(11): 3877-84.
- Stracke, M. L., A. Arestad, M. Levine, H. C. Krutzsch and L. A. Liotta (1995). "Autotaxin is an N-linked glycoprotein but the sugar moieties are not needed for its stimulation of cellular motility." Melanoma Res **5**(4): 203-9.
- Sun, L., O. A. Adebajo, A. Koval, H. K. Anandatheerthavarada, J. Iqbal, X. Y. Wu, B. S. Moonga, X. B. Wu, G. Biswas, P. J. Bevis, M. Kumegawa, S. Epstein, C. L. Huang, N. G. Avadhani, E. Abe and M. Zaidi (2002). "A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca<sup>2+</sup> signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD<sup>+</sup> sensor." Faseb J **16**(3): 302-14.
- Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North and G. Buell (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X<sub>7</sub>)." Science **272**(5262): 735-8.
- Takada, T., K. Iida and J. Moss (1993). "Cloning and site-directed mutagenesis of human ADP-ribosylarginine hydrolase." J Biol Chem **268**(24): 17837-43.
- Takahashi, J., Y. Kagaya, I. Kato, J. Ohta, S. Isoyama, M. Miura, Y. Sugai, M. Hirose, Y. Wakayama, M. Ninomiya, J. Watanabe, S. Takasawa, H. Okamoto and K. Shirato (2003). "Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender." Biochem Biophys Res Commun **312**(2): 434-40.
- Tang, P., M. C. Hung and J. Klostergaard (1995). "ADP-ribosylation inhibitors inhibit cellular RNA synthesis but do not affect expression of manganous superoxide dismutase or heat shock protein 70 in tumor necrosis factor alpha-sensitive and -resistant tumor cells." J Interferon Cytokine Res **15**(9): 791-7.
- Teeling, J. L., R. R. French, M. S. Cragg, J. van den Brakel, M. Pluyter, H. Huang, C. Chan, P. W. Parren, C. E. Hack, M. Dechant, T. Valerius, J. G. van de Winkel and M. J. Glennie (2004). "Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas." Blood **104**(6): 1793-800.

- Terashima, M., M. Badruzzaman, M. Tsuchiya and M. Shimoyama (1996). "Exocytosis of arginine-specific ADP-ribosyltransferase and p33 induced by A23187 and calcium or serum-opsonized zymosan in chicken polymorphonuclear leukocytes." *J Biochem (Tokyo)* **120**(6): 1209-15.
- Terashima, M., C. Yamamori, M. Shimoyama and M. Tsuchiya (1998). "Suppression of cell adhesion and spreading activities of fibronectin by arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken polymorphonuclear leukocytes." *Biochim Biophys Acta* **1404**(3): 299-304.
- Tezcan-Merdol, D., T. Nyman, U. Lindberg, F. Haag, F. Koch-Nolte and M. Rhen (2001). "Actin is ADP-ribosylated by the Salmonella enterica virulence-associated protein SpvB." *Mol Microbiol* **39**(3): 606-19.
- Thiele, H.-G., R. Arndt and K. Wonigeit (1983). "RT6-2 is a nonglycosylated T-Lymphocyte surface membrane antigen anchored to the cytoskeleton." *Transplant. Proc.* **15**: 1635-1637.
- Thiele, H. G., F. Haag and F. Koch-Nolte (1997). Molecular Cloning and Characterization of the T-cell Mono(ADP-ribosyl)transferase RT6: Relationships to other mADPRTs and Possible Functions. *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)Transferases and Related Enzymes*. F. Haag and F. Koch-Nolte. New York, Plenum Press: 109-120.
- Thiele, H. G., F. Koch, A. Hamann and R. Arndt (1986). "Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT6.2." *Immunol.* **59**: 195-201.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-6.
- Tong, W. M., U. Cortes and Z. Q. Wang (2001). "Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis." *Biochim Biophys Acta* **1552**(1): 27-37.
- Tsuchiya, M., N. Hara, K. Yamada, H. Osago and M. Shimoyama (1994). "Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells." *J Biol Chem* **269**(44): 27451-27457.
- Tsuchiya, M., H. Osago, K. Yamada and M. Shimoyama (1997). "A newly identified glycosylphosphatidylinositol-anchored arginine-specific ADP-ribosyltransferase in chicken spleen." *Adv Exp Med Biol* **419**: 245-8.
- Tweten, R. K., J. T. Barbieri and R. J. Collier (1985). "Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP-ribosyltransferase activity." *J Biol Chem* **260**(19): 10392-4.
- van Driel, I. R. and J. W. Goding (1987). "Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. Primary structure deduced from cDNA clones." *J Biol Chem* **262**(10): 4882-7.
- Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak and J. B. Bolen (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>." *Cell* **55**: 301-.
- Vollmayer, P., T. Clair, J. W. Goding, K. Sano, J. Servos and H. Zimmermann (2003). "Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases." *Eur J Biochem* **270**(14): 2971-8.
- von Boehmer, H., I. Aifantis, F. Gounari, O. Azogui, L. Haughn, I. Apostolou, E. Jaeckel, F. Grassi and L. Klein (2003). "Thymic selection revisited: how essential is it?" *Immunol Rev* **191**: 62-78.
- Wang, J., E. Nemoto and G. Dennert (1996). "Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein." *J. Immunol.* **156**(8): 2819-2827.
- Wang, J., E. Nemoto and G. Dennert (1997). "Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP- ribosyltransferase." *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**: 191-201.
- Wang, J., E. Nemoto, A. Y. Kots, H. R. Kaslow and G. Dennert (1994). "Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase." *J. Immunol.* **153**(9): 4048-4058.
- Wang, J., F. Shen, W. Yan, M. Wu and M. Ratnam (1997). "Proteolysis of the carboxyl-terminal GPI signal independent of GPI modification as a mechanism for selective protein secretion." *Biochemistry* **36**(47): 14583-92.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K.

- Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Esvara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody and E. S. Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-62.
- Weill, J. C. and C. A. Reynaud (1992). "Early B-cell development in chickens, sheep and rabbits." *Curr Opin Immunol* **4**(2): 177-80.
- Whalen, B. J., D. L. Greiner, J. P. Mordes and A. A. Rossini (1994). "Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells." *J Autoimmun* **7**(6): 819-31.
- Wick, M. J., J. M. Cook and B. H. Iglewski (1992). "Structure-function analysis of exotoxin A proteins with mutations at histidine 426." *Infect Immun* **60**(3): 1128-39.
- Wick, M. J., D. W. Frank, D. G. Storey and B. H. Iglewski (1990). "Structure, function, and regulation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A." *Annu Rev Microbiol* **44**: 335-63.
- Wilson, B. A., K. A. Reich, B. R. Weinstein and R. J. Collier (1990). "Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine." *Biochemistry* **29**(37): 8643-51.
- Wilson, H. L., S. A. Wilson, A. Surprenant and R. A. North (2002). "Epithelial Membrane Proteins Induce Membrane Blebbing and Interact with the P2X7 Receptor C Terminus." *J. Biol. Chem.* **277**(37): 34017-34023.
- Yamada, K., M. Terashima, M. Shimoyama and M. Tsuchiya (2001). "Arginine-specific ADP-ribosyltransferase on the surface of gizzard smooth muscle cells and the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in maintaining the activity of this transferase." *J Biochem (Tokyo)* **130**(3): 335-40.
- Young, T. L. and R. M. Santella (1988). "Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine." *Carcinogenesis* **9**(4): 589-92.
- Zen, K. and C. A. Parkos (2003). "Leukocyte-epithelial interactions." *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 557-64.

- Zhao, Z., J. Gruszczynska-Biegala and A. Zolkiewska (2004). "ADP-ribosylation of integrin alpha7 modulates the binding of integrin alpha7beta1 to laminin." Biochem J Pt.
- Ziegler, M. (2000). "New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling." Eur J Biochem **267**(6): 1550-64.
- Zielinska, W., H. Barata and E. N. Chini (2004). "Metabolism of cyclic ADP-ribose: Zinc is an endogenous modulator of the cyclase/NAD glycohydrolase ratio of a CD38-like enzyme from human seminal fluid." Life Sci **74**(14): 1781-90.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.
- Zimmermann, H. and N. Braun (1999). "Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system." Prog Brain Res **120**: 371-85.
- Zipris, D., J. Leif, D. Deluca, M. Y. Lin, J. P. Mordes, A. A. Rossini, D. L. Greiner and B. J. Whalen (2001). "Fetal thymi from diabetes-prone but not diabetes-resistant BB/Wor rats fail to generate mature ART2+ T-cells in organ culture." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(1): 65-74.
- Zocchi, E., C. Usai, L. Guida, L. Franco, S. Bruzzone, M. Passalacqua and A. De Flora (1999). "Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization: role of NAD<sup>+</sup> transport across cell membranes." Faseb J **13**(2): 273-83.
- Zolkiewska, A. and J. Moss (1993). "Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells." J Biol Chem **268**(34): 25273-6.
- Zolkiewska, A. and J. Moss (1995). "Processing of ADP-ribosylated integrin alpha 7 in skeletal muscle myotubes." J Biol Chem **270**(16): 9227-33.
- Zolkiewska, A. and J. Moss (1997). "The alpha 7 integrin as a target protein for cell surface mono-ADP-ribosylation in muscle cells." Adv Exp Med Biol **419**: 297-303.
- Zolkiewska, A., M. S. Nightingale and J. Moss (1992). "Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11352-6.
- Zolkiewska, A., W. C. Thompson and J. Moss (1998). "Interaction of integrin alpha 7 beta 1 in C2C12 myotubes and in solution with laminin." Exp Cell Res **240**(1): 86-94.

## Anhang

|         | <i>ART2.1</i> | <i>ART2.2</i> | <i>P2X7</i> |
|---------|---------------|---------------|-------------|
| NZW     | +             | -             | +           |
| C57Bl/6 | -             | +             | P451L       |
| ART2KO  |               |               |             |
| CD38KO  |               |               |             |
| BALB/c  | (+)           | (+)           | +           |
| ART2KO  |               |               |             |
| CD38KO  |               |               |             |
| NOD     | (+)           | (+)           | +           |
| ART2KO  |               |               |             |
| CD38KO  |               |               |             |

**Tabelle 3: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Besonderheiten der ART2 und P2X7 Loci bei den in dieser Dissertation verwendeten Mausstämmen.**

Der NZW Maus fehlt aufgrund einer natürlichen Deletion das ART2.2 Gen. Die NZW Maus ist die Maus mit der höchsten bekannten ART2.1 Expression (Koch-Nolte *et al.* 1995; Matthes *et al.* 1997; Koch-Nolte *et al.* 1999).

Die C57BL/6 Maus kann aufgrund eines natürlichen Stop-Codons das ART2.1 Gen nicht exprimieren. Die C57BL/6 Maus ist die Maus mit der höchsten bekannten ART2.2 Expression (Matthes *et al.* 1997; Koch-Nolte *et al.* 1999). Zudem trägt die C57BL/6 Maus eine Punktmutation im zytosolischen Abschnitt von P2X7 (P451L), die mit einer verminderten Expression und Sensibilität einhergeht (Adriouch *et al.* 2002).

BALB/c und NOD Mäuse exprimieren beide ART2 Loci auf einem niedrigen Niveau. BALB/c und NOD Mäuse exprimieren Wildtyp P2X7 (Koch-Nolte *et al.* 1999; Adriouch *et al.* 2002). Es standen ferner ART2 Knock-out und CD38 Knock-out Mäuse zur Verfügung, die auf den C57BL/6, BALB7c oder NOD Hintergrund rückgekreuzt waren.

ART2 Knock-out Mäuse waren in der eigenen Arbeitsgruppe durch homologe Rekombination der ART2.1 und ART2.2 Loci generiert und über 12 Generationen auf den C57BL/6 oder den BALBc Hintergrund rückgekreuzt worden (Ohlrogge *et al.* 2002).

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Koch-Nolte. Ich danke ihm für die Überlassung des interessanten und aussichtsreichen Themas, seine kontinuierliche Anleitung und Hilfe, seine allseitige Unterstützung in allen Phasen der Arbeit und vor allem für seine ständige und freundschaftliche Mühe um mein Fortkommen.

Frau M. Nissen danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die angewandten Techniken und die praktische Unterstützung bei meiner Arbeit. Für die Hilfestellung bei den Apoptose Assay möchte ich mich bei Frau D. Freese bedanken. Mein Dank gilt ferner Frau F. Braasch für die Bereitstellung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern und für die Hilfestellung bei den Experimenten zum Einfluss von CD38 und zur Reversion der ADP-Ribosylierung.

Herrn Prof. Dr. F. Haag, Herrn Dr. S. Adriouch, Herrn P. Bannas, Herrn Dr. G. Glowacki, Herrn W. Köstner, Frau I. Parusel, Herrn P. Dießenbacher, Herrn F. Scheuplein und Herrn Dr. S. Rothenburg danke ich für ihre Ratschläge und freundliche Unterstützung, sowie für den permanenten kritischen Gedankenaustausch.

Bei allen Mitgliedern des Diagnostiklabors und des Forschungslabors des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf sowie bei Herrn Prof. Dr. B. Fleischer bedanke ich mich für die Unterstützung, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor.

Herrn Dr. E. Leiter danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine immense Unterstützung an den Jackson Labs in Bar Harbor, Maine, USA. Mein Dank gilt auch Prof. B. Kaspers in München und Prof. DeFlora in Genua für ihre Gastfreundschaft und Unterstützung bei meinen Aufenthalten.

Ich danke Dorothee Schmitt für ihre liebevolle Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion sowie für die Hilfe bei den Korrekturen der Dissertationsschrift.

Für die Ermunterung zur wissenschaftlichen Arbeit, das kontinuierliche Interesse und die Hilfe bei den Korrekturen danke ich meinen Eltern Barbara Krebs und Dr. Gerhard Krebs.

Für finanzielle Unterstützung möchte ich der Werner Otto Stiftung und dem Boehringer Ingelheim Fonds danken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Christian Franz Krebs  
Geburtsdatum: 11. Januar 1977 in Köln  
Adresse: Rellinger Str. 53 in 20257 Hamburg  
E-Mail: ckrebs@uke.uni-hamburg.de

### Schulbildung:

1983-1987 „Dietrich-Bonhoeffer-Schule“ Grundschule in Pulheim  
1988-1996 „Geschwister-Scholl-Schule“ Gymnasium in Pulheim  
1996 Abitur mit der Note 1,9

### Zivildienst:

1996-1997 Rettungssanitäter bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Frechen

### Medizinstudium:

1997-1999 an der Universität Göttingen  
1999 Physikum mit der Note 2,7  
seit 1999 an der Universität Hamburg  
2000 Erstes Staatsexamen mit der Note 3,0  
2004 Zweites Staatsexamen mit der Note 2,0  
2005 Drittes Staatsexamen mit der Note 2,0

### Dissertation:

Seit 2001 am Institut für Immunologie bei Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte in Hamburg zum Thema:  
“ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auf der Zellmembran von Lymphozyten“

Februar 2002: Forschungsaufenthalt bei Prof. Bernd Kaspers, Universität München

September 2002 – August 2003 Stipendium der Werner-Otto-Stiftung

September/Okttober 2003 Reisekostenstipendium der Boehringer Ingelheim Fonds

### Praktika und Famulaturen:

1998 Pflegepraktikum an der Universität Bonn  
1998/99 Seminar „Einführung in die experimentellen und klinischen Neurowissenschaften“ in Göttingen über 2 Semester  
2000 Famulatur im Bereich der Inneren Medizin am Alten Eichen Hospital in Hamburg  
1998-1999 Nachdienste als studentische Hilfskraft an der Universität Bonn  
2000-2001 Nachdienste als studentische Hilfskraft am Universität Klinikum in Hamburg  
2000 Famulatur im Bereich der Unfallchirurgie am Marienkrankenhaus in Hamburg  
2004: PJ Innere Medizin auf der Gastroenterologieschen Station und auf der Nephrologischen Station am UKE, Hamburg  
2004: PJ Chirurgie auf der Unfall- und Neurochirurgischen Station am Klinikum in Hamburg-Rissen und auf der Allgemeinchirurgischen Station am Fraser Coast Hospital, Australien  
2004-2005: PJ Neurologie auf der Privatstation am UKE, Hamburg

### Auslandsaufenthalte:

1992 Englischkurs, Brighton, England  
2001 Forschungsaufenthalt bei Prof. Antonio DeFlora, Biological Chemistry, Genoa, Italy  
2002 Famulatur im Department of Cardiology, Exeter, England  
2003 Forschungsaufenthalt bei Edward Leiter an den Jackson Labs, Bar Harbor, USA  
2004 Chirurgie im Praktischen Jahr am Fraser Coast Hospital, Queensland, Australien

### Berufserfahrung:

seit Juni 2005 Beschäftigung als Assistenzarzt an der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Nephrologie/Rheumatologie und Sektion Endokrinologie) am Universitätsklinikum Hamburg

### Fremdsprachen:

Englisch, Französisch

Hamburg, 27. Januar 2006

## Publikationen und Präsentationen

### Publikationen:

“Flow cytometric and immunoBlot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for etheno-adenosine”

**C. Krebs**, W. Koestner, M. Nissen, V. Welge, I. Parusel, F. Malavasi, E. H. Leiter, R. M. Santella, F. Haag, & F. Koch-Nolte  
Anal. Biochem. 314 108–115 (2003)

“NAD-induced T cell death: ART2-catalyzed ADP-ribosylation activates the cytolytic P2X7 receptor”

M. Seman, S. Adriouch, F. Scheuplein, **C. Krebs**, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, & F. Koch-Nolte  
Immunity 19(4):571-582 (2003)

"CD38 controls ART2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins."

**C. Krebs**, S. Adriouch, F. Braasch, W. Koestner, E.H. Leiter, F. Lund, N. Oppenheimer, M. Seman, F. Haag, & F. Koch-Nolte  
J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3298-305.

### Abstracts und Präsentationen:

2001 Poster: Deutsche Gesellschaft für Immunologie in Dresden, Germany:

W. Ohlrogge, M. Seman, S. Adriouch, **C. Krebs**, F. Haag, & F. Koch-Nolte: “Extracellular NAD induces apoptosis of peripheral mouse T cells via the GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2”  
Immunobiol. 204, S220 (2001)

2001 Präsentation: Tagung der Norddeutschen Immunologen in Borstel, Germany:

**C. Krebs**, M. Nissen, V. Welge, F. Haag & F. Koch-Nolte: “Regulation immune responses by extracellular NAD: use of a FACS-assay to monitor ADP-ribosylation of T cell surface proteins”

2002 Präsentation: Deutsche Gesellschaft für Immunologie in Halle, Germany:

**C. Krebs**, W. Köstner, M. Nissen, V. Welge, D. Freese, F. Haag & F. Koch-Nolte: “A FACS-assay to monitor the activity of GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferases on lymphocytes”

2003 Poster: FEBS forum of young scientists in Brussels, Belgium:

**C. Krebs**, F. Braasch, G. Glowacki, G. Dubberke, F. Haag, & F. Koch-Nolte:  
“Immunofluorescence and Immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation“

2003 Poster: DGfI Tagung in Berlin:

F. Scheuplein, **C. Krebs**, S. Adriouch, M. Seman, F. Haag & F. Koch-Nolte: „Triggering apoptosis of naïve T cells by ADP-ribosylation of the P2X7 Purinoceptor”

2004 Poster: 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS in Montreal:

F. Schuplein, **C. Krebs**, S. Adriouch, M. Seman, F. Haag & F. Koch-Nolte: “Comparative analyses of NAD- and ATP-induced apoptosis of naïve T cells”

2005 Poster: Deutsche Gesellschaft für Immunologie in Kiel:

F. Scheuplein, **C. Krebs**, S. Adriouch, P. Bannas, M. Seman, F. Haag & F. Koch-Nolte:  
“Activation of the P2X7 purinoceptor on murine T cells by NAD and ATP released from injured cells”

### Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: