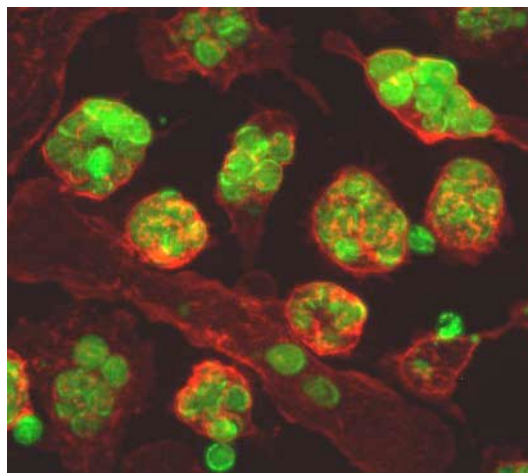


Institut für Immunologie, UKE, Hamburg

Molekulare Mechanismen und Funktion der durch die ADP-Ribosyltransferase ART2 vermittelten Apoptose muriner T-Zellen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von Felix Scheuplein

Hamburg, Dezember 2005

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. F. KOCH-NOLTE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. BRETTING
Tag der Disputation: 03. Februar 2006

Hamburg, den 17. Januar 2006



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg wurde in der Zeit von April 2002 bis Dezember 2005 unter der Anleitung von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte am Institut für Immunologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf durchgeführt.

Meinem Großvater Walther Werg (1910-2001)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> | 3 |
| <i>Zusammenfassung</i> | 9 |
| <i>Abkürzungen</i> | 11 |
| <i>Anglizismen</i> | 13 |
| 1 Einleitung | 15 |
| 1.1 ADP-Ribosylierung | 15 |
| 1.1.1 Enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung | 15 |
| 1.1.2 ADP-Ribosyltransferasen bei Prokaryoten | 17 |
| 1.1.3 Überblick über die ADP-Ribosyltransferasen höherer Lebewesen | 18 |
| 1.1.4 Rolle von T-Zellen und ART2 im Immunsystem | 20 |
| 1.1.5 ART2 und Autoimmunerkrankungen | 21 |
| 1.2 Purinorezeptoren | 23 |
| 1.2.1 P2X-Familie | 23 |
| 1.2.2 P2X7 | 24 |
| 1.3 ATP und NAD | 25 |
| 1.4 Apoptose | 26 |
| 1.5 Phagozytose apoptotischer Zellen | 28 |
| 1.6 Transgene- und Knockout-Mausmodelle | 31 |
| 1.6.1 Generierung von Knockout-Mäusen | 31 |
| 1.6.2 Generierung transgener Mäuse | 32 |
| 1.7 Maus-Modelle zur <i>in vivo</i> Untersuchung der Rolle von ART2 bei Immunfunktionen | 34 |
| 1.7.1 Autoimmuner Diabetes bei NOD Mäusen | 34 |
| 1.7.2 Immunisierung | 35 |
| 1.7.3 Concanavalin A induzierte Autoimmunhepatitis | 35 |
| 1.8 Zielsetzung der Arbeit | 37 |
| 2 Material und Methoden | 38 |
| 2.1 Materialien | 38 |
| 2.1.1 Laborgeräte | 38 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien | 38 |
| 2.1.3 Mausstämme | 39 |
| 2.1.4 Zelllinien | 40 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.5 | Antikörper | 40 |
| 2.1.6 | Chemikalien | 41 |
| 2.1.7 | Enzyme | 42 |
| 2.1.8 | Primer | 43 |
| 2.1.9 | Medien und Lösungen | 44 |
| 2.1.9.1 | Zellkulturmedium für Lymphozyten und Lymphomzellen | 44 |
| 2.1.9.2 | Gey's Puffer für Erythrozytenlyse | 44 |
| 2.1.9.3 | Isolierung genomischer DNA | 44 |
| 2.1.9.4 | Isolierung von Plasmid-DNA | 44 |
| 2.1.9.5 | Isolierung von DNA aus Agarosegelen | 45 |
| 2.1.9.6 | SDS-Page und Westernblot | 45 |
| 2.1.9.7 | Southernblot | 45 |
| 2.1.9.8 | ELISA | 45 |
| 2.1.9.9 | Patch-Clamp | 46 |
| 2.1.9.10 | Bindepuffer für AnnexinV-Bindung | 46 |
| 2.1.10 | Vektoren für die Generierung transgener Mäuse | 46 |
| 2.1.11 | Substrate für ART2 und Agonist und Inhibitor von P2X7 | 46 |
| 2.2 | Methoden | 48 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 48 |
| 2.2.1.1 | Isolierung genomischer DNA aus Gewebe | 48 |
| 2.2.1.2 | Isolierung von Plasmid-DNA | 48 |
| 2.2.1.3 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 49 |
| 2.2.1.4 | E.coli Transformation | 49 |
| 2.2.1.5 | DNA-Sequenzierung | 50 |
| 2.2.1.6 | Herstellung einer DNA-Sonde | 50 |
| 2.2.1.7 | Markierung der DNA-Sonden | 50 |
| 2.2.1.8 | Southernblot | 51 |
| 2.2.2 | Zellbiologische Methoden | 51 |
| 2.2.2.1 | Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus | 51 |
| 2.2.2.2 | Präparation muriner Milzzellen | 52 |
| 2.2.2.3 | Depletion der B-Zellen | 52 |
| 2.2.2.4 | Präparation von Peritonealmakrophagen | 53 |
| 2.2.2.5 | Präparation von Leberlymphozyten | 53 |
| 2.2.2.6 | Präparation von Lymphozyten aus peripherem Blut | 53 |
| 2.2.2.7 | Propagierung von Lymphomzellen | 54 |
| 2.2.3 | Immunologische Methoden | 54 |
| 2.2.3.1 | „Fluorescence Activated Cell Sorting“ FACS | 54 |
| 2.2.3.2 | Messung der ART2-Aktivität | 55 |
| 2.2.3.3 | Apoptose Assays | 55 |
| 2.2.3.4 | Calciumflux-Untersuchung | 56 |
| 2.2.3.5 | Nachweis der LDH-Freisetzung | 57 |

| | | |
|------------|---|------------|
| | ART2-induzierte Apoptose | 5 |
| 2.2.3.6 | Westernblot Analysen | 57 |
| 2.2.3.7 | ELISA | 58 |
| 2.2.3.8 | Patch-Clamp Untersuchung | 59 |
| 3 | Ergebnisse | 60 |
| 3.1 | Molekulare Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) von T-Zellen | 61 |
| 3.1.1 | Nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Propidiumjodid-Aufnahme | 61 |
| 3.1.1.1 | Dosis-Wirkungs-Analyse von NAD und ATP | 62 |
| 3.1.1.2 | Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin | 63 |
| 3.1.1.3 | Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin | 65 |
| 3.1.1.4 | Reversibilität des „PS-Flashens“ nach Entfernen der Agonisten NAD und ATP | 66 |
| 3.1.1.5 | Blockade durch monoklonale Antikörper, KN62 und etheno-NAD | 68 |
| 3.1.1.6 | Reversion der Exponierung von Phosphatidylserin nach NAD-Behandlung | 69 |
| 3.1.1.7 | Abspaltung von ART2 nach Aktivierung von T-Zellen | 70 |
| 3.1.2 | Nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Aufnahme von Ethidiumbromid | 73 |
| 3.1.3 | Calciumflux nach NAD- und ATP-Behandlung | 75 |
| 3.1.4 | Morphologische Veränderungen | 76 |
| 3.1.5 | Aktivierung von Caspasen | 77 |
| 3.1.5.1 | Kinetik der NAD und ATP-vermittelten Caspaseaktivierung | 78 |
| 3.1.5.2 | Aktivierung von Caspase-1 | 80 |
| 3.1.5.3 | Aktivierung von Caspasen und PS-Flashing | 82 |
| 3.1.6 | Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials | 83 |
| 3.1.7 | DNA-Fragmentierung | 84 |
| 3.1.8 | Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase | 85 |
| 3.1.9 | Abstoßen von L-Selektin (CD62L) | 87 |
| 3.1.10 | Verfolgung der ADP-Ribosylierung von Zellmembranproteinen | 88 |
| 3.1.10.1 | NAD Analogon: etheno-NAD | 88 |
| 3.1.10.2 | Radioaktiv markiertes NAD als Substrat | 89 |
| 3.1.11 | Analyse der ART2-Expression und Sensitivität gegenüber NAD und ATP in NOD Mäusen und kongenen Mausstämmen | 91 |
| 3.2 | Endogene Quellen von NAD und ATP | 94 |
| 3.2.1 | Erythrozytenlysate | 94 |
| 3.2.1.1 | Dosis-Wirkungs-Analysen | 95 |
| 3.2.1.2 | Stabilität der Purine in den Lysaten | 97 |
| 3.2.2 | Freisetzung von NAD während der Präparation von T-Zellen | 98 |
| 3.2.2.1 | Spontane Apoptose in verschiedenen Mausstämmen | 99 |
| 3.2.2.2 | Temperaturabhängige Blockade der P2X7-Aktivierung | 100 |
| 3.2.2.3 | Untersuchung der Blockade des Hintergrunds an spontan Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen mittels etheno-NAD und KN62 | 102 |
| 3.3 | Schicksal der durch Purine in die Apoptose getriebenen Zellen | 104 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.1 | <i>In vitro</i> Phagozytose apoptotischer T-Zellen durch kultivierte Peritonealmakrophagen | 104 |
| 3.3.1.1 | Phagozytose NAD- und ATP-behandelter T-Zellen von Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen | 104 |
| 3.3.1.2 | Kinetik der Phagozytose | 109 |
| 3.3.1.3 | Quantifizierung der Phagozytose | 112 |
| 3.3.1.4 | Auswirkung kurzfristiger „Pulse-Chase“-Behandlung von T-Zellen mit NAD und ATP auf die Phagozytose | 113 |
| 3.3.1.5 | Selektive Phagozytose von Wildtyp T-Zellen | 114 |
| 3.3.2 | Phagozytose apoptotischer Zellen durch frisch isolierte Peritonealmakrophagen in Suspension | 117 |
| 3.3.3 | <i>In vivo</i> Phagozytose i.p. injizierter apoptotischer T-Zellen durch residente Peritonealmakrophagen | 118 |
| 3.3.4 | Schicksal nach i.v. Injektion apoptotischer T-Zellen | 120 |
| 3.4 | Zellkulturmodelle der NAD-vermittelten durch ART2 katalysierten | |
| | Signaltransduktion | 123 |
| 3.4.1 | Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien | 123 |
| 3.4.2 | MD27-Lymphomzellen | 127 |
| 3.4.2.1 | Vergleichende Untersuchung von MD27 und T-Zellen bezüglich Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP | 127 |
| 3.4.2.2 | Untersuchung der Reversibilität nach Entfernen der Agonisten NAD und ATP | 129 |
| 3.4.2.3 | Blockade des NAD-induzierten nach außen Kehrens von Phosphatidylserin bei MD27-Zellen | 130 |
| 3.4.2.4 | Untersuchung der Zellzyklusabhängigkeit des NAD-induzierten nach außen Kehrens von Phosphatidylserin bei MD27-Zellen | 130 |
| 3.4.3 | YAC-1.HH-Zellen | 133 |
| 3.4.3.1 | Vergleichende Untersuchung von YAC-1.H- und T-Zellen bezüglich Empfindlichkeit gegenüber NAD | 133 |
| 3.4.3.2 | Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin und morphologischer Veränderungen bei YAC-1.HH-Zellen | 135 |
| 3.4.3.3 | Calciumflux-Untersuchung nach ATP- und NAD-Behandlung bei YAC-1.HH-Zellen | 136 |
| 3.4.3.4 | Abstoßen von CD62L nach Behandlung mit NAD oder dem Phorbolster PMA | 137 |
| 3.4.3.5 | Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber NAD durch Transfektion von P2X7 | 138 |
| 3.4.3.6 | Patch-Clamp-Untersuchung bei YAC-1.HH-Zellen | 139 |
| 3.5 | Herausforderung des Immunsystems ART2-defizienter Tiere | 141 |
| 3.5.1 | Immunisierung mit einem T-Zell abhängigen Antigen: Ovalbumin-TNP | 141 |
| 3.5.2 | Superantigen (SEB) vermittelte Expansion und Deflation der den V β 8 T-Zellrezeptor exprimierenden T-Zell-Population | 142 |
| 3.5.3 | Concanavalin A induzierte Autoimmunhepatitis | 145 |
| 3.5.4 | Infektion von ART2-defizienten und Wildtyp BALB/c Mäusen mit <i>Plasmodium berghei</i> | 148 |
| 3.6 | Generierung ART2-transgener Mäuse | 151 |

| | | |
|------------|---|------------|
| | ART2-induzierte Apoptose | 7 |
| 3.6.1 | Transgene ART2 mit GPI-Anker | 152 |
| 3.6.2 | Transgene ART2 mit der Transmembrandomäne des CD8b | 155 |
| 4 | <i>Diskussion</i> | 156 |
| 4.1 | Molekulare Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) | 156 |
| 4.1.1 | Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch ATP und NAD | 156 |
| | <i>Molekularer Mechanismus</i> | 156 |
| | <i>Vergleich der Aktivierung von P2X7 durch NAD und ATP</i> | 157 |
| 4.1.2 | Apoptotische und nekrotische Merkmale des NICD | 161 |
| | <i>Klassische Merkmale der Apoptose</i> | 161 |
| | <i>Klassische Merkmale der Nekrose</i> | 162 |
| 4.1.3 | Kurzfristige Aktivierung des P2X7 Rezeptors: Signaltransduktion, die nicht zum Zelltod führt. | 163 |
| | <i>Nach außen Kehren von Phosphatidylserin</i> | 163 |
| | <i>Calciumflux</i> | 164 |
| | <i>Abstoßen von CD62L</i> | 164 |
| | <i>Porenbildung</i> | 165 |
| 4.2 | Endogene Quellen von NAD und ATP | 167 |
| 4.2.1 | Erythrozytenlysate | 167 |
| 4.2.2 | Freisetzung durch beschädigte Zellen | 168 |
| 4.2.3 | Mögliche Folgen der Freisetzung von NAD | 169 |
| | <i>Abschließende Betrachtung zu Kapitel 4.2</i> | 170 |
| 4.3 | Schicksal der durch Purine in die Apoptose getriebenen Zellen | 171 |
| | <i>In vitro Phagozytose durch kultivierte Peritonealmakrophagen</i> | 171 |
| | <i>Phagozytose durch residente Peritonealmakrophagen</i> | 171 |
| | <i>In vivo Phagozytose i.v. gespritzter Zellen.</i> | 172 |
| | <i>Abschließende Betrachtung zu Kapitel 4.3</i> | 172 |
| 4.4 | Zellkulturmodelle | 173 |
| | <i>Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien</i> | 173 |
| | <i>MD27</i> | 173 |
| | <i>YAC-1.HH</i> | 174 |

| | |
|---|------------|
| 4.5 Herausforderung des Immunsystems | 176 |
| <i>Immunisierungen</i> | <i>176</i> |
| <i>Infektion mit Plasmodium berghei</i> | <i>176</i> |
| 4.6 ART2-transgene Mäuse | 177 |
| 4.7 Biologische Bedeutung von ART2 | 178 |
| 4.8 Ausblick | 180 |
| <i>Literaturverzeichnis</i> | <i>181</i> |
| <i>Danksagung</i> | <i>191</i> |

Zusammenfassung

Die NAD-abhängige ADP-Ribosylierung ist - ähnlich der Phosphorylierung - eine posttranslationale Protein-Modifikation. Über diesen Mechanismus entfalten Cholera-, Pertussis- und andere bakterielle Toxine ihre pathogene Wirkung. Unsere Arbeitsgruppe hat toxinverwandte Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART1-ART5) bei Säugetieren kloniert, die als sezernierte oder GPI-verankerte Ektoenzyme exprimiert werden. Diese Arbeit konzentriert sich auf die murine ADP-Ribosyltransferase ART2, die von ruhenden T-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird und nach T-Zell Aktivierung von der Zelloberfläche abgestoßen werden kann. Die Inkubation von ART2-exprimierenden T-Zellen mit NAD, dem ART-Substrat, führt zur ADP-Ribosylierung wichtiger Membranproteine und kann die Apoptose der Zelle auslösen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen des NAD induzierten Zelltodes (NICD) untersucht. Durch vergleichende Untersuchungen von Wildtyp- und ART2 defizienten Mäusen und mit Hilfe von Blockade-Experimenten mittels monoklonaler Antikörper oder spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass ART2 und der Purinozeptor P2X7 essentiell für die NAD-vermittelte Signaltransduktion sind. P2X7 ist ein ATP-gesteuerter nicht-selektiver Kationen-Kanal, der als Membranprotein die Cytoplasmamembran zweimal durchspannt. Es konnte gezeigt werden, dass durch ART2 katalysierte ADP-ribosylierung von P2X7 ein kovalent gebundener Ligand präpariert, und P2X7 hierdurch dauerhaft aktiviert wird. Mit Dosis-Wirkungs-Analysen konnte gezeigt werden, dass NAD (über die ART2-katalysierte ADP-Ribosylierung) P2X7 bereits in 10-fach geringerer Konzentration aktivieren kann als der lösliche Ligand ATP. Pulse-Chase-Experimente zeigten, dass das Entfernen von ATP nach kurzen Inkubationen zur Deaktivierung von P2X7 führt. Kurze Inkubationen mit NAD hingegen führen durch ADP-Ribosylierung zur Bildung eines kovalent gebundenen Liganden, der auch nach Entfernen des NAD P2X7 dauerhaft aktiviert. ATP- und NAD-vermittelte Aktivierung von P2X7 führen zu klassischen Zeichen der T-Zell Apoptose: das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin von der Innenseite der Zytoplasmamembran auf die Außenseite, Schrumpfen der Zellen, Caspaseaktivierung, Zusammenbruch der mitochondrialen Membranintegrität und Fragmentierung der DNA. Mit Hilfe von Durchfluss-zytometrischen Echt-Zeit-Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, dass anders als bei klassischen Apoptosewegen das nach außen Kehren des Phosphatidylserins bereits nach wenigen Sekunden induziert wird. Darüber hinaus wurden zwei Lymphomzelllinien identifiziert, die sich als Zellkulturmodelle für den NAD induzierten Zelltod eignen und nützliche Werkzeuge für weiterführende Untersuchungen darstellen.

Es ist denkbar dass NAD und ATP aus lysierten oder beschädigten Zellen freigesetzt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Erythrozytenlysate ausreichende Mengen an NAD und auch ATP enthalten um P2X7 zu aktivieren. Durch vergleichende Untersuchungen von Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass NAD auch in höheren Verdünnungen der Lysate wirksam war, während nur stark konzentrierte Lysate ausreichende ATP Konzentrationen enthielten. Beide Nukleotide unterlagen in den Lysaten einer raschen

Degradation. Es konnte ferner gezeigt werden, dass bereits bei der Präparation von T-Zellen aus Lymphknoten NAD, nicht aber ATP, in ausreichenden Mengen zur Aktivierung von P2X7 freigesetzt werden. Vergleichende Untersuchungen eingezüchteter Mausstämmen zeigten, dass der Anteil „spontan“ apoptotischer Zellen in frischen T-Zell-Präparationen mit dem Expressionsniveau bzw. Genotyp von ART2 und P2X7 eng korreliert.

Das übliche Schicksal apoptotischer Zellen in vivo ist die Entfernung durch Phagozyten – noch bevor das Todesprogramm vollständig abgelaufen ist. Dabei wird das nach außen Kehren von Phosphatidylserin als ein „friß mich“-Signal für Makrophagen gewertet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Zellen nach Aktivierung von P2X7 durch NAD oder ATP durch Peritonealmakrophagen tatsächlich innerhalb von einer Stunde phagozytiert werden.

ART2-defiziente Mäuse, die sich unter sterilen Haltungsbedingungen normal entwickeln, wurden in Pilotexperimenten durch Immunisierung herausgefordert. Dabei reagierten ART2-defiziente Tiere weitgehend normal mit der Produktion von Ovalbumin-TNP-spezifischen Antikörpern, mit der Superantigen induzierten Proliferation und Anergie von T-Zellen und mit der Concanavalin A induzierten Hepatitis. In einem Malaria-Infektionsmodell zeigten ART2-defiziente Tiere eine leicht verzögerte Parasitämie und eine leicht erhöhte Überlebensdauer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, dass der NAD induzierte Zelltod ein Mechanismus für die Eliminierung von naiven T-Zellen in Situationen von Gewebeverletzungen oder in Entzündungsherden sein könnte. Bereits aktivierte T-Zellen, die ART2 von der Oberfläche abgestoßen haben, sind resistent gegenüber extrazellulärem NAD, während potentiell autoreaktive Bystanderzellen ART2 auf der Zelloberfläche tragen und somit eliminiert werden können.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Scheuplein F, Adriouch S, Glowacki G, Haag F, Seman M, Koch-Nolte F.

“Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.“

Ann N Y Acad Sci. 2003 Dec;1010:296-9.

F. Scheuplein, C. Krebs, S. Adriouch, M. Seman, F. Haag, F. Koch-Nolte

“Comparative analyses of NAD and ATP induced apoptosis of naïve T cells”

In: Immunology 2004; Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congress of Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (ISBN:88-758-7070-5) : 505-510 2004

Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F. **“NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor.“**

Immunity. 2003 Oct;19(4):571-82.

Haag F, Freese D, Scheuplein F, Ohlrogge W, Adriouch S, Seman M, Koch-Nolte F

“T Cells of Different Developmental Stages Differ in Sensitivity to Apoptosis Induced by Extracellular NAD” Dev. Imm. 2002; Vol 9(4): 197-202

Abkürzungen

| | |
|-------|-------------------------------------|
| AIF | Apoptosis inducing factor |
| APC | Allophycocyanin |
| ART | ADP-Ribosyltransferase |
| ATCC | American type culture collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | bovine serum albumin |
| CAD | Caspase activated DNase |
| ConA | Concanavalin A |
| Da | Dalton |
| DISC | Death inducing signalling complex |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| EndoG | Endonuklease G |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FITC | Fluoresceinthiocyanat |
| FSC | Forward scatter |
| GPI | Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| ICE | Interleukin-1 converting enzyme |
| Ig | Immunglobulin |

| | |
|----------|--|
| K.O. | Knockout |
| kb | Kilobase |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| LDS | Lithiumdodecylsulfat |
| MDR | multi drug resistance |
| n.A. | numerische Apertur |
| NAD | Nikotinamid Adenin Dinukleotid |
| NADase | NAD-Glykohydrolase |
| NICD | NAD induced cell death |
| PARP | Poly-ADP-Ribosyltransferase |
| PCD | Programmed cell death |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | Phycoerythrin |
| PI | Propidiumjodid |
| PS | Phosphatidylserin |
| s.c. | subcutan |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEB | Staphylococcus aureus Enterotoxin B |
| slg | Zelloberflächenimmunglobulin (surface Ig) |
| SSC | Sidescatter |
| TACE | Tumor-Necrosis-faktor-alpha converting enzyme |

Anglizismen

| | |
|---------------------|---|
| Alignment | Paarweise Anordnung mehrerer DNA- oder Proteinsequenzen |
| Beads | Kügelchen |
| Blebbing | Blasenwerfen der Zytoplasmamembran |
| Bystander T-Zelle | Antigen-unspezifische T-Zellen, die sich in räumlicher Nähe einer Immunreaktion Antigen-spezifischer T-Zellen aufhalten |
| Clearance | Beseitigung |
| Coaten | Protein oder Antikörper auf einer Kunststoffoberfläche immobilisieren |
| Dotplot | Punktwolken-Darstellung von zwei Parametern einer FACS-Analyse |
| downstream effector | Effektor, der in einer Signalkaskade weiter unten steht |
| FLAG-Tag | rekombinant eingefügtes Epitop, das die Erkennung eines Proteins durch einen gegen das Epitop gerichteten Antikörper ermöglicht |
| Forwardscatter | Vorwärtsstreuung; lässt in einer FACS-Analyse auf die Größe von Zellen schließen |
| Gate setzen, Gaten | Eingrenzung einer Zellpopulation bei FACS-Analysen |
| homing | gezieltes Wanderungsverhalten von Lymphozyten in bestimmte Gewebe |
| Knockout | gezieltes Ausschalten eines Gens in der Keimbahn eines Organismus |
| Messenger | Botenstoff |
| Panel | Feld |
| Patch-Clamp | elektrophysiologische Messmethode, mit der die Öffnung von Membrankanälen bestimmt werden kann |
| PS-Flashing | das nach außen Kehren der Membranlipids Phosphatidylserin |

| | |
|------------------------|--|
| Pulse-Chase-Experiment | Impuls-Verfolgungs-Experiment. Nach einem kurzer Exposition von Zellen mit einem Agonisten, werden die Folgen der Exposition zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt |
| Shedding | Abspaltung von Zelloberflächenproteinen und Freisetzung in den Zellüberstand |
| Sidescatter | Seitwärtsstreuung; lässt in einer FACS-Analyse auf die Granularität von Zellen schließen |

1 Einleitung

1.1 ADP-Ribosylierung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Funktion der ADP-Ribosyltransferase ART2 auf murinen T-Zellen untersucht. Dieses erste Kapitel soll einen Überblick über den Mechanismus der ADP-Ribosylierung sowie über die Familie der ADP-Ribosyltransferasen und deren Funktion bei Pro- und Eukaryonten vermitteln.

1.1.1 Enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung

ADP-Ribosylierung ist, wie auch die Phosphorylierung, eine posttranslationale Proteinmodifikation. Ekto-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) und bakterielle ADP-Ribosyltransferasen binden β -NAD⁺ und katalysieren die Übertragung der ADP-Ribosegruppe auf eine spezifische Zielaminosäure (Jacobson and Jacobson 1989; Aktories 1991). Hierbei wird Nikotinamid freigesetzt. Die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und der Ribosegruppe des NAD produziert eine freie Energie von $-34,3$ kJ/mol (Zatman, Kaplan et al. 1953). Es handelt sich also um eine hoch energetische Bindung. Die Energie der N-glykosidischen Bindung wird verwendet, um den Transfer der ADP-Ribosegruppe zu katalysieren. In **Abbildung 1** ist die enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung schematisch dargestellt.

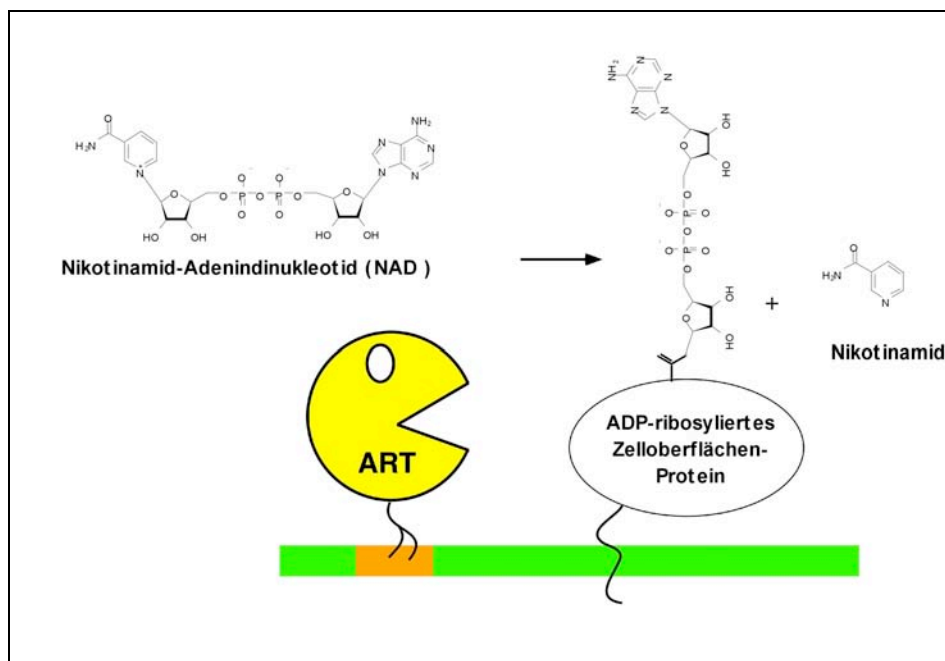


Abb. 1: ADP-Ribosylierung. Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe von β -NAD⁺ auf eine Seitenkette im Zielprotein übertragen. Dabei wird Nikotinamid freigesetzt. Dieser Prozess wird durch Ekto-ADP-Ribosyltransferasen katalysiert. Die meisten Vertebraten-ARTs sind Arginin-spezifisch.

Verschiedene ARTs ADP-ribosylieren die Akzeptoraminosäuren Arginin, Zystein, Asparagin, Diphtamid (modifiziertes Histidin) und Glutamat (Koch-Nolte and Haag 1997). Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der ADP-Ribosyltransferasen, die durch kristallographische

Röntgenstrukturanalysen des ART2 der Ratte (RT6) und bakterieller ADP-Ribosyltransferasen aufgeklärt wurde, wird ART2 in schematischen Zeichnungen als „Pacman“ dargestellt (Choe, Bennett et al. 1992; Sixma, Kalk et al. 1993; Stein, Boodhoo et al. 1994; Mueller-Dieckmann, Ritter et al. 2002). In **Abbildung 2** ist die Struktur der Ratten ART2 dargestellt.

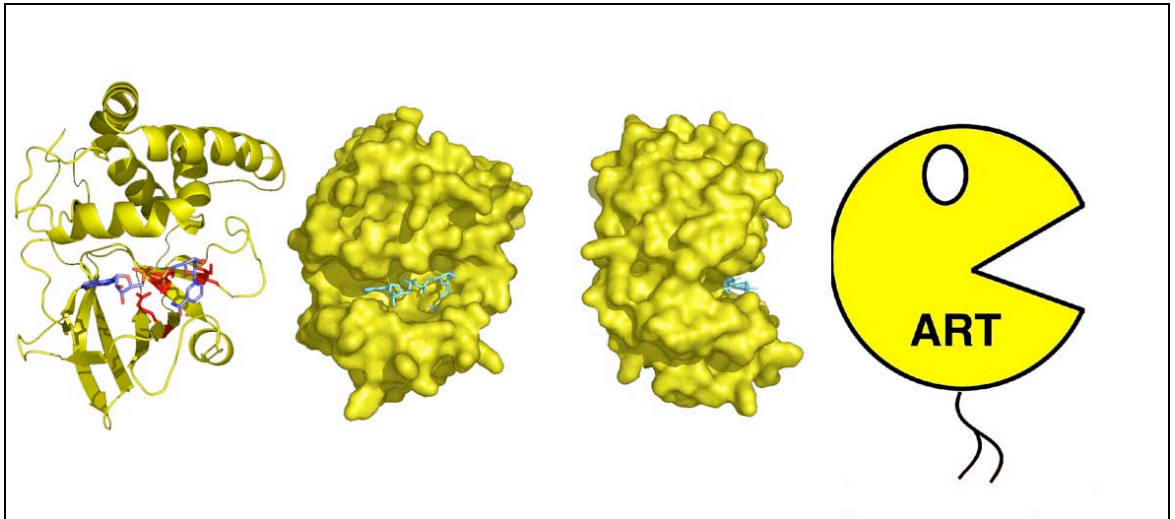


Abb. 2: Tertiärstruktur von RT6 (Ratten ART2). Gezeigt ist die Tertiärstruktur von Ratten ART2, die kristallographisch aufgeklärt wurde. N-terminale und C-terminale Domänen bilden eine Art „Oberkiefer“ und „Unterkiefer“, daher werden in schematischen Schaubildern ARTs als „Pacman“ dargestellt. NAD wurde mit ART2 Kokristallisiert und liegt im „Mund“ des „Pacmans“. Die katalytischen Aminosäuren sind in der Darstellung links rot markiert.

Einige ARTs, wie Cholera-Toxin, Pertussis-Toxin und Ratten ART2 transferieren die ADP-Ribosegruppe neben Zielaminosäuren auch auf Wasser, weisen also zusätzlich auch eine NAD-Glycohydrolase-Aktivität auf (Haag, Koch-Nolte et al. 1997).

Wie bei der Phosphorylierung kann die Funktion des modifizierten Proteins durch ADP-Ribosylierung modifiziert werden. So wurde die ADP-Ribosylierung erstmalig als Mechanismus der Toxizität des Diphtherie-Toxins beschrieben, welches eine modifizierte Aminosäure des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF2) ADP-ribosyliert und dadurch die Proteinsynthese in den betroffenen Zellen blockiert (Honjo, Nishizuka et al. 1968). Ebenfalls der Phosphorylierung ähnlich ist auch die ADP-Ribosylierung ein reversibler Prozess (Ludden 1994; Zolkiewska and Moss 1997). Die Entfernung des ADP-Riboserestes kann durch ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) oder Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPPs) katalysiert werden. Durch die ADP-Ribosylhydrolasen wird die gesamte ADP-Ribosegruppe vom Zielprotein abgetrennt (Moss, Zolkiewska et al. 1997). Andererseits wird durch die NPPs die energiereiche Bindung zwischen den beiden Phosphatgruppen des ADP-Riboserestes gespalten, so dass ein Ribosephosphat-Rest am modifizierten Protein zurückbleibt. Dieses ist dann einer erneuten ADP-Ribosylierung nicht mehr zugänglich (Vollmayer, Clair et al. 2003). Die Möglichkeiten der Entfernung des ADP-Riboserestes sind in **Abbildung 3** schematisch dargestellt.

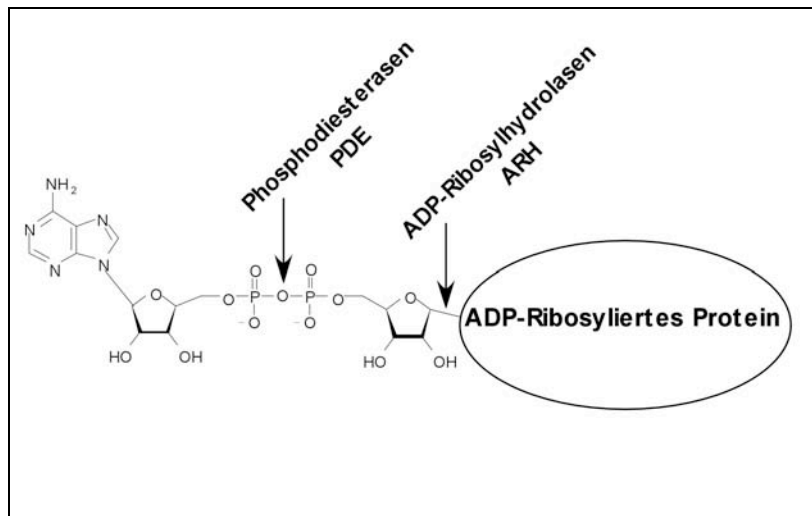


Abb. 3: De-ADP-Ribosylierung. Die ADP-Ribosylierung ist eine potentiell reversible Proteinmodifikation. Phosphodiesterasen (PDE) und ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) können die ADP-Ribose-Gruppe vollständig oder teilweise entfernen. Die Pfeile markieren die durch die Enzymfamilien angegriffenen Bindungen. Bei Entfernen der ADP-Ribose-Gruppe durch Phosphodiesterasen bleibt ein Ribosephosphatrest an der modifizierten Aminosäure zurück. Erneute ADP-Ribosylierung ist nur möglich, wenn der komplette ADP-Ribosyl-Rest entfernt wird, wie es bei ADP-Ribosylhydrolasen geschieht.

1.1.2 ADP-Ribosyltransferasen bei Prokaryoten

Die erste beschriebene ADP-Ribosyltransferase ist das Diphtherie-Toxin. Paul Ehrlich und Emil von Behring hatten mittels Immunisierung von Pferden mit diesem Toxin Antiseren für die Behandlung der Diphtherie gewonnen. In Anerkennung dieser Arbeiten bekam Emil von Behring 1901 den ersten vergebenen Nobelpreis für Medizin. Erst lange Zeit später konnte gezeigt werden, dass das Diphtherie-Toxin eine bakterielle ART ist, die durch ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors EF2, die Proteinbiosynthese blockiert (Honjo, Nishizuka et al. 1968).

Eine Vielzahl weiterer bakterieller Toxine, die von *Vibrio cholera*, *Bordatella pertussis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Clostridium botulinum* sekretiert werden, entfalten ihre Wirkung in Säugetierzellen ebenfalls als ARTs. Durch mono-ADP-Ribosylierung von heterotrimeren G-Proteinen und anderen GTP-bindenden Proteinen wie Ras und Rho oder ATP-bindenden Proteinen wie Aktin, inhibieren sie Signaltransduktion oder beeinflussen die Zytoskelett-Organisation (Moss and Vaughan 1990; Aktories and Just 2000).

Die meisten bakteriellen ARTs sind sekretorische Proteine, die in das Zytoplasma der Zellen des Wirtsorganismus translozieren, um dort die oben beschriebenen Wirkungen zu entfalten. Eine interessante Ausnahme stellt die intrazellulär in phototrophen stickstofffixierenden Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* exprimierte Dinitrogenase-Reduktase ADP-Ribosyltransferase (DRAT) dar. Hier gibt es einen reversiblen ADP-Ribosylierungszyklus, der die Aktivität der Dinitrogenase-

Reduktase reguliert, welche ein Schlüsselenzym der Stickstofffixierung darstellt (Ludden 1994).

1.1.3 Überblick über die ADP-Ribosyltransferasen höherer Lebewesen

ADP-Ribosyltransferasen wurden auch bei Eukaryoten gefunden. Die eukaryotischen ARTs lassen sich in die Unterfamilien der mono-ADP-ribosylierenden (mARTs oder ARTs) und Poly-ADP-ribosylierenden Enzyme (pARTs oder PARPs) einordnen (Domenighini and Rappuoli 1996; Bazan and Koch 1997; Koch-Nolte, Reche et al. 2001; Otto, Reche et al. 2005). Die PARPs stellen multifunktionale Enzyme dar, die nicht nur die ADP-Ribosylierung der Carboxyl-Gruppe von Glutamat-Resten in Zielproteinen katalysiert, sondern auch die ADP-Ribosylierung der 2' oder 3'Hydroxylgruppe in der distalen Ribosegruppe der ADP-Ribose selbst. Hierdurch kommt es zu einer Verlängerung oder auch Verzweigung des entstehenden ADP-Ribose-Polymers an den Zielproteinen (Ruf, Rolli et al. 1998). PARPs sind vor allem im Zellkern lokalisiert, wo sie DNA-bindende Proteine modifizieren, die eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen. Durch diesen Prozess wird die DNA stabilisiert und eine Tumorgenese kann unterdrückt werden (Oei, Griesenbeck et al. 1997; Tong, Cortes et al. 2001).

Mono-ADP-Ribosyltransferasen sind bisher ausschließlich bei Vertebraten nachgewiesen worden. Zunächst wurden die ART1 aus dem Skelettmuskel des Kaninchens (Zolkiewska, Nightingale et al. 1992) sowie die ART2 aus T-Zellen der Ratte (Koch, Haag et al. 1990) und der Maus (Koch-Nolte, Petersen et al. 1996) und ART6 aus dem Knochenmark des Huhns molekular charakterisiert (Tsuchiya, Hara et al. 1994). Seitdem ist eine ganze Familie Arginin-spezifischer ADP-Ribosyltransferasen kloniert worden (Glowacki, Braren et al. 2002). Sie werden in verschiedenen Geweben als membranständige, mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker versehene Ekto-Enzyme oder als sekretiertes Enzym exprimiert und sind in einer einheitlichen Nomenklatur zusammengefasst worden (ART1-ART6). **Abbildung 4** gibt einen Überblick über die Familie der Ekto-ADP-Ribosyltransferasen.


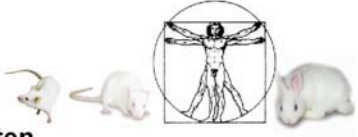
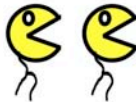




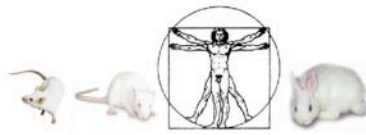




| Gen Namen | # von Genen | kloniert im Jahre | Expression | kloniert bei | Aminosäurespezifität |
|---|---|-------------------|---|---|----------------------|
| ART1 RABNAART MART YAC1 |  | '92 | Muskel, Herz, Lunge, neutr. Granulozyten |  | Arg |
| ART2 Pta Rt6-1 Rt6-2 |  | '90 | reife T Zellen |  | Arg |
| ART3 htMART TART1 |  | '96 | Hoden, Herz, Skelettmuskel, Lunge, Monozyten |  | ? |
| ART4 LART |  | '96 | Lymphatische Gewebe Erythrozyten |  | ? |
| ART5 TART2 YAC2 |  | '96 | Hoden, Herz, Skelettmuskel |  | Arg |
| ART6 CHAT1 CHAT2 |  | '94 | Knochen- mark |  | Arg |

Abb. 4: Mono-ADP-Ribosyltransferasen. Diese Abbildung zeigt die bisher bei Vertebraten klonierten Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs). Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankerte membranständige ARTs sind mit einem verzweigten Schwanz dargestellt. Die Expression der ARTs ist meist auf bestimmte Gewebe beschränkt. Viele der ARTs sind in unterschiedlichen Spezies in denselben Geweben exprimiert. ART2 stellt im menschlichen Genom ein Pseudogen dar. Die meisten Vertebraten-ARTs sind Arginin-spezifisch.

(modifiziert nach F. Koch-Nolte und F. Haag, Adv. Exp. Med. Biol. 419: 1-13 (1997))

Während in Säugetieren, Vögeln und Reptilien, kürzlich auch im Zebrafisch *Danio rerio*, ADP-Ribosyltransferasen nachgewiesen wurden, konnten ART-verwandte Gene bisher weder in Pflanzen, Insekten, Nematoden, Hefen oder anderen einzelligen eukaryotischen Organismen noch bei Archaeobakterien identifiziert werden (Glowacki, Braren et al. 2002).

1.1.4 Rolle von T-Zellen und ART2 im Immunsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bedeutung und Funktion der murinen ADP-Ribosyltransferase ART2 genauer untersucht. Erstmals wurde ART2 bei der Ratte identifiziert. Die Funktion des ursprünglich als RT6 bezeichneten T-Zelloberflächenproteins war lange Zeit unbekannt (Koch-Nolte, Petersen et al. 1996; Thiele, Haag et al. 1997). Bei der Ratte ist das ART2 Gen auf Chromosom 1 lokalisiert und liegt in den zwei allelen Varianten *ART2a* und *ART2b* vor (Butcher, Howard et al. 1979). Für ART2a wurde NADase-Aktivität aber keine Transferase-Aktivität festgestellt. ART2b zeigt neben der NADase-Aktivität auch eine Arginin-spezifische Automodifikation nach Inkubation mit NAD (Haag, Andresen et al. 1995). Im Mausgenom gibt es zwei ART2 Gene, die durch eine Gen-Duplikation entstanden sind. *ART2.1* und *ART2.2* liegen tandemartig in syntenischer Lage auf Chromosom 7 und weisen eine 80%ige Nukleotidsequenzidentität auf (Hollmann, Haag et al. 1996). Beim Menschen liegt das ART2 Gen auf Chromosom 11 (11q13) als Einzelkopie vor (Koch-Nolte, Haag et al. 1993). Im Leseraster des Gens wurden drei vorzeitige Stop-Codons identifiziert, was ART2 beim Menschen, Schimpansen und auch Hund zu einem sogenannten Pseudogen macht (Haag, Koch-Nolte et al. 1994). Die Nachbargene sind konserviert. In diesem Cluster liegen auch die sich überlappenden Gene von *ART1* und *ART5*. Die Inaktivierung eines Gens durch Punktmutationen kommt häufiger vor. In diesem Cluster existiert ein weiteres beim Menschen inaktiviertes Gen, *TRP2*, welches für einen putativen Ionenkanal im vomeronasalen Organ der Maus kodiert. TRP2-defiziente Mäuse-Männchen können das Geschlecht anderer Mäuse nicht mehr erkennen (Stowers, Holy et al. 2002).

ART2.1 und *ART2.2* werden in der Maus ausschließlich auf naiven T-Zellen exprimiert (Ohlrogge, Haag et al. 2002). T-Zellen haben im Immunsystem zwei prominente Aufgaben: als CD4-positive T-Helferzellen (Th) unterstützen sie die Aktivierung von B-Zellen (Th2) oder Makrophagen (Th1) bei der Abwehr von Pathogenen, als CD8-positive cytotoxische T-Zellen töten sie virusinfizierte oder entartete körpereigene Zellen (Delves and Roitt 2000; Delves and Roitt 2000). Bei der T-Zell-Entwicklung wandern Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus ein, wo sie zu monospezifischen T-Zellen heranreifen (Dexter and Spooncer 1987). Während der Heranreifung im Thymus findet eine somatische Rekombination in den in der Keimbahn zur Verfügung stehenden, für den T-Zell-Rezeptor (TCR) kodierenden Genen statt. Diese Veränderung der genomischen Keimbahninformation ist bei Zellen mit Antigenrezeptoren einzigartig und verantwortlich für das große, vielfältige Repertoire an Antigenrezeptoren (Tonegawa 1983; Shinkai, Rathbun et al. 1992). Jede T-Zelle bildet hierbei einen einzigartigen T-Zell-Rezeptor, mit dem die Zelle auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene erkennen kann. Durch eine positive und negative Selektion wird gewährleistet, dass nur T-Zellen den Thymus verlassen, die keine körpereigenen Antigene erkennen aber mit Antigen beladene MHC-Moleküle in ausreichender Affinität binden können (von Boehmer, Aifantis et al. 2003). Autoreaktive Zellen werden durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, eliminiert. Die reifen T-Zellen können nun Antigene erkennen, die ihnen als Peptide auf MHC II Molekülen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen und B-Zellen (CD4+) oder auf MHC I Molekülen von allen kernhaltigen Körperzellen präsentiert werden (CD8+) (Holling,

Schooten et al. 2004; Alexander-Miller 2005). Die Interaktion von T-Zellen mit der Antigen-präsentierenden Zelle beginnt mit einer Interaktion von membranständigen Adhäsionsmolekülen, wie LFA-1, auf der T-Zelle und I-CAM1 auf der Antigen-präsentierenden Zelle (Anderson and Siahhaan 2003). Wenn der T-Zellrezeptor ein Antigen erkennt, wird durch T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion eine Konformationsänderung im LFA-1 Molekül ausgelöst, welche die Affinität des LFA-1 gegenüber I-CAM1 verstärkt. Durch nun festere Bindung kommt es zur Ausbildung einer sogenannten „Immunologischen Synapse“, bei der sich ein äußerer Ring von LFA-1 und I-CAM1 Molekülen bildet, der einen Komplex von T-Zellrezeptor, MHC und CD4 oder CD8, aber auch kostimulatorischen Molekülen wie CD28 und den B7 Molekülen CD80 und CD86, die ein essenzielles zweites Signal für Aktivierung der T-Zelle liefern (Grakoui, Bromley et al. 1999), umschließt. Bleibt das zweite Signal aus, werden die Zellen anerg. So wird eine Toleranz gegenüber Selbstantigenen, die von T-Zellen, welche der negativen Selektion im Thymus entgangen sind, erkannt werden, erreicht. Wenn die Toleranzentwicklung und die Regulation der Immunabwehr durch T-Zellen fehlerhaft verläuft, können Autoimmunerkrankungen entstehen, bei denen autoreaktive T-Zellen körpereigene Zellen attackieren (Moller, Bohme et al. 1990). Es wurde eine T-Zellpopulation identifiziert, die das Auftreten von Autoimmunerkrankungen trotz Anwesenheit autoreaktiver T-Zellen unterdrücken kann. T-Zellen dieser CD4 und CD25 positiven T-Zellpopulation werden als regulatorische T-Zellen oder auch Treg bezeichnet (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001).

ART2 katalysiert die ADP-Ribosylierung vieler Membranproteine, die in der Aktivierung und Migration von T-Zellen eine Rolle spielen. So konnte durch Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD gezeigt werden, dass das Integrin LFA-1 (Nemoto, Yu et al. 1996), der MHCI Corezeptor CD8, der Milz-Homing-Rezeptor CD43, die T-Zelloberflächenproteine CD27, CD44, CD45 (Okamoto, Azhipa et al. 1998) und ein unbekanntes, bei der T-Zellaktivierung beteiligtes 40 KDa Protein, das mit seiner intrazellulären Domäne mit der p56Lck-Kinase assoziiert ist (Wang, Nemoto et al. 1997), durch ART2 ADP-ribosyliert werden. Die ADP-Ribosylierung dieser Zielproteine führt zu einer Reduktion der Zellproliferation, Signaltransduktion, Zielzelladhäsion sowie Zytotoxizität und Zytokinsekretion der T-Zellen. Eine Aktivierung von T-Zellen führt zu einem Abstoßen der ART2 durch eine TACE-verwandte Metalloprotease, was mit einer stark reduzierten ART-Aktivität auf aktivierten T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen korreliert (Kahl, Nissen et al. 2000).

1.1.5 ART2 und Autoimmunerkrankungen

In mehreren Modellen für Autoimmunerkrankungen konnte ein Zusammenhang mit den in dieser Arbeit untersuchten ADP-Ribosyltransferasen hergestellt werden. So zum Beispiel bei einem Modell für den juvenilen, insulinabhängigen Typ-I Diabetes mellitus. Bei dieser Autoimmunerkrankung werden die β -Zellen im Pankreas, die für die Insulinproduktion zuständig sind, durch infiltrierende autoreaktive T-Zellen zerstört. Ein etabliertes Modell für Typ-I Diabetes stellt die „diabetes prone Bio Breeding“ (dpBB) Ratte dar. Die diabetesähnliche Erkrankung geht hier mit einer ausgeprägten Lymphopenie einher. Es konnte gezeigt werden, dass diese fast die gesamte Population der ART2 positiven T-Zellen umfasst (Greiner, Handler et al. 1986). Weiterhin stellte sich heraus, dass der adoptive Transfer von ART2+ T-Zellen aus der Diabetes resistenten

„Bio Breeding“ (drBB) Ratte in junge diabetes-anfällige dpBB-Ratten den Ausbruch des Diabetes verhindern kann (Burstein, Mordes et al. 1989). Schließlich wurde gezeigt, dass die Antikörpervermittelte Depletion der ART2-exprimierenden T-Zellpopulation zur Diabeteserkrankung bei drBB-Ratten führt (Greiner, Mordes et al. 1987).

Ein weiteres Tiermodell für Typ-I Diabetes stellt die „non obese diabetic“ NOD Maus dar. Sie wird in Abschnitt 1.7 beschrieben.

Auch im Modell des systemischen Lupus erythematodes gibt es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von ART2. Tiere der F1-Generation von NZW- und NZB-Mäusen entwickeln eine dem systemischen Lupus erythematodes ähnliche Autoimmunerkrankung. Bei NZW Mäusen ist der *ART2.2* Locus deletiert und *ART2.1* wird sehr schwach transkribiert. Darüber hinaus sind gegenüber NZB Mäusen fünf Aminosäuren im ART2.1-Protein substituiert. NZB Mäuse haben beide *ART2* Gene und *ART2.1* und *ART2.2* werden auf normalem Niveau transkribiert. Tiere der F1-Generation von NZWxNZB Mäusen zeigen eine schwache *ART2*-Transkription wie die NZW Eltern, welche offensichtlich durch einen dominanten Faktor aus dem NZW Genom bewirkt wird. Auch hier ist zumindest eine Beteiligung der strukturell veränderten und schwach exprimierten ART2 in der Entwicklung der Autoimmunerkrankung möglich (Koch-Nolte, Klein et al. 1995).

1.2 Purinorezeptoren

1978 wurde die Existenz von Plasmamembran-Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide, sogenannte P2 purinergische Rezeptoren, aufgrund pharmakologischer und funktioneller Hinweise erstmals postuliert (Burnstock 1978). Seitdem sind bei Säugetieren 12 Mitglieder der P2-Rezeptorfamilie kloniert und charakterisiert worden. Es wurde festgestellt, dass diese für viele Zellantworten auf Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden verantwortlich sind (Abbracchio and Burnstock 1994; Ralevic and Burnstock 1998). Die P2-Rezeptoren teilen sich in die beiden Familien der G-Protein-gekoppelten P2Y Rezeptoren und Liganden-gesteuerten Ionenkanal-P2X Rezeptoren auf. Es wurden bis heute bei Säugetieren 5 Mitglieder der P2Y-Familie und 7 Mitglieder der P2X-Familie identifiziert (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001).

1.2.1 P2X-Familie

Die P2X-Rezeptoren stellen ATP-gesteuerte Ionenkanäle dar, die für monovalente (Na^+ , K^+) und divalente Kationen (Ca^{2+}) permeabel sind. Es wurden 7 Mitglieder identifiziert, die als P2X₁-P2X₇ bezeichnet werden. In fast allen Geweben werden Mitglieder dieser Familie exprimiert (Di Virgilio, Chiozzi et al. 1998). Die Kanäle bilden sich als Multimere mehrerer Untereinheiten und können bei heterologer Expression homomere, aber zum Teil auch heteromere Komplexe bilden. Für P2X₁ und P2X₃ wurde gezeigt, dass sich sowohl stabile Trimere als auch Hexamere bilden können (Nicke, Baumert et al. 1998). Die Proteine der P2X-Untereinheiten sind zwischen 379 und 595 Aminosäuren lang. Sie weisen zwei hydrophobe Transmembrandomänen auf, die durch eine große ca. 280 Aminosäuren lange extrazelluläre Schlaufe, die 10 Cysteine und eine Liganden-bindende Domäne enthält, getrennt werden. N-Terminus und C-Terminus aller Rezeptoren sind im Cytoplasma lokalisiert (North 2002). Bindung von ATP an eine noch immer nicht genau identifizierte Bindedomäne führt zur Konformationsänderung und zur Kanalöffnung. Da noch keine Kristallstruktur von P2X-Rezeptoren existiert und die Rezeptoren auch keine offensichtliche Ähnlichkeit mit andern Ionenkanälen oder ATP-bindenden Proteinen haben, ist über die genauen molekularen Mechanismen der Kanalöffnung noch wenig bekannt (Stojilkovic, Tomic et al. 2005). Die Kanäle zeigen sowohl unterschiedliche pharmakologische Sensitivität gegenüber ATP als auch Unterschiede in der Desensitierung, welche je nach Rezeptor langsam, schnell oder gar nicht erfolgt. Das Entfernen von ATP führt bei allen Mitgliedern zu einem Schließen des Kanals. Die P2X-vermittelte Signaltransduktion geschieht durch einen schnellen Influx von Na^+ und Ca^{2+} und Efflux von K^+ , was zur Depolarisierung der Zellmembran und einem Anstieg der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration führt. Diese drastischen Veränderungen der intrazellulären Ionen-Homöostase durch P2X-Rezeptoröffnung führen zur Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Botenstoffe und Enzymkaskaden, die bisher partiell identifiziert wurden (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001).

1.2.2 P2X7

P2X7 ist ein Mitglied der P2X-Familie, das auf vielen Zellen des Immunsystems exprimiert wird. So wird P2X7 in Makrophagen, dendritischen Zellen (Ferrari, La Sala et al. 2000), B-Zellen und T-Zellen exprimiert (Baricordi, Ferrari et al. 1996; Collo, Neidhart et al. 1997). Als Mitglied der P2X-Familie besitzt auch P2X7 zwei Transmembrandomänen, die von einer langen extrazellulären Schleife getrennt sind sowie einen cytoplasmatischen N-Terminus und einen für P2X7 charakteristischen langen C-Terminus. Im Vergleich zu den andern Mitgliedern der P2X-Familie hat P2X7 eine sehr niedrige Affinität gegenüber ATP mit einer EC_{50} von ca. 500 μ M ATP (Surprenant, Rassendren et al. 1996). Lang anhaltende Stimuli agonistischer Konzentrationen extrazellulären ATPs führen interessanterweise zur Bildung von großen Membranporen, durch die Moleküle von bis zu 900 Da passieren können. Experimentell kann dies auch durch die Aufnahme von fluoreszierenden Farbstoffen nachgewiesen werden (Steinberg, Newman et al. 1987). Aufgrund dieser sich ausbildenden Membranporen wird P2X7 auch als Zytolytischer Purinozeptor bezeichnet. Ob P2X7 selbst diese Pore bildet (Surprenant, Rassendren et al. 1996) oder ein anderes Protein rekrutiert wird (Schilling, Wasylyna et al. 1999; Verhoef, Estacion et al. 2003), ist noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es wurde bei Mäusen eine Punktmutation an Aminosäureposition 451 des langen cytoplasmatischen C-Terminus beschrieben. Die P451L Mutation führt zu einer stark reduzierten Sensitivität des P2X7 gegenüber ATP vermittelter Porenformation und ist bei einigen in der Forschung häufig verwendeten Mausstämmen identifiziert worden (Adriouch, Dox et al. 2002).

Vor allem bei Makrophagen ist P2X7 intensiv untersucht worden und es konnte gezeigt werden, dass ATP vermittelt Caspase-1 aktiviert wird, die den inaktiven Interleukin-1 β -Vorläufer pro-IL1 β spaltet, wodurch aktives IL-1 β freigesetzt werden kann (Verhoef, Estacion et al. 2003). Interleukin-1 β gehört zu einer ungewöhnlichen Zytokinfamilie, zu der IL1 α , IL1 β , IL1ra und IL18 zählen (Janeway 2001). Sie werden, im Gegensatz zu anderen Interleukinen, ohne Leaderpeptid synthetisiert und als inaktive Vorstufen (Pro-IL) im Zytosol gespeichert. Die Prozessierung und Freisetzung erfolgt nach Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ATP. Freigesetzt wird die aktive Form von IL-1 β wahrscheinlich in Mikrovesikeln, die nach P2X7 Aktivierung abgestoßen werden können (MacKenzie, Wilson et al. 2001).

Als Folge ATP vermittelter P2X7 Aktivierung wurde auch das Abspalten (Shedding) von CD23 und L-Selektin CD62L beschrieben (Gu, Bendall et al. 1998). Längere Expositionen mit ATP führen darüber hinaus zum Zelltod (Di Virgilio, Chiozzi et al. 1998). Es war gezeigt worden, dass NAD den Zelltod von T-Zellen auslösen kann und dafür ART2 und ein weiterer Faktor notwendig ist (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001). Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe, zum Teil auch im Rahmen dieser Arbeit, gezeigt werden, dass die durch ART2 katalysierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors für den NAD-induzierten Zelltod (NICD) verantwortlich ist (Scheuplein, Adriouch et al. 2003; Seman, Adriouch et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Mechanismen des NAD- und ATP-vermittelten Zelltods genauer untersucht.

1.3 ATP und NAD

ATP und NAD sind intrazelluläre Moleküle, die zentrale Funktionen im Energiestoffwechsel und Elektronen-Transfer innehaben. ATP stellt eine universelle Energiewährung der Zelle dar. Die Energie der ATP-Hydrolyse wird von der Zelle z.B. für Ionentransport, Muskelarbeit aber auch endergonische Biosynthesen genutzt. Die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe des ATP durch Kinasen auf Zielproteine, welche als Phosphorylierung bezeichnet wird, stellt einen zentralen Mechanismus der Signaltransduktion und der Regulation von Enzymaktivitäten dar. NAD wird in katabolischen Reaktionen wie Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus in seine reduzierte Form NADH umgewandelt. NADH muss daher ständig re-oxidiert werden. Dies geschieht im Wesentlichen durch Enzyme der Atmungskette. Neben seiner Funktion als Co-Enzym wird NAD auch als Substrat verwendet. So nutzen unter anderem Enzyme, die in der DNA-Reparatur eine Rolle spielen, wie Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) (Burkle 2001) oder bakterielle DNA-Ligasen (Wilkinson, Day et al. 2001), NAD als Substrat.

Es konnte gezeigt werden, dass ATP durch nicht-lytische Prozesse in den extrazellulären Raum sekretiert werden kann (Jorgensen, Geist et al. 1997; Cotrina, Lin et al. 1998). Weitere Quellen für extrazelluläres ATP stellen von Blutplättchen sekretierte Granula dar (Meyers, Holmsen et al. 1982). Extrazelluläres ATP kann als Ligand für P2X- oder P2Y-Rezeptoren dienen oder von Ekto-Kinasen als Substrat verwendet werden (Redegeld, Caldwell et al. 1999). Es wurde auch für NAD ein nicht-lytischer Mechanismus der Sekretion beschrieben, bei dem das „Gap-Junction“-Protein Connexin43 hexamere Poren ausbildet, welche die NAD-Sekretion ermöglichen (Bruzzone, Guida et al. 2001). Eine weitere Quelle für extrazelluläre Nukleotide ist die Lyse von Zellen bei Entzündungsreaktionen oder Gewebeverletzung. ATP und NAD liegen intrazellulär in hohen Konzentrationen vor. Die intrazelluläre Konzentration von ATP liegt bei 5-10 mM (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001), die von NAD bei 400-500 μ M (Loetscher, Alvarez-Gonzalez et al. 1987).

Die Konzentrationen extrazellulären NADs und ATPs werden streng reguliert. Potente ubiquitäre Ekto-Enzyme degradieren NAD und ATP sehr schnell. NAD wird vor allem durch die NAD-Glykohydrolasen CD38 und CD157 degradiert (Ortolan, Vacca et al. 2002), während ATP durch CD39 und verwandte ATPasen (ENTPD1-6) auf Endothel- und anderen Zellen abgebaut wird (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002). Sowohl NAD als auch ATP können darüber hinaus auch durch Phosphodiesterasen wie PC-1 und verwandte Enzyme (ENPP1-8) hydrolysiert werden (Goding, Terkeltaub et al. 1998).

1.4 Apoptose

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein für die Entwicklung und Unterhaltung mehrzelliger Organismen essentieller Mechanismus. Es wurden drei Formen von PCD beschrieben (Bursch, Ellinger et al. 2000; Kim 2005). Der apoptotische Zelltod (Typ I PCD) ist durch morphologische Verringerung der Zellgröße, temporäre Ausstülpungen der Zellmembran (sogenanntes Membran-Blebbing), Chromatinkondensation, nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin, DNA-Fragmentierung und Freisetzung apoptotischer Körperchen gekennzeichnet. Daneben sind Zelltod durch Autophagie (Typ II PCD), bei dem sich autophagische Vakuolen im Zytoplasma der sterbenden Zelle bilden, und nekrotischer Zelltod (Typ III PCD), bei dem es zu einem rapiden Verlust der Membranintegrität kommt und der intrazelluläre Inhalt freigesetzt wird, beschrieben worden (Kim, Emi et al. 2005).

Im Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod, auch als Apoptose bezeichnet, wurde eine Familie von Proteasen identifiziert, die eine zentrale Rolle bei diesem Mechanismus des Zelltods einnimmt. Da diese Proteasen ein Cystein im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne aufweisen und Proteine hinter einem Aspartat spalten, wurden sie als Caspasen bezeichnet (Cystein Aspartase = Caspase) (Alnemri, Livingston et al. 1996). Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) gebildet und müssen durch proteolytische Spaltung zu aktiven Enzymen prozessiert werden. 13 Mitglieder dieser Familie sind in Säugetierzellen identifiziert worden und den drei Gruppen der inflammatorischen Caspasen (Caspase-1,-4,-5), welche eine Aufgabe bei der Produktion inflammatorischer Zytokine haben, der Initiator-Caspasen (Caspase-2,-8,-9,-10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3,-6,-7) zugeordnet worden (Nicholson 1999; Kroemer and Martin 2005).

Die Apoptose kann durch vielfältige Faktoren wie Beschädigung von DNA nach UV- oder γ -Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren oder chemotherapeutische Agenzien ausgelöst werden. Ein im Immunsystem weit verbreiteter Mechanismus ist die Signaltransduktion über Todesrezeptoren. Die Familie der Todesrezeptoren stellt eine Unterfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptor Superfamilie dar (Bhardwaj and Aggarwal 2003). Aktivierung dieser Rezeptoren durch sogenannte Todesliganden führen zur Initiation der Apoptose. Acht Mitglieder dieser Familie, die sich durch Besitz einer cytoplasmatischen Domäne von ca. 80 Aminosäuren, der sogenannten Todesdomäne, auszeichnen, wurden charakterisiert (French and Tschopp 2003). Der bisher am intensivsten untersuchte Todesrezeptor ist CD95, der auch als Apo-1 oder FAS bezeichnet wird.

Bei der CD95 vermittelten Signaltransduktion werden nach der Aktivierung des Rezeptors eine Vielzahl von Molekülen rekrutiert, die in letzter Konsequenz die proteolytische Spaltung der Initiator-Caspase Caspase-8 zum aktiven Enzym bewirken, welche daraufhin die Effektor-Caspasen zu aktivieren vermag. Hierbei trimerisiert der Rezeptor nach Bindung des FAS-Liganden und rekrutiert das Adaptormolekül FADD (FAS Associated Death Domain) durch homotypische

Kontakte der Todesdomänen des Rezeptors und des Adaptormoleküls. Mit Hilfe einer sogenannten Todeseffektor-Domäne DED (Death Effector Domain) bindet Procaspase-8 mit seiner DED an das rekrutierte FADD, wodurch der todesinduzierende Signalkomplex DISC (death-inducing signaling complex) komplettiert wird. Durch autoproteolytische Spaltung wird Caspase-8 in aktiver Form vom Komplex freigesetzt (Peter and Kramer 2003). Aktive Caspase-8 kann dann Effektor-Caspasen aktivieren, die dann sogenannte Todessubstrate spalten, welche die beschriebenen Effekte der Apoptose auslösen. Spaltung des Inhibitors der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) führt zur DNA-Fragmentierung, Spaltung anderer Substrate führt zum Schrumpfen der Zellen, Membran-Blebbing und letztendlich zum Zelltod (Lavrik, Golks et al. 2005). In Zellen, in denen aufgrund niedriger FAS-Expression nach Ligandenbindung nur wenig aktive Caspase-8 vorliegt, kann darüber hinaus auch ein Verstärkungszyklus über die Mitochondrien eingeschaltet werden. Hierbei wird das zur Bcl-2-Familie gehörende Protein Bid durch Caspase-8 gespalten, das daraufhin eine Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien bewirkt. Es kann sich anschließend ein Komplex aus zytoplasmatischem Cyt c, Procaspase-9 und anderen pro-apoptischen Proteinen bilden, der als Apoptosom bezeichnet wird und zur proteolytischen Spaltung von Caspase-9 führt. Aktive Caspase-9 kann dann die Effektor-Caspasen aktivieren (Korsmeyer, Wei et al. 2000).

Die klassische Apoptose ist abhängig von der Caspase-Aktivierung. Es gibt aber auch der Apoptose ähnliche Mechanismen, bei der die Aktivierung von Caspasen erst in einem späten Stadium erfolgt, in dem die äußere mitochondriale Membran bereits durchlässig geworden ist. Dieser Prozess wird als MOMP (MOMP = mitochondrial outer membrane permeabilization) bezeichnet. In diesen Fällen ist die Aktivierung von Caspasen eher als Folge des Zelltodes und nicht als Ursache zu sehen. Hier wird der Zelltod auf der Ebene der Mitochondrienpermeabilisierung, die auch als sogenannter „Punkt ohne Wiederkehr“ des Zelltodes bezeichnet wird, induziert (Green and Kroemer 2004). Experimente mit Caspase-spezifischen Inhibitoren zeigten, dass die Inhibierung von Caspasen in Säugetierzellen in vielen Fällen den Zelltod nicht verhindern kann. Es gibt also Caspase-unabhängige Prozesse, die einen Apoptose-ähnlichen Zelltod bewirken können. Der Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und des mitochondrialen Membranpotentials spielt sowohl beim Caspase-abhängigen als auch Caspase-unabhängigen Zelltod eine zentrale Rolle. Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kann Caspase-unabhängig durch das Tumorsuppressorgen p53 über die BH3-Proteine Puma und Noxa (Villunger, Michalak et al. 2003), aber auch nach Spaltung von Bid durch lysosomale Nicht-Caspase-Proteasen, die nach Apoptosestimulus aus dem lysosomalen Lumen ins Zytoplasma translozieren können (Cirman, Oresic et al. 2004), bewirkt werden. Neben Cyt c werden auch andere pro-apoptische Proteine, wie der Apoptose induzierende Faktor (AIF) und die Endonuclease EndoG aus den Mitochondrien freigesetzt, was zu Caspase-unabhängiger Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung führt (Donovan and Cotter 2004). Dieser Caspase-unabhängige Zelltod zeigt also auch wichtige charakteristische Merkmale der klassischen Apoptose.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die klassische Apoptose in der Regel abhängig von der

Caspase-Aktivierung ist, dass aber Caspase-unabhängige Mechanismen des Zelltods existieren, die viele Merkmale klassischer Apoptose aufweisen. Darüber hinaus gibt es auch Prozesse, bei denen neben deutlichen Apoptosemerkmalen auch Merkmale der Nekrose auftreten. Diese werden daher als Aponekrose bezeichnet (Formigli, Papucci et al. 2000). Für die Klassifizierung noch nicht beschriebener Mechanismen des Zelltodes, die weder eine klassische Apoptose noch eine Nekrose darstellen, müssen jeweils Apoptosemerkmale und Nekrosemerkmale gegeneinander abgewogen werden.

1.5 Phagozytose apoptotischer Zellen

Die in Kapitel 1.4 beschriebenen Merkmale apoptotischer Zellen wurden größtenteils *in vitro* untersucht. Tatsächlich ist es schwierig *in vivo* Zellen nachzuweisen, welche Merkmale der Apoptose aufweisen, da apoptotische Zellen rasch durch Nachbarzellen, vor allem aber durch auf die Phagozytose spezialisierte Zellen wie Makrophagen, verschlungen werden (Savill, Dransfield et al. 2002). Um phagozytiert werden zu können, muss die apoptotische Zelle erst einmal als apoptotisch erkannt werden. Die große Wichtigkeit des Erkennens und effizienten Entfernens apoptotischer Zellen durch Phagozyten spiegelt sich in der Vielzahl und Redundanz der beteiligten Liganden und Rezeptoren wider. **Abbildung 5** gibt einen Überblick über die sogenannten „friss mich“-Signale apoptotischer Zellen und der entsprechenden Rezeptoren auf Seite der Phagozyten.

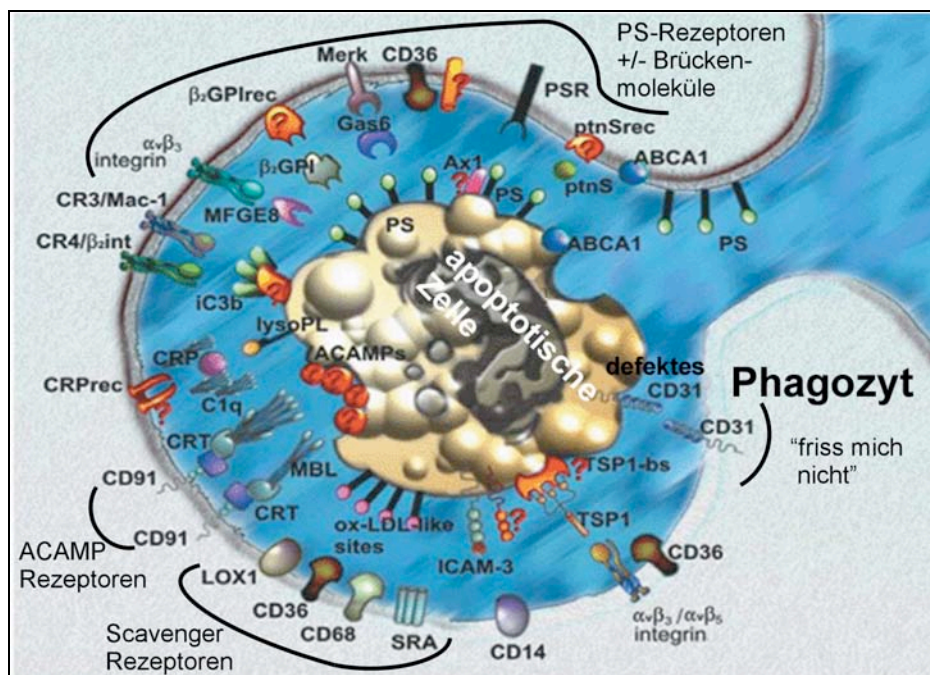


Abb. 5: „Friss mich“-Signale apoptotischer Zellen. Das am meisten untersuchte Signal ist das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zytoplasmamembran. Es sind spezifische Rezeptoren für PS (z.B. PSR) aber auch PS-bindende Brückenmoleküle (z.B. MFGE8; Gas6, β_2 Gpi), die die Signaltransduktion durch Binden an entsprechende Rezeptoren sicherstellen, beschrieben worden. Sogenannte Scavenger-Rezeptoren (Lox1; CD36; CD68; SRA) erkennen „oxidiertes LDL“-ähnliche Regionen auf apoptotischen Zellen (LDL=low density Lipoproteins). Der CD91-Calreticulin-Komplex kann durch Binden an C1q des Komplementsystems und dem Mannose-bindenden Lektin MBL sogenannte ACAMPs (apoptotic cell associated molecular patterns) erkennen. Eine Vielzahl weiterer Interaktionen ist beschrieben worden. (Modifiziert nach (Moreira and Barcinski 2004))

Seit das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin 1990 als erster Rezeptor für das Erkennen und Phagozytieren apoptotischer

Zellen beschrieben wurde (Savill, Dransfield et al. 1990), sind viele *in vitro*-Studien durchgeführt worden, um den Prozess der Phagozytose apoptotischer Zellen genauer zu verstehen. Hierbei stellte sich heraus, dass die apoptotische Zelle eine Vielzahl von „friss mich“-Signalen auf der Zelloberfläche präsentiert, die durch ebenso viele Rezeptoren erkannt werden können. So erkennen zum Beispiel sogenannte Scavenger-Rezeptoren (Scavenger (engl.) = Aasfresser), die eine wichtige Rolle bei der Endozytose oxidiertes low-density Lipoproteine (LDL) spielen, oxidierte Oberflächenproteine, die auf apoptotischen Zellen präsentiert werden (Chang, Bergmark et al. 1999). Der CD91-Calreticulin-Komplex kann das initiale Protein des Komplementsystems C1q und ein Mannose-bindendes Lektin binden, die als Bestandteile der angeborenen Immunität auch pathogenähnliche mit apoptotischen Zellen assoziierte Muster, sogenannte ACAMPs (apoptotic cell associated molecular pattern), erkennen können (Savill, Dransfield et al. 2002).

Das wohl am besten charakterisierte „friss mich“-Signal ist das nach außen Kehren von Phosphatidylserin. Dennoch ist bis heute weder der genaue Mechanismus des nach außen Kehrens noch die Erkennung des Signals durch Makrophagen gut verstanden. Für das nach außen Kehren des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Zytoplasmamembran, das phylogenetisch konserviert ist (van den Eijnde, Boshart et al. 1998), werden zwei Prozesse verantwortlich gemacht. Phosphatidylserin kann grundsätzlich spontan von innen nach außen oder von außen nach innen translozieren und die Asymmetrie der Cytoplasmamembran, bei der Phosphatidylserin ausschließlich auf der Innenseite vorliegt, wird durch einen ATP-abhängigen Membrantransporter, der Aminophospholipidtranslokase, aufrecht erhalten (Tang, Halleck et al. 1996). In apoptotischen Zellen wird dieses Enzym inhibiert, was zu einem Auftauchen von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zytoplasmamembran durch passive Diffusion führt. Zusätzlich wird in den apoptotischen Zellen ein als Scramblase bezeichnetes Enzym aktiviert, das eine aktive Durchmischung der innen und außen lokalisierten Phospholipide bewirkt (Bratton, Fadok et al. 1997). Die molekulare Identität der beiden Enzyme ist bis heute unbekannt. Es wurden Proteine als Aminophospholipidtranslokase und Scramblase identifiziert, jedoch stellte sich heraus, dass die Aminophospholipidtranslokase offensichtlich nicht die gesuchte Translokase ist, die für die Membrandistribution von Phosphatidylserin verantwortlich ist (Williamson and Schlegel 2004). Darüber hinaus können Scramblase defiziente Mäuse effizient Phosphatidylserin nach außen kehren (Zhou, Zhao et al. 2002).

Die Erkennung von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zytoplasmamembran apoptotischer Zellen wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Es wurden zahlreiche von Makrophagen sekretierte Moleküle identifiziert, die als Brückenmoleküle an Phosphatidylserin binden können und die Signaltransduktion über spezifische Rezeptoren vermitteln. Es wurde auch ein Phosphatidylserinrezeptor (PSR) beschrieben, der direkt an Phosphatidylserin binden kann. Mit Hilfe einer Phagenbibliothek von murinen Makrophagenproteinen und einem monoklonalen Antikörper, der die Phagozytose von Phosphatidylserin-Vesikeln inhibiert, wurde ein putatives PSR-Protein identifiziert und das *PSR* Gen kloniert (Fadok, Bratton et al. 2000). Knockout-Mäuse wurden generiert und es zeigte sich, dass die PSR-defizienten Mäuse *in vitro* und *in vivo* keine beeinträchtigte Phagozytose apoptotischer Zellen aufwiesen. Darüber hinaus zeigte sich, dass das

putative PSR-Protein im Nucleus lokalisiert ist. Offensichtlich war mit der Phage-Display Technik ein Protein identifiziert worden, das nur schwache Kreuzreaktivität mit dem monoklonalen Antikörper aufwies. Die wahre Identität des Phosphatidylserinrezeptors ist daher immer noch unbekannt (Williamson and Schlegel 2004). Ein wichtiges Werkzeug zur experimentellen Detektion von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zytoplasmamembran, das auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird, ist das AnnexinV. AnnexinV gehört zur evolutionär konservierten Familie Calcium- und Lipid-bindender Proteine (Morgan and Fernandez 1995). Die Fähigkeit calciumabhängig negativ geladene Membranlipide zu binden, wird durch 4 C-terminale aus je 5 α -Helices bestehende Domänen vermittelt (Huber, Romisch et al. 1990). Es handelt sich bei den Mitgliedern dieser Familie um ubiquitäre zytosolische Proteine mit zahlreichen zellulären Funktionen, die auf der Fähigkeit der Annexine basieren, calciumabhängig Membranen zu binden. So werden z.B Funktionen bei der Interaktion von Membran und Zytoskelett (Babiychuk and Draeger 2000) sowie beim endosomalen Transport (Mayran, Parton et al. 2003) beschrieben. Einige Mitglieder der Annexin-Familie (AnnexinI, AnnexinII und AnnexinV) wurden auch extrazellulär nachgewiesen, wobei der Sekretionsmechanismus bisher unklar ist. Für extrazelluläres AnnexinV wurde eine Rolle als anti-coagulierendes Protein beschrieben (Rand 2000).

Neben den oben beschriebenen „friss mich“-Signalen gibt es auch „friss mich nicht“-Signale, deren Fehlen zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen führen kann. Das auch als PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) bekannte CD31 wird auf der Oberfläche von Leukozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert (Newman 1997). Es konnte gezeigt werden, dass eine homophile Interaktion zwischen zwei CD31-Molekülen, die jeweils auf Leukozyt und Makrophage exprimiert sind, zu einem Abstoßen der Zellen voneinander führt. In apoptotischen Zellen wird die CD31-vermittelte Signaltransduktion inhibiert. Homophile Interaktion zwischen CD31 auf dem Makrophagen und inaktiviertem CD31 auf einer apoptotischen Zelle führt zu einer starken Bindung und zur Phagozytose der Zelle durch den Makrophagen (Brown, Heinisch et al. 2002). Die homophile Interaktion von CD31, deren Verlauf über Entlassen oder Gefressen werden entscheidet, kann als Beispiel „molekularen Händeschüttelns“ verstanden werden (Chimini 2002).

1.6 Transgene- und Knockout-Mausmodelle

Um die Funktion eines Genprodukts *in vivo* genauer untersuchen zu können, gibt es die Möglichkeit, das Gen in einem Mausstamm zu inaktivieren, wodurch die Expression des Gens verhindert wird. Untersuchung der für ein bestimmtes Genprodukt defizienten Mäuse kann dann Aufschlüsse über die biologische Funktion geben. Neben dieser auch als „gene targeting“ bezeichneten Methode zur Generierung sogenannter „Knockout“-Mäuse gibt es auch die Möglichkeit, das Gen in veränderter Form oder mit einem veränderten Expressionsmuster in einer transgenen Maus zu exprimieren. Auch hierdurch können wertvolle Informationen zur Funktion von Genprodukten gewonnen werden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Methoden zur Generierung von Knockout-Mäusen und transgenen Mäusen gegeben werden.

1.6.1 Generierung von Knockout-Mäusen

Die Generierung von Knockout-Mäusen basiert auf dem Prinzip der Inaktivierung des Gens in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination (Joyner 1993; Hogan, Beddington et al. 1994). Hierzu werden klonierte Kopien des auszuschaltenden Gens durch Ersetzen essentieller Teile des Gens durch ein Antibiotikaresistenzgen, z.B. für die Neomycinresistenz, so verändert, dass sie ihre Funktion verlieren. So generierte sogenannte „Targeting-Vektoren“ enthalten darüber hinaus, an den das veränderte Zielgen flankierenden Enden, noch die Gensequenz für die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus. Murine embryonale Stammzellen, meist vom Mausstamm 129, werden dann mit dem Vektor transfiziert und es kommt in seltenen Fällen zu einer homologen Rekombination, bei der das intakte Gen der ES-Zelle durch die defekte Kopie des Targeting-Vektors ersetzt wird. Zellen, bei denen eine Integration des veränderten Gens, und somit auch des Neomycinresistenzgens, ins Genom stattgefunden hat, können durch Zugabe von Neomycin selektiert werden. Da die Integration im Prinzip auch ohne homologe Rekombination an einer zufälligen Stelle im Genom stattfinden kann, werden die Zellen darüber hinaus auch mit Ganciclovir behandelt. Zellen, die bei der möglichen Integration ohne Rekombination die Sequenz für das Thymidinkinasegen zwangsläufig mit integriert haben, sterben hierdurch ab. So können Zellen selektiert werden, die das defekte Gen an der gewünschten Stelle integriert haben. Diese ES-Zellen werden dann in Blastozysten einer Maus, meist C57BL/6 Maus, mikroinjiziert. Die Blastocysten werden dann in pseudoschwangere Ammen übertragen. Die daraus entstehenden Mäuse sind sogenannte Chimären, die mosaikartig aus Zellen mit 129-Genom und Zellen mit C57BL/6-Genom bestehen. Wenn die so kombinierten Mausstämme sich in einem Genlocus für die Fellfarbe unterscheiden, kann aufgrund einer Abschätzung der Fellanteile in den Nachkommen auch auf die Beteiligung in anderen Geweben, so auch der Keimbahn, geschlossen werden (Joyner 1993). Mit Hilfe von Southernblot- und PCR-Analysen kann die Weitergabe des Knockout-Locus der chimären Tiere auf ihre Nachkommen verfolgt werden. Nach der erfolgreichen Herstellung einer Knockout-Maus wird diese auf einen definierten genetischen Hintergrund eingezüchtet, um kongene Linien zu erhalten. Zu diesem Zweck werden die Tiere für mindestens 12 Generationen mit Mäusen des gewünschten

Hintergrunds rückgekreuzt. In der Immunologie häufig verwendete eingezüchtete Mauslinien stellen BALB/c und C57BL/6 dar. In unserer Arbeitsgruppe wurden auf diese Weise ART2.1/ART2.2 Doppel-Knockout-Mäuse generiert (Mathes 1997; Ohlrogge, Haag et al. 2002), die im Folgenden als ART2-defiziente Mäuse bezeichnet werden. Diese sind auf den BALB/c und C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt worden. Moderne Varianten der „Knockout“-Technik, wie zum Beispiel das Cre-LoxP-System (Sauer 1993), ermöglichen das Ausschalten eines Gens in bestimmten Geweben. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, das Gen durch einen Marker, wie GFP (green fluorescent protein), zu ersetzen um zu untersuchen, in welchen Geweben und zu welchem Zeitpunkt das ausgeschaltete Gen exprimiert wird (Motoike, Loughna et al. 2000). Bei der sogenannten „Knock in“-Technik kann darüber hinaus ein bestimmtes Gen durch die mutierte Variante desselben Gens ausgetauscht werden (Petrilli, Herceg et al. 2004).

1.6.2 Generierung transgener Mäuse

Bei der Generierung transgener Mäuse erfolgt eine zufällige Integration fremder DNA in das Mausgenom (Hogan, Beddington et al. 1994). Die hierfür verwendeten Injektionskonstrukte enthalten neben der cDNA des Gens, das als Transgen exprimiert werden soll, auch einen entsprechenden Promotor und möglicherweise auch regulatorische Sequenzen, die dann das Expressionsmuster bestimmen. Wird ein ubiquitär aktiver Promoter verwendet, wird das Transgen in der Maus ubiquitär exprimiert, während die Verwendung eines gewebsspezifischen Promotors zu einer gewebsspezifischen Expression führt. Indem die Sequenz des Transgens verändert wird, kann sowohl die Funktion als auch Lokalisation des transgenen Genprodukts beeinflusst werden. Zur Generierung ART2 transgener Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei auf dem pHSE3'-Vektor basierende Injektionskonstrukte generiert, bei denen das Transgen unter die Kontrolle des in Kombination mit dem I μ -Enhancers in allen hämatopoetischen Zellen aktiven MHC I Promoters gerät (Pircher, Burki et al. 1989). Die Sequenz wurde insoweit verändert, dass die transgenen Proteine N-Terminal den sogenannten FLAG-Tag tragen, so dass sie in der transgenen Maus mit dem FLAG-Tag-spezifischen M2-Antikörper auf der Zelloberfläche nachweisbar sind. Bei einem Konstrukt wurde der natürliche C-Terminus mit GPI-Verankerungssignal gegen die C-terminale Transmembrandomäne des CD8 ersetzt. Zur Generierung der transgenen Mäuse werden die Injektionskonstrukte in linearisierter Form in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert. Die injizierten Eizellen werden dann in pseudoschwangere Ammen übertragen. Ein Teil der implantierten Eier entwickelt sich zu Nachkommen, die zum Teil das Transgen in ihrem Genom integriert haben. Da die Integration des DNA-Fragments zufällig geschieht, ist es möglich, dass ein anderes, möglicherweise essentielles Gen durch Integration des Transgens inaktiviert wird. Die Integration in der Nähe *cis*-wirkender regulatorischer DNA-Elemente wie z.B. „Silencer“ kann darüber hinaus eine Expression des Transgens verhindern. Mit Hilfe von Southernblot-Analysen können sogenannte „Founder-Tiere“ identifiziert werden, die das Transgen in einer oder mehreren Kopien in ihrem Genom integriert haben. Die Expression des Transgens kann im Fall von transgenen Zelloberflächenproteinen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Generierung transgener Mäuse werden auch diese auf einen genetisch definierten Hintergrund eingezüchtet. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten ART2-transgenen Mäuse

sollen auf den BALB/c Hintergrund rückgekreuzt werden. Hierfür werden die Foundertiere mit ART2 defizienten BALB/c Mäusen verpaart, so dass die Tiere ausschließlich die transgene ART2 und nicht die endogene ART2 exprimieren.

1.7 Maus-Modelle zur *in vivo* Untersuchung der Rolle von ART2 bei Immunfunktionen

1.7.1 Autoimmuner Diabetes bei NOD Mäusen

Die NOD Maus (NOD = non obese diabetic) ist ein Modell für den juvenilen Typ-I autoimmunen Diabetes. In diesem Modell, wie auch bei der humanen Erkrankung, entwickelt sich in einem hohen Prozentsatz der Geschwistertiere im Alter von 16-20 Wochen der Diabetes als Konsequenz einer T-Zell-vermittelten Zerstörung der Insulin produzierenden pankreatischen β -Zellen (Serreze and Leiter 2001). Das Auftreten des Diabetes in diesem Modell erfolgt allerdings nur in spezifischer pathogenfreier (SPF) Umgebung. Immunstimulation durch Pathogene unterdrückt den Ausbruch der Erkrankung. Es konnte gezeigt werden, dass die Kostimulation von CD28 durch B7-Moleküle dafür notwendig ist und hierbei die Proliferation regulatorischer CD4+CD25+ T-Zellen eine Rolle spielt. Diese Zellpopulation schützt prädiabetische NOD Mäuse vor dem Ausbruch des Diabetes (Salomon, Lenschow et al. 2000). Es wird darüber hinaus spekuliert, dass die kompensatorische homöostatische Proliferation autoreaktiver Zellen ein Mechanismus der Diabetesentwicklung in der NOD Maus darstellt. Danach zeigen T-Zellen von NOD Mäusen eine verminderte Überlebensfähigkeit und es kommt daher zu einer vermehrten Proliferation potentiell autoreaktiver Zellen, um die Lücke zu füllen. Wird das Immunsystem der Mäuse stimuliert, wird die Lücke durch antigenspezifische nicht-autoreaktive T-Zellen aufgefüllt (King, Ilic et al. 2004), was den Ausbruch der Krankheit verhindert. Eine einmalige Immunisierung junger, 3 Wochen alter NOD Mäuse mit CFA (Complete Freund's Adjuvans) löst eine klassische polyklonale Immunreaktion gegen die im Freund'schen Adjuvans enthaltenen mykobakteriellen Bestandteile aus. Dies wirkt sich in SFP-Umgebung schützend aus und wird in der Zucht dieser Tiere genutzt, um Erkrankungen während der Schwangerschaft vorzubeugen.

Auch in diesem Modell sind Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von ART2 im Verlauf der Erkrankung beschrieben worden. So wurde bei jungen NOD Mäusen eine Verzögerung der ART2.2-Expression auf Milz T-Zellen gegenüber Kontrollstämmen festgestellt. Die Behandlung mit Cyclophosphamid induzierte eine vorübergehenden Depletion von Lymphozyten in der Milz von NOD-Mäusen. Bereits nach 8 Tagen war die ursprüngliche Zahl von T-Zellen in der Milz wieder erreicht. Es zeigte sich jedoch, dass die Zahl ART2 positiver Zellen noch lange stark reduziert blieb und erst nach 20 Tagen der ursprüngliche Anteil ART2-exprimierender Zellen wieder erreicht war. Während der Zeit der reduzierten ART2-Expression wurde eine verstärkte Infiltration der Pankreas durch Lymphozyten (Insulitis) festgestellt (Ablamunits, Bridgett et al. 2001).

Zahlreiche genetische Loci, die zur Suszeptibilität gegenüber Typ-I Diabetes beitragen, sind charakterisiert worden (Todd and Wicker 2001). Die Identifizierung dieser Loci wurde zum Teil durch sogenannte kongene Stämme ermöglicht. Hierzu wurden zunächst rekombinante Inzuchtstämme generiert (Reifsnnyder, Flynn et al. 1999). Nachkommen der Kreuzung einer NOD Maus und CBA Maus wurden für 20 Generationen eingezüchtet (Chen, Reifsnnyder et al. 2005). Die

daraus entstehenden rekombinanten Inzuchtstämme enthielten unterschiedliche Mischungen aus den NOD und CBA Genomen, deren Anteile mit stammspezifischen molekularen Markern bestimmt werden konnten. Die wiederholte Rückkreuzung von Mäusen dieser rekombinanten Inzuchtstämme mit NOD Mäusen führte zu wachsenden Anteilen NOD-Genoms. So konnten kongene Stämme generiert werden, die zu 99% NOD-Genom enthalten und nur noch auf einer kleinen Region eines Chromosoms CBA-Genom enthielten. Wenn ein solcher Stamm keine Suszeptibilität gegenüber Diabetes zeigt, liegt in dieser chromosomalen Region ein Suszeptibilitätslocus. In der vorliegenden Arbeit wurde die ART2-Expression und Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP bei NOD Mäusen, CBA Mäusen und kongenen Mäusen untersucht.

1.7.2 Immunisierung

Unter Immunisierung versteht man das absichtliche Auslösen einer Immunreaktion. Hierbei wird eine immunogene Substanz, ein sogenanntes Antigen, in das zu immunisierende Tier injiziert. Die Immunisierung ruft eine Antikörperantwort durch B-Zellen hervor. Hierfür ist im Fall T-Zell-abhängiger Antigene eine Stimulation der B-Zellen durch T-Helferzellen, die das gleiche Antigen wie die B-Zelle erkennen, notwendig. Das Protein Ovalbumin, welches eine T-Helfer-Zell-abhängige Antikörperantwort auslöst, wurde im Rahmen dieser Arbeit für die vergleichende Immunisierung von Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen verwendet und die Antikörperantwort ausgewertet. Das Ovalbumin war hierbei mit dem Hapten 2,4,6-Trinitrophenyl gekoppelt, um die Antikörperantwort gegen ein spezifisches Epitop (Hapten) untersuchen zu können. Neben klassischen Antigenen gibt es auch sogenannte Superantigene (Nagashima, Aranami et al. 2004). Im Gegensatz zu anderen Proteinantigenen werden Sie von den T-Zellen direkt erkannt, ohne dass sie als Peptide prozessiert auf MHC Molekülen präsentiert werden. Die Superantigene binden direkt an mit Peptide beladene MHC Moleküle und können dann zusätzlich noch an die V β -Region von vielen T-Zellrezeptoren binden. So kommt es zu einer polyklonalen Expansion von T-Zell-Populationen mit einer bestimmte V β -Kette. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Superantigen handelt es sich um *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Dieses bindet an T-Zellen mit V β -8 enthaltenden T-Zell-Rezeptoren und führt zu polyklonaler Expansion dieser T-Zellen, deren Zahl aber nach wenigen Tagen durch Aktivierungs-induzierten Zelltod wieder zurückgeht. (Kawabe and Ochi 1990).

1.7.3 Concanavalin A induzierte Autoimmunhepatitis

Das Lektin Concanavalin A (ConA) aus den Samen der Bohne *Canavalia ensiformis* bindet an viele verschiedene T-Zell-Membranproteine und kann dadurch eine polyklonale Aktivierung von T-Zellen bewirken (Chilson and Kelly-Chilson 1989). Con A wird daher *in vitro* auch als Mitogen verwendet, um T-Zellen zu aktivieren. Injektion von Con A in Mäuse führt zu einer der autoimmunen Hepatitis ähnlichen Leberschädigung. Untersuchungen mit SCID Mäusen, T-Zell-depletierten und Makrophagen-depletierten Mäusen zeigen, dass dieser Prozess sowohl T-Zell-, als auch Makrophagen-abhängig ist (Tiegs, Hentschel et al. 1992). Auch NKT-Zell-defiziente Mäuse sind resistent gegenüber der ConA induzierten Autoimmunhepatitis (Takeda, Hayakawa et al. 2000), was auf die Beteiligung auch dieser Zellen am Krankheitsverlauf hinweist. Im Verlauf der bereits

nach 24 Stunden auftretenden Hepatitis kommt es zu einer starken Schädigung des Lebergewebes, welches durch erhöhte Leberenzym-Aktivität im Blutplasma der Tiere nachweisbar ist. Es kommt darüber hinaus auch zu einer massiven Infiltration durch Lymphozyten (March, Garcia-Pagan et al. 2005) und Granulozyten (Chen, McKallip et al. 2001). Dieses Modell wurde in dieser Arbeit für vergleichende Untersuchungen von Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen eingesetzt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der auf murinen T-Zellen exprimierte P2X7 Purinozeptor kann durch millimolare Konzentrationen des löslichen Liganden ATP oder durch die NAD-abhängige posttranslationale Proteinmodifikation der ADP-Ribosylierung aktiviert werden. Die dauerhafte Aktivierung von P2X7 führt zum Tod der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der NAD- und ATP-vermittelten Aktivierung des P2X7 Rezeptors und des Zelltodes vergleichend untersucht und näher charakterisiert werden.

NAD und ATP liegen als zentrale Metabolite des Energiestoffwechsels intrazellulär in millimolaren Konzentration vor. Neuere Befunde deuten an, dass beide Nukleotide extrazellulär als Signalmoleküle fungieren können, z.B. nach Freisetzung aus lysierten Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit aus lysierten oder beschädigten Zellen freigesetztes NAD und ATP den P2X7 Rezeptor aktivieren können.

Erste Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Aktivierung von P2X7 auf T-Zellen zu einem extrem schnellen (innerhalb von wenigen Minuten) nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran führt. Daraus ergab sich die Frage, inwiefern die P2X7 Aktivierung und das nach außen Kehren von Phosphatidylserin als „friss mich“ Signal für Phagozyten dient.

Darüber hinaus sollten Lymphomzelllinien auf Expression von ART2 und P2X7 sowie auf Sensitivität gegenüber NAD und ATP untersucht werden, um Zellkulturmodelle für die P2X7-vermittelte Signaltransduktion zu etablieren.

ART2-defiziente Tiere entwickeln sich in der spezifischen pathogenfreien Umgebung der Versuchstierhaltung des UKE unauffällig. Im Rahmen von Pilotexperimenten mit ausgewählten Immunisierungs- und Infektions-Modellen wollte untersucht werden, ob ART2-defiziente Tiere in der Lage sind, auf Herausforderungen mit angemessenen Immunreaktionen zu reagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| FACSCalibur | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Biometra T3 PCR-Maschine | Whatman Biometra, Göttingen |
| Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A | Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf |
| Fujix BAS2000 Phosphoimager | Fuji Film, Tokyo (Japan) |
| High Voltage Power Pack P30 | Whatman Biometra, Göttingen |
| Xcell SureLock Mini-Cell | Invitrogen, Paisley (Großbritannien) |
| Xcell II Blotting System | Invitrogen, Paisley (Großbritannien) |
| Axiovert S100 Mikroskop | Zeiss, Jena |
| Axiovert 200M Mikroskop | Zeiss, Jena |
| Digitalkamera DP500 | Olympus, Hamburg |
| Axiocam MRm | Zeiss, Jena |
| ApoTome | Zeiss, Jena |
| ELISA-Reader | Tecan, Crailsheim |
| DMZ Universal-Zieh-Gerät | Zeitz, Augsburg |
| EPC-9 Patch-Clamp Verstärker | HEKA, Lambrecht |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| Nitex Membran (80 µm Maschenweite) | Cadisch Precision Meshes Ltd., London (Großbritannien) |
| BD Falcon Cellstrainer (70 µM Maschenweite) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Kodak Biomax MR Röntgenfilm | Kodak Company, Connecticut (USA) |
| 96 Well Zellkulturplatten | Nunc, Roskilde (Dänemark) |
| Zellkulturschalen | Nunc, Roskilde (Dänemark) |

| | |
|---|--|
| BD Falcon 8-well Cultureslides | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Nitrozellulose-Hybond-C | Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Polyvinylidendifluorid-ImmobilonP (PVDF) | Boehringer Ingelheim, Ingelheim |
| NYTRAN-Plus Polyamidmembran | Whatman Schleicher & Schuell, Dassel |
| NuPAGE precast Gele | Invitrogen, Paisly (Großbritannien) |
| Borosilikat Kapillaren für Patch-Clamp-Untersuchungen (1,5 mm Außendurchmesser) | WorldPrecisionInstruments, Florida (USA) |

2.1.3 Mausstämme

| | |
|--------------------------|---|
| Balb/cByJ | Jackson Laboratory (USA) |
| Balb/c.ART2.1KO/ART2.2KO | wurden in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. N. Killeen (UCSF, San Francisco, USA) hergestellt (Mathes 1997) und auf den Balb/c Hintergrund rückgekreuzt (Ohlrogge, Haag et al. 2002). |
| Balb/c.CD38KO | wurden von Dr. F. Lund (Trudeau Institute, Saranac Lake, USA) zur Verfügung gestellt. |
| ART2.GPI-transgene | Die transgenen Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit der „Transgenic Mouse Facility“ im ZMNH (Dr. Hermanns-Borgmeyer) hergestellt und werden zur Zeit auf den |
| ART2.TM-transgene | Balb/c.ART2.1KO/ART2.2KO Hintergrund eingezüchtet. |
| CBA/J | Jackson Laboratory (USA) |
| NOD/Lt | Jackson Laboratory (USA) |
| NOD.CBA.Tyr | Jackson Laboratory (USA) |
| NOcCB-1 | Jackson Laboratory (USA) |

Die Balb/c Wildtyp, ART2-defizienten, CD38-defizienten und transgenen Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet. Die Experimente mit den CBA/J, NOD/Lt, NOD.CBA.Tyr und NOcCB-1 Mäusen wurden während eines Auslandsaufenthaltes im Jackson Laboratory in den USA durchgeführt.

2.1.4 Zelllinien

| <u>Zelllinie:</u> | <u>Herkunft:</u> |
|-------------------------------|---|
| MD27 Balb/c Hybridom | M.Neumaier, UKE, Hamburg |
| EL 4 C57/Bl6 Lymphomzelllinie | C.Stocking, HPI, Hamburg |
| YAC-1.ATCC A/Sn Lymphom | ATCC, Manassas, USA |
| YAC-1.HH A/Sn Lymphom | A.Hamann, Charité, Berlin |
| LB-Alpha Balb/c Lymphom | A.Hamann, Charité, Berlin |
| SL12.2 α AKR/s Lymphom | G.Dennert, University of Southern California (USA). |
| EL 4.ATCC | G.Dennert, University of Southern California (USA). |

2.1.5 Antikörper

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Hamster-anti-Maus-CD3-FITC | Pharmingen, Heidelberg |
| Hamster-anti-Maus-CD3-APC | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-CD4-Cy3 | Ted Duffy, The Jackson Laboratory |
| Ratte-anti-Maus-CD4-APC | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-CD8-PE | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-CD11b-FITC | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-CD11b-PE | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-ART2.1 | UKE, Hamburg |
| Ratte-anti-Maus-ART2.2-FITC | The Jackson Laboratory |
| Ratte-anti-Maus-CD62L-FITC | Pharmingen, Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-CD62L-PE | Pharmingen, Heidelberg |
| Hamster-anti-Maus-CD69-PE | Pharmingen, Heidelberg |
| Maus-anti-Maus-V β 8-TCR-FITC | Pharmingen, Heidelberg |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Maus-anti-Ethenoadenosin-Alexa488 | UKE, Hamburg |
| Maus-anti-FLAG M2-FITC | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE | Pharmingen, Heidelberg |
| Ziege-anti-Ratte-IgG-PE | Dianova, Hamburg |
| Esel-anti-Maus-IgG1-PE | Dianova, Hamburg |
| Ratte-anti-Maus-CD11a | Pharmingen, Heidelberg |
| Kaninchen-anti-Maus-P2X7 Serum | UKE, Hamburg |
| Llama-anti-Maus-ART2 Serum | UKE, Hamburg |
| Maus-anti-Ethenoadenosin | UKE, Hamburg |
| Ratte-anti-Maus-CD3 | SEROTEC, Düsseldorf |
| Hamster-anti-Maus-CD28 | Pharmingen, Heidelberg |
| AnnexinV-FITC | Becton Dickinson, Heidelberg |
| AnnexinV-APC | Becton Dickinson, Heidelberg |

2.1.6 Chemikalien

Alle im Folgenden nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder der Firma Merck, Darmstadt erworben.

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| BSA | New England Biolabs, Frankfurt |
| DNA Typing Grade Agarose | GibcoBRL, Karlsruhe |
| DNA Molekulargewichtsmarker | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| DNA Ladepuffer | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| Carbenicillin | Serva, Heidelberg |
| Celltrackergreen | Molecular Probes, Karlsruhe |
| Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1 | Dynal, Hamburg |
| FAM-VAD-FMK Pan-Caspase-Kit | Biocarta, Hamburg |
| FAM-YVAD-FMK Caspase-1 Kit | Biocarta, Hamburg |

| | |
|--|--------------------------------------|
| KN62 (1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenyl-piperazin) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| LDH-Release-kit | Roche, Mannheim |
| Apoalert Mitosensor Kit | Becton Dickinson, Heidelberg |
| NuPage Sample Reducing Agent (DTT) | Invitrogen-Novex, Karlsruhe |
| NuPage SDS-PAGE MES running buffer | Invitrogen-Novex, Karlsruhe |
| NuPage SDS-PAGE transfer buffer | Invitrogen-Novex, Karlsruhe |
| NuPage LDS sample buffer | Invitrogen-Novex, Karlsruhe |
| PKH26 | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| ³² P-NAD | Amersham, Braunschweig |
| ³² P-dCTP | Amersham, Braunschweig |
| Propidiumjodid | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Rediprime DNA Labeling Kit | Amersham, Braunschweig |
| QIAquick Gel Extracton Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAGEN Endofree Plasmid Maxiprep Kit | Qiagen, Hilden |
| Ultramount, permanent Mounting Medium | DAKO-Cytomation, Glostrup (Dänemark) |

2.1.7 Enzyme

| | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| PFU-Turbo DNA-Polymerase | Stratagene, Amsterdam (Niederlande) |
| Platinum Blue DNA-Polymerase | Invitrogen, Karlsruhe |
| Proteinase K | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| T4-Ligase | Invitrogen, Karlsruhe |
| BamH1 (20.000 U/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |
| Sal I (20.000 units/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |
| Bcl I (15.000 U/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |
| Pst I (20.000 U/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |

| | |
|--------------------------|--------------------------------|
| Xho I (20.000 units/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |
| Eco RI (20.000 units/ml) | New England Biolabs, Frankfurt |

2.1.8 Primer

| Name | Produkt | Nukleotidsequenz |
|--------|------------------------------|----------------------------------|
| F13 | ART2.1 Exon F vorwärts | CATCCACAGAAGCCTTAATGAG |
| F43 | ART2.1 Exon F rückwärts | CTAAGCTGCTAACGTTGTCTGC |
| F44 | ART2.2 Exon F rückwärts | CTCTCTTTGTTAAAGATGAAGAACT |
| NF1 | Neomycinresistenz vorwärts | GATGGATTGCACGCAGGTTCT |
| NR1 | Neomycinresistenz rückwärts | AGGTAGCCGGATCAAGCGTAT |
| TgSF | Transgene ART2 vorwärts | TAAAAGTCGACGAATTCATGGCCTTACCAG |
| TgGPIr | Transgene ART2-GPI rückwärts | GCACTTGATCAGATCTACGGCTCAGCAAGAGT |
| TgTMr | Transgene ART2-TM rückwärts | CTAGTTGATCATTGTGAAACTGTTTCATG |

2.1.9 Medien und Lösungen

2.1.9.1 Zellkulturmedium für Lymphozyten und Lymphomzellen

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 (GibcoBRL) mit 10% FCS (Firma Biochrom), 50 µg/l Gentamycin (GibcoBRL), 1% Glutamin (GibcoBRL), 1% Pyruvat (GibcoBRL) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) verwendet.

2.1.9.2 Gey's Puffer für Erythrozytenlyse

Puffer A:

35g/l NH₄Cl, 1.85g/l KCl, 1.5g/l Na₂HPO₄*12 H₂O, 0.119g/l KH₂ PO₄ , 5.0 g/l Glukose, 0.05 g/l Phenolrot

Puffer B:

4.2 g/l MgCl₂*6 H₂O, 1.4 g/l MgSO₄*7 H₂O, 3.4 g/l CaCl₂*2 H₂O

Puffer C:

22.5 g/l NaHCO₃

Der gebrauchsfertige Puffer wird direkt vor der Verwendung angesetzt: 20 Teile Puffer A + 5 Teile Puffer B + 5 Teile Puffer C + 70 Teile aqua dest.

2.1.9.3 Isolierung genomischer DNA

Lysis Puffer:

0.1M Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.2M NaCl, 100 µg Proteinase K (direkt vor Gebrauch dazugeben)

Elutionspuffer TE: 10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA

2.1.9.4 Isolierung von Plasmid-DNA

„QIAprep Spin Miniprep Kit“

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3 M K-Acetat pH 5.5

Waschpuffer PB

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10 mM Tris-HCl

2.1.9.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Puffer QG

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10 mM Tris-HCl

2.1.9.6 SDS-Page und Westernblot

Lysepuffer: 1% TX-100, 1mM AEBSF, 1mM ADPR

MOPS Laufpuffer: 50 mM MOPS, 50 mM Tris-Base, 3.5 mM SDS, 1mM EDTA, pH 7,7

1xTransferpuffer: 3.027g/l Tris-Base, 14.4g Glycin pH 8.3, 20% Methanol

1xTBS: 8 g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 3 g/l Tris-Base pH 7.4

Silberlösung: 1xTBS, 20 % AgNO₃, 40% Na-Citrat, 20% FeSO₄ (direkt vor Anwendung herstellen)

2.1.9.7 Southernblot

Denaturierungslösung: 0.4 M NaOH

Depurinierungslösung: 0.25 M HCl

20xSSC: 175.3 g/l NaCl, 88.2 g/l Trinatriumcitrat

Transferlösung: 2xSSC

Waschpuffer: 0.5xSSC, 1% SDS

20xSSPE: 175.3 g/l NaCl, 27.6 g/l NaH₂PO₄*H₂O, 7.4 g/l EDTA, pH 7.4 mit NaOH

Hybrisierungspuffer: 1.5x SSPE, 7% SDS, 10% PEG 20000

2.1.9.8 ELISA

Blockpuffer: PBS, 1% BSA

Probenpuffer: PBS mit 10% Ziegenserum

Waschpuffer: PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween20

2.1.9.9 Patch-Clamp

Extrazelluläre Lösung:

135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM Sucrose, auf pH 7.4 einstellen mit NaOH , 0.01mg/ml Phenolrot.

Intrazelluläre Lösung: 125 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, auf pH 7.2 einstellen mit KOH

2.1.9.10 Bindepuffer für AnnexinV-Bindung

RPMI 1640 (GibcoBRL) + 1,6 mM CaCl₂ (ad 2 mM CaCl₂)

2.1.10 Vektoren für die Generierung transgener Mäuse

Die Vektoren basieren auf dem pHSE3'-Vektor von Dr.Pircher (Universitätsklinikum Freiburg). Es wurden zwei Konstrukte mit jeweils einer GPI-verankerten und transmembran-verankerten ART2.2 hergestellt. In **Abbildung 6** sind die beiden Konstrukte mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen dargestellt.

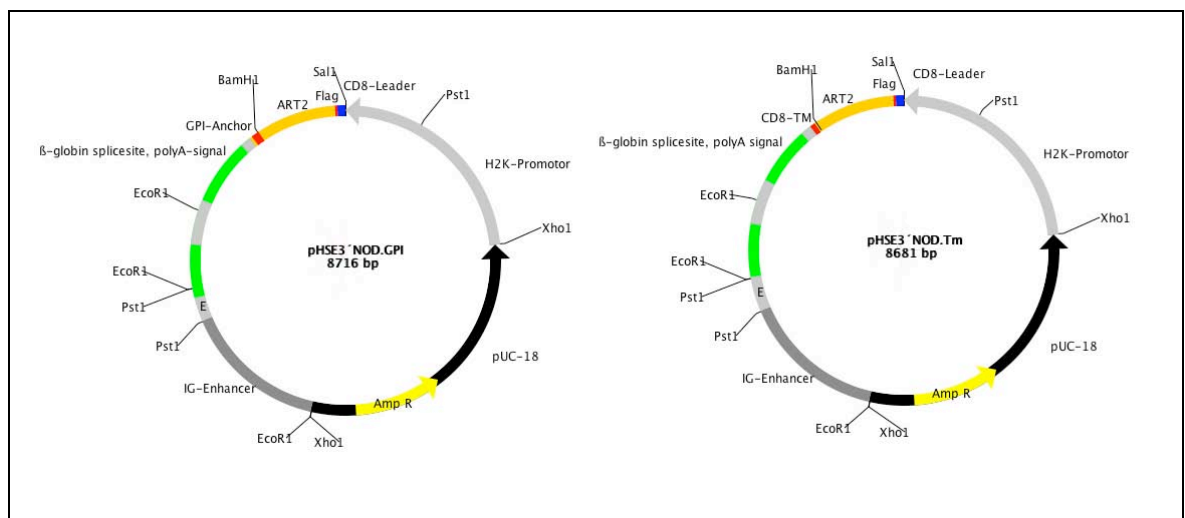


Abb. 6: Konstrukte für die Generierung transgener Mäuse. Zu sehen ist das Konstrukt für die GPI-verankerte ART2 (links) und die mit dem Transmembran-Anker von CD8 auf der Zelloberfläche verankerte ART2 (rechts). Mit Hilfe eines Xho1 Verdau können die bakteriellen Sequenzen (Ampicillinresistenz) vor der Pronukleus-Injektion herausgeschnitten werden. Die ART2 wird unter Kontrolle des MHC1 (H2K) Promotors und des Iγ_u Enhancers exprimiert. Beide transgenen ARTs sind mit einem FLAG-Tag versehen.

2.1.11 Substrate für ART2 und Agonist und Inhibitor von P2X7

Als Substrate für die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung wurden NAD und das NAD-Analogon 6'-N-etheno-NAD in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. Als direkter Agonist des P2X7-Rezeptors wurde ATP in den angegebenen Konzentrationen benutzt. Der P2X7-spezifische Inhibitor KN62 wurde in Blockadeexperimenten in den angegebenen Konzentrationen verwendet. In **Abbildung 7** sind die Strukturformeln dieser Moleküle dargestellt.

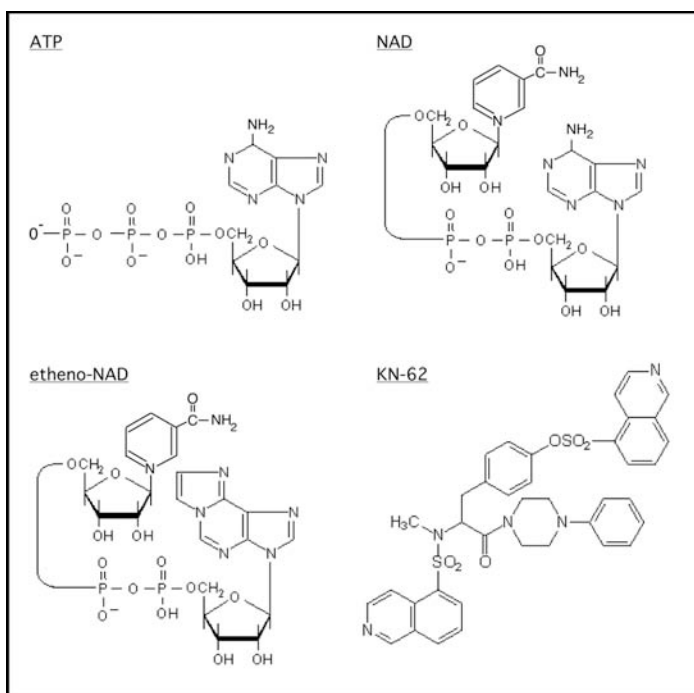


Abb. 7: Strukturformeln von NAD, etheno-NAD, ATP und KN62. NAD und 6'-etheno-NAD dienen beide als Substrat für ADP-Ribosyltransferasen. ATP ist ein Agonist für den P2X7 Purinorezeptor. KN62 ist ein Inhibitor des P2X7 Purinorezeptors.

2.2 Methoden

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

Current Protocols In Immunology (Coico 2001)

Current Protocols In Molecular Biology (Asubel 1999)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrock, Fritsch et al. 1989)

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 *Isolierung genomischer DNA aus Gewebe*

Für das Screening der ART2-defizienten Mäuse und die Analyse der ART2-transgenen Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen. Hierfür wurden die ca. 1 cm langen Schwanzbiopsien zunächst für 3 Stunden bei 55°C auf einem Schüttler in 600 µl Lysispuffer und 100 µg Proteinase-K lysiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, in dem bereits 600 µl Isopropanol für die Fällung der DNA vorgelegt worden war. Die ausgefallene DNA wurde durch 1-minütige Zentrifugation mit 9000 rpm pelletiert und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde bei 4°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde photospektrometrisch ermittelt.

2.2.1.2 *Isolierung von Plasmid-DNA*

Plasmid-DNA wurde je nach erwarteter DNA-Ausbeute mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (für DNA-Mengen bis 20 µg) oder dem „Qiagen Endofree Plasmid Maxiprep Kit“ aus transformierten *E.Coli* Bakterien gewonnen. Die Anweisungen des Herstellers wurden dabei beachtet. Im Prinzip erfolgt bei der Präparation eine alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender selektiver Bindung von Nukleinsäuren an eine Silikatmembran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Nach zwei Waschschrritten wird die DNA von der Membran eluiert. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Qualität der isolierten DNA in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel kontrolliert.

2.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein etabliertes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki, Gelfand et al. 1988). Hierbei wurde beim Screening der ART2-defizienten und ART2-transgenen Mäusen als Template 100-500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien verwendet. Bei der Amplifikation der ART2 Sequenzen für die Generierung der Injektionskonstrukte wurde 0.1-1 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Polymerasen wurden nach erwarteter Fragmentlänge und Fehlerrate der Polymerase ausgewählt. So wurde für die Amplifikation der Sequenzen für die Injektionskonstrukte die Pfu-Turbo Polymerase mit niedriger Fehlerrate ausgewählt. Je nach Länge der Primer und GC-Gehalt der Sequenz wurden unterschiedliche Schmelztemperaturen gewählt. Um die Spezifität der Primer zu erhöhen, wurde zum Teil eine „touch-down“-PCR mit fallenden Annealing-Temperaturen in den ersten Zyklen und einer konstant niedrigen Annealing-Temperatur während der folgenden Zyklen durchgeführt.

Im Folgenden sind die PCR-Programme für die jeweiligen Primerkombinationen angegeben.

F13xF43 (Exon F)

1. 94°C, 9 min; 65°C 30 sec; 72°C 1min
2. 94°C, 30 sec; 60°C; 30 sec; 72°C, 1 min
3. 94°C, 30 sec; 50°C; 72°C, 1 min
4. 94°C, 1 min; 55°C, 30 sec; 72°C, 1 min
5. 33 Zyklen gehe zu 4.
6. 72°C 8 min
7. auf 4°C halten

NF1xNR1 (Neomycinresistenz)

1. 95°C, 9 min
2. 95°C, 30 sec
3. 59°C, 30 sec
4. 72°C, 2 min
5. 35 Zyklen gehe zu 2.
6. 72°C, 10 min
7. auf 4°C halten

TgSFxTgGPIr/TgTMr (ART2-Sequenz für transgene Mäuse)

1. 95°C, 9 min
2. 95°C, 30 sec
3. 55°C, 30 sec
4. 72°C, 1,5 min
5. 35 Zyklen gehen zu 2.
6. 72°C, 10 min
7. auf 4°C halten

TgSFxF44 (Transgen)

1. 94°C, 9 min; 65°C 30 sec; 72°C 1min
2. 94°C, 20 sec; 60°C; 30 sec; 72°C, 3 min
3. 94°C, 1 min; 50°C, 30 sec; 72°C, 3 min
4. 33 Zyklen gehe zu 3.
5. 72°C 8 min
6. auf 4°C halten

2.2.1.4 *E.coli* Transformation

Für die Transformation mit den beiden transgenen Injektions-Vektoren oder der Re-Transformation fertiger Konstrukte aus einer Plasmidpräparation mit dem „QIAprep Spin Miniprep

Kit“ wurden supercompetente XL10Gold-Zellen (Stratagene) verwendet. Bei der Transformation wurde ein Hitzeschock-Verfahren durchgeführt. Nach dem Auftauen von 150 µl Zellen wurden 3 µl β-Mercaptoethanol-Mix hinzugegeben und die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurde ca. 1 µg DNA zu den Zellen gegeben und die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 54°C für 60 Sekunden durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gehalten und 400µl 37°C warmes SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator gehalten und anschließend auf LB-Platten mit Carbenicillin ausplattiert, um transformierte Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 DNA-Sequenzierung

Die ART2-Sequenzen der pHSE3'-Konstrukte für die transgenen Mäuse wurden vor der Injektion sequenziert, um sicher zu gehen, dass bei der PCR-Amplifikation keine Mutationen entstanden sind. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger, Coulson et al. 1980). Es wurde das BigDye Terminator Sequenzierungs-kit verwendet. Es wurden ca. 500 ng DNA und die entsprechenden Primer verwendet.

Sequenzierungsprogramm:

1. 96°C, 40 sec
2. 50°C, 15 sec
3. 60°C, 4 min
4. 28 Zyklen gehe zu 1.
5. auf 4°C halten

Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA mit 20 mM Natriumacetat und 75% Ethanol gefällt und für 4 Minuten auf Eis gehalten. Im Anschluss wurde die DNA bei 4°C 30 Minuten bei 16.000g pelletiert, mit 75% Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 16.000g pelletiert. Das Pellet wurde zuletzt getrocknet. Die Proben wurden dann im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie, UKE, Hamburg, mit Hilfe eines DNA-Sequencing Systems (ABI 370A) sequenziert.

2.2.1.6 Herstellung einer DNA-Sonde

Für die Herstellung der DNA-Sonde für das Screening der transgenen Mäuse wurden jeweils 5 µg Plasmid-DNA des pHSE3'-ART2.GPI Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und PST I (2,5 Kb-Fragment) oder EcoRI und PSTI (1,15 Kb-Fragment) in den entsprechenden empfohlenen Puffern über Nacht verdaut, in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extracton Kit“ aus dem Gel aufgereinigt.

2.2.1.7 Markierung der DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit dem „Rediprime DNA Labeling Kit“.

Hierbei wird eine Polymerase verwendet, die an die freien 3'-Enden von degenerierten Primern, die nach einer Denaturierung der Sonden-DNA für 5 min bei 95°C an die DNA binden, radioaktiv markierte Nukleotide einbaut. Nach Herstellerangaben wurden 25ng aufgereinigte DNA für 30 Minuten bei 37°C mit 50 µCi ³²P-dCTP markiert. Nicht inkorporierte Aktivität wurde über NICK-Säulen entfernt. Der Einbau wurde in einem Cherenkow-Szintillator kontrolliert. Die Sonde wurde abschließend nochmals bei 100°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten.

2.2.1.8 Southernblot

Für den Southernblot wurden ca. 5µg genomische DNA aus Schwanzbiopsien der transgenen Mäuse mit EcoRI oder PSTI (10-20 units/Ansatz) über Nacht verdaut. Die DNA-Fragmente wurden dann mit einem 1% Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt (Southern 1975). Die Gele wurden anschließend für 15 Minuten mit 0,25 M HCl depuriniert, mit aqua dest. gewaschen und für weitere 15 Minuten mit 0,4 M NaOH denaturiert. Mit Hilfe eines Kapillarblots wurde die DNA dann auf eine Polyamid-Membran übertragen. Die Membran wurde mit 2 x SSC gewaschen und getrocknet. Die Membran wurde für die Detektion für 30 Minuten bei 68°C im Hybridisierungssofen mit Hybridisierungspuffer in Anwesenheit von 200µg/ml denaturierter Heringsspermien-DNA geblockt. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde hinzugegeben und über Nacht bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz mit Waschpuffer gewaschen, anschließend zweimal für 30 Minuten im Rotationsofen mit Waschpuffer bei 68°C inkubiert. Die Membran wurde getrocknet, in Plastikfolie eingewickelt und über Nacht auf einer Phosphoimagerplatte in einer Kassette exponiert. Die Phosphoimagerplatte wurde dann mit einem Fujix BAS2000 Phosphoimager ausgewertet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus

6-8 Wochen alte Mäuse wurden mit einem 30 % O₂ / 70% CO₂ Gasgemisch betäubt und anschließend mit 100 % CO₂ getötet. Lymphknoten und Thymus wurden präpariert und in 35 mm Petrischalen in eiskaltem RPMI aufgenommen. Es wurden hierbei die zervikalen, axillären, inguinalen, mesenterialen und lumbalen Lymphknoten entnommen (**Abb.8**). Die Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus wurden mit Hilfe einer NITEX-Membran (70 µM Maschengröße) aus dem Zellverband gelöst. Hierbei wurden die Lymphknoten oder der Thymus zwischen zwei Membranen gelegt und mit einer Pinzette zerdrückt. So wurden die Zellen durch das feinmaschige Gewebe in das Medium freigesetzt, während die Membran Hülle und Bindegewebe zurückhielt. Die Zellen wurden mehrfach bei 4°C gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Lymphozyten dann für Versuche eingesetzt.

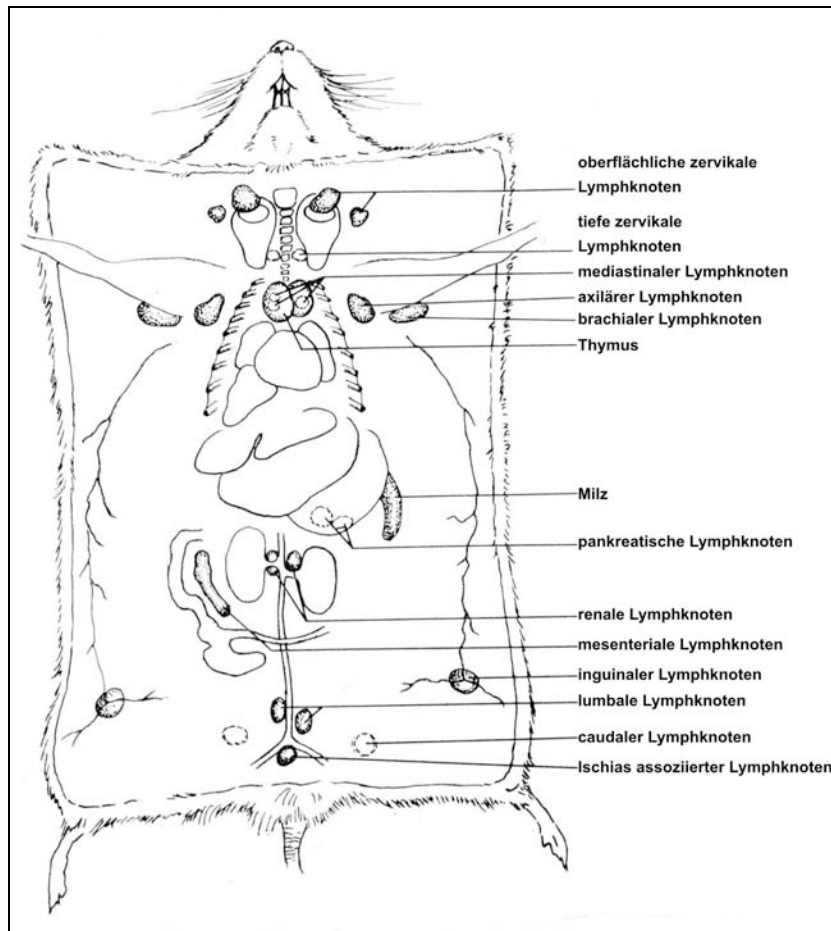


Abb. 8: Lymphatische Organe der Maus. Diese Abbildung zeigt die Lage der lymphatischen Organe der Maus: Lymphknoten, Milz und Thymus. Für Gewinnung von Gesamtlmphknotenzellen wurden die oberflächlichen zervikalen, axillären, brachialen, inguinalen, lumbalen und mesenterialen Lymphknoten präpariert. Für Experimente zur Untersuchung der ADP-Ribosylierung mit radioaktiv markiertem NAD wurde auch die Milz präpariert. Bei der Analyse der transgenen Mäuse wurde darüber hinaus auch noch der Thymus präpariert. (modifiziert nach: http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)

2.2.2.2 Präparation muriner Milzzellen

Aus 6-8 Wochen alten, getöteten Mäusen wurde die Milz entnommen und in eine 35 mm Petrischale mit eiskaltem RPMI gelegt. Die Milz wurde dann mit einer Pinzette durch die feinen Maschen einer NITEX-Membran gedrückt und die Zellen somit in das Medium freigesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem RPMI wurden die Zellen in 10 ml Gey's Puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten durch osmotischen Schock zu lysieren. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen für Experimente eingesetzt.

2.2.2.3 Depletion der B-Zellen

Die Depletion der B-Zellen erfolgte mit Hilfe magnetischer „Beads“, an denen Schafantikörper gegen Maus IgG1 immobilisiert sind. Die „Beads“ wurden vor der Verwendung zweimalig mit RPMI gewaschen. Die Menge verwendeter „Beads“ richtet sich dabei nach der Zahl der zu

depletierenden B-Zellen. Es wurden ca. 5 „Beads“ pro B-Zelle eingesetzt (ca. 30 % B-Zellen bei Lymphknotenzellen). Die Zellen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotationsinkubator inkubiert. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die magnetischen „Beads“ und damit auch die gebundenen B-Zellen aus der Suspension entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß mit der gleichen Menge an „Beads“ überführt und für weitere 10 Minuten rotiert. Durch die zweite Inkubation wurden restliche B-Zellen mit Hilfe des Magnetständers entfernt. Die Zahl der aufgereinigten T-Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2.4 *Präparation von Peritonealmakrophagen*

Zur Gewinnung von Peritonealmakrophagen wurde das Peritoneum der getöteten Mäuse zweimalig mit 5 ml eiskaltem RPMI ausgespült. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen und die Zahl der Makrophagen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Makrophagen wurden dann entweder unmittelbar für Phagozytose-Experimente verwendet oder auf speziellen Mikroskopobjektträgern als adhärenente Zellen kultiviert. Für die Kultivierung von Makrophagen wurden jeweils $3-4 \times 10^5$ Makrophagen in 800 µl Kulturmedium aufgenommen und in jeweils eine Kammer eines „BD Falcon 8-well Cultureslides“ gegeben. Die Zellen wurden dann für 12-24 h bei 37°C und 5 %CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nicht haftende Zellen wurden durch sanftes Waschen mit Kulturmedium entfernt. Die Makrophagen wurden für weitere 2 Tage im Brutschrank kultiviert und dann für Phagozytose-Experimente verwendet.

2.2.2.5 *Präparation von Leberlymphozyten*

Für die Präparation von Leberlymphozyten wurde die Leber direkt nach Tötung der Maus mit 10 ml PBS durchgespült. Hierbei wird eine Kanüle in die *Vena portae* eingeführt und die *Vena cava inferior* durchtrennt. Die durchspülte, blasse Leber wurde entnommen und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden mit Hilfe des Kunststoffstempels einer Spritze durch ein Metallsieb mit 200 µM Maschengröße gedrückt, um eine Einzelzellsuspension in RPMI herzustellen. Die Zellen wurden durch ein 70 µM Falcon-Zellsieb gegeben, um Gewebebestandteile der Leber aus der Zellsuspension zu entfernen. Die Zellen wurden bei 500g zentrifugiert und in 50 ml 35% Percoll, 100 Units/ml Heparin aufgenommen. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 800g zentrifugiert. Die Hepatozyten wurden als Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 15 ml eiskaltem Gey's Puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2.6 *Präparation von Lymphozyten aus peripherem Blut*

Betäubten Mäusen wurde retroorbital ca. 500 µl Blut entnommen. In den Gefäßen zur Blutentnahme wurden zuvor 100 Units Heparin (10 µl) vorgelegt. Es wurde anschließend 1 ml 0,9% NaCl, 2 mM EDTA hinzugegeben und gründlich gemischt. Das Blut wurde dann in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 3 ml eiskalter Gey's Puffer darauf gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dann für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Das

Pellet wurde erneut in 4 ml Gey's Puffer aufgenommen und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Lymphozyten dann in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2.7 Propagierung von Lymphomzellen

Alle Schritte der Zellkultur wurden unter sterilen Laminar-Flow-Bedingungen durchgeführt. 1ml kryokonservierte Lymphomzellen (Einfriermedium: 50% FCS, 40% MEM, 10% DMSO) wurden in einem Wasserbad rasch auf 37°C gebracht, in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben. Es wurde auch noch eine 1:10 Verdünnung davon auf eine Zellkulturschale gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank propagiert. Die Zellen wurden dann ca. alle 3 Tage geteilt, wenn die Suspension zu 80% konfluent erschien. Hierbei wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Kulturmedium vorgenommen. Vor der Verwendung für Experimente wurden die Zellen mit RPMI gewaschen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 „Fluorescence Activated Cell Sorting“ FACS

Die sogenannte Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einer großen Zahl an Zellen. Hierbei kann die Expression von Zelloberflächenmolekülen durch Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper nachgewiesen werden. Es kann hierbei sowohl die relative Expression auf der einzelnen Zelle als auch der Anteil exprimierender Zellen in einer Population bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Expression zahlreicher Antigene auf Lymphomzellen, Thymus-, Milz-, Lymphknoten- und Leberlymphozyten untersucht. Eine weitere Anwendung wurde durch fluoreszierende Substanzen ermöglicht, mit denen die Zellen angefärbt werden. So konnten Calciumflux, Aktivierung von Caspasen, mitochondriales Membranpotential, DNA-Fragmentierung und das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden.

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

Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen.

Die Anfärbungen mit Antikörpern zum Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen wurden auf 96-well Platten durchgeführt. Hierbei wurden 4×10^5 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden mit eisgekühltem Kulturmedium durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 1600 rpm wurden die Zellen in 100 µl Kulturmedium für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit ca. 0.5µg der jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubiert. Hierbei wurden bis zu 3 verschiedene Antikörper, die jeweils mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt waren, verwendet. Bei der Verwendung unkonjugierter Antikörper wurde im Anschluss, nach einem Waschschriff, eine 30-minütige Inkubation mit einem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Im Anschluss an die Anfärbung wurden die Zellen gewaschen und in FACS-Röhrchen mit Kulturmedium und 10µg/ml Propidiumjodid überführt. Die Zellen wurden dann im FACS mit Hilfe der entsprechenden Software (Cellquest, Becton Dickinson) gemessen und die Daten ausgewertet.

2.2.3.2 Messung der ART2-Aktivität

Für die Messung der ART2-Aktivität wurde das NAD-Analogon etheno-NAD verwendet. Das etheno-NAD dient ART2 als Substrat zur etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen. Die etheno-Adenosingruppe wird von dem monoklonalen Antikörper „1G4“ erkannt, der ursprünglich für die Untersuchung von DNA-Modifikationen nach Exposition von Zellen mit Vinylchlorid entwickelt wurde (Young and Santella 1988). Die Zellen wurden bei 37°C oder 4°C für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen Konzentrationen an etheno-NAD inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimalig gewaschen und mit 1µg/100µl Alexa488-gekoppeltem 1G4-Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln angefärbt. Zur Kontrolle wurden auch Zellen, die in Abwesenheit von etheno-NAD inkubiert worden waren, angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen dann im FACS analysiert.

2.2.3.3 Apoptose Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen nach Behandlung mit NAD und ATP auf zahlreiche Merkmale der Apoptose überprüft. Im Folgenden werden die Methoden kurz beschrieben.

2.2.3.3.1 Detektion von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zytoplasmamembran

Das Membranlipid Phosphatidylserin ist bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Ein vielfach beschriebenes Merkmal apoptotischer Zellen ist das nach außen Kehren dieses Membranlipids. Das 35 KDa Protein AnnexinV bindet calciumabhängig mit hoher Spezifität an Phosphatidylserin. Fluorochrom-gekoppeltes AnnexinV kann daher für den Nachweis Phosphatidylserin nach außen kehrender Zellen im FACS verwendet werden. In dieser Arbeit wurde Fluorochrom-gekoppeltes AnnexinV nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4×10^5 Zellen wurden nach Behandlung mit NAD, ATP, Staurosporin oder einer Kobalt-Gamma-Quelle mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen in 50 μ l mit 1 μ g/ml Fluorochrom-gekoppeltem AnnexinV und 10 μ g/ml Propidiumjodid für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln angefärbt. Die Zellen wurden dann in 400 μ l AnnexinV-Waschpuffer aufgenommen und im FACS analysiert. Bei den Echtzeit-Experimenten wurden die Zellen in 37°C warmen AnnexinV-Bindepuffer aufgenommen, der 1 μ g/ml AnnexinV enthielt.

2.2.3.3.2 Nachweis der DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung von DNA durch Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige DNasen gilt als klassisches Merkmal der Apoptose. Um die DNA-Fragmentierung nachzuweisen, wurden die induzierten Zellen gewaschen, in 100 μ l 80% Methanol aufgenommen und für 3 Stunden bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 μ g/ml Propidiumjodid angefärbt. Danach wurden die Zellen im FACS analysiert. Der relative DNA-Gehalt wurde im Kanal FL2-W des FACSCalibur Durchflusszytometers detektiert.

2.2.3.3.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe des „Apoalert Mitosensor“-Kits (Becton Dickonson) gemessen. Die Methode basiert auf einem Fluoreszenzfarbstoff, der in intakten Mitochondrien Potential-abhängig Aggregate bildet, die rot fluoreszieren und in Kanal FL-2 des FACSCalibur Durchflusszytometers detektierbar sind. Zellen, deren mitochondriales Membranpotential zusammengebrochen ist, enthalten die monomere Form des Fluoreszenzfarbstoffs, welche grün fluoresziert und im Kanal FL-1 des Durchflusszytometers detektierbar ist. 10^6 induzierte Zellen wurden bei 350 g pelletiert und für 20 Minuten bei 37°C und 5% CO mit der vom Hersteller angegebenen Konzentration des Farbstoffs angefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit einem speziellen Puffer gewaschen und im FACS analysiert.

2.2.3.3.4 Nachweis aktivierter Caspasen

Aktivierte Caspasen wurden mit Carboxyfluorescein (FAM) gekoppelten Peptiden mit terminaler Fluoromethylketongruppe (FMK), die eine Diffusion des Peptids in intakte Zellen erlaubt, durchgeführt (BioCarta). Zu 3×10^5 induzierte Zellen wurde die vom Hersteller empfohlene Menge Peptid zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 1-stündiger Inkubation mit einem speziellen Puffer zweimal gewaschen und anschließend im FACS analysiert. Bei den Zeitkinetik-Untersuchungen wurde die Induktion teilweise während der Anfärbung mit den Peptiden durchgeführt.

2.2.3.4 Calciumflux-Untersuchung

Für die Calciumflux-Untersuchungen wurden die Zellen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo3 angefärbt. Hierzu wurden 10^7 Zellen mit PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} und 1% FCS gewaschen in PBS mit 1% FCS aufgenommen. Eine konzentrierte Stocklösung von Fluo3 und dem für die bessere Löslichkeit des Fluo3 zugesetzte Pluronic F127 wurde zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden

mit einer Endkonzentration von 2 μM Fluo3 für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur angefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 100 μl PBS mit 1% FCS aufgenommen und bis zum Experiment im Dunkeln auf Eis gehalten. Für das Experiment wurden jeweils 10 μl Zellen in 490 μl auf 37°C vorgewärmtes oder 4°C kaltes PBS mit 1 mM CaCl_2 gegeben und die Echtzeit-Messung gestartet. Während der Messung wurden die Zellen dann induziert.

2.2.3.5 Nachweis der LDH-Freisetzung

Der Nachweis der LDH-Freisetzung wurde mit dem „cytotoxicity kit“ (Roche) durchgeführt. Bei der Durchführung wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Der Test basiert auf der photometrischen Messung der Umsetzung eines Substrats durch aus den Zellen freigesetzte LDH. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen Konzentrationen an NAD und ATP auf einer 96-well Platte behandelt. Zur Bestimmung der maximalen Freisetzung der LDH wurden auch Zellen mit 1% TX-100 behandelt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen pelletiert und der Überstand auf eine ELISA-Platte übertragen. Durch Inkubation mit dem Substrat konnte dann die Freisetzung der LDH photometrisch nachgewiesen werden. Der Hintergrund wurde nach Empfehlung des Herstellers von den Werten abgezogen und die Werte wurden als Prozent der maximalen Freisetzung berechnet.

2.2.3.6 Westernblot Analysen

2.2.3.6.1 Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD und Zelllyse

Für den Nachweis der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen wurde radioaktiv markiertes ^{32}P -NAD verwendet. 10^7 aufgereinigte T-Zellen pro Immunpräzipitation wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 20 μCi ^{32}P -NAD, 1 μM unmarkiertem NAD und 1mM ADP-Ribose in 200 μl PBS inkubiert. Die nicht inkorporierte Aktivität wurde durch 7- bis 10-faches Waschen mit 1ml Waschpuffer (PBS, 1% FCS, 0.5 mM ADP-Ribose) entfernt. Die Zellen wurden pelletiert und für 15 Minuten bei 4°C mit Lysepuffer (PBS, 1% TX-100, 1mM AEBSF, 1mM ADP-Ribose) lysiert. Bei den Ansätzen für die Immunpräzipitation phosphorylierter Proteine wurden die Zellen sowohl vor der Lyse für 1 Minute und während der Lyse mit 100 μM Natriumpervanadat inkubiert, um endogene Phosphatasen zu inhibieren. Im Anschluss an die Lyse wurden die Zellen für 3 Minuten bei 500g zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Abschließend wurde der Überstand dann für 3 Minuten bei 15.000g zentrifugiert, um Membranen zu entfernen. Die so gewonnenen Lysate wurden für eine Immunpräzipitation verwendet.

2.2.3.6.2 Immunpräzipitation

Die Lysate wurden für 30 Minuten bei 4°C mit 20 μl ProteinG-Sepharosematrix inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat herauszuklären. Die ProteinG-Sepharosematrix wurde bei allen Wasch- und Inkubations-Schritten bei maximal 100g zentrifugiert. Für die Immunpräzipitation wurden 1 μg Antikörper an 20 μl ProteinG-Sepharosematrix gekoppelt. Hierfür wurde mit PBS gewaschene Matrix für 1 h mit den jeweiligen Antikörpern bei 4° auf einem Rollinkubator inkubiert. Vor der Verwendung wurde die Matrix dreimalig mit 1% TX-100 in PBS

gewaschen. Die vorgeklärten Lysate wurden für eine Stunde bei 4°C mit den Antikörpergekoppelten Matrizes inkubiert. Danach wurden die Matrizes 2 mal kurz und 2 mal für 20 Minuten mit 1% TX-100 in PBS gewaschen. Die Matrix wurde dann in 40 µl LDS-Puffer mit 1mM DTT aufgenommen und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen des Überstandes auf das SDS-Gel für 1 Minute bei 15.000g zentrifugiert.

2.2.3.6.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde mit 10%igen „NuPAGE“ Bis/Tris Polyacrylamid-Gelen und MOPS Puffer mit 1mM DTT durchgeführt. 20 µl der Lysate wurden neben einem Größenmarker (Multimark) aufgetragen und ca. 30 Minuten bei 200V in einer „Xcell SureLock Mini-Cell“ Kammer elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch einen Zwei-Richtungs-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (NC-Membran) und Polyvinylendifluorid-Membran (PVDF-Membran) geblottet. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch 10 Sekunden in Methanol aktiviert. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen die NC-Membran und PVDF-Membran gelegt und mit in Blotpuffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen bedeckt in die Blotkammer gespannt. Die Proteine wurden bei 30 V Spannung für 1 Minute auf die NC-Membran und für 90 Minuten auf die PVDF-Membran geblottet.

2.2.3.6.4 Silberfärbung

Um die Beladung der Gele und die Reinheit der Immunpräzipitation abschätzen zu können, wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran für 1-2 Minuten mit einer Silberlösung gefärbt. Die Membran wurde anschließend mit aqua dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.2.3.6.5 Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurden die PVDF-Membranen in eine Expositionskassette geklebt und ein Kodak Biomax MR Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde dann für 24-72 Stunden bei -80°C exponiert und anschließend in der „Fuji FPM 100A“ Entwicklungsmaschine entwickelt.

2.2.3.7 ELISA

Für den ELISA der Seren immunisierter Tiere wurde eine 96-well Platte mit 1µg Ovalbumin-TNP pro Napf über Nacht bei 4°C ge-coated. Die Nöpfe wurden dreimal mit Waschpuffer (PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween20) gewaschen und für eine Stunde mit Blockpuffer (PBS mit 1% BSA) blockiert. Die Immunseren wurden dann in den angegebenen Verdünnungen in Verdünnungspuffer (PBS mit 10% Ziegenserum) auf die Nöpfe gegeben. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Immunseren wurden dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte viermal gewaschen und für 1 Stunde mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörpern gegen Maus-Immunglobulin inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurde dann 100 µl Enzymsubstrat für 20 Minuten im Dunkeln hinzugegeben. Die Enzymreaktion wurde mit 50 µl Stopplösung gestoppt. Die Extinktion wurde dann in einem ELISA Reader bei 420/650 nm detektiert.

2.2.3.8 Patch-Clamp Untersuchung

Die Patch-Clamp Untersuchungen wurden im Rahmen eines Praktikums des Aufbaustudiengangs Molekularbiologie im Labor von Dr. Robert Bähring (ZMNH) durchgeführt. Für die Patch-Clamp Untersuchung wurden YAC-1.HH Zellen verwendet. Um diese Suspensionszellen verwenden zu können, mussten sie auf 35 mm Petrischalen immobilisiert werden. Dazu wurden die Petrischalen über Nacht mit Antikörpern gegen Ratten IgG-FC gecoatet (10µg/ in 2 ml). 5×10^5 YAC-1HH Zellen wurden für 30 Minuten mit 1µg/ml Ratte anti-Maus-LFA-1 Antikörper inkubiert, gewaschen und auf die gecoatete Petrischale gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die losen Zellen vorsichtig mit Kulturmedium abgewaschen. Für das Patch-Clamping wurde dann das Kulturmedium gegen extrazelluläre Lösung ausgetauscht. Für die Messelektrode wurden Pipetten gezogen. Hierfür wurde ein Universal-Ziehgerät der Firma Zeitz und 1,5 mm Borsilikatglaskapillaren mit Filament verwendet. Die Spitze der Pipetten wurde mit einem Glühdraht unter dem Mikroskop poliert. Die Lochgröße der Pipette wurde so gewählt, dass ein Badwiderstand von 2,5–3 MegaOhm erreicht wurde. Die Pipetten wurden mit intrazellulärer Lösung gefüllt und über eine Silberelektrode gestülpt, die an einen EPC-9 Verstärker der Firma HEKA angeschlossen wurde. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurde die Pipette so auf die Oberfläche einer YAC-1.HH Zelle gebracht, dass die Zelle gerade berührt wurde. Dies machte sich durch einen plötzlichen Anstieg des Badwiderstands bemerkbar. Anschließend wurde durch Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette zunächst ein vollständiger Abschluss der Pipettenspitze durch die Zellmembran erreicht. Durch einen stärkeren Unterdruck wurde dann die sogenannte „Whole Cell“-Konfiguration erreicht, bei der die Elektrode elektrisch mit der gesamten Zelle gekoppelt ist. Es wurde eine negative Spannung von – 80 mV angelegt. Um Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern, wird bei der Messung von dem Verstärker ein sogenannter Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der nach einer Öffnung von Kanälen durch die Membran fließt. Der Kompensationsstrom ist dem Membranstrom entgegengerichtet, sodass die an die Zelle angelegte Spannung konstant bleibt. Die Öffnung von Ionenkanälen kann mit diesem Verfahren dargestellt werden. Für die Applikation von NAD und ATP wurde ein von einer peristaltischen Pumpe betriebenes schnelles lokales Superfusionssystem verwendet. Gemessen wurde mit der Software PULSE (HEKA); die Auswertung erfolgte mit dem Programm PULSEFIT.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in insgesamt sechs Abschnitte.

Im ersten, umfangreichsten Teil wird das experimentelle Vorgehen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) von T-Zellen abgehandelt. Durch vergleichende Untersuchungen der T-Zellen ART2-defizienter und ART2-exprimierender Mäuse konnte eine Vielzahl molekularer Folgen der NAD-Behandlung genauer beschrieben werden. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass ART2 durch ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinozeptors diesen aktiviert. Da ATP der bislang einzige beschriebene physiologische P2X7-Agonist war, wurden vergleichende Untersuchungen des bekannten Agonisten ATP und dem nun neuen Agonisten NAD durchgeführt. Hierbei zeigten sich grundsätzlich sehr ähnliche Konsequenzen der Aktivierung des P2X7 Purinozeptors für die Zellen: Öffnen des Kationenkanals und Calciuminflux, das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellen, Abstoßen des L-Selektins (CD62L) von der Zelloberfläche, Permeabilisierung der Zellmembran, Caspaseaktivierung, Fragmentierung von DNA, Zusammenbruch der mitochondrialen Membranintegrität und in letzter Konsequenz der Tod der Zellen. Es konnten jedoch durch die vergleichenden Untersuchungen auch grundsätzliche Unterschiede der NAD- und ATP-abhängigen Aktivierung des P2X7 Purinozeptors gezeigt werden. Es entsteht bei der ADP-Ribosylierung ein an den Rezeptor kovalent gebundener Ligand, so dass durch Entfernen des Substrats NAD die Aktivierung nicht beendet wird. Die Aktivierung durch ATP ist demgegenüber reversibel.

Im zweiten Abschnitt werden experimentell mögliche Quellen für extrazelluläres NAD und ATP untersucht. Als Modelle dienen hierbei einerseits durch Ultraschallbehandlung lysierte Erythrozyten, andererseits bei der Präparation primärer Zellen beschädigte Lymphozyten.

Im dritten Abschnitt werden Experimente zur Klärung einer möglichen biologischen Konsequenz des NAD-induzierten Zelltodes - die Phagozytose der sterbenden Zellen durch Makrophagen - vorgestellt.

Im nächsten Abschnitt werden Versuche dokumentiert, Zellkulturmodelle für die ART2-vermittelte Signaltransduktion zu etablieren. Von vielen untersuchten Lymphomzelllinien werden die beiden Linien MD27 und YAC-1.HH genauer charakterisiert.

Der fünfte Abschnitt widmet sich experimentellen Herausforderungen des Immunsystems ART2-defizienter Mäuse, um mögliche Konsequenzen der ART2-Defizienz für Immunreaktionen aufzuklären.

Im letzten Abschnitt wird die Generierung zweier transgener Mausstämme beschrieben. Hierbei wird ART2 einerseits mit dem natürlichen GPI-Anker, andererseits mit der Transmembrandomäne des CD8 überexprimiert.

3.1 Molekulare Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) von T-Zellen

Nach ersten Beobachtungen des T-Zelltodes als Folge einer Inkubation mit extrazellulärem NAD (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001) sollten Untersuchungen durchgeführt werden, um den Wirkmechanismus aufzuklären. Die Tatsache, dass T-Zellen ART2-defizienter Mäuse resistent gegenüber NAD-induziertem Zelltod sind, deutete klar auf eine Rolle der ART2-vermittelten ADP-Ribosylierung bei diesem Prozess (Ohlrogge, Haag et al. 2002). Im Folgenden werden die Experimente beschrieben, die zur Aufklärung der molekularen Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) durchgeführt wurden.

3.1.1 Nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Propidiumjodid-Aufnahme

Eines der frühen Zeichen der Apoptose von Zellen ist das nach außen Kehren des Phospholipids Phosphatidylserin, das in vitalen Zellen vornehmlich auf der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Bossy-Wetzel and Green 2000). Es lässt sich durch das calciumabhängige Binden von Fluorochrom-gekoppelten AnnexinV nachweisen. Die Anfärbbarkeit der Zellulären DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid weist auf den Verlust der Membranintegrität hin und gilt als späteres Zeichen des Zelltodes. Es wurde gezeigt, dass Behandlung von T-Zellen mit NAD zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin und zur T-Zell Apoptose führt (Adriouch, Ohlrogge et al. 2001). Im folgenden Abschnitt wird in sieben Unterkapiteln das nach außen Kehren von Phosphatidylserin genauer untersucht.

Aufgereinigte T-Zellen einer ART2-defizienten und einer Wildtyp BALB/c Maus wurden in RPMI Kulturmedium auf 4×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt. Jeweils 4×10^5 Zellen pro Ansatz wurden dann in Anwesenheit oder Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ NAD im Inkubator bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ für 1 oder 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt, und im FACS analysiert. Bei unbehandelten T-Zellen der Wildtyp Mäuse waren nach 1 Stunde 9% der Zellen AnnexinV- und Propidiumjodid-positiv. Auch bei den T-Zellen der ART2-defizienten Maus zeigten sich 4% doppelpositive Zellen (vergleiche **Abb.9** A und B: Panel1). Dieser geringe Anteil ist bei isolierten T-Zellen immer zu sehen und repräsentiert tote Zellen, die vermutlich bei der Präparation beschädigt wurden. Bei den unbehandelten Wildtyp T-Zellen zeigten sich darüber hinaus auch ein Anteil von 13% AnnexinV-positiver aber Propidiumjodid-negativer, also apoptotischer Zellen, der bei den ART2-defizienten T-Zellen vollkommen fehlte (vergleiche **Abb.9** A und B Panel 1). Wie später noch näher dargestellt wird, zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied der beiden Mausstämme, da es sich hierbei um ART2-abhängiges nach außen Kehren von Phosphatidylserin handelt, das durch bei der Präparation freigesetztes NAD bewirkt wird. Die Behandlung von Wildtyp T-Zellen mit $10 \mu\text{M}$ NAD führte bereits nach 1 Stunde bei 44% der Zellen zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.9** A: Panel 2). Auch der Anteil AnnexinV/Propidiumjodid-doppelpositiver Zellen stieg auf 29%, was auf einen raschen Verlust der Membranintegrität schließen ließ. Bei den ART2-defizienten T-Zellen zeigte sich jedoch keinerlei Wirkung der NAD-Behandlung (vergleiche **Abb.9** B: Panel 1 und 2).

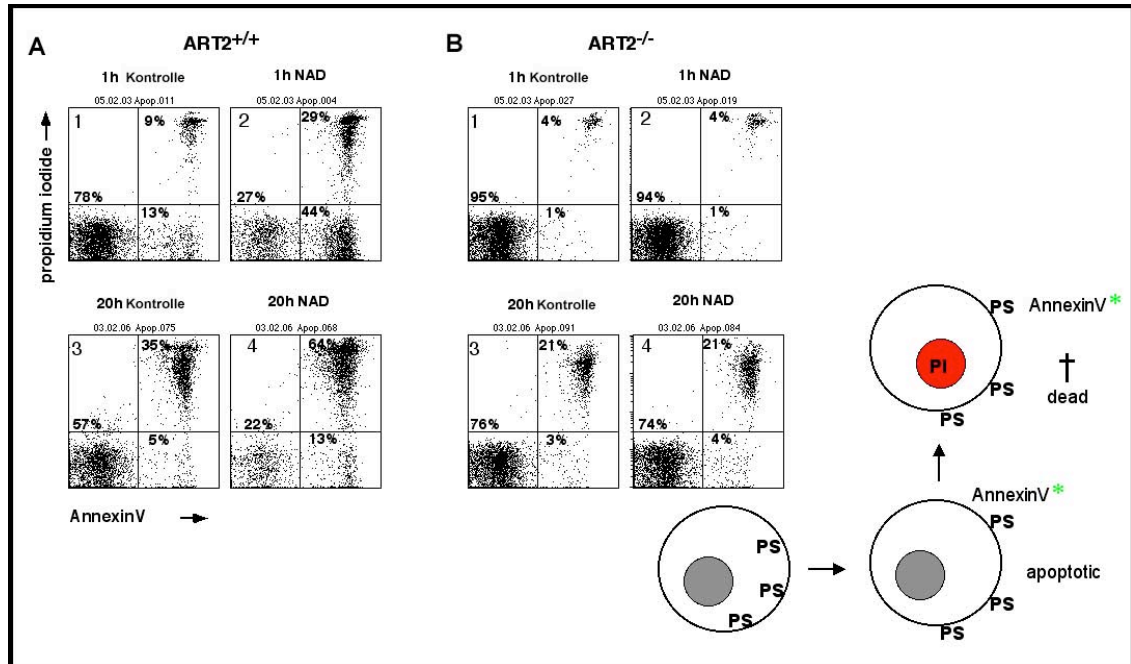


Abb. 9: ART2-vermitteltes nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Aufnahme von Propidiumjodid nach Behandlung von T-Zellen mit NAD. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten von BALB/c Wildtyp (**A**) und ART2-defizienten (**B**) Mäusen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 μ M NAD für 1 Stunde oder für 20 Stunden bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert. Schematisch ist das nach außen Kehren von Phosphatidylserin bei früh apoptotischen Zellen und die Aufnahme des DNA-Farbstoffs Propidiumjodid bei toten Zellen dargestellt.

Während der Großteil der NAD-behandelten Wildtyp T-Zellen nach 1 Stunde noch nicht durch Propidiumjodid angefärbt wurde, waren die meisten Zellen nach 20 Stunden tot und daher durch Propidiumjodid anfärbbar (**Abb9 A: Panel 4**). NAD-Behandlung führte andererseits bei ART2-defizienten T-Zellen auch nach 20 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu keinem Anstieg der sterbenden (AnnexinV-positive) oder toten (AnnexinV/Propidiumjodid-doppelpositive) T-Zellen (vergleiche **Abb.9 B Panel 3 und 4**). Der Anteil von 21% „spontan“ toten Zellen ART2-defizienter Tiere ist also auf einen NAD-unabhängigen Tod zurückzuführen.

3.1.1.1 Dosis-Wirkungs-Analyse von NAD und ATP

Ein derart rascher Zelltod mit ähnlichem Verlauf wurde auch als Konsequenz der Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch extrazelluläres ATP beschrieben (Surprenant, Rassendren et al. 1996; Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001). Daher haben wir vergleichende Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Reaktion auf extrazelluläres NAD und ATP durchgeführt. Hierzu wurden aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus für 30 Minuten bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 0,5 μ M bis 1 mM von NAD und ATP behandelt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen in AnnexinV-Bindpuffer gewaschen und mit 1 μ g/ml AnnexinV und 10 μ g/ml Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Für die Dosis-Wirkungs-Kurve (**Abb. 10**) wurde jeweils der Prozentsatz vitaler Zellen, die sich weder durch AnnexinV noch durch Propidiumjodid anfärben ließen, gegen die Konzentration von NAD oder ATP aufgetragen.

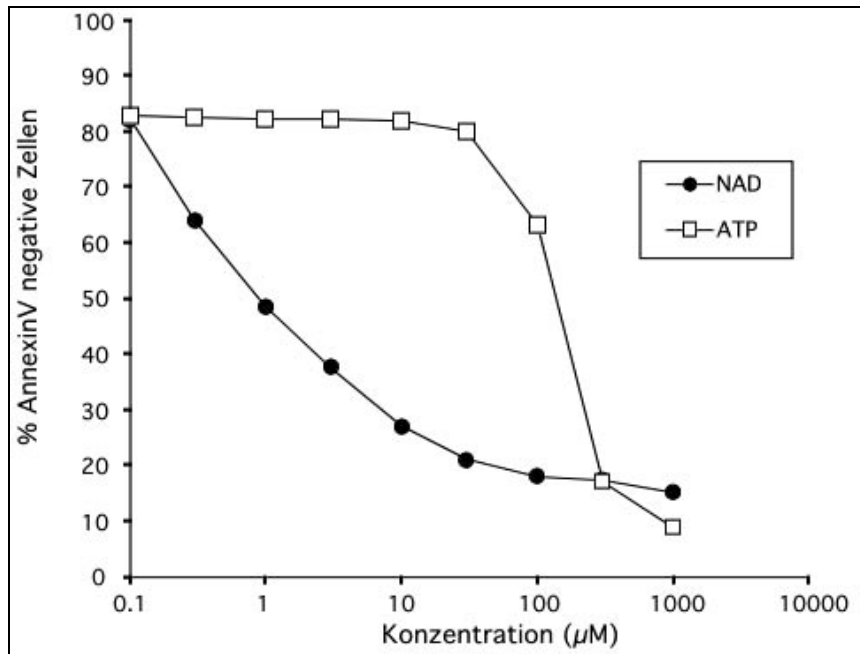


Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Analyse von NAD und ATP. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen von NAD oder ATP in RPMI Komplettmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der Prozentsatz AnnexinV/PI negativer Zellen.

In diesem Experiment zeigte sich, dass bei der Behandlung der Zellen mit ATP ein gewisser Schwellenwert erreicht werden musste, um das nach außen Kehren von Phosphatidylserin auszulösen, während die NAD-Behandlung bereits bei niedriger Konzentration einen Effekt auf einen Teil der T-Zellen ausübte. Die EC₅₀ für ATP lag mit etwa 200 µM weitaus höher als bei NAD, wo etwa bei 5 µM noch 50 Prozent der Zellen reagierten.

3.1.1.2 Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin

Nachdem Unterschiede in der Dosis-Wirkung von NAD und ATP gefunden wurden, sollte nun die Kinetik des NAD- und ATP-induzierten Zelltodes untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde hier die durch DNA-Schäden induzierte, p53 abhängige Apoptose (Wu, Earle et al. 2002) verwendet. Hierzu wurden T-Zellen aus den Lymphknoten von BALB/c Wildtyp Mäusen isoliert. Die Zellen wurden dann 30 Minuten, 5 Stunden, 10 Stunden oder 22 Stunden in Anwesenheit von 25 µM NAD oder 250 µM ATP bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Parallel wurden auch T-Zellen mittels einer Kobaltquelle mit einer Dosis von 8 Gray bestrahlt. Diese Zellen sowie unbehandelte Zellen wurden dann für die gleichen Zeiträume wie die NAD- und ATP-behandelten Zellen ebenfalls bei 37°C inkubiert. Jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen dann mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit 1µg/ml AnnexinV und 10µg/ml Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. In **Abbildung 11** sind die Ergebnisse der FACS-Messungen zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt.

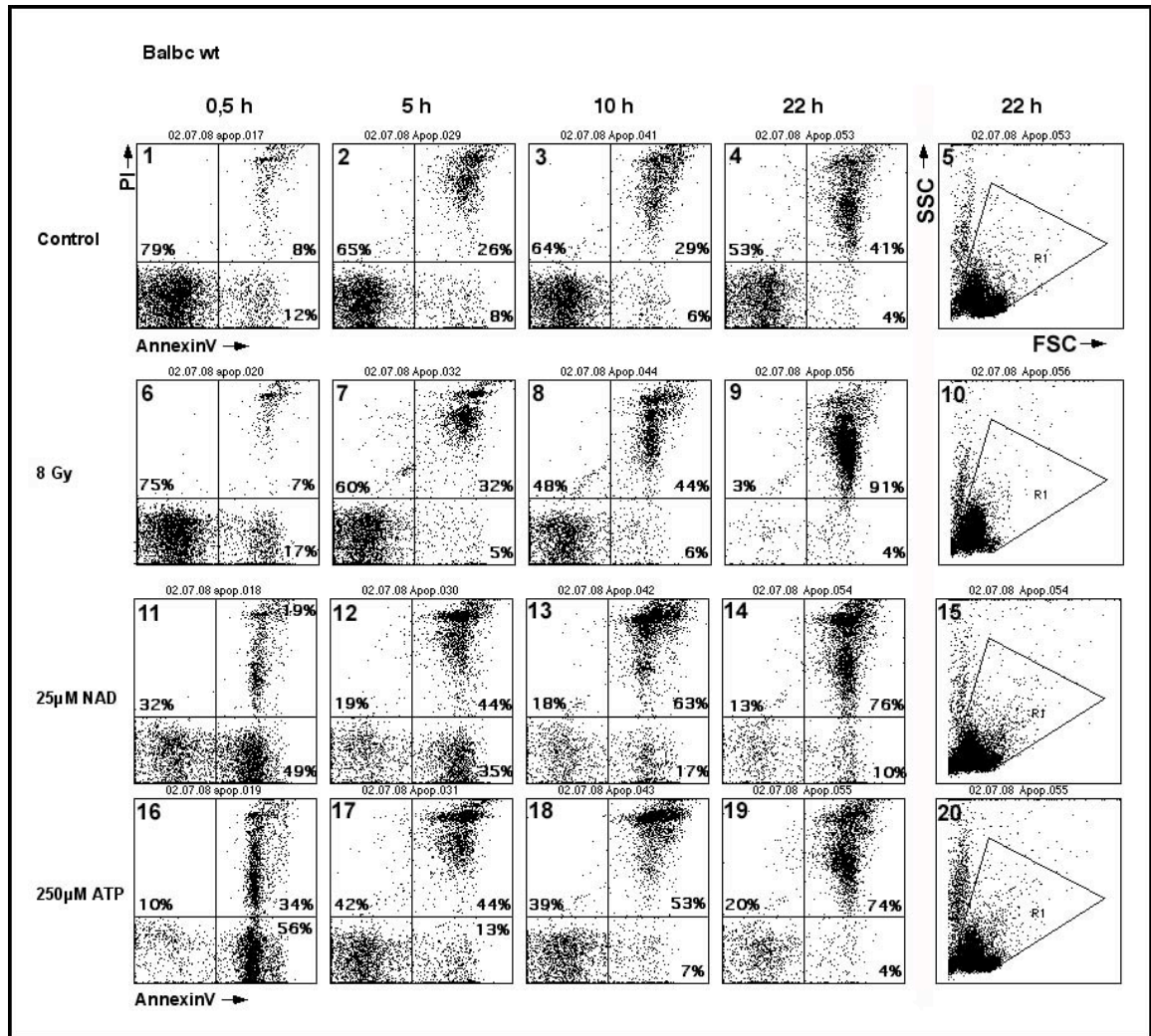


Abb. 11: Vergleichende Untersuchung der Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin nach NAD-, ATP- oder Strahlen-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 0,5 , 5, 10 oder 22 Stunden mit 25 μ M NAD oder 250 μ M ATP inkubiert. Parallel wurden auch unbehandelte oder mit einer Kobalt-Quelle bestrahlte (8 Gy) T-Zellen für die gleiche Zeit inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert. Hierbei wurde wie bei allen anderen in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Messungen ein einheitliches FSC/SSC Gate (zu sehen in Panel 5) verwendet, um Zelltrümmer von der Messung auszuschließen.

Es zeigten sich hierbei deutliche Unterschiede bezüglich der Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin. Bei den unbehandelten Zellen zeigte sich nach 30 Minuten ein Anteil von 12% AnnexinV-positiver/Propidiumjodid-negativer Zellen (**Abb.11** Panel 1). Im Verlauf des Experiments nahm die Zahl der AnnexinV/Propidiumjodid doppelpositiven (toten) Zellen stetig zu, so dass nach 22 Stunden 41% der Zellen tot waren (**Abb.11** Panel 4). Während sowohl NAD- als auch ATP-Behandlung innerhalb der ersten halben Stunde zu einem raschen Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Cytoplasmamembran führte (**Abb.11** Panel 11,16), ließen sich zum gleichen Zeitpunkt bei den bestrahlten Zellen nur vereinzelt apoptotische (AnnexinV-positiv/Propidiumjodid-negativ) Zellen nachweisen (**Abb.11** Panel 6). Erst nach fünf bis zehn Stunden konnte eine deutliche Zunahme toter Zellen festgestellt werden. Interessanterweise führte die Bestrahlung der Zellen zur gleichzeitigen Anfärbbarkeit mit AnnexinV und Propidiumjodid. Bei den NAD- und ATP-behandelten Zellen wurde zunächst Phosphatidylserin

nach außen gekehrt, während die Membranintegrität der Zellen noch vorhanden war: Die Zellen waren zunächst nur AnnexinV positiv. Nach 5 Stunden waren aber auch bei den ATP-behandelten T-Zellen vornehmlich doppelpositive Zellen zu sehen (**Abb.11** Panel 17), während bei den NAD-behandelten Lymphozyten noch eine deutliche Population an AnnexinV-positiven/Propidiumjodid-negativen Zellen nachweisbar war (**Abb.11** Panel 12). Insgesamt zeigte sich bei den NAD- und ATP-behandelten Lymphozyten ein - im Vergleich zur durch DNA-Schäden ausgelösten Apoptose - rapide ausgelöster Zelltod. Bei den bestrahlten Zellen waren jedoch nach 22 Stunden alle Zellen tot (**Abb.11** Panel 9), während bei den NAD- und ATP-behandelten Zellen ein Rest überlebender Zellen nachweisbar war (**Abb.11** Panel 14,19).

3.1.1.3 Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin

Da das nach außen Kehren von Phosphatidylserin nach NAD- und ATP-Behandlung bereits nach 30 Minuten nachweisbar war, sollte mit Hilfe einer Echtzeit-Untersuchung ein genaueres Bild der Kinetik dieses Prozesses erlangt werden. Hierzu wurden T-Zellen aus den Lymphknoten einer ART2-defizienten und Wildtyp BALB/c Maus isoliert. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 700 μ l 37°C warmem RPMI aufgenommen, welches bereits 2 mM CaCl_2 , 1 μ g/ml AnnexinV-FITC und 10 μ g/ml Propidiumjodid enthielt. Nachdem die Zellen für 5 Minuten in einem FACS-Röhrchen im Wasserbad auf 37°C gehalten wurden, begann die Echtzeit-Messung im FACS. Um die Temperatur in den Röhrchen bei 37°C zu halten, wurde während der Messung ein auf 37°C erhitztes Gel-Kissen um die Röhrchen gewickelt. Durch die Wahl eines Zeit-Intervalls von 500 ms für die Echtzeitmessung ergab sich eine Gesamtmesszeit von 8,5 Minuten. Nach einer ersten Minute für die Messung der Basisfluoreszenz wurde die entsprechende Menge einer hochkonzentrierten Stocklösung NAD bzw. ATP in einem kleinen Volumen hinzupipettiert und die Messung für 7 weitere Minuten fortgesetzt. In **Abbildung 12 A** ist der Verlauf der mittleren Fluoreszenz dargestellt.

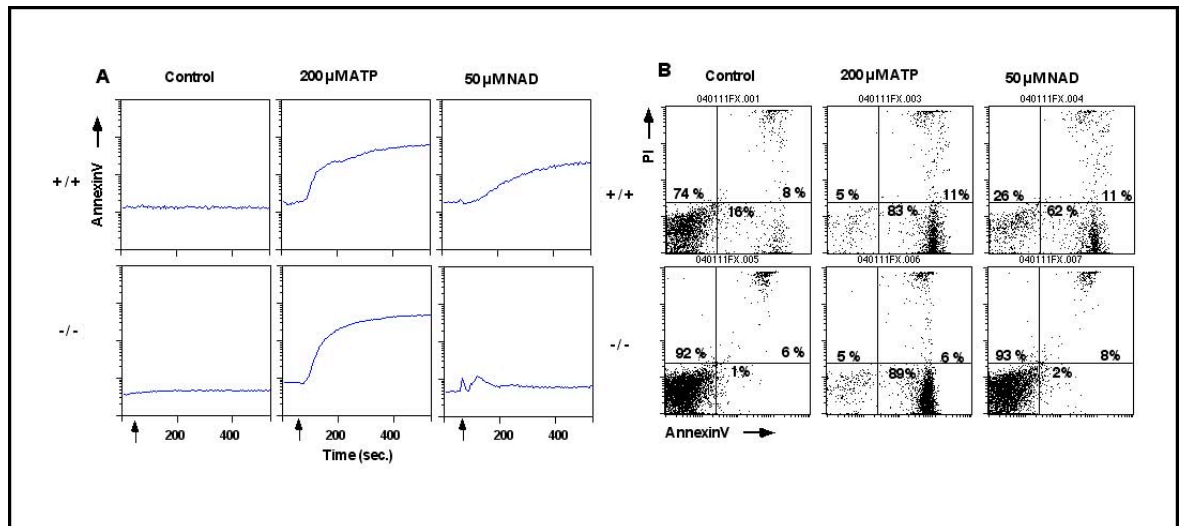


Abb. 12: Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin während NAD- oder ATP-Behandlung. Unbehandelte, aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus wurden in warmem AnnexinV-FITC, Propidiumjodid und 2mM CaCl₂ enthaltendem RPMI-Medium in FACS-Röhrchen aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Während der FACS Echtzeitmessung wurde nach 1 Minute (siehe Pfeile bei **A**) das Röhrchen für wenige Sekunden aus dem FACS-Gerät entfernt und die entsprechende Menge an ATP oder NAD als konzentrierte Stocklösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Echtzeitmessung umgehend fortgeführt. Mit Hilfe eines im Wasserbad vorgewärmten Heizpacks wurde die Temperatur in dem Röhrchen bei 37°C gehalten. Dargestellt ist der Verlauf der mittleren Fluoreszenz über die Zeit von 8 Minuten (**A**). Gezeigt ist der 8 Minuten Endpunkt der Messung als klassischen AnnexinV/PI FACS-Plot (**B**).

Es zeigte sich hierbei, dass Behandlung von T-Zellen mit ATP bereits innerhalb weniger Sekunden zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin führt (**Abb.12 A**). Dieses blitzschnelle nach außen Kehren von Phosphatidylserin haben wir daher „PS-Flashing“ genannt. Die Inkubation der Zellen mit NAD führte im Fall der ART2-defizienten T-Zellen zu keiner Reaktion. Bei den Wildtyp T-Zellen hingegen zeigte sich ein ebenfalls rasches, aber mit im Vergleich mit ATP-Behandelten Zellen etwas verzögertes PS-Flashing. **Abbildung 12 B** zeigt die letzte Minute der Echtzeitmessung. Es war anhand der Anfärbung mit AnnexinV-FITC deutlich zu erkennen, dass die Zellen innerhalb von 8 Minuten bereits vollständig Phosphatidylserin exponiert haben. Andererseits war die Membranintegrität zu diesem frühen Zeitpunkt offensichtlich noch vollständig gegeben, da sich die Zellen noch nicht mit Propidiumjodid anfärben ließen.

3.1.1.4 Reversibilität des „PS-Flashens“ nach Entfernen der Agonisten NAD und ATP

Um die Agonisten NAD und ATP in diesem Prozess noch genauer zu untersuchen, wurden „Pulse-Chase“-Untersuchungen durchgeführt. Aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus wurden zu diesem Zweck für eine kurze Zeit (5 Minuten) den beiden Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in RPMI Kulturmedium aufgenommen und für weitere 175 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu den in **Abbildung 13** angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und mit AnnexinV und Propidiumjodid angefärbt. Bei der Auswertung wurden die prozentualen Anteile der vitalen Zellen, die sich weder durch AnnexinV noch durch Propidiumjodid anfärben ließen (**Abb.13 C**, rot markierte Population), ermittelt.

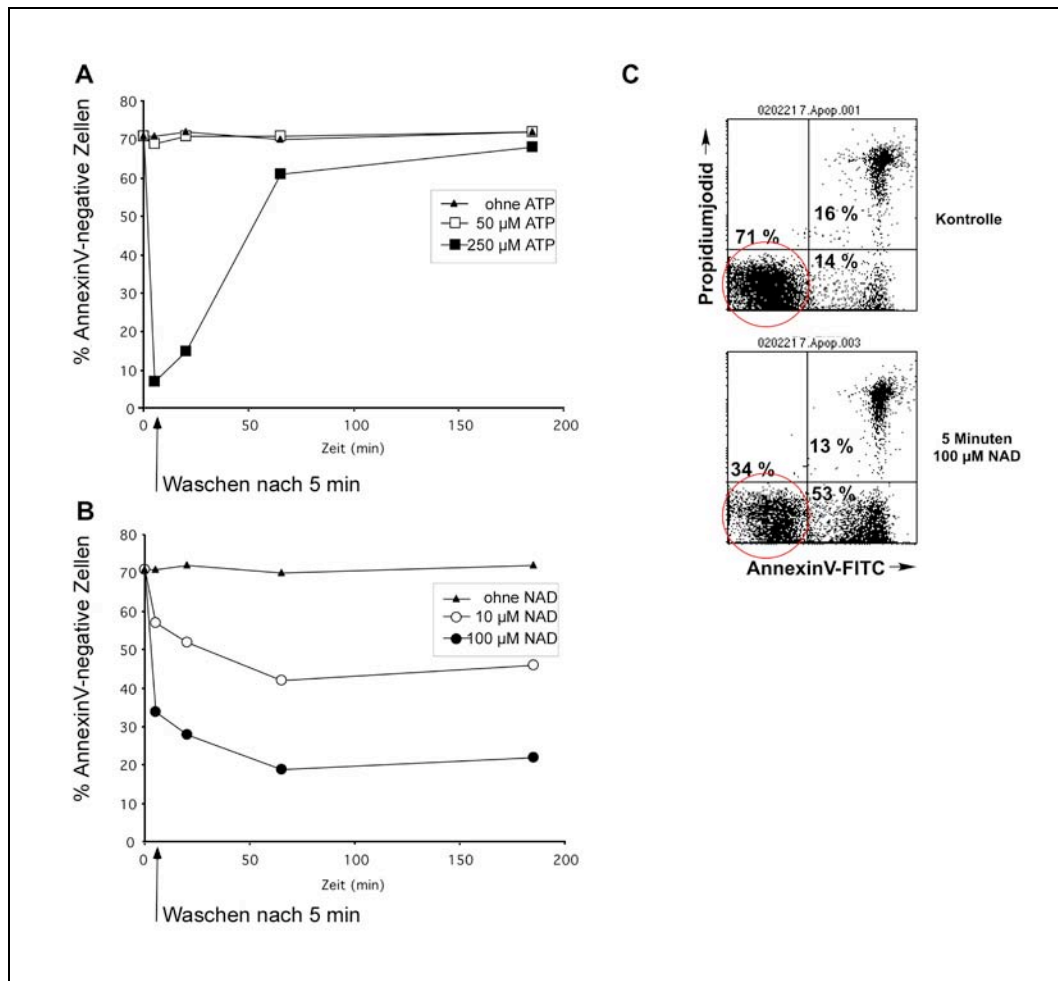


Abb. 13: Untersuchung der Reversibilität des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin nach Entfernen der Agonisten NAD oder ATP. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 5 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen an NAD (A) oder ATP (B) behandelt. Anschließend wurden die Agonisten durch Waschen der Zellen entfernt, und die Zellen wurden bei 37°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden dann zu den angegebenen Zeitpunkten mit AnnexinV-Bindpuffer gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert. Angegeben sind die Prozentzahlen vitaler (AnnexinV/Propidiumjodid-doppelnegativ) Zellen (siehe (C)).

Es zeigte sich deutlich, dass die fünfminütige Inkubation der Zellen mit einer wirksamen Konzentration von 250 μ M ATP zwar zu PS-Flashing führt, sich die Zellen jedoch nach Entfernen des Agonisten wieder erholen und Phosphatidylserin von der Zelloberfläche re-internalisiert wird. Die Behandlung der Zellen mit 50 μ M ATP führte zu keinem nach außen Kehren von Phosphatidylserin (Abb. 13A). Andererseits führte eine kurze Inkubation der Zellen auch mit sehr niedrigen NAD-Konzentrationen zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin. Darüber hinaus erholten sich die Zellen nach Entfernen von NAD nicht wieder, der Prozentsatz PS-flashender Zellen blieb konstant (Abb.13B).

3.1.1.5 Blockade durch monoklonale Antikörper, KN62 und etheno-NAD

Die Tatsache, dass die Inkubation mit NAD und ATP, bezüglich des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin, sehr ähnliche Konsequenzen für die T-Zellen hatte, wies auf die Beteiligung des P2X7 Purinozeptors auch in der ART2-vermittelten, NAD-abhängigen Signaltransduktion hin. Um eine Beteiligung von P2X7 nachzuweisen, wurde ein Blockade-Experiment mit spezifischen Immunsereen durchgeführt. Die Immunsereen waren von unserer Arbeitsgruppe durch DNA-Immunsierung eines Llamas mit ART2- und Kaninchen mit P2X7-Expressionskonstrukten hergestellt worden. In **Abbildung 14** sind die Ergebnisse dieses Blockade-Experiments dargestellt. Vorinkubation von aufgereinigten T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus mit ART2-spezifischem Immunsereum führte zu einer Blockade der NAD-vermittelte Signaltransduktion (vergleiche **Abb.14**: Panel 2 und 3), während die ATP-vermittelte Signaltransduktion nicht beeinträchtigt wurde (vergleiche **Abb.14**: Panel 5 und 6).

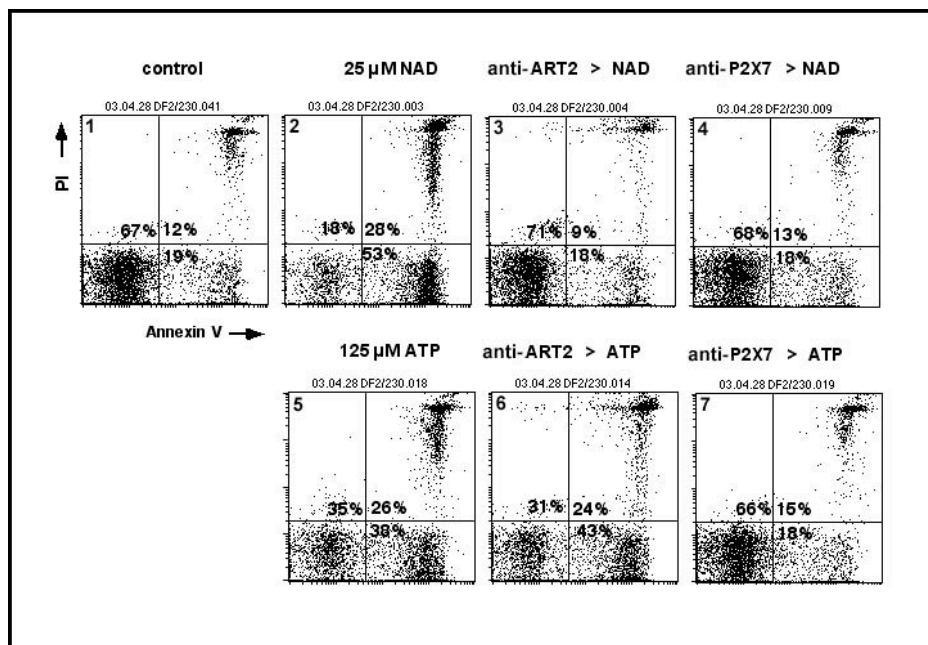


Abb. 14: Blockade des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin durch ART2- und P2X7-spezifische Antikörper. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 30 Minuten mit NAD oder ATP inkubiert. Zur Blockade wurden die Zellen für 1 h mit ART2- oder P2X7-spezifischen Antikörpern vorinkubiert, bevor NAD oder ATP für 30 Minuten hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert.

Im Gegensatz hierzu führte die Vorinkubation der Zellen mit P2X7-spezifischen Antikörpern zu einer Blockade sowohl der durch NAD als auch der durch ATP induzierten Exponierung von Phosphatidylserin (**Abb.14**: Panel 4 und 7).

In einem weiteren Experiment wurde der P2X7-Inhibitor KN62 eingesetzt, um die Beteiligung des P2X7 Rezeptors an der NAD-vermittelten Signaltransduktion nachzuweisen. Ein Teil der Zellen wurde in diesem Experiment auch mit dem NAD-Analogen etheno-NAD vorinkubiert. Das etheno-NAD wird von ART2 als Substrat für etheno-ADP-Ribosylierung verwendet (Krebs, Koestner et al. 2003), aktiviert jedoch P2X7 hierdurch nicht. Bei einem weiteren Ansatz wurde außerdem während der Inkubation mit den Agonisten NAD und ATP ein decarboxyliertes Arginin-Derivat, Agmatin, als

kompetitives Ziel für die ADP-Ribosylierung durch ART2 angeboten. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in **Abbildung 15** dargestellt.

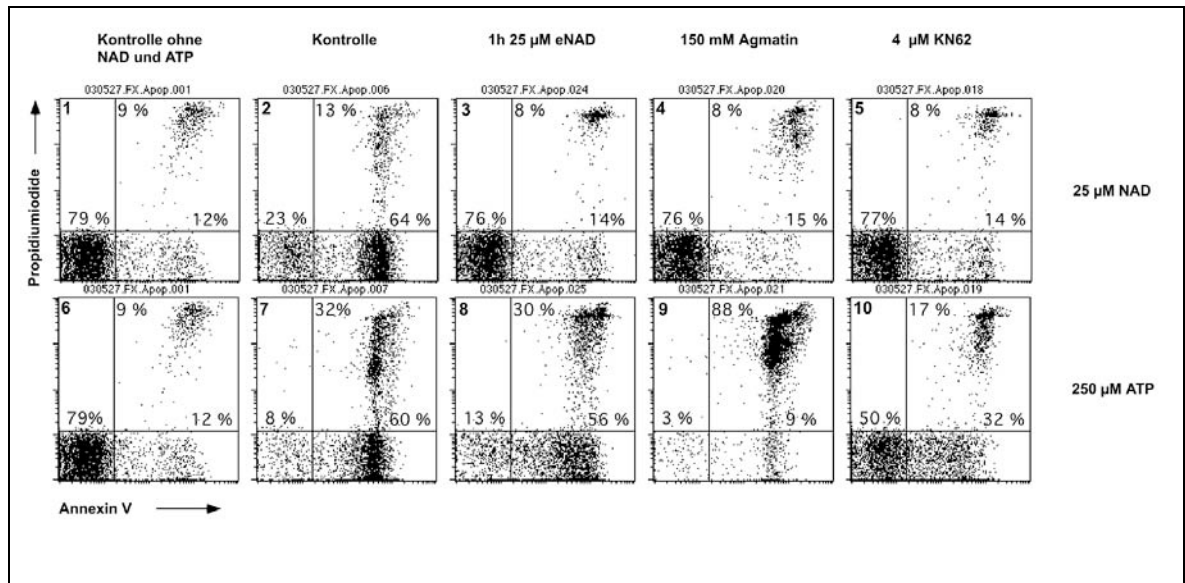


Abb. 15: Blockade des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin durch Vorinkubation mit dem NAD-Analogen etheno-NAD, Agmatin und KN62. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtypmaus wurden für 30 Minuten mit NAD oder ATP inkubiert. Zur Blockade wurden die Zellen zuvor für 1 Stunde mit dem NAD-Analogen etheno-NAD und dem P2X7 Inhibitor KN62 vorinkubiert. Anschließend wurden NAD und ATP zu den Zellen gegeben. Hierbei war Agmatin und KN62 in den entsprechenden Ansätzen während der Inkubation mit NAD und ATP anwesend. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert.

Die Blockade der NAD-vermittelten Signaltransduktion auch durch den P2X7-Inhibitor KN62 (**Abb.15**: Panel 5) unterstützt die Vermutung der Beteiligung des P2X7 Purinozeptors an der ART2 katalysierten PS-Exponierung. In der Konzentration von 4 µM inhibierte KN62 die Aktivierung von P2X7 durch ATP allerdings nur teilweise (**Abb.15**: Panel 10). Interessanterweise führte die Vorinkubation der Zellen mit dem NAD Analogon etheno-NAD zu einer vollständigen Blockade des durch NAD induzierten PS-Flashings, während die Signaltransduktion durch ATP weitgehend unbeeinflusst war (vergleiche **Abb.15**: Panel 3 und 8). Die Anwesenheit von Agmatin führte zu einer Blockade der Exponierung von Phosphatidylserin nach NAD-Behandlung, während die durch ATP vermittelte Signaltransduktion unverändert war (Vergleiche **Abb.15**: Panel 4 und 9).

3.1.1.6 Reversion der Exponierung von Phosphatidylserin nach NAD-Behandlung

Nachdem wir zeigen konnten, dass der P2X7-Inhibitor KN62 auch die NAD-vermittelte Signaltransduktion blockieren kann, war unser nächstes Ziel, die Reversibilität des PS-Flashings nach NAD-Behandlung in einem weiteren „Pulse-Chase“-Experiment zu untersuchen. In diesem Experiment wurden aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus für eine kurze Zeit (10 Minuten) mit unterschiedlichen Konzentrationen NAD behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für weitere 190 Minuten bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde zu den Zellen entweder direkt oder nach weiteren 45 Minuten 10 µM KN62 beigefügt. Zu den in **Abbildung 16** angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen jeweils mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben

sind jeweils die prozentualen Anteile der AnnexinV- und Propidiumjodid-negativen, vitalen Zellen (**Abb. 16**).

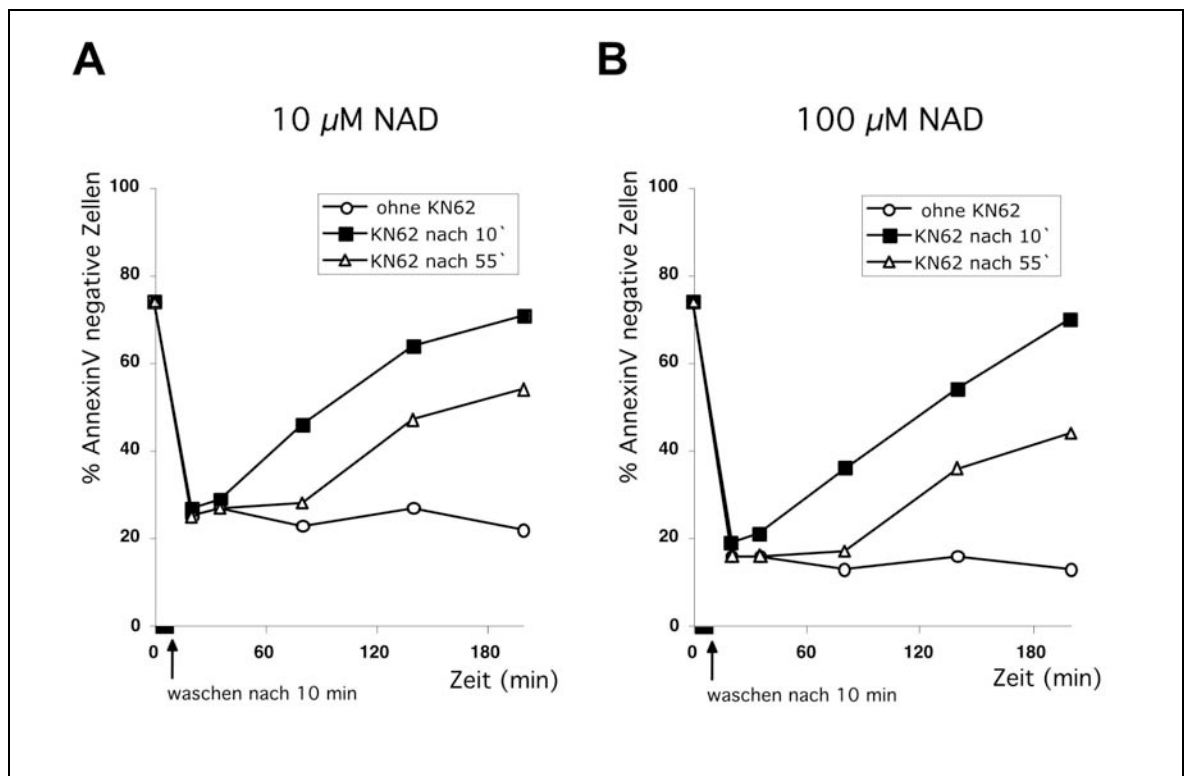


Abb. 16: Reversion des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin nach Inkubation mit NAD. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 10 Minuten mit 10 μM (**A**) oder 100 μM (**B**) NAD behandelt. Das NAD wurde durch Waschen entfernt. Zum Zeitpunkt des Waschens oder nach weiteren 45 Minuten wurde dann der P2X7-Inhibitor KN62 hinzugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der Prozentsatz AnnexinV/PI negativer Zellen.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Exponierung von Phosphatidylserin durch NAD-Behandlung nicht nur durch während der Inkubation anwesendes KN62 blockieren lässt (**Abb.15**: Panel 5), sondern sich auch noch nach der erfolgten Exponierung unterdrücken lässt. Zellen, die direkt nach der NAD-Behandlung mit KN62 behandelt wurden, internalisierten das Phosphatidylserin innerhalb von 3 Stunden wieder vollständig. Sogar ein großer Anteil der Zellen, die erst 45 Minuten nach dem NAD-Puls mit KN62 behandelt worden waren, internalisierten das Phosphatidylserin wieder.

3.1.1.7 Abspaltung von ART2 nach Aktivierung von T-Zellen

Es war bereits gezeigt worden, dass das GPI-verankerte ART2-Enzym nach der Aktivierung von T-Zellen durch eine Metalloprotease von der Zelloberfläche abgestoßen werden kann (Kahl, Nissen et al. 2000). Wir wollten nun untersuchen, ob Abstoßen der ART2 von der Zelloberfläche zu einer geringeren Sensitivität gegenüber extrazellulärem NAD führt. Dazu wurden aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus *in vitro* aktiviert. Die Zellen wurden entweder mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert. Zur antikörpervermittelten Aktivierung wurden 6-well Zellkulturschalen über Nacht bei 4°C mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$

anti-CD3 Antikörper gecoatet und anschließend gewaschen. Die T-Zellen wurden dann in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper für 2 Stunden bei 37°C in den gecoateten Schalen inkubiert. Zur PMA-Stimulierung wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37°C mit 160 nM PMA behandelt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD62L bzw. CD3, ART2.2 und ART2.1 angefärbt und im FACS analysiert. Die übrigen Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 µM oder 200 µM NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Sowohl die PMA-Behandlung als auch die Aktivierung der T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern führte zum Abstoßen von CD62L, was als ein Zeichen der Aktivierung von T-Zellen gilt (vergleiche **Abb.17**: Panel 1,2 und 3). Auch die mittlere Fluoreszenz der Antikörperanfärbung gegen ART2.1 (**Abb.17**: Panel 8,9) und ART2.2 (**Abb.17**: Panel 5,6) ging bei beiden Arten der Stimulation gegenüber der unbehandelten Kontrolle stark zurück, was auf das Abstoßen der ART2 nach Aktivierung zurückzuführen ist.

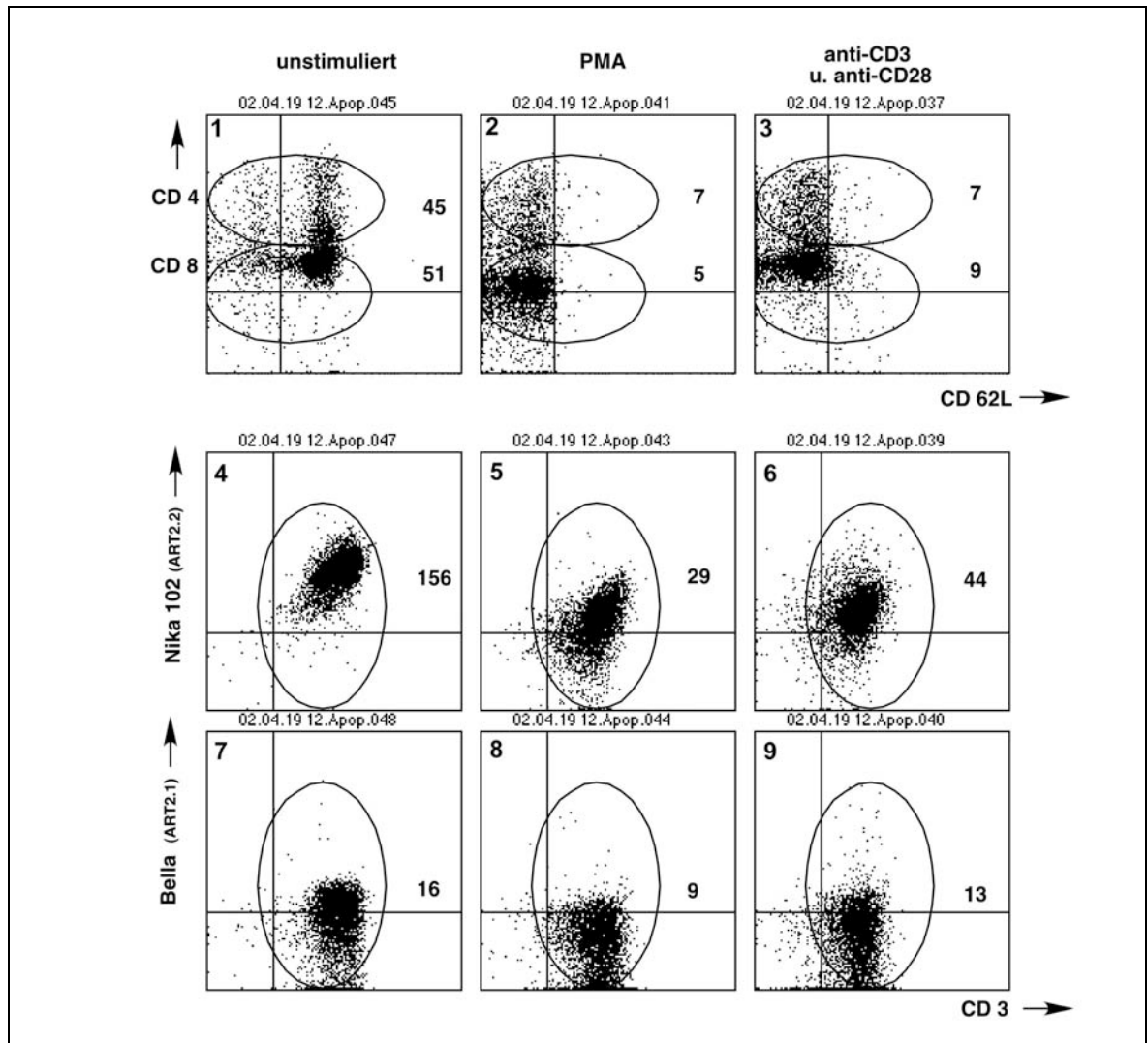


Abb. 17: Abstoßen von CD62L und ART2 nach T-Zell Aktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 inkubiert. Die aktivierten Zellen wurden dann mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD62L oder unkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen ART2.1 (Bella) und ART2.2 (Nika102) und dem entsprechenden Sekundärantikörper angefärbt und im FACS analysiert. Angegebene Zahlen entsprechen der mittleren Fluoreszenzintensität der ausgewählten Zellpopulationen.

Besonders deutlich war dieser Rückgang der Anfärbung mit ART2.1- und ART2.2-spezifischen Antikörpern bei den mit PMA behandelten T-Zellen (**Abb.17**: Panel 5,8). Bei der nachfolgenden Behandlung der naiven und aktivierten T-Zellen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Sensitivität gegenüber NAD, die sehr gut mit dem Rückgang von ART2 auf der Zelloberfläche korrelierte. Besonders deutlich zu beobachten war dies bei der niedrigeren Konzentration von 20 μM NAD. Während bei den unbehandelten Zellen die NAD-Behandlung zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin führte (**Abb.18**: Panel 2), zeigten die PMA-stimulierten Zellen keine Reaktion (Vergleiche **Abb.18**: Panel 4 und 5).

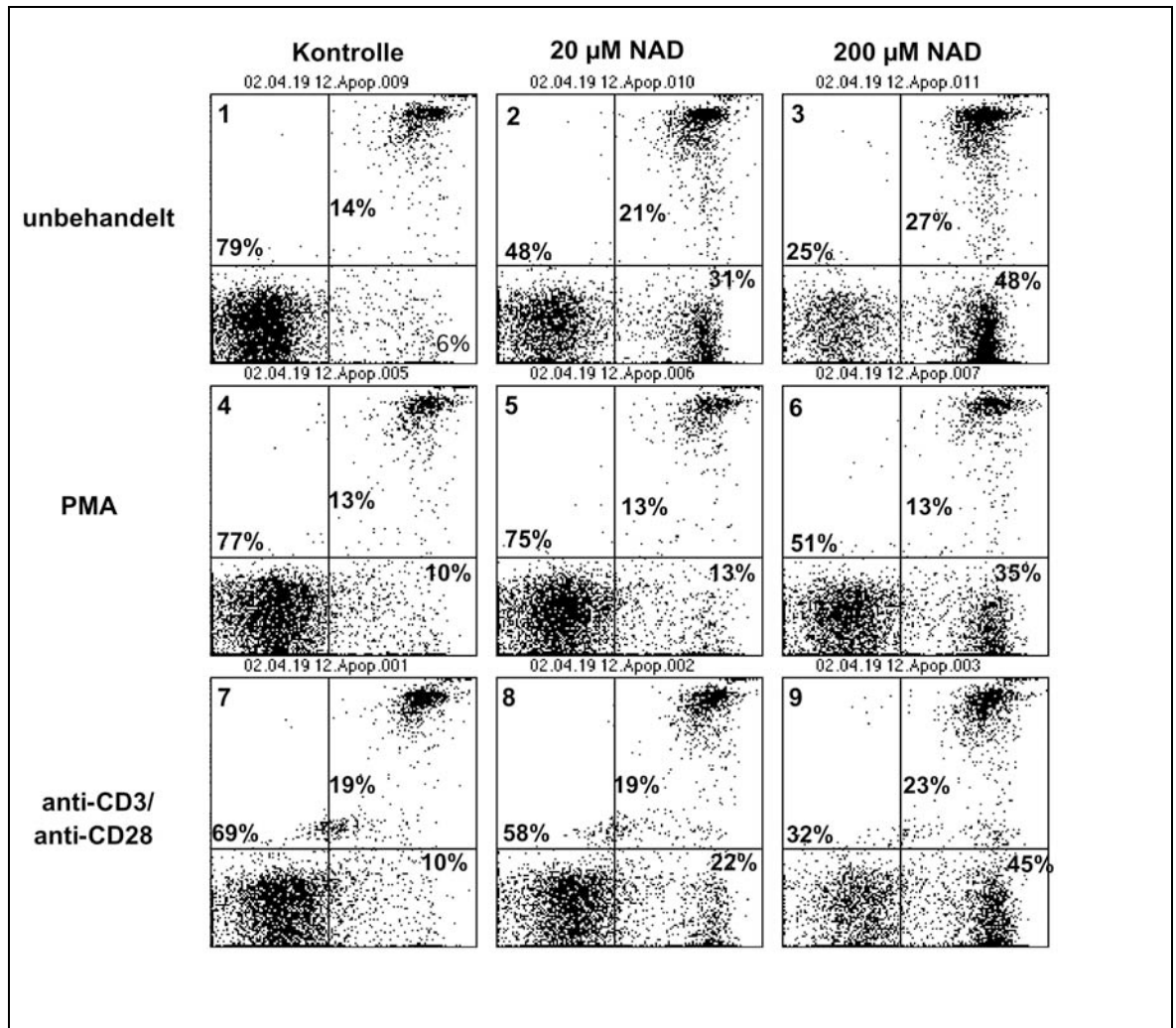


Abb. 18: Sensitivität von T-Zellen gegenüber NAD nach Aktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 inkubiert. Die aktivierten Zellen wurden dann für 30 Minuten mit 20 oder 200 µM NAD behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert.

Die durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper aktivierten Zellen zeigten eine verminderte Reaktion (**Abb.18**: Panel 8). Nach Inkubation mit 200 µM NAD waren bei den unbehandelten T-Zellen nur noch 25% der Zellen vital (**Abb.18**: Panel 3), während 51% der PMA behandelten T-Zellen resistent gegenüber der NAD-Behandlung waren (**Abb.18**: Panel 6). Die verminderte Sensitivität gegenüber NAD ist bei den PMA-stimulierten Zellen am deutlichsten zu sehen, was sich durch effizienteres Abstoßen von ART2 nach der PMA-Behandlung erklären lässt (**Abb.17**: Panel 5,8).

3.1.2 Nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Aufnahme von Ethidiumbromid

Nachhaltige Aktivierung des P2X7 Purinozeptors mit ATP kann zur Ausbildung von Membranporen führen, durch die Moleküle bis 800 Da die Membran passieren können. Dies lässt sich durch Aufnahme von fluoreszierenden DNA-Farbstoffen wie Ethidiumbromid nachweisen (North and Surprenant 2000; Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001). Um die Bildung von Membranporen nach NAD- und ATP-Behandlung zu untersuchen, wurde ein Kinetik-Experiment durchgeführt. In diesem Experiment wurden aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus für die in **Abbildung 19**

angegebenen Zeiten bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen NAD und ATP behandelt. Für die letzte Minute der Inkubation wurde 1µg/ml Ethidiumbromid zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert.

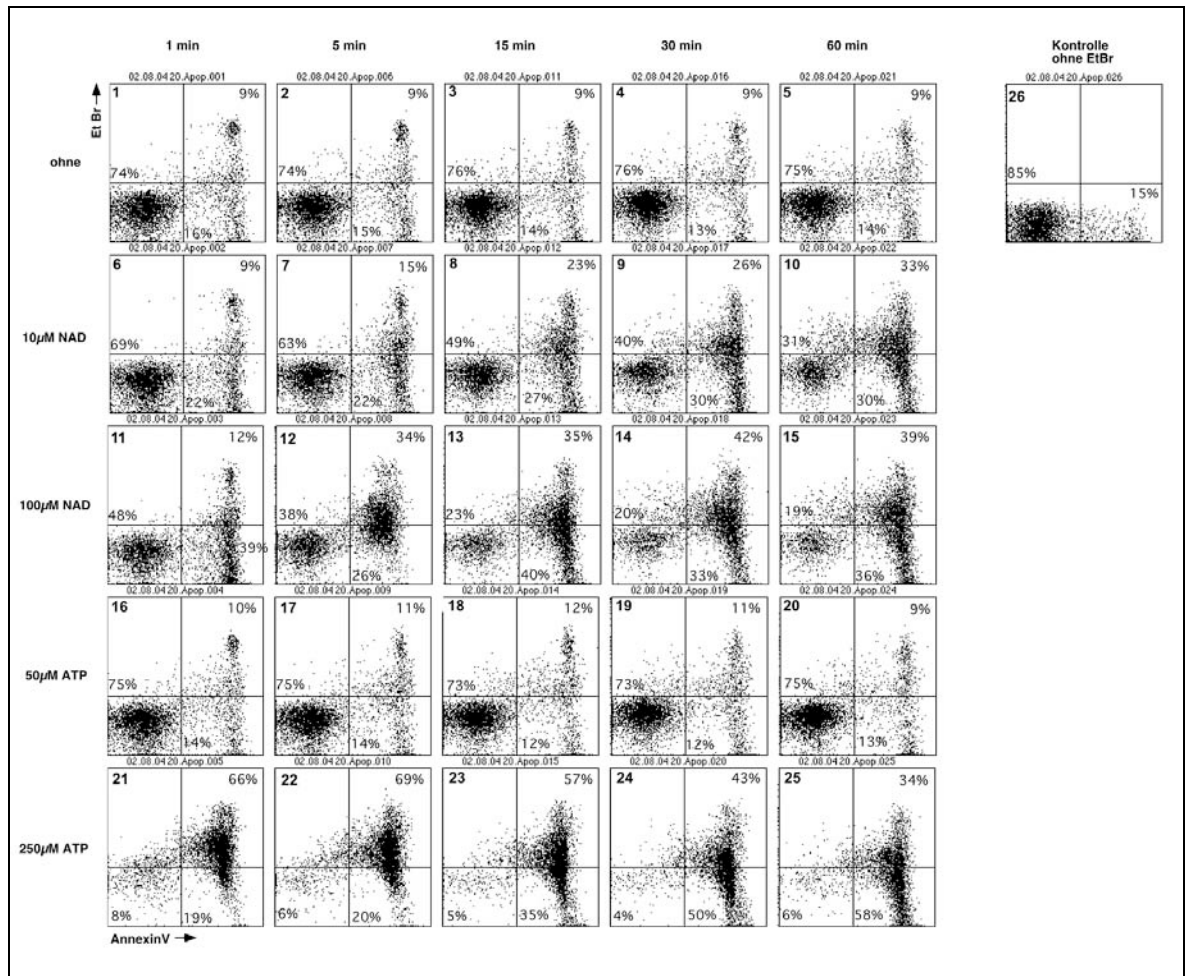


Abb. 19: Kinetik der Porenbildung nach Inkubation von T-Zellen mit NAD oder ATP. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 1, 5, 15, 30 oder 60 Minuten mit angegebenen Konzentrationen NAD oder ATP bei 37°C inkubiert. Jeweils für die letzte Minute der Inkubation wurde Ethidiumbromid zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert.

Es stellte sich heraus, dass bereits eine einminütige Inkubation mit 250 µM ATP zur Bildung von Membranporen und damit zu einer Anfärbbarkeit mit Ethidiumbromid führte (**Abb.19: Panel 21**), während auch eine 60 minütige Inkubation mit 50 µM ATP keine Wirkung zeigte (**Abb.19: Panel 20**). Die Inkubation mit 100 µM NAD führte erst nach 5 Minuten bei einem Teil der Zellen zur Aufnahme von Ethidiumbromid (**Abb.19: Panel 12**). Die Behandlung mit 10 µM NAD führte erst viel später und nur bei einem kleinen Prozentsatz der Zellen zur Bildung von Membranporen (**Abb.19: Panel 8-10**). Insgesamt zeigte sich, dass grundsätzlich auch die ART2-vermittelte NAD-abhängige Signaltransduktion zur Ausbildung von Membranporen führen kann. Außerdem konnte nur bei Zellen, die Phosphatidylserin nach außen gekehrt hatten, eine Porenbildung detektiert werden. Um nachzuweisen, dass hierbei eine Aktivierung von P2X7 notwendig ist und die Signaltransduktion ART2-abhängig ist, wurden in einem weiteren Experiment der P2X7-Inhibitor KN62 und ART2-

spezifische Immunsereen eingesetzt. Durch Vorinkubation mit dem NAD-Analogon etheno-NAD, welches von ART2 als Substrat zur etheno-ADP-Ribosylierung verwendet wird (Krebs, Koestner et al. 2003), sollte untersucht werden, inwiefern die ADP-Ribosylierung eines Zielproteins für die Signaltransduktion notwendig ist. Die aufgereinigten Wildtyp T-Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C mit KN62, den Immunsereen oder etheno-NAD vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 20 µM NAD behandelt. In der letzten Minute der Inkubation wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert. Die Behandlung der Zellen mit 20 µM NAD führte zur Aufnahme von Ethidiumbromid (**Abb.20**: Panel 2). Die Porenbildung wurde durch den P2X7-Inhibitor KN62 vollständig unterdrückt (**Abb.20**: Panel 8). Auch ART2- und P2X7-spezifischen Antiseren konnte eine Aufnahme von Ethidiumbromid verhindern (**Abb.20**: Panel 6,7).

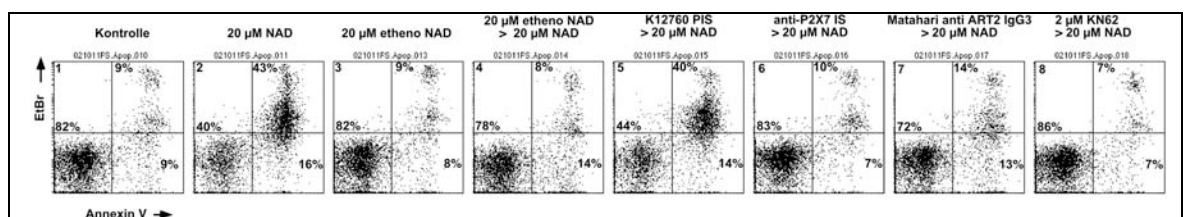


Abb. 20: Blockade der NAD-vermittelten Phosphatidylserin-Exponierung und Ethidiumbromidaufnahme. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 30 Minuten mit etheno-NAD, ART2- oder P2X7- spezifischen Immunsereen oder dem Inhibitor KN62 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 20 µM NAD behandelt. In der letzten Minute der Inkubation wurde Ethidiumbromid zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert.

Die Vorinkubation der Zellen mit dem NAD-Analogon etheno-NAD führte zu einer Blockade der Porenbildung nach NAD-Behandlung. Die bei der Vorinkubation erfolgte etheno-ADP-Ribosylierung der Zelloberflächenproteine verhinderte offensichtlich die spätere zur Signaltransduktion notwendige ADP-Ribosylierung bei der nachfolgenden NAD-Behandlung.

3.1.3 Calciumflux nach NAD- und ATP-Behandlung

Da Aktivierung von P2X7 durch ATP bei murinen Makrophagen zu einem Influx von Calcium führt (Gudipaty, Munetz et al. 2003), sollte untersucht werden, ob dieser auch nach ATP- und NAD-Behandlung von T-Zellen nachweisbar ist. Dafür wurden aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo3 angefärbt und in einem kleinen Volumen auf Eis gehalten. Die Zellen wurden dann für die Echtzeitmessung in einem größeren Volumen 37°C warmem oder 4°C kaltem PBS mit 1% FCS und 1 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach einer Minute Echtzeitmessung im FACS wurden die FACS-Röhrchen kurz aus dem FACS-Gerät entfernt, die angegebenen Konzentrationen an ATP oder NAD hinzugegeben und die Messung fortgesetzt. Die angegebene Temperatur im Röhrchen war durch vorgewärmte bzw. vorgekühlte Gel-Kissen, die um das FACS-Röhrchen gewickelt wurden, konstant gehalten worden. Es zeigte sich, dass durch eine Konzentration von 250 µM ATP bei einer Temperatur von 37°C innerhalb von Sekunden ein Influx von Calcium ausgelöst wurde (**Abb.21**: Panel 3). Der Calciumflux konnte auch durch eine höhere ATP-Konzentration von 500 µM nicht weiter gesteigert werden (**Abb.21**: Panel 4). Die Aktivierung von P2X7 durch ATP und der

damit verbundene Calciumflux wurde bei 4°C stark gehemmt (**Abb.21**: Panel 4).

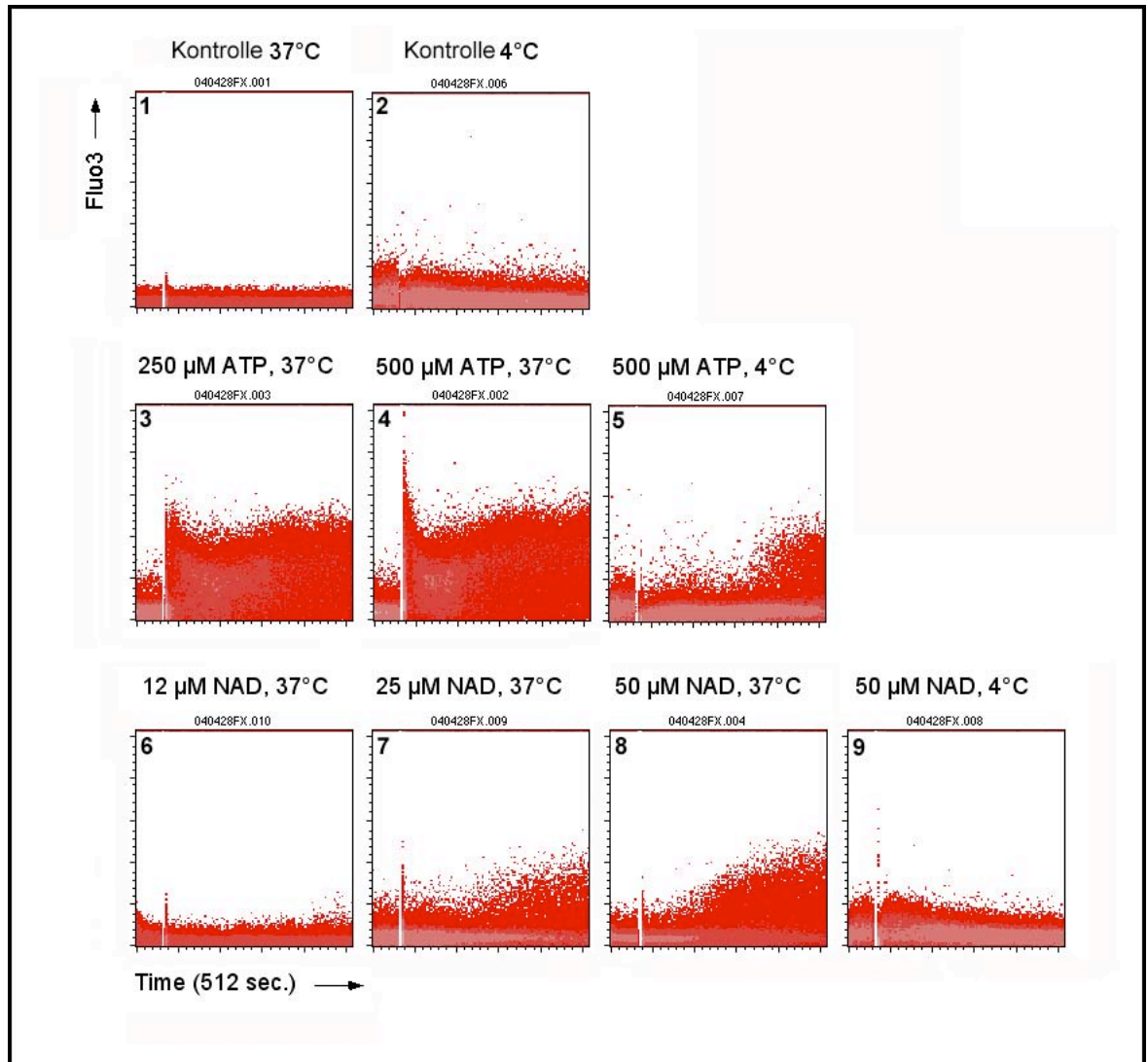


Abb. 21: Calciumflux nach NAD- und ATP- Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo3 angefärbt und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden für die jeweilige Echtzeitmessung im FACS-Gerät in 37°C warmen oder 4° kalten PBS mit 1mM CaCl₂ aufgenommen. Nach 1 Minute wurde dann ATP oder NAD in angegebener Konzentration hinzugegeben (Zeitpunkt an weißer Lücke im Plot zu erkennen). Während der Messung wurde die angegebene Temperatur durch ein Wärme- oder Kältepack gewährleistet. Calciumflux in die Zellen wird durch ein Ansteigen der Fluoreszenz nachgewiesen.

Die Behandlung der T-Zellen mit NAD führte ebenfalls zu einem messbaren, aber im Vergleich zum ATP langsameren Calciumflux (**Abb.21**: Panel 7,8). Bei niedrigen Konzentrationen ließ sich innerhalb der Messzeit von 8 Minuten kein Calciumflux nachweisen (**Abb.21**: Panel 6). Genau wie die ATP-vermittelte war auch die NAD-vermittelte Aktivierung von P2X7 temperaturabhängig (**Abb.21**: Panel 9).

3.1.4 Morphologische Veränderungen

Zellen, die durch einen nekrotischen Prozess sterben, schwellen charakteristischer Weise dabei an (Dive, Gregory et al. 1992; Okada, Maeno et al. 2001). Dies lässt sich in der Durchflusszytometrie durch Veränderungen im Forwardscatter nachvollziehen. Zur Analyse der Veränderungen des

Zellvolumens wurden aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus für 16 Stunden bei 37°C mit 20 μ M NAD inkubiert. Zur Blockade des NAD-vermittelten Effekts wurden die Zellen für 60 Minuten vor und während der NAD-Inkubation mit 0,1 μ g/ml ART2-spezifischen Antikörpern behandelt. Die Veränderung des Zellvolumens nach NAD-Behandlung konnte mittels FACS-Analyse deutlich nachvollzogen werden. So führte die Behandlung der Zellen mit NAD nicht zur Zunahme des Volumens, sondern zu einem Schrumpfen, welches sich durch eine Abnahme im Forwardscatter zeigte (**Abb. 22**). Dies weist auf einen apoptotischen Prozess hin. Die Vorbehandlung der Zellen mit ART2-spezifischen Antikörpern blockierte diese morphologischen Veränderungen der Zellen.

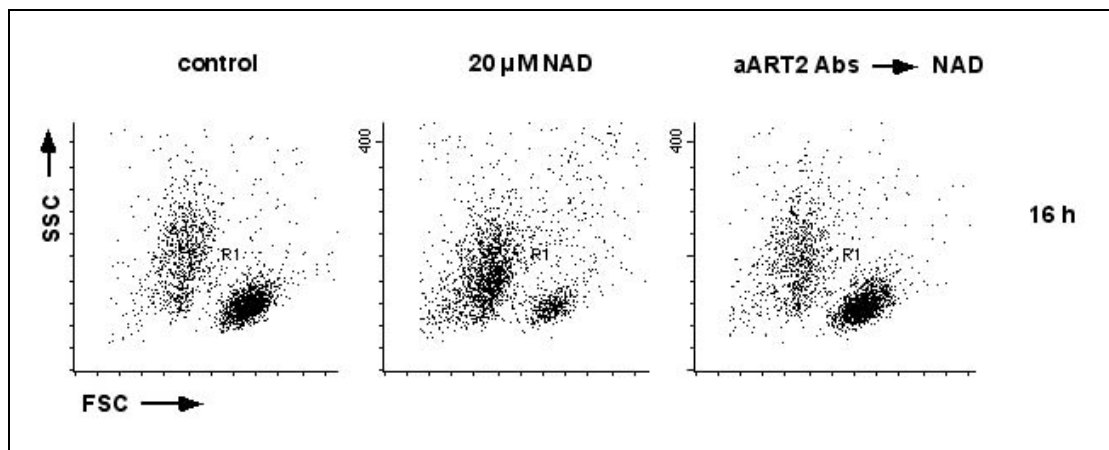


Abb. 22: Morphologische Veränderung nach NAD-Behandlung von T-Zellen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 16 h in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 μ M NAD bei 37°C inkubiert. Zur Blockade wurden die Zellen für 1 Stunde mit ART2-spezifischen Antikörpern vorinkubiert. Die Zellen wurden im FACS mittels Forward- und Sidescatter auf ihre Morphologie untersucht.

3.1.5 Aktivierung von Caspasen

Da gezeigt wurde, dass Aktivierung von P2X7 durch ATP sowohl bei der murinen Mikroglia-Zelllinie N13 als auch bei murinen Makrophagen zur Aktivierung von Caspasen führt (Ferrari, Los et al. 1999; Kahlenberg and Dubyak 2004), wollten wir nun untersuchen, inwiefern dieses auch nach Behandlung von T-Zellen mit ATP oder NAD zutrifft. Um aktivierte Caspasen nachzuweisen, wurde ein durchflusszytometrischer Ansatz gewählt. Es wurde ein Carboxyfluorescein (FAM) gekoppeltes Peptid verwendet, welches mit seiner Sequenz Valin-Alanin-Aspartat (VAD) der proteolytischen Erkennungssequenz aktivierter Caspasen entspricht. Das Peptid war mit einer terminalen Fluoromethylketongruppe (FMK) versehen, um die Diffusion des Peptids in intakte Zellen zu ermöglichen. Das Peptid konnte in die Zelle hineindiffundieren und sich irreversibel an aktivierte Caspasen binden. Durch Waschen der Zellen nach 60 minütiger Inkubation in einem speziellen Apoptosepuffer wurden nicht gebundene Peptide aus der Zelle herausgewaschen, so dass nur die Zellen, die Caspasen aktiviert hatten, noch das irreversibel an die aktivierten Caspasen gebundene Fluorochrom-gekoppelte Peptid enthielten. Aktivierte Caspasen konnten so im FACS detektiert werden.

3.1.5.1 Kinetik der NAD und ATP-vermittelten Caspaseaktivierung

Zum Nachweis der Aktivierung von Caspasen nach NAD- oder ATP-Behandlung wurde ein Kinetik-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden aufgereinigte T-Zellen einer ART2-defizienten und einer Wildtyp BALB/c Maus für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der Inkubation wurde das aktivierte Caspasen bindende Peptid FAM-VAD-FMK zu den Ansätzen hinzugefügt. Jeweils für die letzten 120, 60, 30, 10 und 5 Minuten wurden die T-Zellen mit 25 µM NAD oder 250 µM ATP behandelt. Nach Waschen im Apoptosepuffer wurden die Zellen dann im FACS analysiert. Die Behandlung von Wildtyp T-Zellen mit NAD führte zu einer Aktivierung von Caspasen. Bereits nach 10 Minuten beginnend (**Abb.23**: Panel 2), stieg die Zahl der Zellen mit aktivierten Caspasen innerhalb von 2 Stunden auf 37% an (**Abb.23**: Panel 5). Die ART2-defizienten T-Zellen zeigten keine Reaktion auf die NAD-Behandlung, was darauf hinweist, dass dieser Prozess ART2-abhängig ist (**Abb.23**: Panel 7-11).

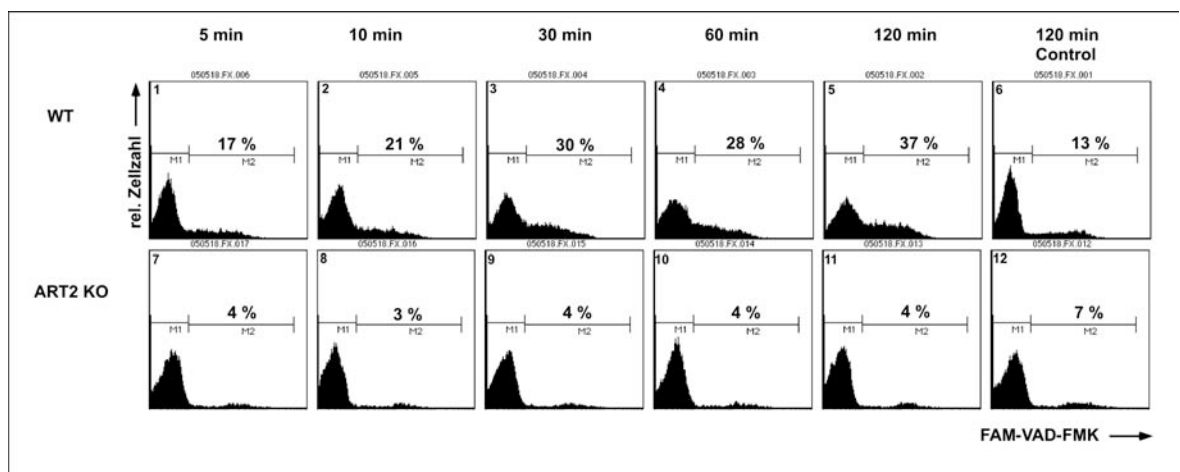


Abb. 23: Kinetik der NAD-vermittelten Caspaseaktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der zweistündigen Inkubation wurde ein Fluorochromgekoppeltes, aktivierte Caspasen bindendes Peptid (FAM-VAD-FMK) zu den Ansätzen hinzugefügt. Jeweils für die letzten 120, 60, 30, 10 und 5 Minuten der zweistündigen Inkubation wurden die Zellen mit 25 µM NAD behandelt. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Apoptosepuffer gewaschen und im FACS analysiert. Caspase-Peptid, welches nicht an aktivierte Caspase gebunden hat, wird hierbei aus der Zelle entfernt. Aktivierte Caspasen werden daher durch Zunahme der Fluoreszenz in den Zellen gemessen.

Die Behandlung von T-Zellen mit 250 µM ATP führte sowohl bei den T-Zellen der Wildtyp als auch der ART2-defizienten Maus zu einer Aktivierung von Caspasen. Dieser Prozess begann bereits nach einer Inkubation von 5 Minuten (**Abb.24**: Panel 1,7). Der Prozentsatz Caspase positiver Zellen stieg innerhalb 2 Stunden auf 59- 65 % (**Abb.24**: Panel 5,11).

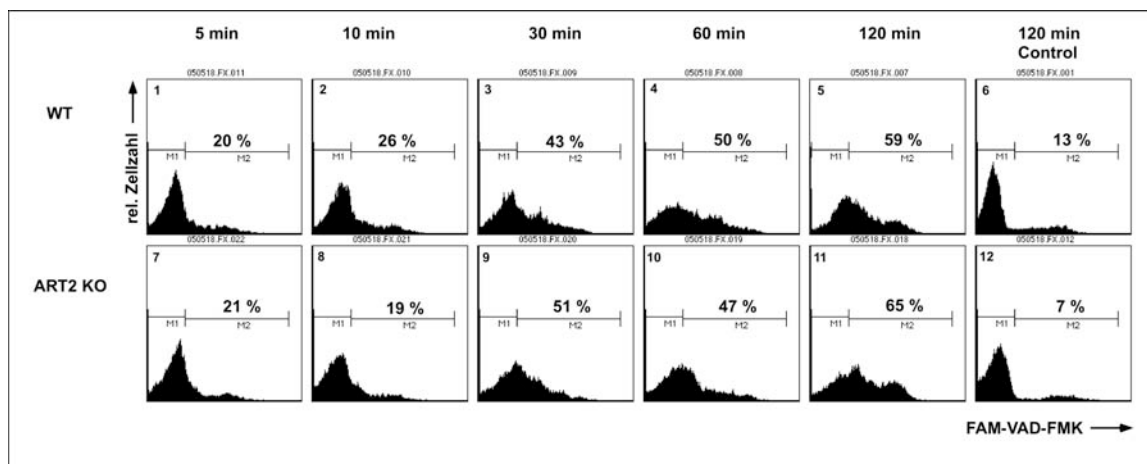


Abb. 24: Kinetik der ATP-vermittelten Caspaseaktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der zweistündigen Inkubation wurde ein Fluorochromgekoppeltes, aktivierte Caspasen bindendes Peptid (FAM-VAD-FMK) zu den Ansätzen hinzugefügt. Jeweils für die letzten 120, 60, 30, 10 und 5 Minuten der zweistündigen Inkubation wurden die Zellen mit 250 µM ATP behandelt. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Apoptosepuffer gewaschen und im FACS analysiert. Caspase-Peptid, welches nicht an aktivierte Caspase gebunden hat, wird hierbei aus der Zelle entfernt. Aktivierte Caspasen werden daher durch Zunahme der Fluoreszenz in den Zellen gemessen.

Um einen direkten Vergleich zwischen NAD- und ATP-vermittelter Caspaseaktivierung einerseits und den T-Zellen der Wildtyp und ART2-defizienten Mäuse andererseits zu ermöglichen, werden die Ergebnisse der beiden Kinetik-Experimente in **Abbildung 25** zusammen aufgeführt.

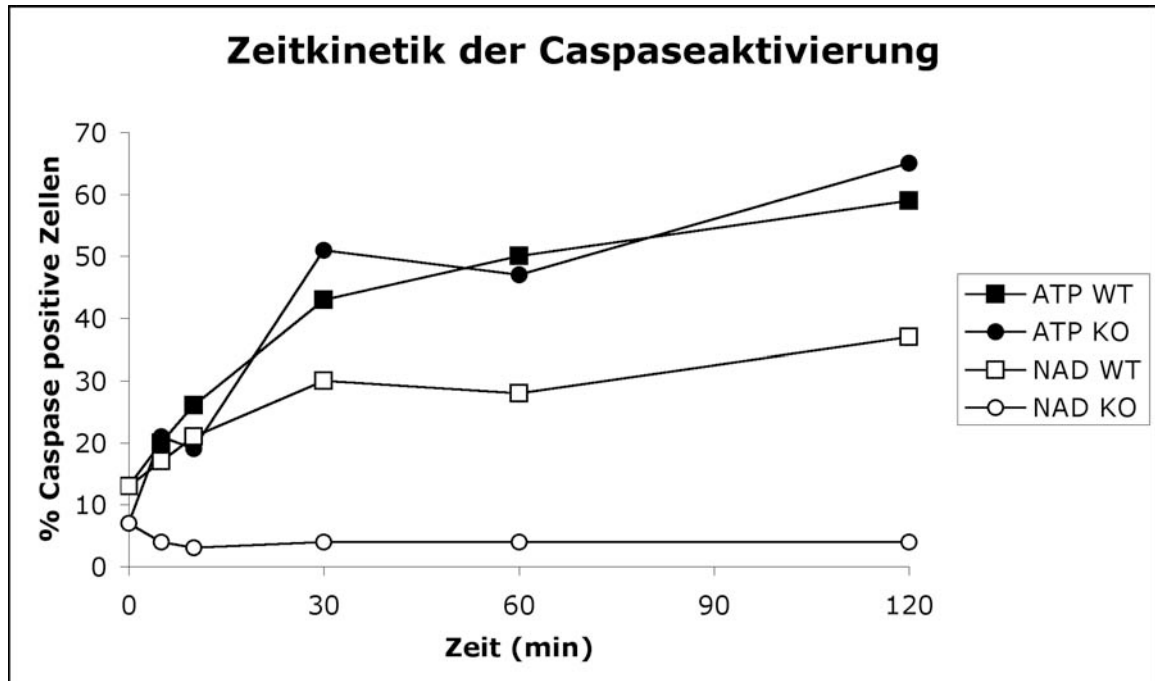


Abb. 25: Kinetik der NAD- und ATP-vermittelten Caspaseaktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der zweistündigen Inkubation wurde ein Fluorochrom-gekoppeltes, aktivierte Caspasen bindendes Peptid (FAM-VAD-FMK) zu den Ansätzen hinzugefügt. Jeweils für die letzten 120, 60, 30, 10 und 5 Minuten der zweistündigen Inkubation wurden die Zellen mit 25 µM NAD oder 250 µM ATP behandelt. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Apoptosepuffer gewaschen und im FACS analysiert. Caspase-Peptid, welches nicht an aktivierte Caspase gebunden hat, wird hierbei aus der Zelle entfernt. Aktivierte Caspasen werden daher durch Zunahme der Fluoreszenz in den Zellen gemessen. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der Zellen, die Caspasen aktiviert hatten.

Es zeigte sich deutlich, dass die ATP-Behandlung der ART2-defizienten und Wildtyp T-Zellen eine vergleichbare Kinetik der Caspaseaktivierung aufwies und die Gesamtzahl der Caspase positiven Zellen vergleichbar waren (**Abb.25**: schwarze Symbole). Die ART2-defizienten T-Zellen waren vollständig resistent gegenüber NAD-Behandlung, während sich bei einem mit der Zeit steigenden Anteil der Wildtyp T-Zellen aktive Caspasen nachweisen ließen (**Abb.25**: weiße Symbole).

3.1.5.2 Aktivierung von Caspase-1

Um zu bestimmen, ob ähnlich der Aktivierung von P2X7 in Makrophagen auch nach der Behandlung von T-Zellen mit ATP oder NAD Caspase-1 aktiviert wird, wurde das Caspase-1-spezifische Peptid FAM-YVAD-FMK eingesetzt. Das zusätzliche Tyrosin im Peptid vermittelt die Spezifität des Peptids für Caspase-1. Es wurden hierfür aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus für 3 Stunden bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µM NAD, 500 µM ATP oder 5 µM Staurosporin behandelt. In der letzten Stunde der Inkubation wurde dann entweder das alle aktivierten Caspasen bindende FAM-VAD-FMK oder das Caspase-1-spezifische FAM-YVAD-FMK zu den Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen dann mit dem speziellen Apoptosepuffer gewaschen und im FACS analysiert. Sowohl NAD- (**Abb.26A**: Panel 2) und ATP-Behandlung (**Abb.26A**: Panel 3,7) als auch Staurosporin-Behandlung (**Abb.26A**: Panel 4,8) führten zu einer starken Reduktion des

Forwardscatters der Zellen, wie es auch schon in Kapitel 3.1.4 (**Abb.22**) beschrieben wurde. Im Fall der ART2-defizienten T-Zellen zeigte die NAD-Behandlung keinen Effekt (**Abb.26A: Panel 6**).

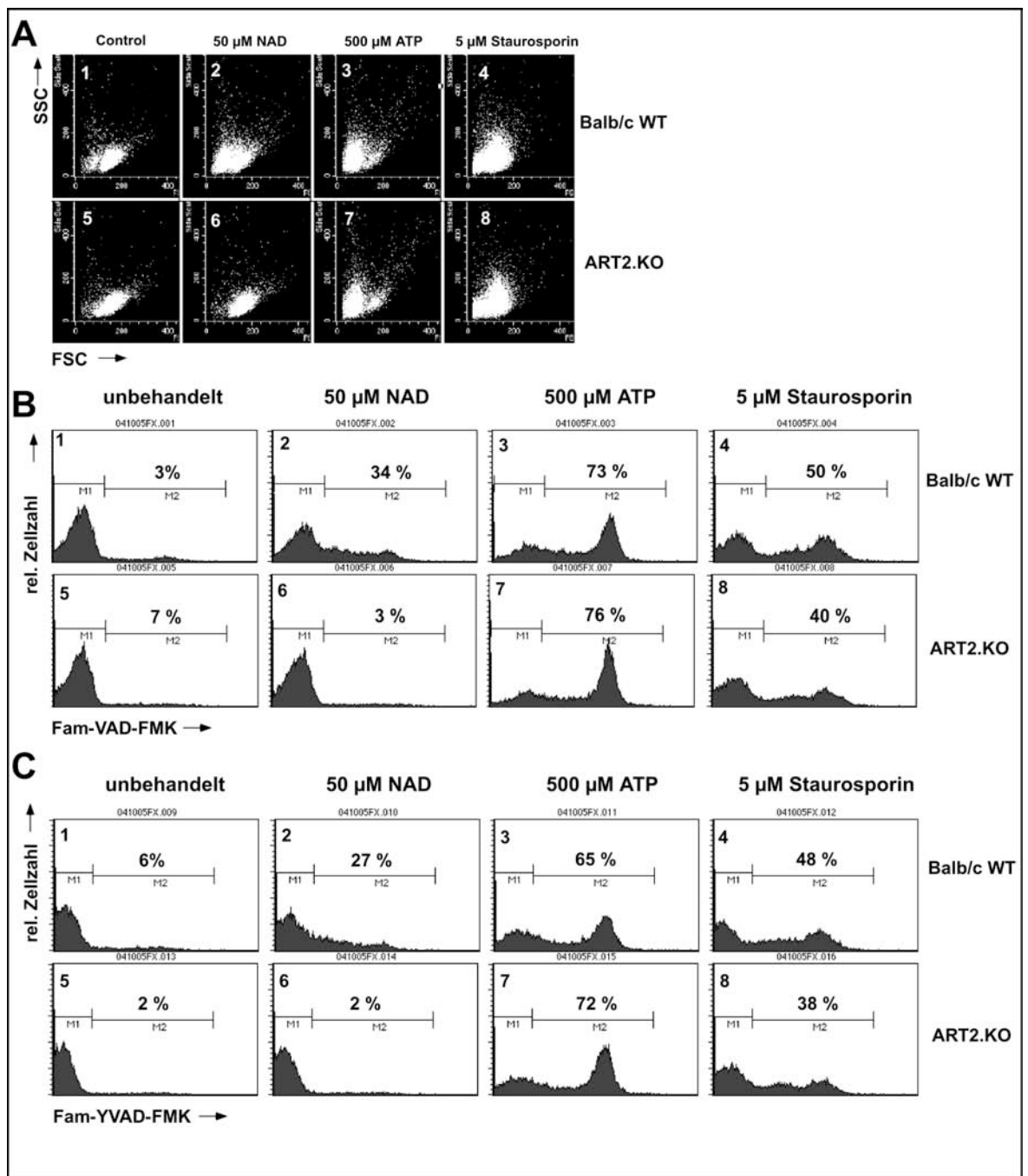


Abb. 26: Untersuchung der Caspase-1 Aktivierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 3 Stunden bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 μ M NAD, 500 μ M ATP oder 5 μ M Staurosporin inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der dreistündigen Inkubation wurde ein Fluorochrom-gekoppeltes, aktivierte Caspasen bindendes Peptid (FAM-VAD-FMK) (**B**), bzw. ein Caspase-1-spezifisches Peptid (FAM-YVAD-FMK) (**C**) zu den Ansätzen hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Apoptosepuffer gewaschen und im FACS analysiert. Caspase-Peptid, welches nicht an aktivierte Caspasen gebunden hat, wird hierbei aus der Zelle entfernt. Aktivierte Caspasen werden daher durch Zunahme der Fluoreszenz in den Zellen gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen auch mittels Forward/Sidescatter auf Änderungen in ihrer Morphologie untersucht (**A**).

Behandlung der Zellen mit den aufgeführten Agonisten führte darüber hinaus zu einer Aktivierung von Caspasen, wobei der größte Anteil Caspase positiver Zellen nach ATP-Behandlung auftraten.

(**Abb.26 B**: Panel 3,7). Die NAD-Behandlung der T-Zellen ART2-defizienter Mäuse führte zu keiner Aktivierung (**Abb.26 B**: Panel 6). Die Verwendung des Caspase-1-spezifischen Peptids zeigte, dass die Aktivierung von Caspasen hauptsächlich Caspase-1 betraf (vergleiche: **Abb.26: B** und **C**). Laut Hersteller kann das Caspase-1 spezifische Peptid auch mit sehr schwacher Affinität an Caspase-3 binden. Es ist letztlich nicht auszuschließen, dass neben Caspase-1 nach NAD-Behandlung zum Teil auch Caspase-3 aktiviert wurde.

3.1.5.3 Aktivierung von Caspasen und PS-Flashing

Um genauer zu charakterisieren, ob primär die Phosphatidylserin nach außen kehrende Zellen auch Caspasen aktivieren, wurde der oben gezeigte Ansatz zum Nachweis aktivierter Caspasen mit dem Nachweis von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche kombiniert. Hierzu wurden BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente T-Zellen für 1 Stunde bei 37°C in Anwesenheit des FAM-VAD-FMK Peptids inkubiert. Für die letzte halbe Stunde bzw. die letzten 5 Minuten wurden die Zellen in Anwesenheit von 25 µM NAD oder 250 µM ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in dem speziellen Apoptosepuffer gewaschen, um nicht gebundenes FAM-VAD-FMK Peptid aus den Zellen herauszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert. In der Tat zeigte sich, dass nach Behandlung mit NAD oder ATP vor allem die Zellen Caspasen aktivierten, die mit nach außen Kehren von Phosphatidylserin reagiert hatten, sich also durch AnnexinV und das FAM-VAD-FMK anfärben ließen (**Abb.27 A**: Panels 2-5, **B**: Panels 3 und 5).

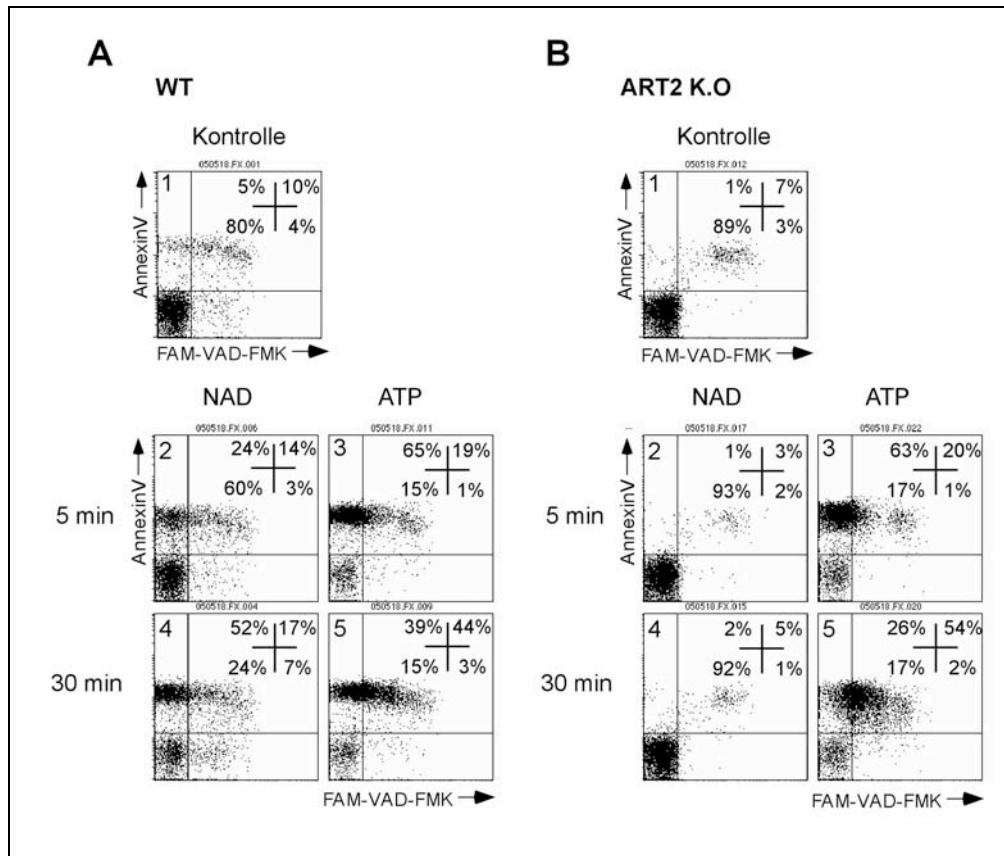


Abb. 27: NAD- und ATP-vermittelte Caspaseaktivierung und nach außen Kehren von Phosphatidylserin. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp (**A**) und einer ART2-defizienten Maus (**B**) wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Stunde vor Ablauf der zweistündigen Inkubation wurde ein Fluorochrom-gekoppeltes, aktivierte Caspase bindendes Peptid (FAM-VAD-FMK) zu den Ansätzen hinzugefügt. Jeweils für die letzten 30 und 5 Minuten der zweistündigen Inkubation wurden die Zellen mit 25 μM NAD oder 250 μM ATP behandelt. Anschließend wurden die Zellen zunächst in einem speziellen Apoptosepuffer gewaschen, dann mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert.

Weiterhin zeigte sich, dass die T-Zellen ART2-defizienten Mäuse resistent gegenüber der NAD-Behandlung waren (**Abb.27B**: Panel 2,4), während sie auf ATP-Behandlung (**Abb.27B**: Panel 3,5) vergleichbar mit BALB/c Wildtyp T-Zellen reagierten. Die ATP behandelten Zellen zeigten zuerst ein sehr schnelles nach außen Kehren von Phosphatidylserin und anschließend eine Aktivierung von Caspasen. Diese getrennte Abfolge konnte jedoch bei den NAD-behandelten Wildtyp T-Zellen nicht so klar gezeigt werden. Es schien, dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin zeitlich eher mit dem Erscheinen von aktivierten Caspasen zusammentrifft.

3.1.6 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials

Im Zusammenhang mit der Apoptose von Lymphozyten wurde als wichtiges Merkmal auch der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beschrieben (Marchetti, Hirsch et al. 1996). Unter Verwendung von „BD Mitosensor“, welches die mitochondriale Membranintegrität nachweisen kann, haben wir untersucht, inwieweit dieses Merkmal auch beim NAD-induzierten Zelltod (NICD) nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen einer BALB/c Wildtyp Maus für 6 Stunden bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 μM NAD oder 5 μM Staurosporin inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit „BD Mitosensor“ angefärbt. Durch Potential-abhängige Aggregatbildung dieses Farbstoffs in intakten Mitochondrien wechselt die

Fluoreszenz des Farbstoffes in den roten Bereich. Monomere des Farbstoffs fluoreszieren im grünen Bereich. In Zellen, deren Mitochondrien ihr Membranpotential verloren haben, können sich keine Aggregate des Farbstoffes bilden (Reers, Smiley et al. 1995). Diese Zellen sind durch eine gesteigert grüne Fluoreszenz nachweisbar. Die Analyse der Zellen im FACS ergab, dass während des NAD-induzierten Zelltodes eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials nachweisbar ist. Dies geschah vor allem bei Zellen, die auch morphologische Änderungen erfahren hatten, was durch ein geringeres Signal im Forwardscatter detektiert werden konnte (**Abb.28**).

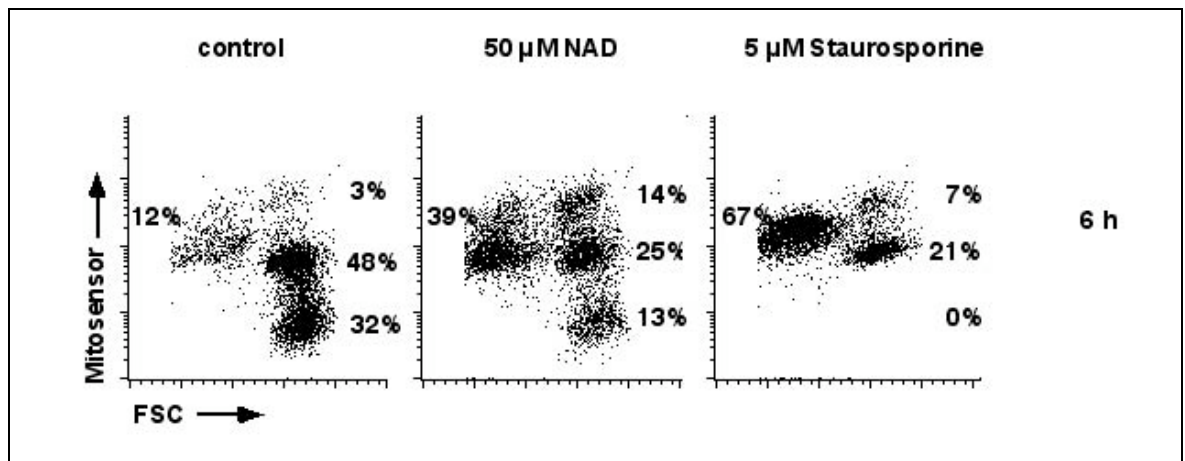


Abb. 28: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach NAD- und Staurosporin-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 6 Stunden bei 37°C mit 50 µM NAD oder 5 µM Staurosporin behandelt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit „BD Mitosensor“ angefärbt und im FACS analysiert. Zusammenbruch des Membranpotentials wird durch gesteigerte Fluoreszenz detektiert.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass während des NAD-induzierten Zelltods sich auch das mitochondriale Membranpotential reduziert, wenn auch nicht so deutlich wie bei den mit Staurosporin behandelten Zellen.

3.1.7 DNA-Fragmentierung

Ein weiteres Merkmal von Zellen während eines apoptotischen Prozesses ist die DNA-Fragmentierung (Peitsch, Muller et al. 1993) durch von Caspasen aktivierte DNasen. Um den Vorgang der DNA-Fragmentierung nach Aktivierung von P2X7 zu untersuchen, haben wir ein durchflusszytometrisches Verfahren angewandt, um den DNA-Gehalt zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu bestimmen. Durch die Fixierung von Zellen mit Methanol wird deren Cytoplasmamembran durchlässig für DNA-Fragmente. In Zellen, die ihre DNA fragmentiert haben, lässt sich daher nach der Anfärbung mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid ein geringerer DNA-Gehalt nachweisen. Diese Population, die einen geringeren DNA-Gehalt hat als Zellen, die in der G₁-Phase des Zellzyklus stehen, nennt man auch Sub-G₁-Peak. Für dieses Experiment wurden T-Zellen aus den Lymphknoten von BALB/c Wildtyp Mäusen isoliert. Die Zellen wurden dann 30 Minuten, 5 Stunden, 10 Stunden, 22 Stunden oder 30 Stunden in Anwesenheit von 25 µM NAD oder 250 µM ATP bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Parallel wurden auch T-Zellen mittels einer Kobaltquelle mit einer Dosis von 8 Gray bestrahlt. Diese Zellen sowie auch unbehandelte Zellen wurden dann für die gleichen Zeiträume wie die NAD- und ATP-behandelten Zellen ebenfalls im Brutschrank inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit

80% Methanol fixiert, mit 1 µg/ml Propidiumjodid angefärbt und der DNA-Gehalt im FACS analysiert. Es ließ sich nach NAD- und ATP-Behandlung klar ein wachsender Sub-G1-Peak und somit DNA-Fragmentierung nachweisen (**Abb.29**).

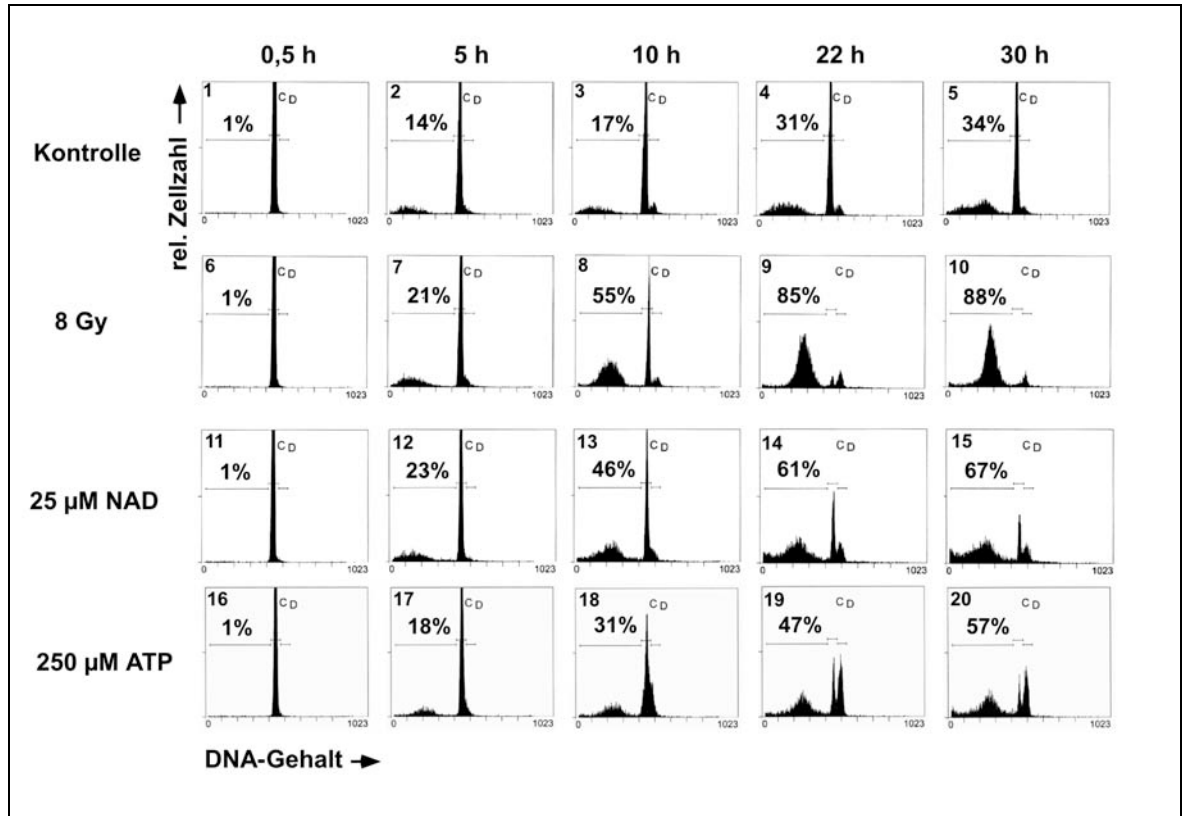


Abb. 29: Vergleichende Untersuchung der DNA-Fragmentierung nach NAD-, ATP- oder Strahlen-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 0,5 , 5 , 10 oder 22 Stunden mit 25 µM NAD oder 250 µM ATP inkubiert. Parallel wurden auch unbehandelte oder mit einer Kobalt-Quelle bestrahlte (8 Gy) T-Zellen für die gleiche Zeit inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 80% Methanol fixiert, mit Propidiumjodid angefärbt und im FACS auf den DNA-Gehalt analysiert. Angegeben ist der Prozentsatz von Zellen im Sub-G₁-Peak. Peak C entspricht den Zellen mit diploidem DNA-Gehalt (G₀- oder G₁-Phase). Peak D entspricht T-Zellen mit vermehrtem DNA-Gehalt (Zellen in S-Phase oder fusionierte Zellen).

Die Kinetik dieser DNA-Fragmentierung war vergleichbar mit der bestrahlten Positivkontrolle. Die Fragmentierung ließ sich bereits nach 10 Stunden klar erkennen (**Abb.29**: Panel 8,13,18). Die durch Bestrahlung induzierte DNA-Fragmentierung hatte nach 22 Stunden bereits das Maximum erreicht und betraf 85% der Zellen (**Abb.29**: Panel 9). Die durch NAD- und ATP-Behandlung ausgelöste DNA-Fragmentierung war möglicherweise noch nicht vollständig abgelaufen und betraf weniger Zellen, lag aber mit 67% und 57% betroffenen Zellen weit über dem Wert der unbehandelten Kontrolle (Vergleiche **Abb.29**: Panel 15,20 und 5). Es konnte nach Aktivierung von P2X7 ein weiteres Merkmal apoptotischer Prozesse nachgewiesen werden.

3.1.8 Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase

Es ist beschrieben worden, dass es bei Makrophagen als Konsequenz der lang anhaltenden Aktivierung von P2X7 neben der Öffnung eines Kanals und von Membranporen auch zur Lyse von Zellen kommen kann. Daher wird P2X7 auch als zytolytischer Purinozeptor bezeichnet

(Surprenant, Rassendren et al. 1996). Um die Ausbildung zytolytischer Membranveränderungen nachzuweisen, haben wir vergleichende Untersuchungen nach NAD- und ATP-Behandlung von T-Zellen durchgeführt. Das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein cytoplasmatisches Enzym, das bei Verlust der Membranintegrität von Zellen in den Überstand abgegeben wird. T-Zellen einer ART2-defizienten und BALB/c Wildtyp Maus wurden bei 37°C für 2 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von NAD und ATP behandelt. Im Anschluss wurde der Überstand von jeweils 5×10^5 Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Substrat der LDH inkubiert. Das Produkt der Umsetzung ließ sich photometrisch bestimmen. Um die maximale Freisetzung der LDH zu bestimmen, wurden Zellen in einem Parallelansatz mit 2% TritonX-100 lysiert und die Lysate mit dem Substrat inkubiert. In der Auswertung wurde dann der Hintergrund unbehandelter Zellen abgezogen und der Prozentsatz relativ zur maximal möglichen Freisetzung bestimmt.

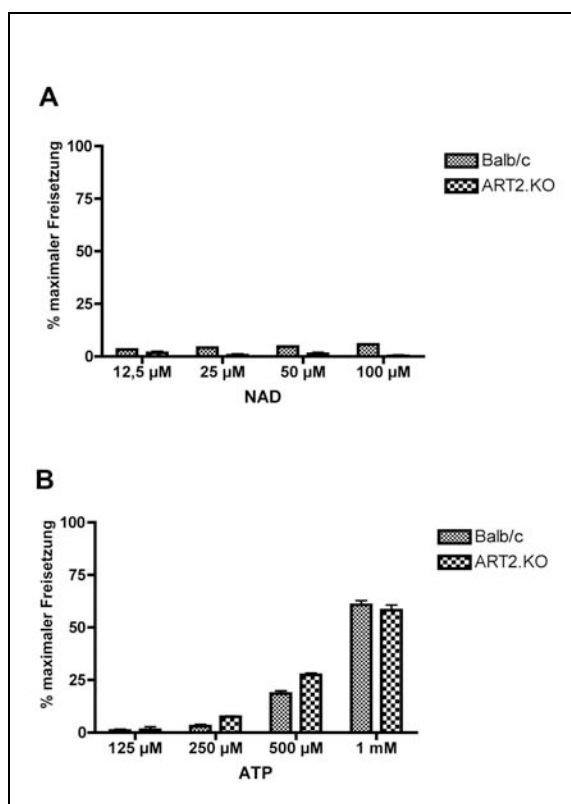


Abb. 30: Untersuchung der Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase nach NAD- und ATP-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 2 Stunden bei 37°C mit den angegebenen Konzentrationen NAD (**A**) oder ATP (**B**) behandelt. Der Überstand der Zellen wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit einem Substrat, das durch Lactat-Dehydrogenase umgesetzt wird, inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt und die Substratumsetzung photometrisch bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Prozentteil der durch TritonX-100-Lyse bestimmten, maximal möglichen Freisetzung.

Es zeigte sich, dass Behandlung der Zellen mit NAD nur bei Wildtyp T-Zellen zu minimaler Freisetzung von LDH führte (**Abb.30 A**). Die Behandlung mit hohen Konzentrationen ATP führte jedoch zu einer halbmaximalen Freisetzung von LDH, also zu einem Verlust der Membranintegrität. Dies zeigte sich sowohl bei Wildtyp als auch bei ART2-defizienten T-Zellen (**Abb.30 B**). Andererseits führte die Inkubation mit 250 µM ATP nur zu einer schwachen Freisetzung von LDH, obwohl die Dosis ausreichend ist, die Aufnahme von Ethidiumbromid (**Abb.19**), DNA-

Fragmentierung (**Abb.29**) und Aktivierung von Caspasen (**Abb.27**) auszulösen.

3.1.9 Abstoßen von L-Selektin (CD62L)

Eine weitere Konsequenz der Aktivierung von P2X7 mit ATP ist das Abstoßen von CD62L von der Zelloberfläche (Gu, Bendall et al. 1998). Um zu überprüfen, ob CD62L auch nach Aktivierung von P2X7 durch extrazelluläres NAD von der Oberfläche abgestoßen wird, haben wir vergleichende Experimente mit T-Zellen einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus durchgeführt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 25 µM NAD oder 250 µM ATP inkubiert. Zum Nachweis der Beteiligung von P2X7 bei diesem Prozess wurden die Zellen in einem Parallelansatz zusätzlich auch mit dem P2X7-Inhibitor KN62 behandelt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen entweder mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD62L angefärbt oder mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert.

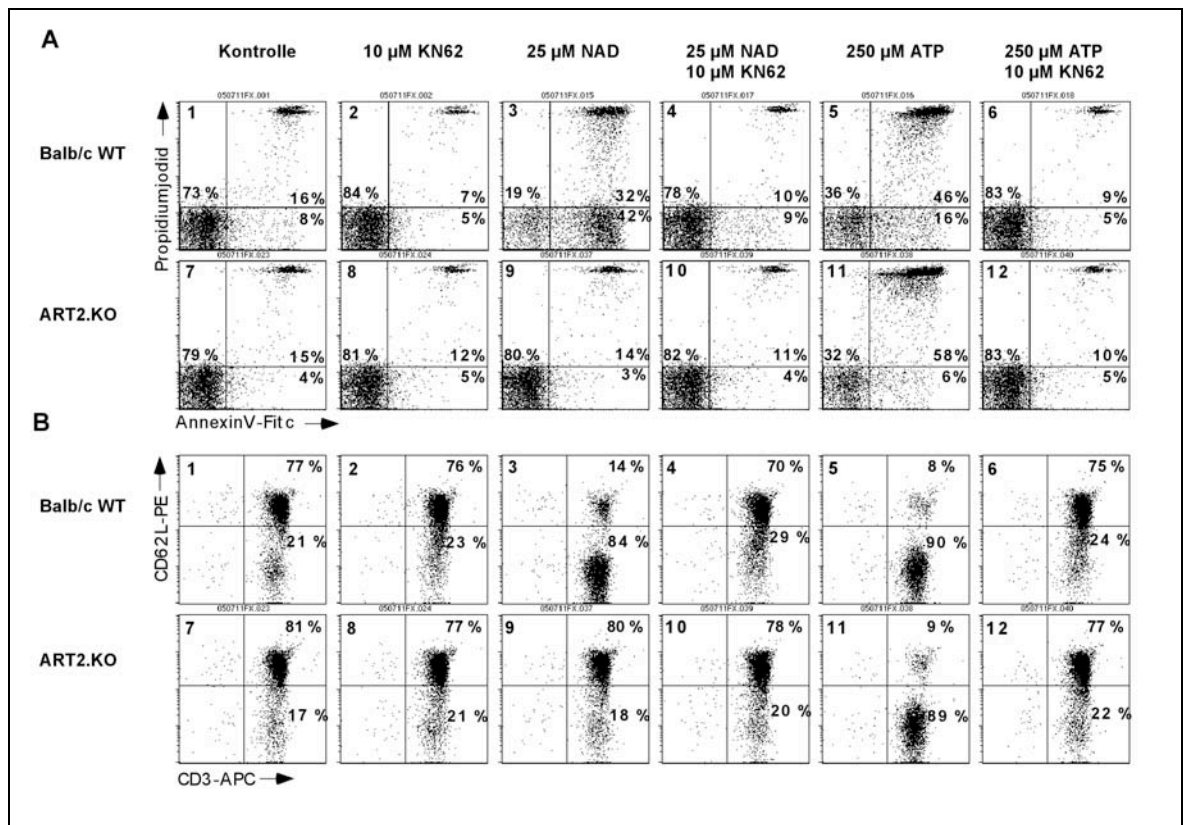


Abb. 31: Abstoßen von CD62L nach NAD- und ATP-vermittelter Aktivierung von P2X7. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 25 µM NAD oder 250 µM ATP behandelt. Zur Blockade wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem P2X7-Inhibitor KN62 vorinkubiert. Nach der Inkubation mit NAD und ATP wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Zur Analyse des Abstoßens von CD62L wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD62L inkubiert, gewaschen und die Fluoreszenz im FACS gemessen (**B**).

Behandlung sowohl mit NAD als auch ATP führte bei BALB/c Wildtyp T-Zellen zum bereits beschriebenen nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.31A**: Panel 3 und 5) und zum Abstoßen von CD62L (**Abb.31B**: Panel 3 und 5). Sowohl das nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.32A**: Panel 4 und 6) als auch das Abstoßen von CD62L (**Abb.31B**: Panel

4 und 6) ließ sich durch den P2X7-Inhibitor KN62 blockieren. Die ART2-defizienten T-Zellen reagierten auf ATP-Behandlung mit nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.31A**: Panel 11) und Abstoßen von CD62L (**Abb.31B**: Panel 11), während sie resistent gegenüber NAD waren (**Abb.31 A** und **B**: Panel 9). Die durch ATP-vermittelten Effekte wurden auch hier durch KN62 blockiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten an, dass das Abstoßen von CD62L durch Aktivierung von P2X7 ausgelöst wurde und der durch NAD vermittelte Effekt ART2-katalysiert und P2X7-abhängig ist.

3.1.10 Verfolgung der ADP-Ribosylierung von Zellmembranproteinen

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden verwendet, um die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu verfolgen. Zum einen wurde die Tatsache genutzt, dass ART2 das NAD-Analogon etheno-NAD als Substrat für etheno-ADP-Ribosylierung verwenden kann. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe des monoklonalen 1G4-Antikörpers, der die etheno-ADP-Ribose-Gruppe erkennen kann, ein durchflusszytometrischer Nachweis der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung etabliert (Krebs, Koestner et al. 2003). Als zweite Methode zum Nachweis der ADP-Ribosylierung wurde ³²P-markiertes NAD als Substrat eingesetzt. Nach anschließender Lyse, Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Westernblot lassen sich die ADP-ribosylierten Zielproteine mittels Autoradiographie nachweisen.

3.1.10.1 NAD Analogon: etheno-NAD

Um eine mögliche Temperaturabhängigkeit der ADP-Ribosylierung zu untersuchen, wurden aufgereinigte T-Zellen von BALB/c Wildtyp, ART2-defizienten und für die potente Ecto-NADase CD38-defizienten Mäusen für 30 Minuten bei 37°C oder 4°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 12,5 µM etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 37°C oder 4°C inkubiert oder direkt mit einem Fluorochrom-gekoppelten 1G4-Antikörper angefärbt und im FACS analysiert.

Die etheno-ADP-Ribosylierung konnte sowohl in BALB/c Wildtyp als auch CD38-defizienten T-Zellen deutlich nachgewiesen werden (**Abb.32**). Die CD38-defizienten T-Zellen zeigten hierbei eine höhere etheno-ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche (vergleiche **Abb.32**: Panel 2,6). Auf T-Zellen ART2-defizienter Mäuse konnte keine ART-Aktivität nachgewiesen werden (**Abb.32**: Panels 9-12). Bezüglich der Temperaturabhängigkeit ließ sich feststellen, dass die Inkubation mit etheno-NAD bei 4°C zu einer höheren Zelloberflächen-etheno-ADP-Ribosylierung führte als bei 37°C (vergleiche **Abb.32**: Panel 2 und 1; 6 und 5). Die Weiterinkubation bei 37°C nach Entfernen des etheno-NADs führte bei den T-Zellen der Wildtyp und CD38-defizienten Maus zu einem Rückgang der nachweisbaren etheno-ADP-ribosylierten Oberflächenproteine (vergleiche **Abb.32**: Panels 2 und 3; 6 und 7). Dieser Effekt war bei der 4°C Inkubation etwas schwächer ausgeprägt (**Abb.32**: Panels 4,8). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die etheno-ADP-Ribosylierung bei 4°C effizienter als bei 37°C war. Der Rückgang nachweisbarer etheno-ADP-ribosylierter Proteine nach weiterer Inkubation lässt auf die mögliche Aktivität einer ADP-Ribosyl-Hydrolase oder die Endocytose der modifizierten Proteine schließen.

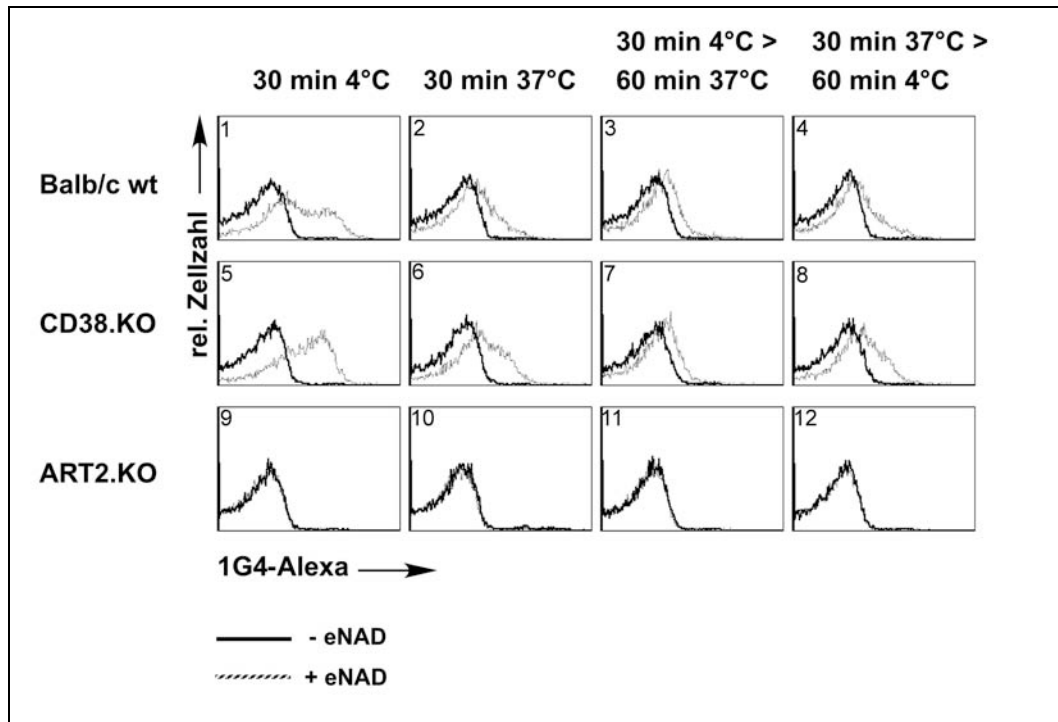


Abb. 32: ADP-Ribosylierung von Zelloberflächen Proteinen mit dem Substrat etheno-NAD. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp, CD38-defizienten oder einer ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 12,5 μM etheno-NAD inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und entweder direkt mit einem ALEXA-gekoppelten, monoklonalen Antikörper, der etheno-ADP-ribosylierte Protein detektiert anfärbt, oder zunächst für 60 Minuten bei 37°C oder 4°C weiter inkubiert und anschließend wie beschrieben anfärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im FACS analysiert. Aufgetragen ist mittlere Fluoreszenz gegen relative Zellzahl.

3.1.10.2 Radioaktiv markiertes NAD als Substrat

Zur Verfolgung der ADP-Ribosylierung mit dem natürlichen Substrat von ART2, NAD, wurde radioaktiv markiertes ^{32}P -NAD verwendet.

In diesem Experiment wurden aufgereinigte T-Zellen aus Milz und Lymphknoten je einer Wildtyp und einer CD38-defizienten Maus auf dem BALB/c oder C57BL/6 Hintergrund mit ^{32}P -NAD bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Es wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen eingesetzt. Durch mehrfaches Waschen wurde nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD entfernt. Die Zellen wurden dann bei 4°C für 15 Minuten mit 1% TX-100 lysiert. Aus den Lysaten wurde mit Hilfe von Protein-G-Sepharose-gekoppelten Antikörpern LFA-1, P2X7 und ein noch unbekanntes Protein, das an einem Tyrosinrest phosphoryliert ist, immunpräzipitiert. Um eine De-Phosphorylierung zu verhindern, wurden die Ansätze, aus denen mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper immunpräzipitiert werden sollte, mit 100 μM Natriumvanadat behandelt. Nach einer Stunde Immunpräzipitation bei 4°C wurde die Protein-G-Sepharosematrix mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch 10 minütiges Erhitzen in SDS-Puffer mit DTT auf 70°C von der Protein-G-Sepharosematrix gelöst. Der Überstand wurde dann mittels SDS-PAGE in einem 10% Bis/Tris Polyacrylamid-Gel und MOPS-Puffer aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Mittels Autoradiographie für 72 Stunden bei -80°C wurden die immunpräzipitierten, ADP-ribosylierten Proteine nachgewiesen.

Durch dieses Experiment ließ sich eindeutig zeigen, dass P2X7 selbst ein Zielprotein der ADP-Ribosylierung ist (**Abb.33** Spuren 4 und 7).

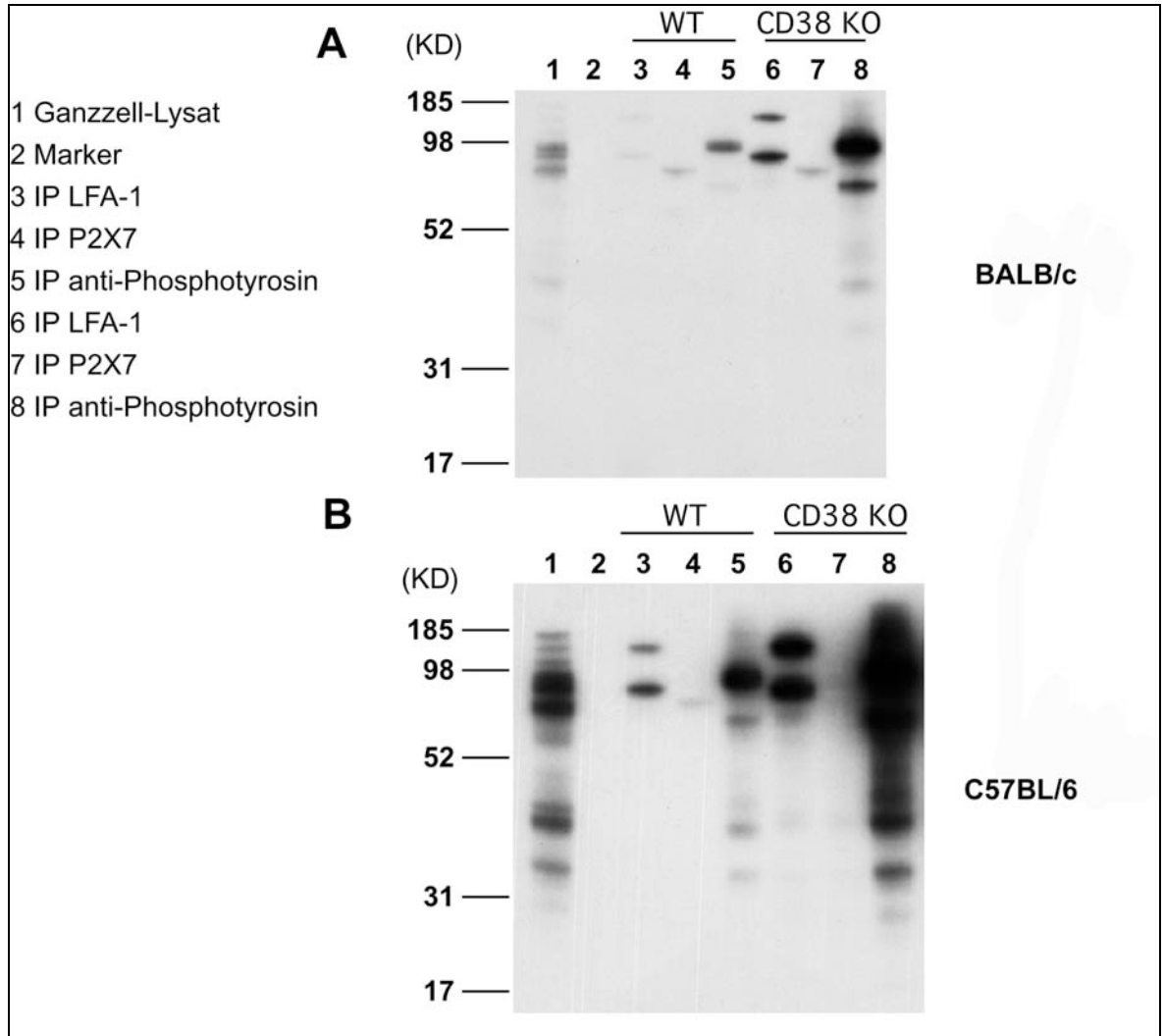


Abb. 33: ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mit radioaktiv markiertem NAD in verschiedenen Mausstämmen. Aufgereinigte T-Zellen aus Milz und Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp, C57BL/6 Wildtyp Maus und jeweils einer CD38-defizienten Maus auf dem BALB/c- (**A**) und C57BL/6-Hintergrund (**B**) wurden für 20 Minuten mit radioaktiv markiertem NAD bei 4°C inkubiert. Durch wiederholtes Waschen wurde nicht eingebautes radioaktives NAD entfernt. Die Zellen wurden 15 Minuten bei 4°C mit TX-100 lysiert. Aus den Lysaten wurde dann mit Hilfe von Protein-G-Sepharose-gekoppelten Antikörpern LFA-1, P2X7 und ein nicht identifiziertes an einem Tyrosinrest phosphoryliertes Protein immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet und es folgte Autoradiografie für 72 h bei -80°C.

Es liegt die Vermutung nahe, dass ADP-Ribosylierung von P2X7 auch die Ursache für die Aktivierung des Rezeptors darstellt. Der ADP-Riboserest könnte die Adenosin-Gruppe eines gebundenen ATP-Moleküls nachahmen. Hierdurch erklärt sich möglicherweise auch die Beobachtung, dass etheno-NAD zwar effizient als Substrat von ART2 dient aber P2X7 nicht zu aktivieren vermag. Dies könnte auf die Modifikation an der Adenosin-Gruppe des etheno-NAD (**Abb.7**) zurückzuführen sein. Es konnte in allen Mausstämmen auch ADP-ribosyliertes LFA-1 (**Abb.33**: Spur 3 und 6) immunpräzipitiert werden. Auch das ca. 80 kDa große, unbekannte Protein

war in allen Ansätzen nachweisbar. Insgesamt war erkennbar, dass die Inkorporation von ^{32}P -NAD in T-Zellen der Mäuse auf dem BALB/c-Hintergrund etwas schwächer war als bei den T-Zellen auf C57BL/6-Hintergrund. Die Abwesenheit der potenten NADase CD38 auf T-Zellen CD38-defizienten Tieren ging in beiden Mausstämmen mit einer deutlichen Steigerung der Inkorporation einher.

3.1.11 Analyse der ART2-Expression und Sensitivität gegenüber NAD und ATP in NOD Mäusen und kongenen Mausstämmen

Es war bekannt, dass bestimmte Mausstämme wie C57BL/6 oder CBA eine Punktmutation im *P2X7* Gen haben, die zu einer Veränderung im Protein an Position 451 von Prolin zu Leucin führt (Adriouch, Dox et al. 2002). Diese Änderung führt zu einer stark reduzierten Aktivierbarkeit von *P2X7* durch ATP.

Während eines vierwöchigen Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Dr. Edward Leiter im Jackson Laboratory (Maine, USA) hatte ich die Möglichkeit mit Mausstämmen zu arbeiten, die unterschiedliche Allele an *ART2*- und *P2X7*-Loci aufwiesen. So hat der eingekreuzte Mausstamm NOD/Lt ein *ART2*-Allel, das eine Expression von ART2 auf mittelstarkem Niveau bewirkt, der CBA Mausstamm hingegen ein Allel, welches für eine niedrige Expression von ART2 sorgt (Koch-Nolte, Duffy et al. 1999). Darüber hinaus hat der NOD/Lt Stamm das Wildtyp *P2X7*-Allel, während die CBA Mäuse die P451L-Mutation tragen (Adriouch, Dox et al. 2002). Da NOD/Lt Mäuse spontan Typ 1 juvenilen Diabetes entwickeln, hat das Labor von Dr. Leiter kongene Stämme hergestellt, um weitere Suszeptibilitätsloci zu identifizieren (Chen, Reifsnyder et al. 2005). Hierzu wurden die Nachkommen der F_1 -Generation einer Verpaarung zwischen NOD und CBA Mäusen für eine Generation auf CBA zurückgekreuzt. Nachkommen hieraus wurden dann für 20 Generationen eingezüchtet. So entstanden neue Linien, die eine Mischung aus NOD- und CBA-Genom aufweisen (Reifsnyder, Flynn et al. 1999). Durch Rückkreuzung eines dieser Stämme auf den NOD Hintergrund ist der Stamm NOD.CBA.Tyr entstanden, der zu über 99% NOD-Genom enthält. Nur auf Chromosom 7 ist ein kleiner Bereich CBA-Genom zurückgeblieben. In dieser chromosomalen Region liegt das Tyrosinase-Gen, welches für die braune Farbe der CBA Mäuse verantwortlich ist und auf das bei den Rückkreuzungen selektiert worden war. Interessanterweise liegen in dieser Region auch die beiden *ART2* Gene. So hat dieser Stamm nun den Wildtyp *P2X7* aus dem NOD-Genom und das *ART2*-Allel aus dem CBA-Genom. Der kongene Stamm NOcCB-1 hat das NOD *ART2*-Allel, das für Expression auf mittlerem Niveau sorgt und das CBA *P2X7*-Allel mit der P451L Mutation.

Um die ART2-Expression in diesen Mausstämmen vergleichend zu untersuchen, wurden aufgereinigte T-Zellen von NOD, NOD.CBA.Tyr, NOcCB-1 und CBA Mäusen mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und ART2 angefärbt und im FACS analysiert. Das Niveau der Expression in diesen Stämmen korreliert weitgehend mit den beschriebenen Allelen. So zeigen T-Zellen der NOD.CBA.Tyr Maus, die sich von der NOD Maus nur in dem kleinen *ART2*-enthaltenden Abschnitt des Chromosoms 7 unterscheidet das für CBA Mäuse typische niedrige ART2-Expressions-Niveau (**Abb. 34 B und D**). Allerdings scheinen auch andere Genorte einen

hemmenden Einfluss auf die Zelloberflächen-ART2-Expression auszuüben: die NOcCB-1 Maus, die das *ART2*-Allel der NOD Maus trägt und ansonsten eine ausgewogene Mischung aus NOD- und CBA-Genom-Anteilen aufweist, zeigt eine niedrigere Expression als die NOD Maus (vergleiche **Abb.34 A und C**).

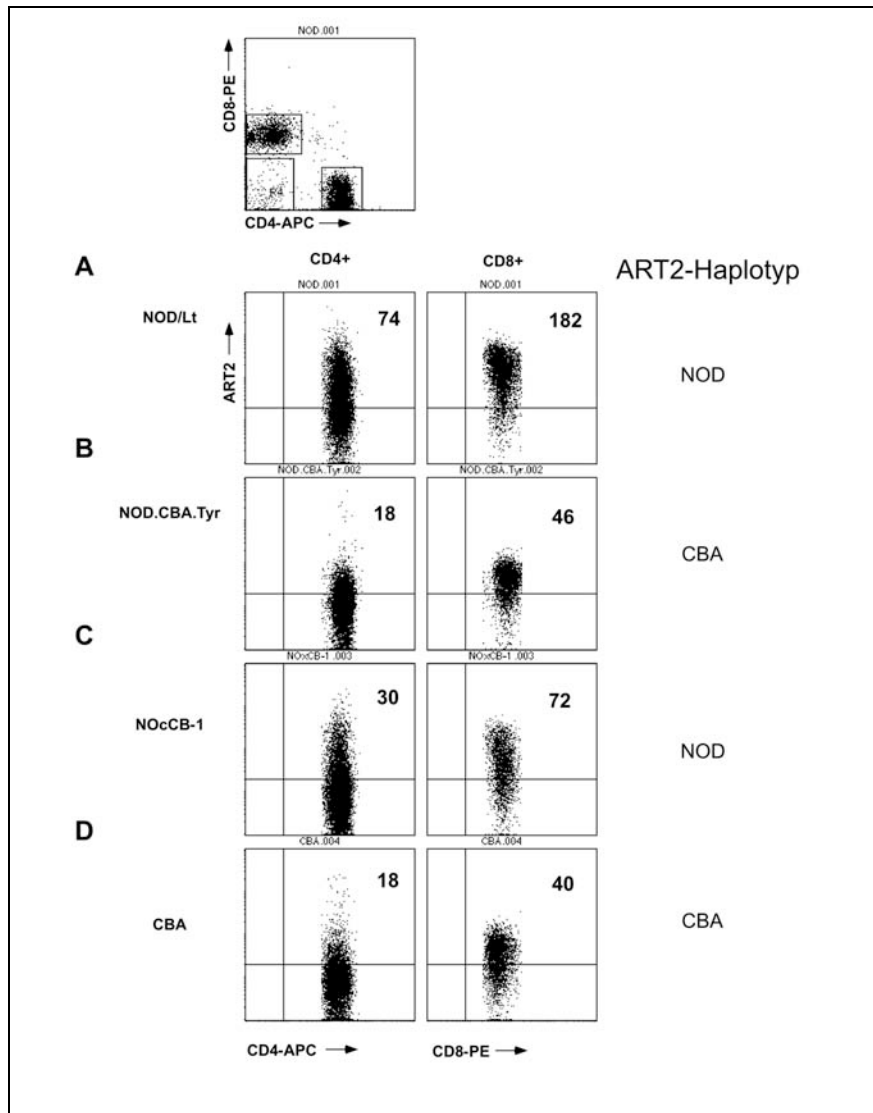


Abb. 34: Vergleichende Untersuchung der ART2 Expression in NOD, CBA und kongenen Mausstämmen. Aufgereinigte T-Zellen einer NOD, CBA, NOD.CBA.Tyr und NOcCB-1 Maus wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und ART2.1/ART2.2 (Ali) angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. In **A-D** ist die ART2-Expression auf den „gegateten“ CD4+ T-Helfer-Zellen und CD8+ cytotoxischen T-Zellen dargestellt. Hierbei ist die mittlere Fluoreszenzintensität (log MFI) als Maß für die ART2-Expression für die Populationen angegeben. Weiterhin ist auch der ART2-Haplotyp der untersuchten Stämme angegeben.

Es galt nun, den Einfluss von *ART2*-Allel und *P2X7*-Allel auf die Sensitivität der T-Zellen gegenüber NAD und ATP zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden aufgereinigte T-Zellen von Mäusen aus den oben beschriebenen Stämmen für 30 Minuten bei 37°C mit NAD und ATP behandelt. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt.

Die niedrigere Expression von ART2 in NOD.CBA.Tyr Mäusen im Vergleich zu NOD Mäusen spiegelte sich durch eine leicht reduzierte Reaktion gegenüber extrazellulärem NAD wider

(vergleiche **Abb.35**: Panel 2 und 5). Da beide Stämme den Wildtyp P2X7 haben, unterschied sich die Empfindlichkeit gegenüber ATP nicht (**Abb.35**: Panel 3 und 6). Der Hintergrund an Zellen, die ohne Behandlung mit NAD und ATP „spontan“ Phosphatidylserin externalisieren (vergleiche **Abb.35**: Panel 1 und 4), wird offensichtlich auch durch das *ART2* Allel stark beeinflusst, da die beiden kongenen Mausstämme sich nahezu ausschließlich in diesem Allel unterscheiden.

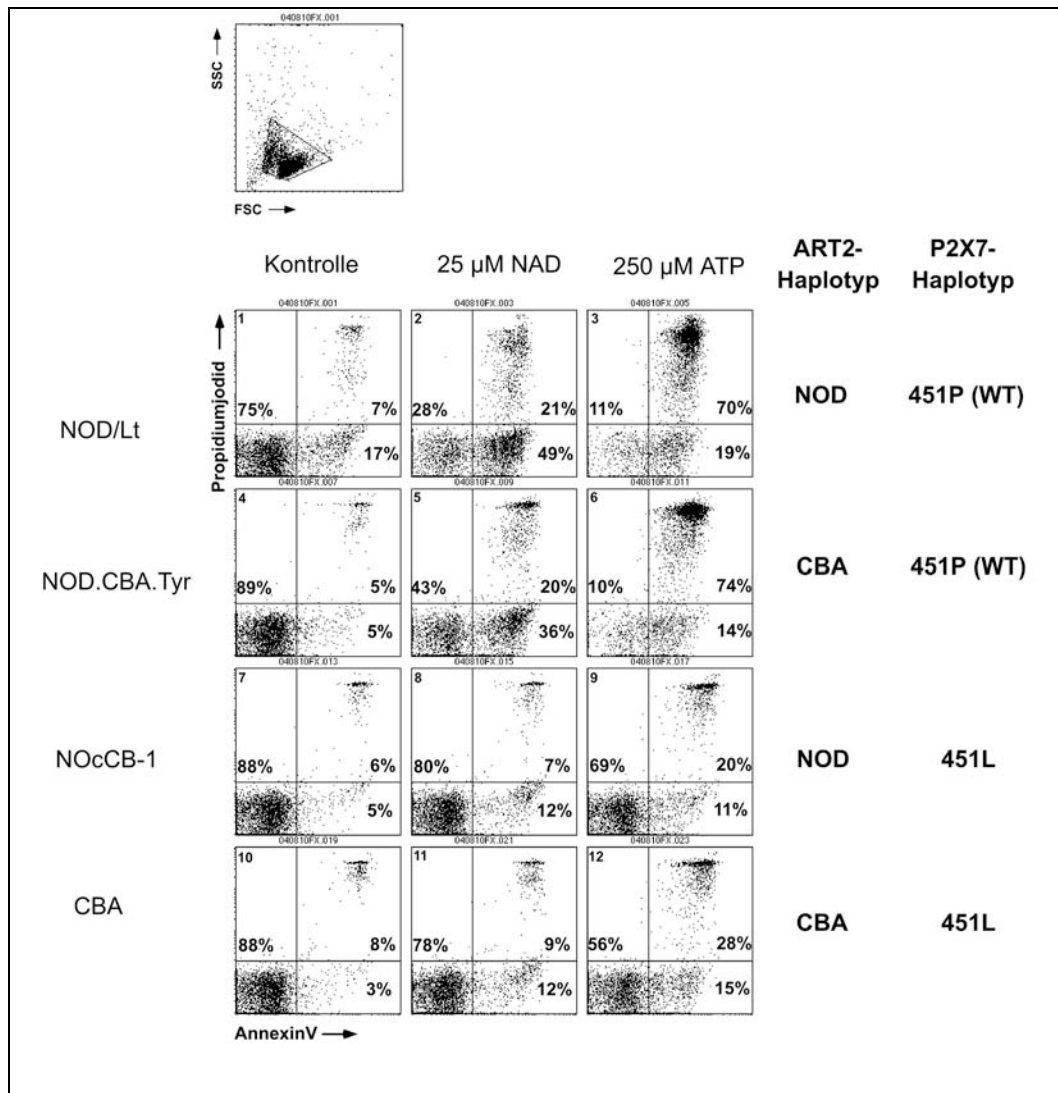


Abb. 35: Vergleichende Untersuchung zur Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP in NOD, CBA und kongenen Mausstämmen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 30 Minuten mit NAD oder ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentzahlen entsprechen der Zahl apoptotischer T-Zellen. Angegeben sind weiterhin die ART2- und P2X7-Haplotypen der untersuchten Mausstämme.

Die T-Zellen der Mäuse mit dem mutierten 451L *P2X7*-Allel, CBA und NOcCB-1, zeigten nahezu keine Reaktion auf die Behandlung mit NAD (**Abb.35**: Panel 8,11) und eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber ATP (**Abb.35**: Panel 9,12). Der niedrige Hintergrund spontan PS-flashender T-Zellen in diesen Stämmen steht im Einklang mit der mangelnden Ansprechbarkeit des mutierten 451L *P2X7*-Allels.

3.2 Endogene Quellen von NAD und ATP

NAD und ATP sind unter physiologischen Bedingungen intrazelluläre Moleküle. Es sind als Quellen von extrazellulärem NAD und ATP sowohl lytische als auch nicht-lytische Mechanismen der Freisetzung beschrieben worden (Bruzzone, Guida et al. 2001; Lazarowski, Boucher et al. 2003). In dieser Arbeit wurden zwei Modelle verwendet, um die Freisetzung endogener Nukleotide zu erreichen. Zum einen wurden Erythrozyten mit Ultraschall behandelt, um die gewonnenen Lysate anschließend für Apoptose-Experimente zu verwenden. Das zweite Modell der Freisetzung endogener Nukleotide ist die Freisetzung nach mechanischer Belastung während der Präparation von primären Zellen aus Lymphknoten.

3.2.1 Erythrozytenlysate

Zur Gewinnung der Erythrozytenlysate wurde Mäusen retroorbital Blut entnommen. Um die Blutgerinnung zu verhindern wurden, 10 U Heparin in 500 µl PBS in den Eppendorfhütchen vorgelegt. Die Erythrozyten wurden dann durch Zentrifugation bei 1500xg pelletiert und in 1,5-fachem Volumen eiskaltem PBS aufgenommen. Mit Hilfe einer Ultraschallnadel wurden die Erythrozyten durch zweimalige Behandlung für 10 Sekunden bei maximaler Leistung lysiert. Die Lysate wurden dann strikt auf Eis gehalten. Zelltrümmer wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000xg entfernt. Die Lysate wurden anschließend mit RPMI auf die jeweils angegebenen Verdünnungen eingestellt. Hierbei bezog sich der Verdünnungsfaktor jeweils auf das Verhältnis zum ursprünglichen Erythrozytenvolumen. Die Verdünnung sollte die Situation in vivo nachahmen, wo der cytoplasmatische Inhalt einer lysierten Zelle sich in den extrazellulären Flüssigkeiten verdünnt.

Um zu untersuchen, ob freigesetztes, endogenes ATP und NAD in der Lage ist, klassische Wirkungen der P2X7-Aktivierung wie PS-Flashing oder das Abstoßen von CD62L auszulösen, wurden T-Zellen mit den Lysaten behandelt. Hierzu wurden aufgereinigte T-Zellen aus einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus mit den angegebenen Konzentrationen an Lysaten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Beteiligung von P2X7 nachzuweisen, wurden auch Zellen in Anwesenheit des P2X7-Inhibitors KN62 inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation entweder mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD62L angefärbt oder mit AnnexinV-Bindpuffer gewaschen und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt. Anschließend wurden die Zellen im FACS analysiert.

Tatsächlich konnten durch Inkubation der T-Zellen mit konzentrierten Erythrozytenlysaten die Effekte der Aktivierung von P2X7 ausgelöst werden. So führte die Inkubation der Zellen mit konzentrierten Lysaten bei T-Zellen Wildtyp und ART2-defizienter Mäuse zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.36 A**: Panel 3,9) sowie zum Abstoßen von CD62L (**Abb.36 B**: Panel 3,9). Beide Effekte wurden durch Anwesenheit von 10 µM KN62 blockiert, was die Beteiligung von P2X7 an den beschriebenen Effekten nachweist (**Abb.36 A** und **B**: Panel 4,10).

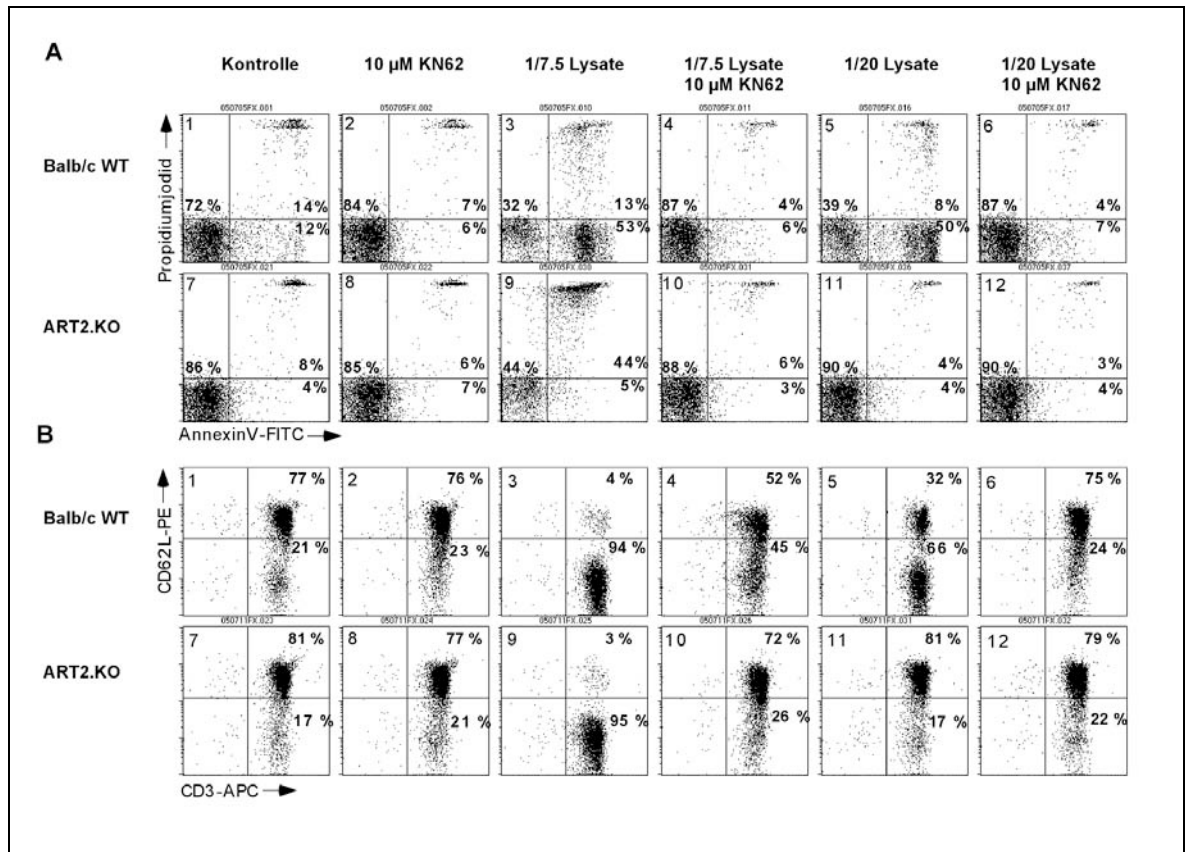


Abb. 36: Aktivierung von P2X7 durch NAD und ATP in Erythrozytenlysaten. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen Erythrozytenlysat behandelt. Das Lysat wurde durch Ultraschallbehandlung von Erythrozyten gewonnen. Zur Blockade wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem P2X7-Inhibitor KN62 vorinkubiert. Nach der Inkubation mit den Lysaten wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Zur Analyse des Abstoßens von CD62L wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD62L inkubiert, gewaschen und die Fluoreszenz im FACS gemessen (**B**).

Die Verwendung von Lysaten mit einem höheren Verdünnungsfaktor (1:20) führte ausschließlich bei den BALB/c Wildtyp T-Zellen zu PS-Flashing und Abstoßen von CD62L (**Abb.36 A und B**: Panel 5). Die ART2-defizienten T-Zellen zeigten bei hochverdünnten Lysaten keinerlei Reaktion (**Abb.36 A und B**: Panel 11). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass die Wirkung niedrig konzentrierter Lysate auf T-Zellen hauptsächlich auf NAD zurückzuführen ist, die Wirkung hoch konzentrierter Lysate auf NAD und ATP.

3.2.1.1 Dosis-Wirkungs-Analysen

Um dieses unterschiedliche Verhalten der Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen auf höher verdünnte Lysate zu untersuchen, wurden vergleichende Dosis-Wirkungs-Analysen durchgeführt. T-Zellen ART2-defizienter und BALB/c Wildtyp Mäuse wurden für 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAD, ATP, einer Mischung von NAD und ATP im Verhältnis 1:10 und verschieden verdünnten Lysaten bei 37° inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid gefärbt und im FACS analysiert. In **Abbildung 37** ist das Ergebnis dieser Experimente dargestellt. Es wurden jeweils der Prozentsatz AnnexinV negativer Zellen gegen die Konzentration aufgetragen.

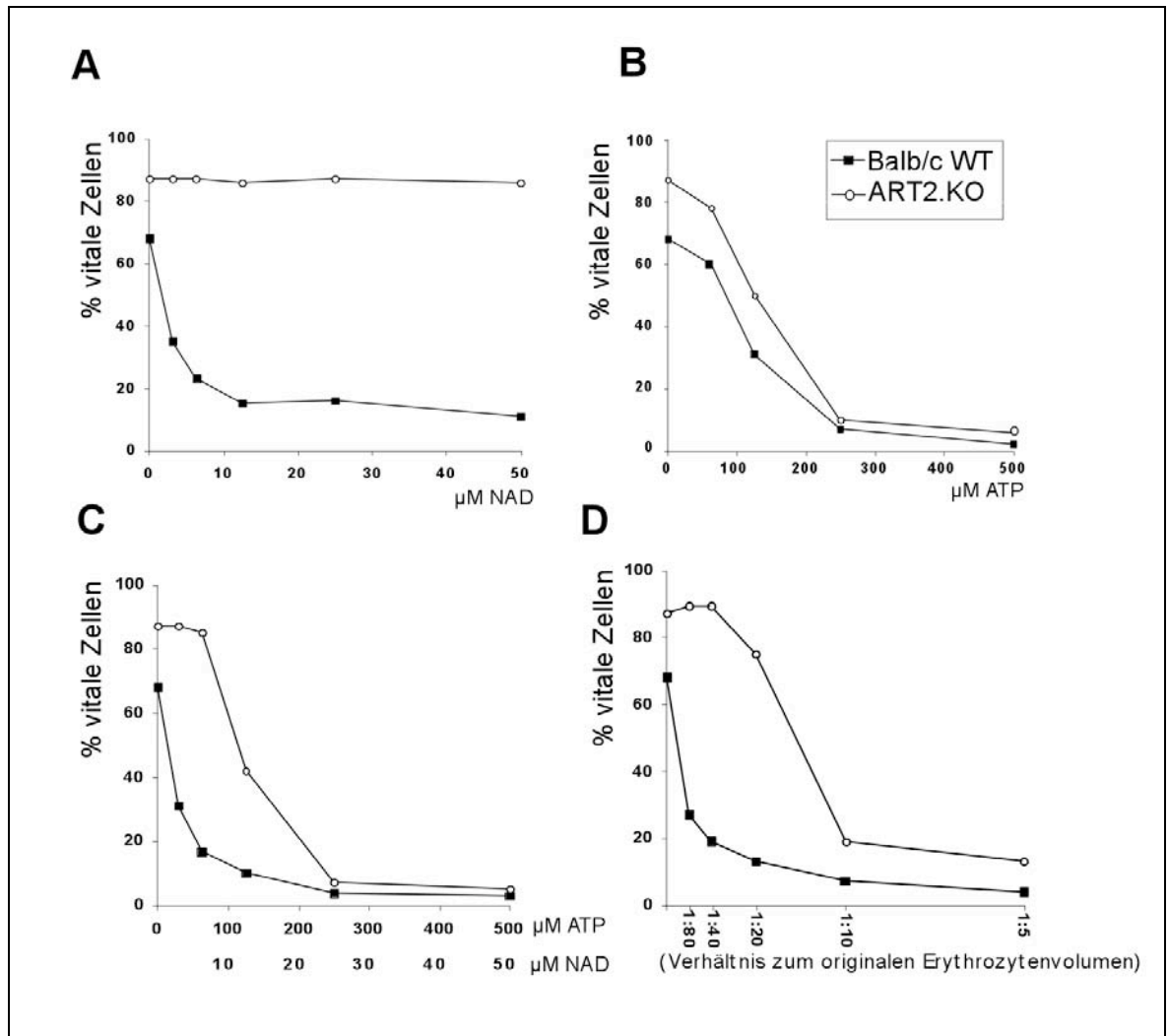


Abb. 37: Vergleichende Dosis-Wirkungs-Analysen an T-Zellen von BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen an NAD (A), ATP (B), NAD:ATP Gemisch (C) und verschiedenen Verdünnungen des Erythrozytenlysates (D) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben sind jeweils der Prozentsatz AnnexinV-negativer Zellen.

Erwartungsgemäß führte NAD-Behandlung nur im Fall der Wildtyp T-Zellen zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin (Abb.37 A). Auffallend war ferner der Unterschied in der Vitalität von ART2-defizienten und Wildtyp T-Zellen ohne Zugabe von exogenem NAD oder ATP. Während sich 83% der ART2-defizienten T-Zellen nicht durch AnnexinV-FITC anfärben ließen, waren es bei den Wildtyp T-Zellen nur 70% (Abb.37 A-D). Die Behandlung der T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen ATP führte bei Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen zu einer vergleichbaren Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb.37 B). Insgesamt zeigte sich bei der Behandlung mit NAD und ATP, dass NAD auch bei niedrigen Konzentrationen noch wirksam war, während der ATP-vermittelte Effekt bei Konzentrationen unter 100 μM ATP vollständig ausblieb. Die Behandlung der T-Zellen mit Erythrozytenlysaten in steigender Verdünnung führte bei BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen zu einer sehr unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurve. Während die Wirkung bei den ART2-defizienten T-Zellen bereits nach einer Verdünnung von 1:20 stark nachließ, waren die Lysate bei den Wildtyp T-Zellen noch in einer Verdünnung von 1:80 deutlich wirksam (Abb.37 D).

Endogenes ATP aus den Lysaten, welches bei ART2-defizienten T-Zellen den einzigen Agonisten zur Aktivierung des P2X7 Rezeptors darstellt, wurde offensichtlich schnell auf eine unwirksame Dosis verdünnt, während P2X7 bei Wildtyp T-Zellen ART2-vermittelt noch durch niedrige NAD- Konzentrationen in höher verdünnten Lysaten aktiviert werden konnte. Diese Vermutung bestätigte sich bei der Dosis-Wirkungs-Kurve der T-Zellen, die mit einem Gemisch an NAD und ATP im Verhältnis 1:10 behandelt wurden. Auch hier reagierten bei niedrigeren Konzentrationen nur noch die Wildtyp T-Zellen (**Abb.37 C**).

3.2.1.2 Stabilität der Purine in den Lysaten

Da in den Lysaten auch NAD und ATP degradierende Enzyme vorhanden sein könnten, sollte die Stabilität der freigesetzten Nukleotide in den Lysaten überprüft werden. Hierfür wurde ein weiteres Dosis-Wirkungs-Experiment mit Erythrozytenlysaten durchgeführt. Hierbei wurden die Lysate jedoch vor der Verwendung für 60 oder 10 Minuten bei 37°C inkubiert bzw. direkt nach Gewinnung schockgefroren und vor dem Experiment aufgetaut. Die frisch aufgetauten Lysate lösten bei ART2-defizienten und Wildtyp T-Zellen gleichermaßen das nach außen Kehren von Phosphatidylserin aus (**Abb.38A**: Panel 1,4). Bereits nach 10 Minuten war offensichtlich die Konzentration an NAD und ATP in den Lysaten stark verringert. Während der Großteil der Wildtyp T-Zellen noch Phosphatidylserin exponierte (**Abb.38 A**: Panel 2), reagierten bei den ART2-defizienten T-Zellen 64% der Zellen nicht mehr (**Abb.38 A**: Panel 5). Es zeigte sich, dass nach Vorinkubation der Lysate für 60 Minuten bei 37°C offensichtlich kaum endogenes ATP oder NAD mehr vorhanden war. Sowohl ART2-defiziente als auch Wildtyp T-Zellen reagierten nicht mehr auf Inkubation mit diesen Lysaten (**Abb.38 A**: Panel 3,6). Die geringe Stabilität von NAD und ATP in den Lysaten spiegelte sich auch in einer veränderten Dosis-Wirkungs-Kurve aus. Während die nicht vorinkubierten Lysate eine ähnliche Dosis-Wirkung wie im vorangegangenen Versuch (**Abb.37 D**) zeigten, führte die Vorinkubation der Lysate für 10 Minuten bereits zu einer deutlichen Verschiebung der Kurven (**Abb.38 B**). 60 Minuten vorinkubierte Lysate bewirkten auch bei der geringsten Verdünnungsstufe nichts.

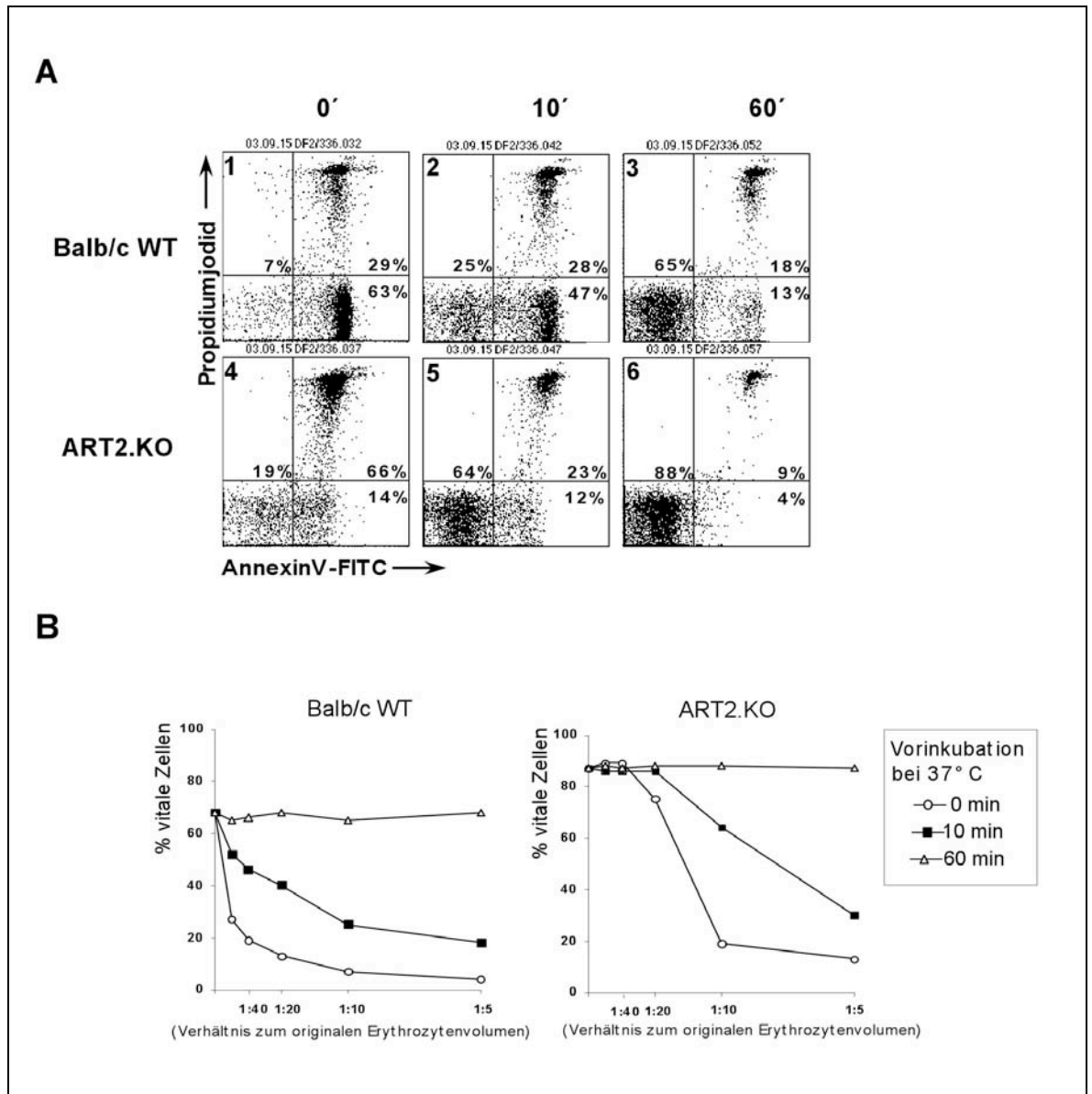


Abb. 38: Stabilität von NAD und ATP in den Erythrozytenlysaten. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 37°C mit unterschiedlichen Verdünnungen der Lysate inkubiert. Die Lysate wurden zuvor für 0, 10 oder 60 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren. Nach der Inkubation der Zellen mit den Lysaten wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt ist die Wirkung der für 0, 10 oder 60 Minuten bei 37° vorinkubierten Lysate in der Verdünnung 1:10 (FACS-Plot (A)), oder als Dosis-Wirkungs-Kurve für verschiedene Verdünnungen (B). In der Kurve angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile AnnexinV-negativer Zellen.

3.2.2 Freisetzung von NAD während der Präparation von T-Zellen

Das zweite Modell der Freisetzung basiert auf der Beobachtung eines unterschiedlichen Anteils spontan Phosphatidylserin nach außen kehrender T-Zellen nach Präparation aus den Lymphknoten von ART2-defizienten und Wildtyp Mäusen (vergleiche **Abb.36 A**: Panel 1 und 7).

3.2.2.1 Spontane Apoptose in verschiedenen Mausstämmen

Um die Rolle von ART2 und der wichtigsten extrazellulären NADase, CD38, bei diesem „spontanen“ nach außen Kehren von Phosphatidylserin zu untersuchen, wurden T-Zellen von Wildtyp, ART2-defizienten und CD38-defizienten Mäusen aus den Lymphknoten aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µM NAD inkubiert. Die Zellen wurden dann mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die NAD metabolisierenden Enzyme ART2 und CD38 eine entscheidende Rolle bei diesem spontanen Zelltod spielen. Während der Anteil toter Zellen (AnnexinV/Propidiumjodid doppelpositiv) bei ART2-defizienten und Wildtyp T-Zellen ähnlich hoch bei 12-13% lag, war der Anteil apoptotischer Zellen (AnnexinV-positiv/Propidiumjodid-negativ) bei Wildtyp T-Zellen deutlich höher als bei ART2-defizienten (vergleiche **Abb.39**: Panel 2 und 1).

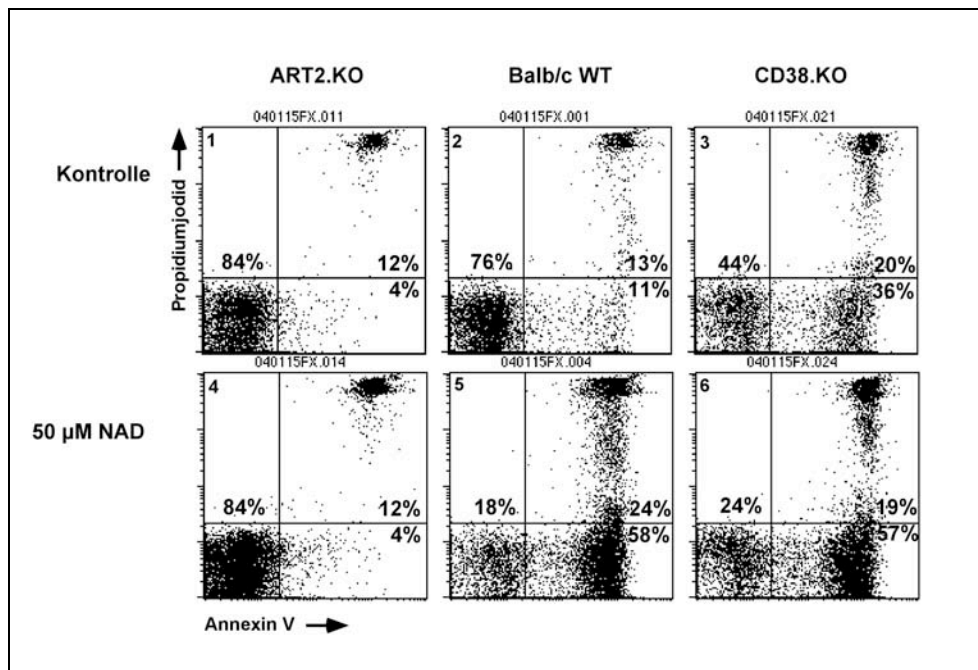


Abb. 39: Spontanes nach außen Kehren von Phosphatidylserin in unterschiedlichen Mausstämmen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer Wildtyp, ART2 oder CD38-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µM NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert.

Noch stärker ausgeprägt war der Anteil apoptotischer Zellen bei den T-Zellen CD38-defizienter Mäuse zu erkennen, wo bei ca. 1/3 der Zellen Phosphatidylserin auf der Außenseite nachweisbar war (**Abb.39**: Panel 3). Behandlung der T-Zellen mit 50 µM NAD führte zu keiner Reaktion bei ART2-defizienten T-Zellen (**Abb.39**: Panel 4). Die T-Zellen aus der Wildtyp und CD38-defizienten Maus wiesen eine vergleichbare Zahl PS-flashender Zellen auf (**Abb.39**: Panel 5,6).

3.2.2.2 Temperaturabhängige Blockade der P2X7-Aktivierung

Bei den Calciumflux-Untersuchungen (**Abb.21**) hatte sich gezeigt, dass die Aktivierung von P2X7 temperaturabhängig ist. Die etheno-ADP-Ribosylierung andererseits verlief sehr effizient bei 4°C (**Abb.32**).

Es sollte nun untersucht werden, ob die spontan PS-flashenden Zellen bereits *in vivo* Phosphatidylserin nach außen kehren. Dafür wurden die T-Zellen bei 4°C präpariert und aufgereinigt und anschließend für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden Zellen auch für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C extrazellulärem NAD ausgesetzt. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und entweder für weitere 60 Minuten bei 37°C oder 4° C inkubiert oder direkt mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Es zeigte sich, dass bei T-Zellen, die bei 4°C präpariert wurden und anschließend für 30 Minuten bei 4°C inkubiert wurden, selbst bei den CD38-defizienten T-Zellen, die zuvor einen hohen Hintergrund spontan apoptotischer Zellen gezeigt hatten, kein Phosphatidylserin auf der Außenseite nachweisbar war (**Abb.40A**: Panel 1 und 5).

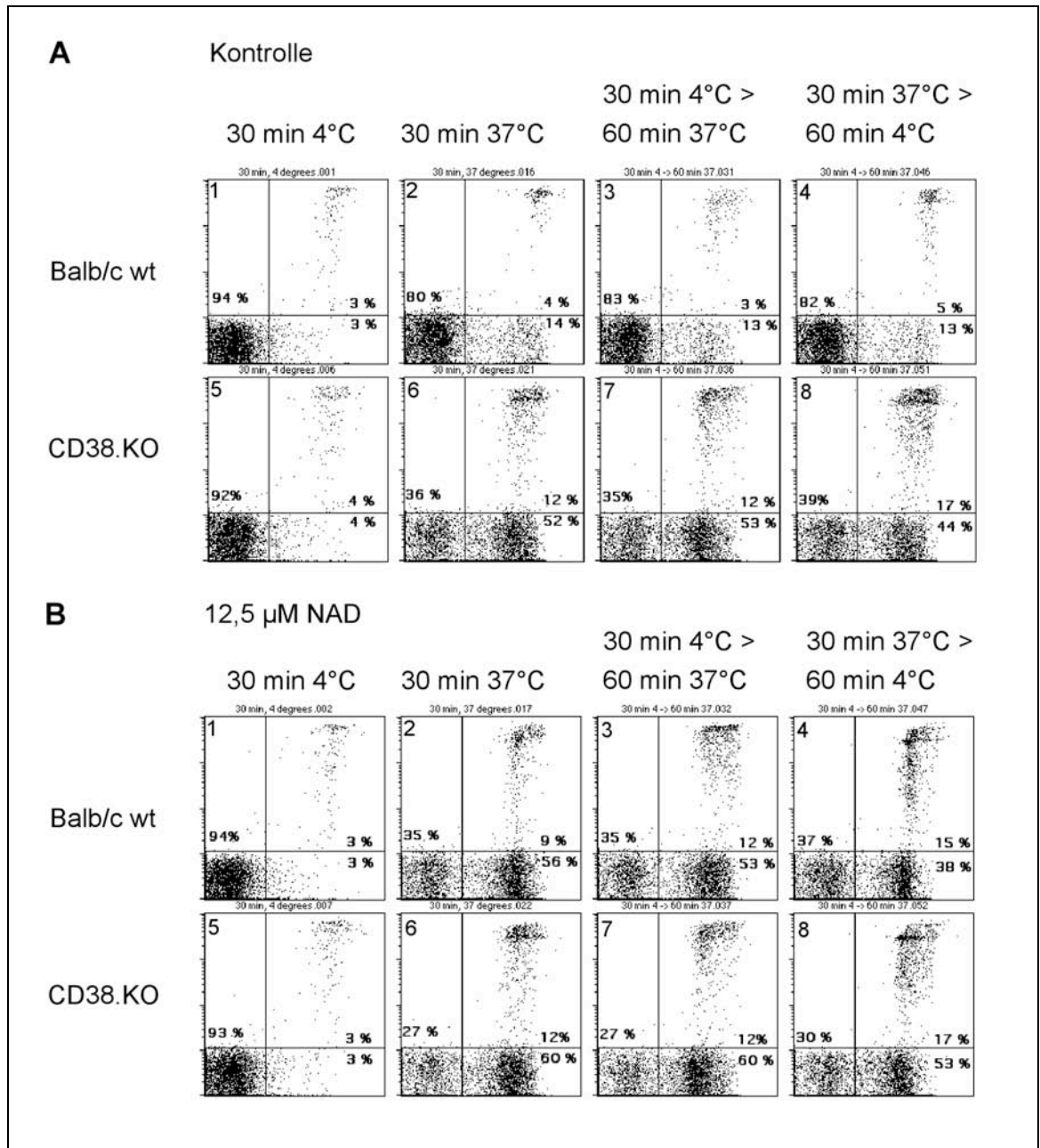


Abb. 40: Temperaturabhängigkeit der Aktivierung von P2X7 aber nicht der ADP-Ribosylierung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus wurden für 30 Minuten in Anwesenheit (B) oder Abwesenheit (A) von 12,5µM NAD bei 4°C oder 37°C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach der Inkubation gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert

Wurden diese Zellen anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, ließen sich jedoch Phosphatidylserin nach außen kehrende Zellen detektieren (**Abb.40A**: Panel 3 und 7). Zellen, die für 30 Minuten bei 37°C inkubiert worden waren, zogen das Phosphatidylserin während einer anschließenden einstündigen Inkubation bei 4°C nicht wieder ein (vergleiche **Abb.40A**: Panel 2 und 4; 6 und 8). Dies deutet darauf hin, dass das spontane PS-Flashen der 30 Minuten bei 37°C inkubierten Zellen (**Abb.40 A**: Panel 2,6) erst während der Präparation der Zellen ausgelöst wurde. Darüber hinaus führte auch die Inkubation mit 12,5 µM NAD bei 4°C zu keinem nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.40B**: Panel 1,5). Die ADP-Ribosylierung der Zellen findet jedoch offensichtlich statt. Wenn man Zellen, die bei 4°C mit 12,5 µM NAD behandelt worden

waren, wusch und anschließend für 60 Minuten bei 37°C in Abwesenheit von extrazellulärem NAD inkubierte, zeigten diese ein vergleichbares nach außen Kehren von Phosphatidylserin wie Zellen, die in Anwesenheit von NAD bei 37°C inkubiert worden waren (vergleiche **Abb.40B**: Panel 2 und 4; 6 und 8).

3.2.2.3 Untersuchung der Blockade des Hintergrunds an spontan Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen mittels etheno-NAD und KN62

Um den Zeitpunkt der spontanen ADP-Ribosylierung genauer einzugrenzen, wurden T-Zellen einer CD38-defizienten Maus mit dem P2X7-Inhibitor KN62 und dem NAD-Analogen etheno-NAD inkubiert. Falls die T-Zellen erst während der Inkubation bei 37°C ADP-ribosyliert wurden, sollte etheno-NAD das spontane nach außen Kehren von Phosphatidylserin blockieren, da es kompetitiv mit NAD um ART2 konkurriert und keinen P2X7-Agonist darstellt. Falls die ADP-Ribosylierung bereits während der Präparation stattfand, sollte KN62 die Aktivierung von P2X7 auch nachträglich blockieren können. T-Zellen wurden aus inguinalen und mesenterialen Lymphknoten einer CD38-defizienten Maus präpariert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 25 μ M etheno-NAD oder 2 μ M KN62 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindpuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

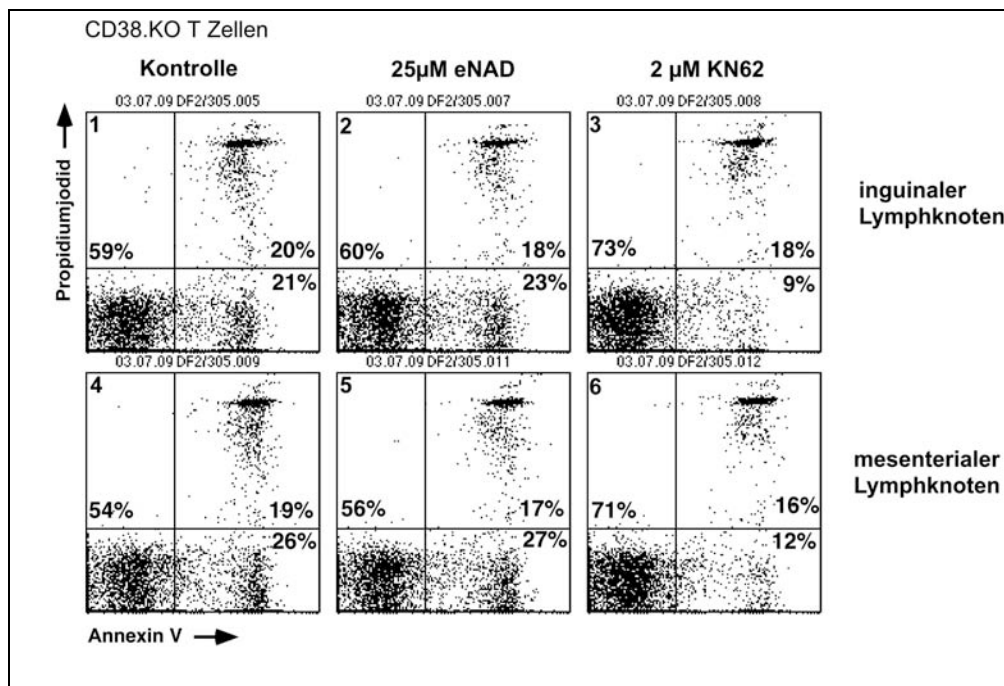


Abb. 41: Blockade des Hintergrunds spontan Phosphatidylserin nach außen kehrender Zellen mit etheno-NAD und KN62. Gesamtlymphozyten aus dem jeweils einem einzelnen Lymphknoten einer CD38-defizienten Maus wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Blockade wurde in diesen 30 Minuten etheno-NAD oder KN62 hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS analysiert

Der Anteil spontan PS-flashender Zellen war nach Präparation aus inguinalen und mesenterialen Lymphknoten vergleichbar (**Abb.41**: Panel 1,4). Es zeigte sich, dass Inkubation der Zellen mit etheno-NAD das spontane nach außen Kehren von Phosphatidylserin nicht blockieren konnte

(**Abb.41**: Panel 2,5). Nur die Inkubation mit KN62 führte zu einem deutlichen Rückgang des Anteils PS-flashenden T-Zellen (**Abb.41**: Panel 3,6).

3.3 Schicksal der durch Purine in die Apoptose getriebenen Zellen

Das nach außen Kehren von Phosphatidylserin ist als ein „friss mich“ Signal apoptotischer Zellen an Makrophagen beschrieben worden (Fadok, de Cathelineau et al. 2001; Huynh, Fadok et al. 2002; Kurosaka, Takahashi et al. 2003). Um zu untersuchen, welche Konsequenzen das NAD- oder ATP-vermittelte rapide PS-Flashing von T-Zellen auf Interaktionen mit Phagozyten hat, wurden *in vitro* und *in vivo* Phagozytose-Experimente durchgeführt.

3.3.1 *In vitro* Phagozytose apoptotischer T-Zellen durch kultivierte Peritonealmakrophagen

Erste Experimente zur Interaktion von NAD- oder ATP-behandelten T-Zellen und Phagozyten wurden mit Hilfe von kultivierten Peritonealmakrophagen durchgeführt. Hierzu wurde das Peritoneum von BALB/c Wildtyp Mäusen zweimalig mit 5 ml eiskaltem RPMI gespült. Die ausgespülten Zellen wurden dann über Nacht auf speziellen Zellkultur-Objektträgern (Cultureslides) bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI Komplettmedium inkubiert. Nicht haftende Zellen wurden durch sanftes Spülen von den Objektträgern entfernt. Pro Maus wurden ca. 1x10⁶ Peritonealmakrophagen gewonnen und zu je 3x10⁵ Zellen pro Napf angesetzt. Nach weiteren zwei Tagen Kultivierung im Brutschrank wurden die Makrophagen dann für die Phagozytose-Experimente eingesetzt.

3.3.1.1 Phagozytose NAD- und ATP-behandelter T-Zellen von Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen

Um die Phagozytose der NAD-behandelten T-Zellen durch Peritonealmakrophagen verfolgen zu können, wurden die T-Zellen mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Celltrackergreen angefärbt. Dieser fluoreszierende Farbstoff kann frei in die Zellen diffundieren und wird durch cytoplasmatische Enzyme zu einem für die Cytoplasmamembran undurchlässigen Reaktionsprodukt modifiziert. Die Überlebensfähigkeit der Zellen wird durch diesen Farbstoff nicht beeinträchtigt.

Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit 1 µM Celltrackergreen angefärbt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C in Abwesenheit oder Anwesenheit von 25 µM NAD inkubiert. Um das nach außen Kehren von Phosphatidylserin zu dokumentieren, wurde ein Teil der Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und mit AnnexinV-APC angefärbt. Nach NAD-Behandlung lag der Anteil der PS-flashenden T-Zellen in bei den Wildtyp Zellen bei 48% (**Abb.42 A**: Panel 2). ART2-defiziente T-Zellen dagegen zeigten praktisch keine PS-Exposition nach der NAD-Behandlung (**Abb.42 A**: Panel 1).

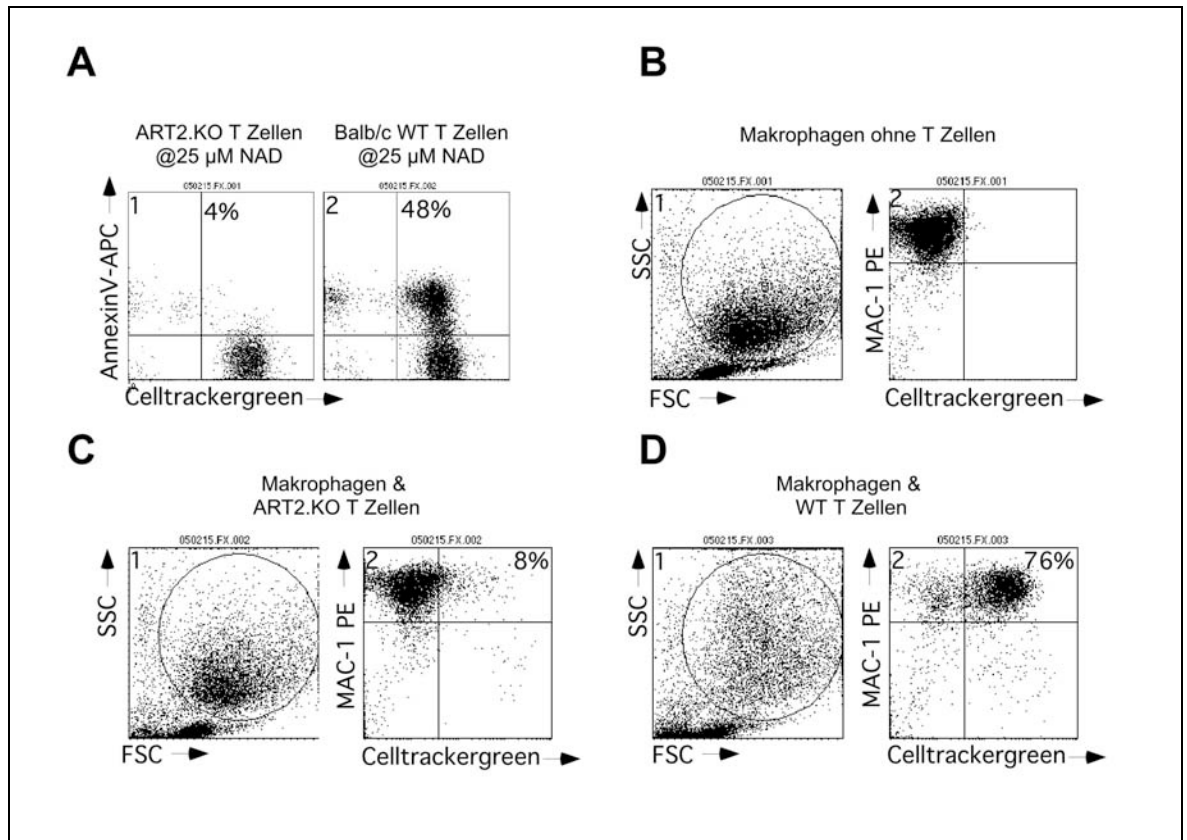


Abb. 42: Phagozytose NAD-behandelter T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit Celltrackergreen angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 μ M NAD behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Die übrigen Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 90 Minuten bei 37°C koinkubiert (**C,D**). Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Die adhärenen Makrophagen wurden dann durch hartes Pipettieren von den Cultureslides gespült und im FACS analysiert. Makrophagen, die Celltrackergreen gefärbte Zellen phagozytiert hatten, konnten durch Doppelfärbung mit MAC-1 und Celltrackergreen identifiziert werden. (**B**) Kontrollanfärbung von Makrophagen ohne T-Zellen.

Die grün gefärbten, NAD-behandelten Zellen wurden dann für 90 Minuten bei 37°C in einem Volumen von 300 μ l RPMI-Medium auf den Cultureslides mit den adhärenen Peritonealmakrophagen koinkubiert. Hierbei wurden die T-Zellen in einem Verhältnis von 10:1 zu den Makrophagen eingesetzt. Nach 90 Minuten Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen durch sanftes Waschen mit eiskaltem PBS, das 0,5 mM EDTA enthielt, entfernt. Anschließend wurden die Peritonealmakrophagen mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen den Makrophagenmarker CD11b angefärbt. Die Makrophagen wurden dann durch hartes Pipettieren mit eiskaltem PBS/EDTA von den Cultureslides gespült und im FACS analysiert. Es wurde in der Analyse im Forward/Sidescatter Plot auf die Population der Makrophagen gegatet. Makrophagen, die mit Celltrackergreen angefärbte Zellen phagozytiert hatten, ließen sich durch Doppel-Fluoreszenz im roten Kanal (MAC-1-positiv) und grünen Kanal (Celltrackergreen-positiv) nachweisen.

Es zeigte sich in diesem Experiment deutlich, dass das durch NAD-vermittelte, ART2-abhängige nach außen Kehren von Phosphatidylserin zu einer raschen Phagozytose der PS-flashenden

Zellen durch Peritonealmakrophagen führt. Über 70% der mit Wildtyp T-Zellen koinkubierten Makrophagen zeigten Celltrackergreen-Färbung (**Abb.42 D**: Panel 2). Auch die Morphologie der Makrophagen, die phagozytiert hatten, wechselte drastisch, was sich in einer Veränderung des Forward-Sidescatters widerspiegelte (vergleiche **Abb.42 C** und **D**: Panel 1). Die NAD-behandelten ART2-defizienten Zellen wurden durch die Makrophagen nicht angerührt (**Abb.42 C**: Panel 2).

Die NAD-Behandlung von T-Zellen führt zur ADP-Ribosylierung verschiedener Zelloberflächenproteine und in Folge zur Aktivierung von P2X. Nun sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von P2X7 die Phagozytose bewirkt oder möglicherweise die ADP-Ribosylierung anderer Zelloberflächenproteine. Es wurden zu diesem Zweck ART2-defiziente, mit Celltrackergreen gefärbte T-Zellen für 30 Minuten mit 500 μM ATP behandelt, wodurch P2X7 aktiviert wird aber keine Zelloberflächenproteine ADP-ribosyliert werden. Anschließend wurden die so behandelten Zellen für einen *in vitro* Phagozytoseversuch verwendet.

Die Behandlung der ART2-defizienten T-Zellen führte zu einem Anstieg des Anteils der Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen auf 65% (**Abb.43 A**: Panel 4), während bei unbehandelten T-Zellen praktisch keine AnnexinV-positiven Zellen nachweisbar waren (**Abb.43 A**: Panel 2).

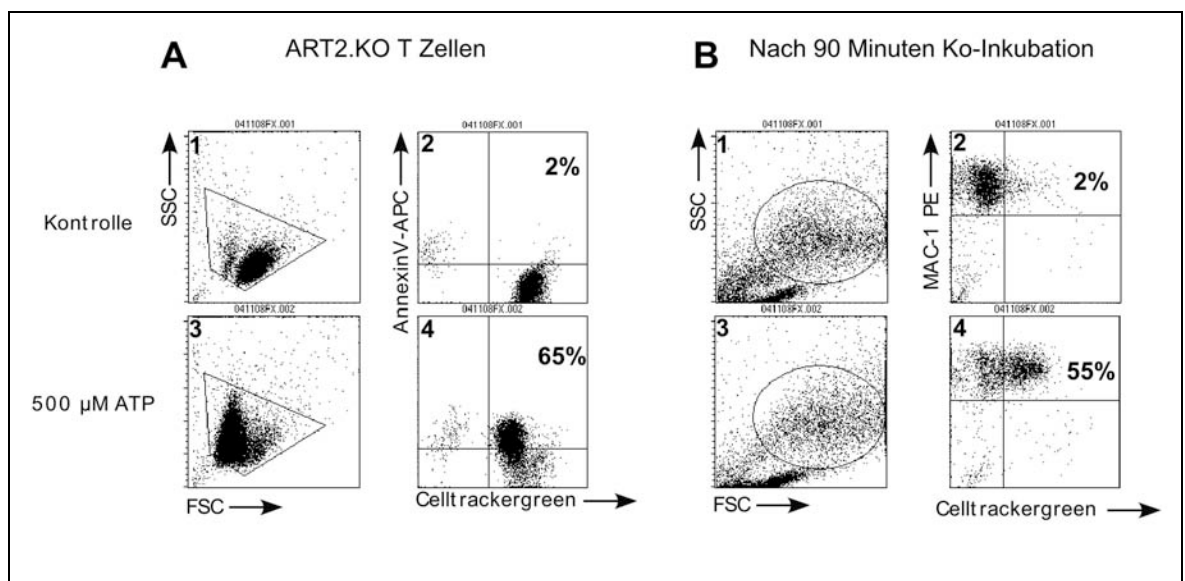


Abb. 43: Phagozytose ATP behandelter T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten in Anwesenheit oder Abwesenheit von 500 μM ATP inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Die übrigen Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 90 Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Die adhärenen Makrophagen wurden dann durch hartes Pipettieren von den Cultureslides gewaschen und im FACS analysiert. Makrophagen, die Celltracker gefärbte Zellen phagozytiert hatten, konnten durch Doppelfärbung mit MAC-1 und Celltrackergreen identifiziert werden (**B**).

Tatsächlich wurden auch ART2-defiziente T-Zellen phagozytiert, nachdem P2X7 aktiviert und Phosphatidylserin nach außen gekehrt wurde, während die nicht behandelten Zellen unangetastet blieben (vergleiche **Abb.43 B**: Panel 2 und 4).

Die durch Behandlung von T-Zellen mit extrazellulärem NAD und ATP ausgelöste rasche Phagozytose sollte im Folgenden vergleichend untersucht werden. Hierzu wurden mit Celltrackergreen angefarbte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus für 30 Minuten bei 37°C mit 50 μ M NAD oder 500 μ M ATP behandelt. Die Zellen wurden gewaschen und für 90 Minuten auf Cultureslides mit adhärennten Peritonealmakrophagen koinkubiert. Nach Entfernen der losen Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA wurden die adhärennten Makrophagen mit 2% Para-Formaldehyd fixiert und mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen den Makrophagenmarker CD11b angefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit Mountingmedium für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei konnten die Ergebnisse aus den durchflusszytometrisch ausgewerteten Experimenten bestätigt werden. Die NAD-Behandlung führte nur bei T-Zellen der Wildtyp Maus zu einer anschließenden Phagozytose der Zellen (Vergleiche **Abb.44**: Panel 2 und 5).

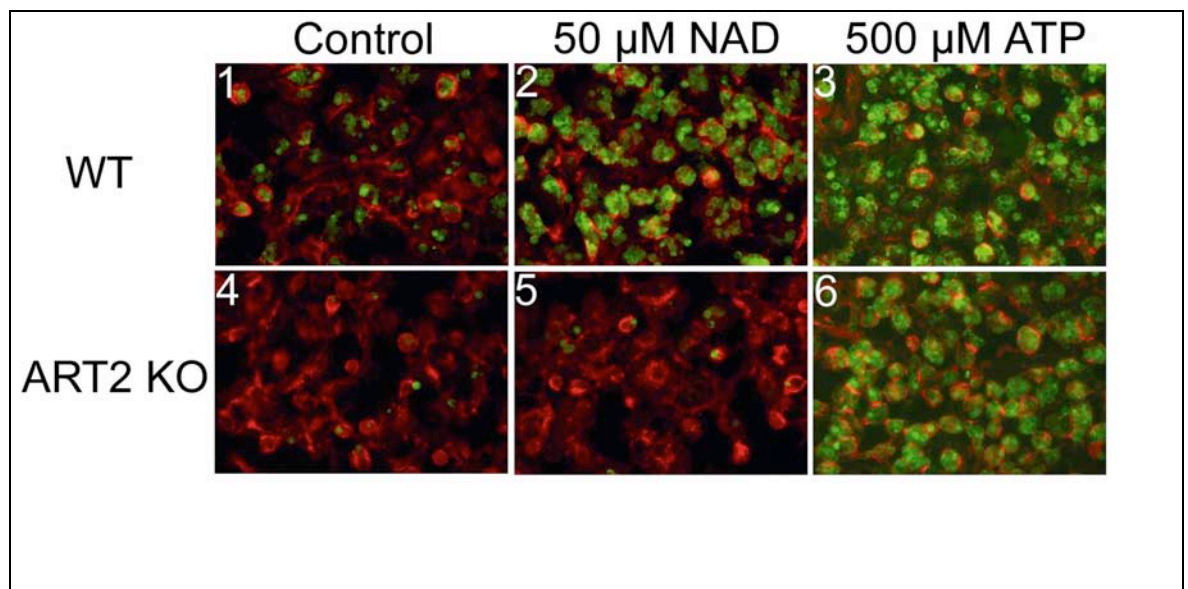


Abb. 44: Phagozytose von T-Zellen nach NAD- oder ATP-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp (Panel 1-3) und einer ART2-defizienten Maus (Panel 4-6) wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit NAD (Panel 2,5) oder ATP (Panel 3,6) behandelt. Die Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 75 Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Schließlich wurden mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops mit Neofluar 63x Ölimmersionsobjektiv (N.A 1,25) und Digitalkamera Fotos von den Makrophagen gemacht.

Nach Inkubation der Zellen mit ATP wurden sowohl ART2-defiziente als auch Wildtyp T-Zellen durch Makrophagen phagozytiert (**Abb.44**: Panel 3,6). Interessanterweise ließ sich auch bei den nicht-behandelten T-Zellen eine gewisse Hintergrund-Phagozytose beobachten. Diese war vor allem bei Wildtyp T-Zellen zu beobachten (**Abb.44**: Panel 1,4). Diese Tatsache passt sehr gut zu dem bereits beschriebenen, spontanen nach außen Kehren von Phosphatidylserin nach Präparation von Wildtyp T-Zellen (**3.2.2.1, Abb.39**).

Um nun nachzuweisen, dass die T-Zellen tatsächlich in die Makrophagen aufgenommen wurden und nicht nur sehr stark an diese gebunden waren, wurde ein Zeiss Apotom verwendet. Mit dem Apotom ist es möglich, so genannte Z-Stapel aufzunehmen. Hierbei werden optische Schnitte, die

unterhalb der Zelle beginnen und in Schritten von 300 nm durch das Präparat „wandern“, aufgenommen. Mit Hilfe der Axiovision-Software von Zeiss kann anschließend aus diesen Z-Stapeln eine 3D-Rekonstruktion der Zellen errechnet werden. Mit Hilfe dieser Technik ließ sich eindeutig zeigen, dass die T-Zellen innerhalb der Makrophagen lokalisiert waren, also tatsächlich eine Phagozytose stattgefunden hatte. Die errechnete 3D-Rekonstruktion lässt sich von jedem erdenklichen Blickwinkel aus betrachten. Von unterhalb des Objektträgers aus betrachtet erscheinen die Makrophagen geöffnet. Da die Zellen adhären auf dem Objektträger wachsen, kann der Makrophagen-spezifische Antikörper nicht auf der Unterseite der Makrophagen binden (**Abb.45A**: Panel 3, **B**: Panel 5).

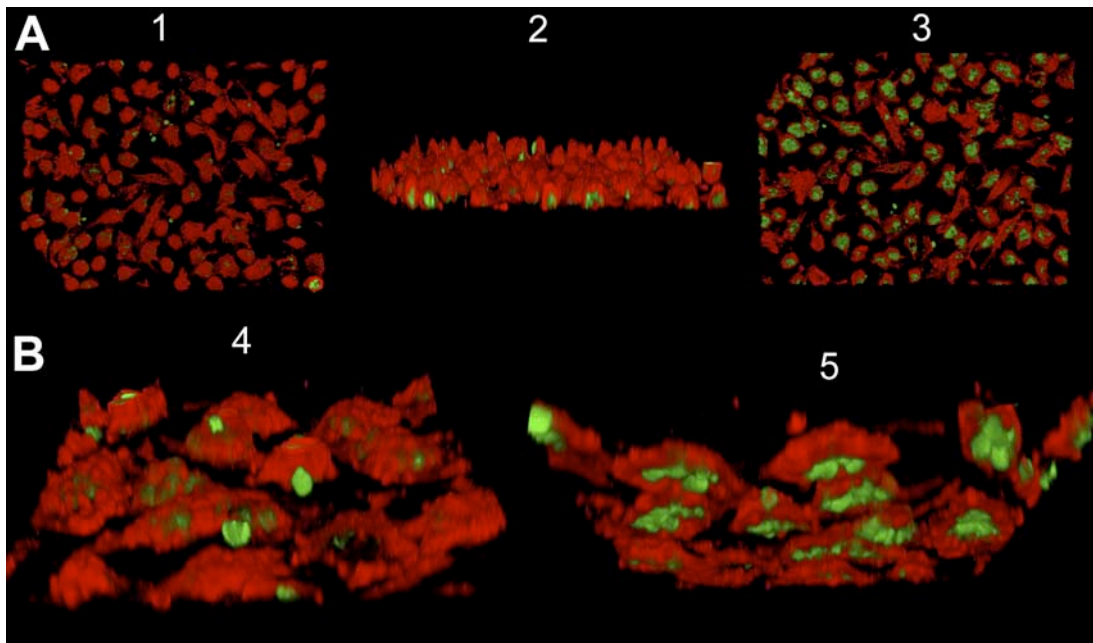


Abb. 45: 3D-Rekonstruktion mit Zeiss Apotom. Nach 90 Minuten Koinkubation von NAD-behandelten, Celltrackergreen gefärbten T-Zellen und Peritonealmakrophagen wurden die losen Zellen mit PBS/EDTA von den Cultureslides gewaschen. Die Makrophagen wurden anschließend mit 2% Para-Formaldehyd fixiert, mit MAC1-PE angefärbt und auf den Cultureslides mit Mountingmedium für Fluoreszenzmikroskopie eingedeckelt. Mit Hilfe eines Zeiss Apotoms wurden Z-Stapel von 300 nm Höhe über 30 µm aufgenommen. Mit Hilfe der Zeiss Axiovision Software wurden aus den Z-Stapeln 3-D Rekonstruktionen errechnet. Es wurde ein 40x (N.A.: 0,6) (**A**) oder 63x (N.A.: 1,25) (**B**) Zeiss Neofluar Ölimmersionsobjektiv verwendet. (**A**) Panel 1: Sicht von oben auf die Zellen. Panel 2: seitliche Ansicht (80° gedreht). Panel 3: Sicht von unten (180° gedreht). (**B**) Panel 4: Sicht von schräg oben auf die Zellen (45° gedreht). Panel 5: Sicht von schräg unten (130° gedreht).

Durch Betrachtung der 3D-Rekonstruktion von der Oberseite der Zellen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen, die bei der Ansicht der Makrophagen von unten im Innern der Makrophagen gesichtet wurden, tatsächlich in den Makrophagen lokalisiert waren (**Abb.45A**: Panel 1,2 , **Abb.45B**: Panel 4).

3.3.1.2 Kinetik der Phagozytose

Da die Phagozytose der T-Zellen durch Makrophagen nach 90 Minuten bereits fortgeschritten war, sollte die Kinetik der Phagozytose untersucht werden. Mit Celltrackergreen angefärbte, aufgereinigte T-Zellen einer BALB/c Wildtypmaus wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 25µM NAD behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 20, 40, 60, 80 und 100 Minuten mit Peritonealmakrophagen koinkubiert. Nach Ablauf der Koinkubation wurden die nicht phagozytierten Zellen mit eiskaltem PBS/EDTA abgewaschen. Nach Anfärbung der Makrophagen mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen den Makrophagenmarker CD11b wurden die Makrophagen durch hartes Pipettieren mit eiskaltem PBS/EDTA von den Cultureslides gespült und im FACS analysiert. Die NAD-Behandlung bewirkte bei 76% der Zellen das nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.46 A**: Panel 2).

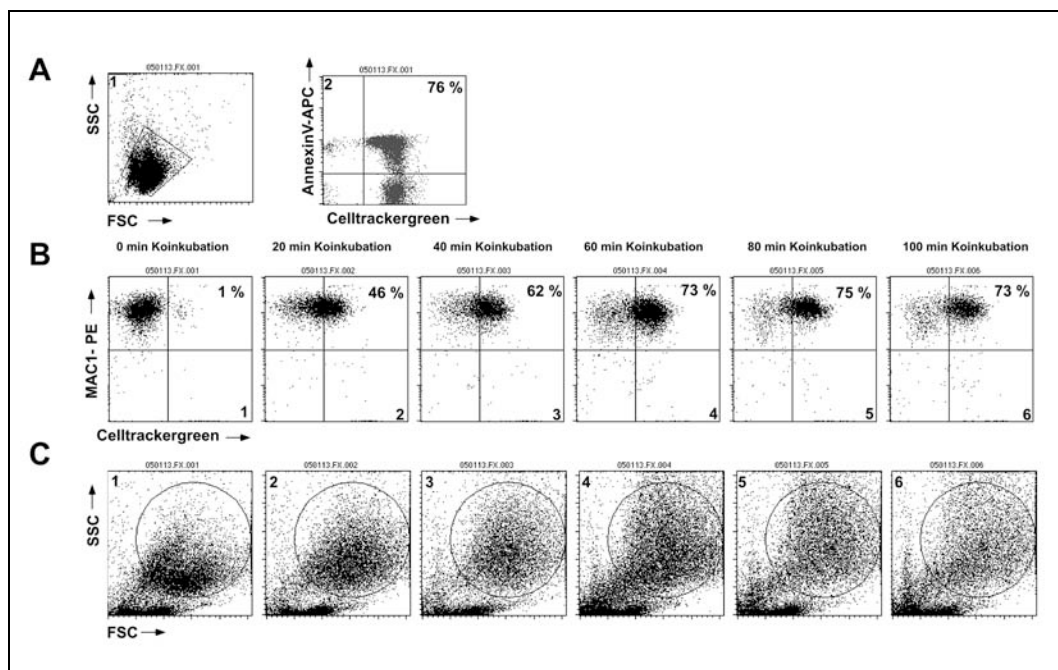


Abb. 46: Kinetik der Phagozytose NAD-behandelter T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 µM NAD behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Die übrigen Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für die angegebene Zeit bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Die adhärenen Makrophagen wurden dann durch hartes Pipettieren von den Cultureslides gespült und im FACS analysiert. Makrophagen, die Celltracker gefärbte Zellen phagozytiert hatten, konnten durch Doppelfärbung mit MAC-1 und Celltrackergreen identifiziert werden (**B**). Forward- und Sidescatter der Makrophagen (**C**).

Die Koinkubation der NAD-behandelten Zellen mit Peritonealmakrophagen führte bereits nach 20 Minuten zum Beginn der Phagozytose (**Abb.46B**: Panel 2). Nach 60 Minuten war bereits der maximale Prozentsatz CD11b/Celltrackergreen doppelpositiver Makrophagen erreicht (**Abb.46 B**: Panel 4). Die fortschreitende Phagozytose ließ sich auch durch eine Veränderung im Forward-Sidescatter der Makrophagen verfolgen. Durch die Phagozytose von T-Zellen stieg sowohl die Granularität als auch die Größe der Zellen an (**Abb.46 C**: Panels 1-6). Dies war ebenfalls bereits

nach 20 Minuten Koinkubation zu beobachten (**Abb.46 C**: Panel 2).

In einem weiteren Experiment wurden die T-Zellen auch für kürzere Zeiträume wie 1, 5, 10 und 15 Minuten mit den Makrophagen koinkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen, nach Entfernen der losen Zellen, mit 2% Para-Formaldehyd fixiert und mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen den Makrophagenmarker CD11b (MAC-1) angefärbt. Die Zellen wurden dann mit einem speziellen Mountingmedium für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckelt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei zeigten sich erste an den Makrophagen haftende Zellen bereits nach 5 Minuten (**Abb.47**: Panel 2).

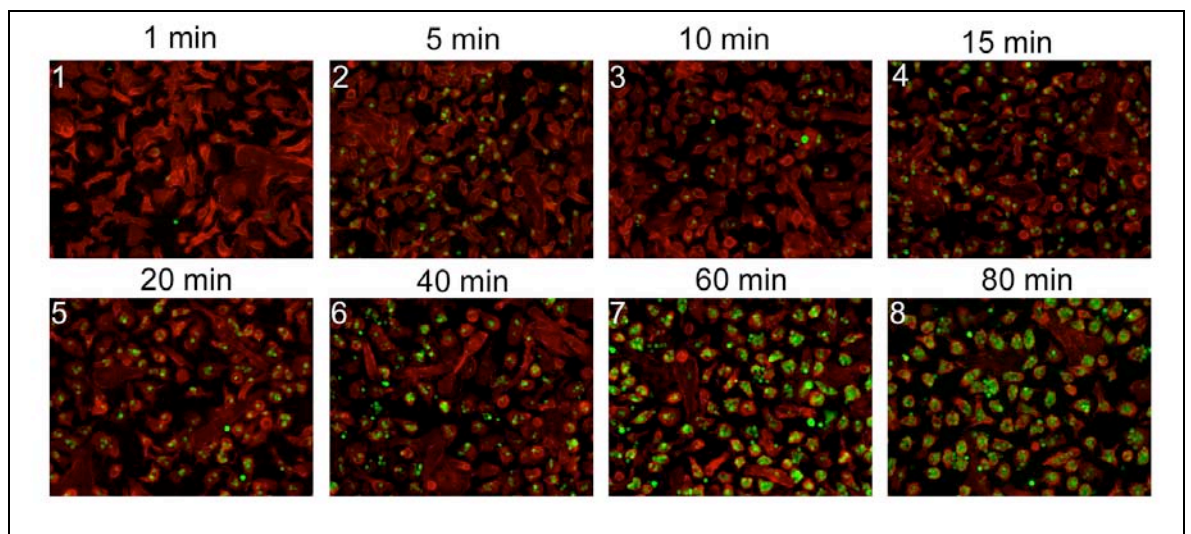


Abb. 47: Kinetik der Phagozytose NAD behandelter T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 μ M NAD behandelt. Die Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60 und 80 Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops mit 40x Ölimmersionsobjektiv (N.A: 0,6) und Digitalkamera wurden Fotos gemacht.

Auch in diesem Experiment zeigte sich nach 60 Minuten keine deutliche Steigerung des Anteils phagozytierender Makrophagen mehr. In **Abbildung 48** sind die Zeitpunkte nach 20 und 80 Minuten Koinkubation in höherer Vergrößerung gezeigt. Mit Hilfe des Zeiss Apotoms wurden auch hier Z-Stapel aufgenommen. In diesem Fall wurde dann aus den Z-Stapelbildern ein Bild mit erweitertem Focus errechnet. Alle Ebenen werden in einem einzigen Bild scharf abgebildet. Es war deutlich zu erkennen, dass nach 20 Minuten Koinkubation bereits viele T-Zellen an den Makrophagen fest anhafteten. Teilweise waren auch Invaginationen der Makrophagenmembran sichtbar (**Abb.48A**).

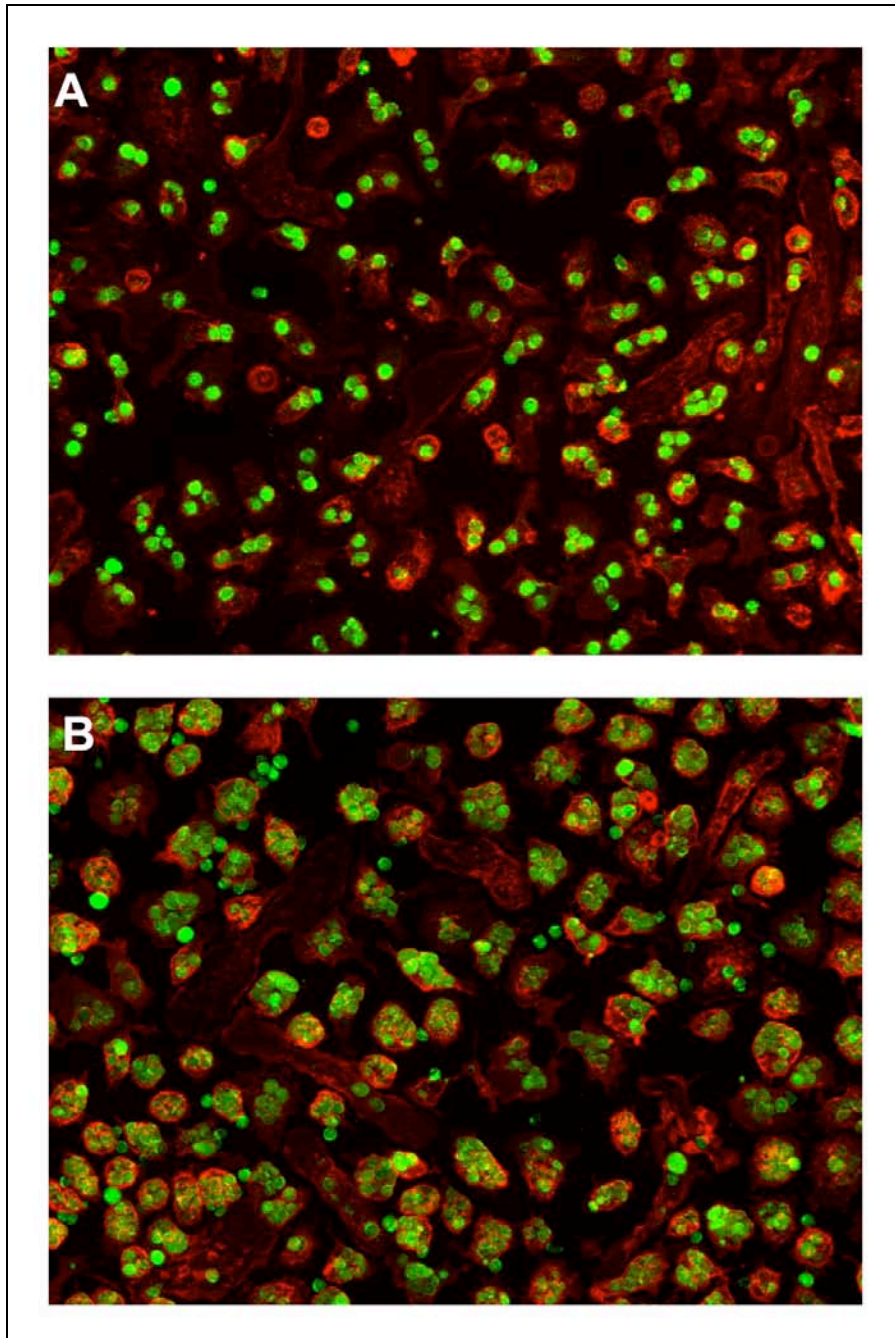


Abb. 48: Phagozytose NAD-behandelter T-Zellen durch Peritonealmakrophagen nach 20 min (A) und 80 min(B) Koinkubation. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 μ M NAD behandelt. Die Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 20 (A) oder 80 (B) Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen CD11b angefärbt. Mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops mit Apotom, Neofluar 63x Ölimmersionsobjektiv (N.A: 1,25) und Digitalkamera wurden Fotos gemacht.

Nach 80 Minuten Koinkubation waren die Zellen bereits deutlich im Innern der Makrophagen lokalisiert. Viele Makrophagen hatten bereits mehrere T-Zellen phagozytiert (**Abb.48B**).

3.3.1.3 Quantifizierung der Phagozytose

Die Phagozytose der NAD-behandelten T Lymphozyten sollte genauer quantifiziert werden. Für dieses Vorhaben wurden mit Celltrackergreen gefärbte, aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus für 30 Minuten bei 37°C mit 25 µM NAD behandelt. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von 10 T-Zellen pro Makrophage für 90 Minuten koinkubiert. Nach Entfernen der nicht phagozytierten T-Zellen durch Waschen mit PBS/EDTA wurden die Makrophagen mit PE-gekoppelten anti-CD11b Antikörpern angefärbt. Die Makrophagen wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Es wurden jeweils 3 Gesichtsfelder mit je ca. 350 Makrophagen fotografiert. Anschließend wurden die Bilder ausgewertet und die Zahl der Makrophagen bestimmt, die jeweils keine, 1, 2, 3, 4 oder mehr als 4 T-Zellen phagozytiert hatten. Nur 5 % der mit Wildtyp T-Zellen inkubierten Makrophagen phagozytierten keine einzige T-Zelle (**Abb.49**, weiße Balken).

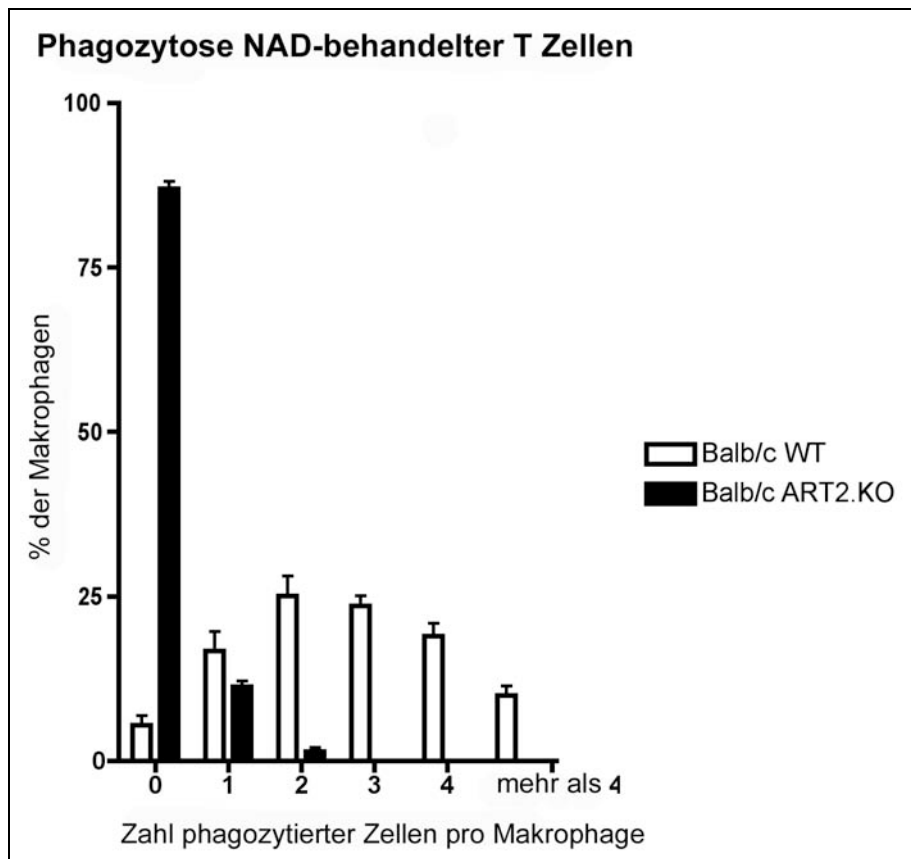


Abb. 49: Quantifizierung der Phagozytose von T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 µM NAD behandelt. Die Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 90 Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Es wurden mittels Fluoreszenzmikroskops und einer Digitalkamera Bilder von den Makrophagen gemacht. Es wurden für BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente T-Zellen jeweils 3 große Gesichtsfelder fotografiert. Pro Mausstamm wurden dann 1000 Makrophagen ausgewertet und die Zahl der Celltracker gefärbten Zellen in den Makrophagen gezählt.

Bei den mit ART2-defizienten T-Zellen koinkubierten Makrophagen hingegen phagozytierten 88%

gar nicht (**Abb.49**, schwarze Balken). Dieses Experiment zeigte darüber hinaus, dass ein Großteil der mit den Wildtyp T-Zellen koinkubierten Makrophagen mehr als eine T-Zelle aufgenommen hatten. Bei den wenigen Makrophagen, die ART2-defiziente T-Zellen internalisiert hatten, war meist nur 1 phagozytierte T-Zelle nachweisbar (**Abb.49** schwarze Balken).

3.3.1.4 Auswirkung kurzfristiger „Pulse-Chase“-Behandlung von T-Zellen mit NAD und ATP auf die Phagozytose

Die Pulse-Chase-Experimente mit extrazellulärem NAD und ATP hatten gezeigt, dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin nach einem ATP-Puls reversibel ist, während eine kurze NAD-Behandlung ausreichend ist, auch in anschließender Abwesenheit von NAD das Phosphatidylserin auf der Außenseite der Cytoplasmamembran zu halten (**Abb.13**). Die Reversion des PS-Flashens konnte allerdings durch Inkubation mit dem P2X7-Inhibitor KN62 auch nach einer NAD-Behandlung erreicht werden (**Abb.16**).

Um zu überprüfen, inwiefern die Reversion des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin mit der Phagozytose der Zellen durch Peritonealmakrophagen korreliert, wurden die Pulse-Chase-Experimente nun mit einem anschließenden Phagozytose-Experiment wiederholt. Dafür wurden mit Celltrackergreen gefärbte, aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus aufgereinigte T-Zellen für 3 Minuten mit 250 μM ATP oder 25 μM NAD behandelt, gewaschen und für weitere 87 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen für 90 Minuten mit 250 μM ATP inkubiert. Um die Reversion des PS-Flashens nach NAD-Behandlung zu erreichen, wurden Zellen, die für 3 Minuten mit 25 μM NAD behandelt worden waren, nach dem Waschen in Anwesenheit von 10 μM KN62 inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der T-Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert. Die übrigen Zellen wurden für 90 Minuten auf Cultureslides mit Peritonealmakrophagen koinkubiert. Anschließend wurden lose Zellen mit PBS/EDTA fort gewaschen und die Makrophagen mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen den Makrophagenmarker CD11b angefärbt. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS/EDTA von den Cultureslides entfernt und im FACS analysiert.

Im ersten Versuchsteil bestätigten sich die Ergebnisse aus den vorangegangenen Pulse-Chase-Experimenten (**Abb.13,Abb.16**). Durch ATP-vermittelt nach außen gekehrtes Phosphatidylserin wird nach Entfernen des Agonisten wieder eingezogen (**Abb.50 A: Panel 3**). Das PS-Flashing nach kurzer NAD-Behandlung ließ sich nur durch den P2X7-Inhibitor KN62 unterdrücken (**Abb.50 A: Panel 5**). Hier war die Zahl der AnnexinV-positiven Zellen mit 5% noch deutlich unter dem Wert von 10% bei unbehandelten T-Zellen(**Abb.50 A: Panel 1**).

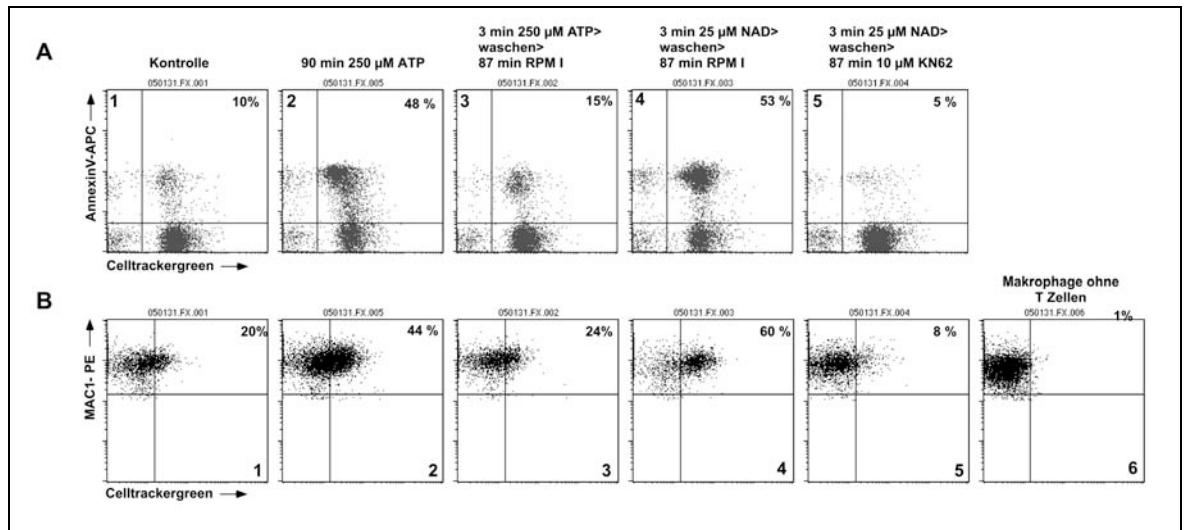


Abb. 50: Auswirkung der kurzfristigen Pulse-Chase Behandlung von T-Zellen mit NAD und ATP auf die Phagozytose. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtypmaus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten mit NAD oder ATP behandelt, gewaschen und für weitere 87 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Blockade des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin nach NAD-Behandlung wurde 1 Ansatz mit dem P2X7-Inhibitor KN62 inkubiert. Kontrollzellen wurden für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen für 90 Minuten mit ATP behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Die übrigen Zellen wurden in Cultureslides mit kultivierten Peritonealmakrophagen für 90 Minuten bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen mit eiskaltem PBS/EDTA fortgewaschen. Makrophagen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Die adhärennten Makrophagen wurden dann durch hartes Pipettieren von den Cultureslides gewaschen und im FACS analysiert (**B**).

Im zweiten Versuchteil konnte gezeigt werden, dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin mit der Phagozytose der Zellen durch Peritonealmakrophagen korreliert. Nur nach NAD-Behandlung und 90 minütiger ATP-Behandlung, die auch zu verstärktem nach außen Kehren von Phosphatidylserin führten, kam es zu einer gesteigerten Phagozytose der T-Zellen durch die Peritonealmakrophagen (**Abb.50B Panel 2,4**). Interessanterweise bewirkte der geringere Prozentsatz PS-exponierender Zellen nach der Behandlung mit KN62 zu einer, im Vergleich zur Phagozytose unbehandelter T-Zellen, reduzierten Internalisierung von T-Zellen durch Peritonealmakrophagen (vergleiche **Abb.50 B: Panel 1 und 4**).

3.3.1.5 Selektive Phagozytose von Wildtyp T-Zellen

Es sollte nun untersucht werden, ob die Peritonealmakrophagen auch aus einer Mischung von NAD-behandelten Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen tatsächlich selektiv nur Wildtyp Zellen phagozytieren würden. Zu diesem Zweck wurde neben dem bewährten Celltrackergreen auch der Farbstoff PKH26 verwendet. PKH26 ist ein lipophiler roter Fluoreszenzfarbstoff, der in die Cytoplasmamembran integriert wird. Um auszuschließen, dass die Anfärbung mit den Farbstoffen zu Unterschieden in der Vitalität der T-Zellen führt, wurden die T-Zellen aus einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus jeweils mit Celltrackergreen und PKH26 angefärbt und für 30 Minuten in Anwesenheit von 50 μ M NAD inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-APC bzw. AnnexinV-FITC angefärbt und im

FACS analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Färbung keinen Einfluss auf die Zahl der Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen hatte. NAD-Behandlung führte bei mit Celltrackergreen angefärbten Wildtyp T-Zellen zu ähnlich starkem PS-Flashing, wie bei den mit PKH26 gefärbten (vergleiche **Abb.51 A und B**: Panel 2).

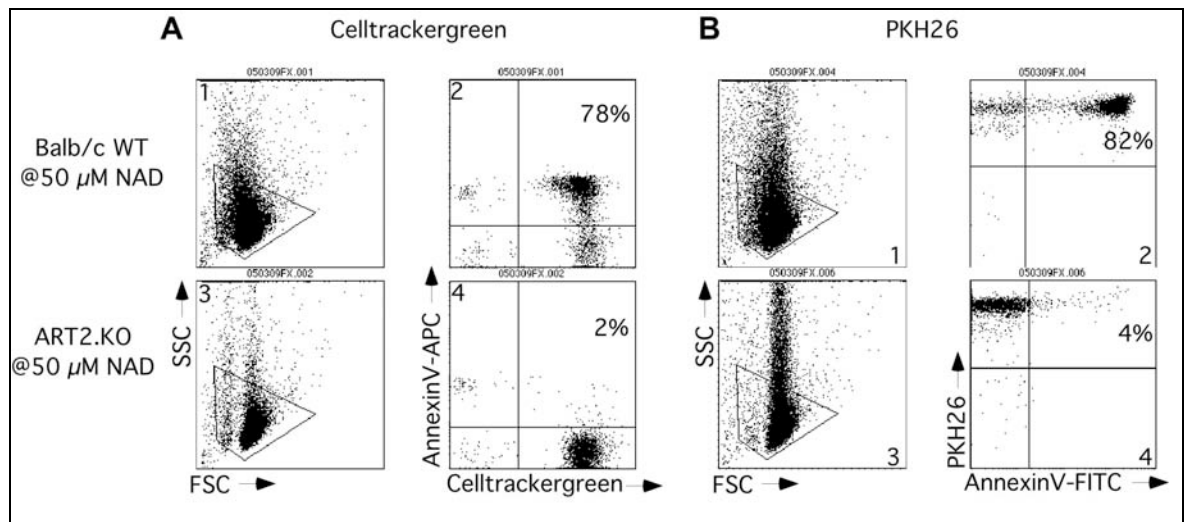


Abb. 51: Alternative Anfärbung von T-Zellen mit Celltrackergreen und PKH26. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem grün fluoreszierenden cytoplasmatischen Farbstoff Celltrackergreen (**A**) oder dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 (**B**) angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C mit NAD behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-APC (**A**) oder AnnexinV-FITC (**B**) angefärbt und im FACS analysiert

Unabhängig von der Färbung zeigten die ART2-defizienten T-Zellen keine Reaktion auf die NAD-Behandlung (**Abb.51 A und B**: Panel 4).

Die übrigen Zellen wurden für 90 Minuten mit Peritonealmakrophagen koinkubiert. Nicht phagozytierte Zellen wurden mit PBS/EDTA fortgewaschen. Nun wurden die Makrophagen, die mit grünen T-Zellen koinkubiert worden waren, mit einem rot fluoreszierenden anti-CD11b-PE Antikörper und die Makrophagen, die mit roten T-Zellen koinkubiert worden waren, mit einem grün fluoreszierenden anti-CD11b-FITC Antikörper angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen anschließend fotografiert. Es zeigte sich deutlich, dass die Methode der Anfärbung keinerlei Einfluss auf die spätere Phagozytose durch Peritonealmakrophagen hatte. NAD behandelte, ART2-defiziente T-Zellen wurden nicht phagozytiert (**Abb.52**: Panel 1,3), während NAD-behandelte BALB/c Wildtyp T-Zellen effizient phagozytiert wurden (**Abb.52**: Panel 2,4).

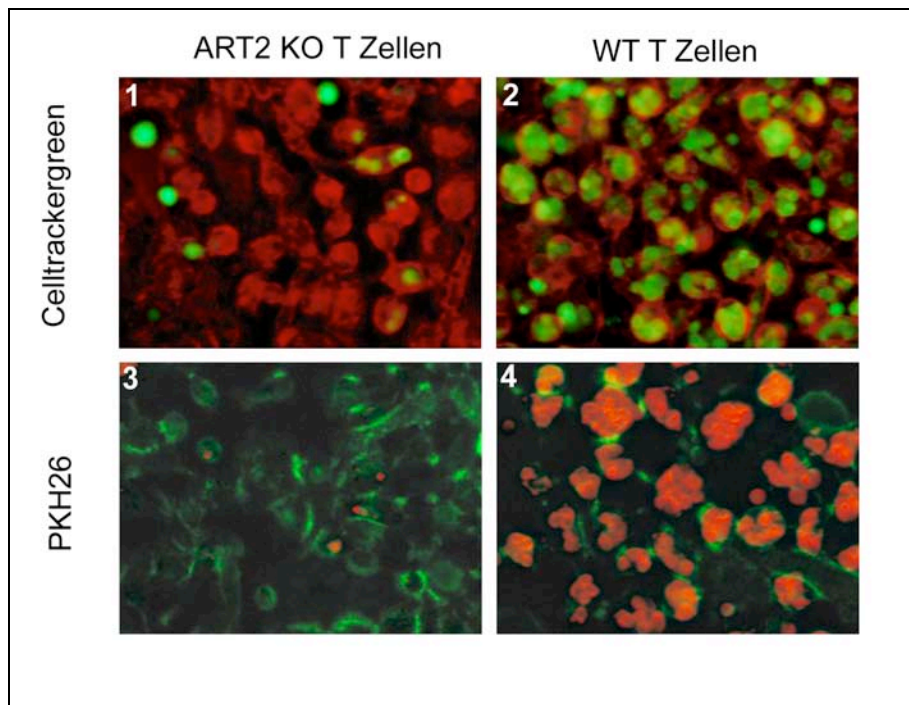


Abb. 52: Selektive Phagozytose NAD-behandelter BALB/c Wildtyp T-Zellen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem grün fluoreszierenden cytoplasmatischen Farbstoff Celltrackergreen oder dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C mit NAD behandelt. Die Zellen wurden gewaschen und für 90 Minuten bei 37°C mit kultivierten Peritonealmakrophagen koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Makrophagen wurden mit einem PE- bzw. FITC-gekoppelten Antikörper gegen MAC-1 angefärbt. Makrophagen, die mit roten T-Zellen koinkubiert worden waren, wurden grün, Makrophagen, die mit grünen T-Zellen koinkubiert worden waren, rot angefärbt. Schließlich wurden mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops mit 32x Objektiv (N.A: 0,4) und Digitalkamera Fotos von den Makrophagen gemacht.

Um nun zu klären, ob die Peritonealmakrophagen aus einer Mischung von NAD-behandelten BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen selektiv die Wildtyp T-Zellen phagozytieren können, wurden jeweils NAD-behandelte, grün gefärbte Wildtyp T-Zellen mit NAD-behandelten, roten ART2-defizienten T-Zellen in einem 1:1 Verhältnis gemischt und umgekehrt. Die T-Zell-Gemische wurden anschließend für 90 Minuten bei 37°C mit adhären Peritonealmakrophagen koinkubiert. Nach dem Fortwaschen der nicht phagozytierten Zellen mit eiskaltem PBA-EDTA wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert. Tatsächlich waren die Makrophagen in der Lage, aus einem Gemisch von T-Zellen selektiv die NAD-behandelten Wildtyp T-Zellen zu phagozytieren. Nach der Koinkubation mit dem 1:1 Gemisch von grünen Wildtyp T-Zellen und roten ART2-defizienten T-Zellen waren in den Makrophagen ausschließlich grüne Wildtyp T-Zellen zu sehen. Die Makrophagen haben also die PS-flashenden Wildtypzellen selektiv phagozytiert, während die ART2-defizienten Zellen nicht angetastet wurden (**Abb.53:** Panel 1).

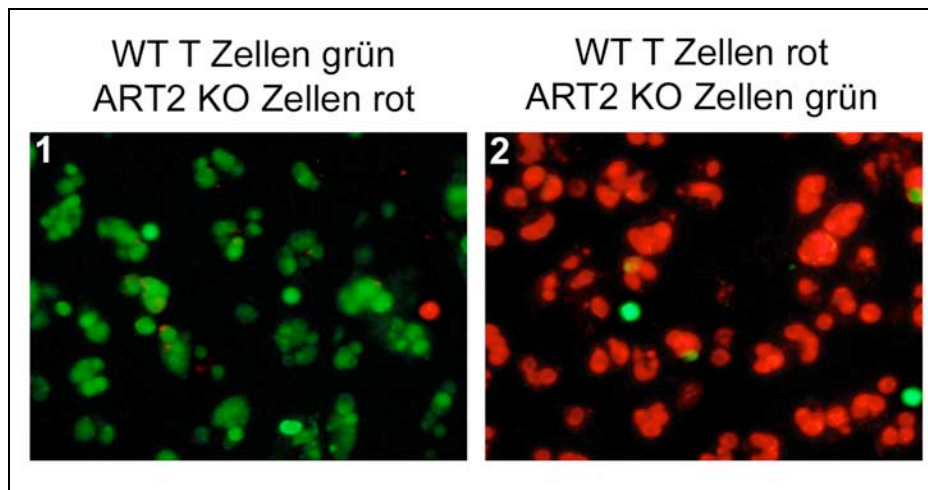


Abb. 53: Selektive Phagozytose von Wildtyp T-Zellen nach NAD-Behandlung. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem grün fluoreszierenden, cytoplasmatischen Farbstoff Celltrackergreen oder dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C mit NAD behandelt. Es wurden dann 1:1 Mischungen aus grünen Wildtyp und roten ART2-defizienten T-Zellen, bzw. roten Wildtyp und grünen ART2-defizienten T-Zellen für 90 Minuten bei 37°C mit kultivierten Peritonealmakrophagen koinkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS/EDTA entfernt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit 32x Objektiv (N.A: 0,4) und Digitalkamera wurden dann die Zellen in den Makrophagen fotografiert.

Andererseits wurden aus der Mischung mit roten Wildtyp T-Zellen und grünen ART2-defizienten T-Zellen ausschließlich rote Zellen von den Makrophagen phagozytiert, während die grünen ART2-defizienten Zellen nicht angetastet wurden (**Abb.53**: Panel 2).

3.3.2 Phagozytose apoptotischer Zellen durch frisch isolierte Peritonealmakrophagen in Suspension

In den vorangegangenen Experimenten wurden jeweils kultivierte Peritonealmakrophagen auf Cultureslides verwendet. Nun sollte untersucht werden, inwiefern auch frisch aus dem Peritoneum einer Maus ausgespülte Peritonealmakrophagen fähig sind, Phosphatidylserin nach außen kehrende T-Zellen zu phagozytieren. Zu diesem Zweck wurde ein Kinetik-Experiment mit in Lösung befindlichen, frisch isolierten Peritonealmakrophagen und NAD- oder ATP-behandelten T-Zellen durchgeführt (**Abb.54**). Es wurden in diesem Versuch mit Celltrackergreen gefärbte BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente T-Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 25 µM NAD oder 200 µM ATP behandelt. Im Anschluss daran wurden jeweils 1×10^6 Peritonealmakrophagen in einem Volumen von 1,5 ml mit 5×10^6 T-Zellen bei 37°C koinkubiert. Jeweils sofort oder nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurden dann 200 µl der Zellsuspension entnommen und mit 2 % Para-Formaldehyd fixiert. Die Makrophagen wurden dann mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD11b angefärbt und im FACS analysiert. Bei der Auswertung wurde auf MAC-1 positive Zellen gegatet (**Abb.54 A**) und der Prozentsatz der Makrophagen ermittelt, die Celltrackergreen gefärbte Zellen phagozytiert hatten.

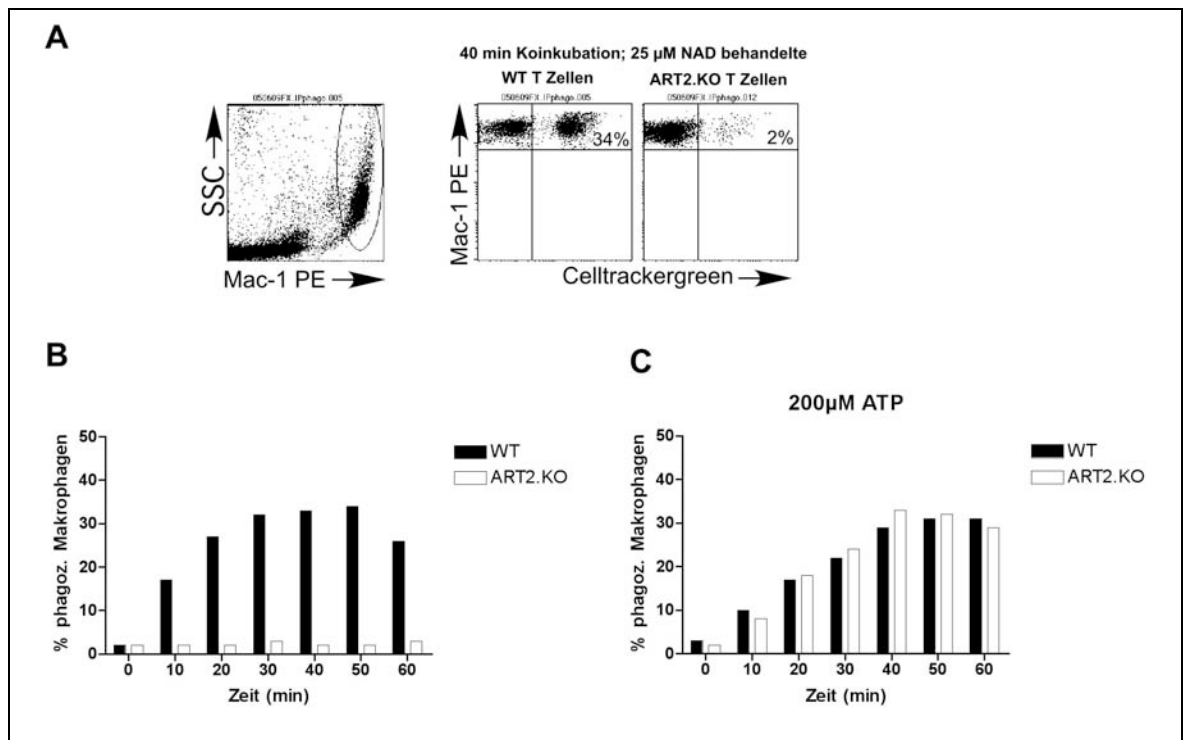


Abb. 54: Zeitlicher Verlauf der in vitro Phagozytose von NAD- oder ATP-behandelten T-Zellen durch residente Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen angefärbt. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten mit NAD (**B**) oder ATP (**C**) behandelt. Die behandelten Zellen wurden dann jeweils mit frisch aus dem Peritoneum der Spendermäuse ausgespülten Peritonealmakrophagen bei 37°C koinkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen aus den Ansätzen entnommen und die Phagozytose mit 2% PFA gestoppt. Die Zellen wurden dann mit PE-gekoppeltem MAC-1 Antikörper angefärbt. Im FACS wurde dann auf die MAC-1 positiven Zellen gegatet. Dies ist beispielhaft an repräsentativen FACS-Plots nach 40 Minuten Koinkubation von NAD-behandelten T-Zellen mit Makrophagen zu sehen (**A**). Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil der Makrophagen, die T-Zellen phagozytiert haben.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch frisch isolierte Peritonealmakrophagen in der Lage sind, Phosphatidylserin nach außen kehrende T-Zellen zu phagozytieren. NAD-behandelte ART2-defiziente T-Zellen wurden wiederum nicht durch die Makrophagen angetastet (**Abb.54 B**, weiße Balken). Andererseits wurden ATP-behandelte ART2-defiziente T-Zellen in gleichem Maße und gleicher Kinetik wie Wildtyp T-Zellen phagozytiert (**Abb.54 C**). In diesem Experiment zeigte sich außerdem erneut die hohe Geschwindigkeit der Phagozytose Phosphatidylserin nach außen kehrender T-Zellen durch Peritonealmakrophagen. Der relative Anteil MAC1 positiver Zellen, die bei diesen Suspensions-Ansätzen Zellen phagozytierten, war mit maximal 35% deutlich niedriger als bei den fest haftenden Makrophagen, wo 75% der Makrophagen phagozytiert hatten (Vergleiche **Abb.54** und **Abb.46**).

3.3.3 In vivo Phagozytose i.p. injizierter apoptotischer T-Zellen durch residente Peritonealmakrophagen

Um das Ergebnis des *in vitro* Versuchs mit frisch ausgespülten Peritonealmakrophagen auch *in vivo* zu bestätigen, wurden jeweils 5×10^6 mit Celltrackergreen gefärbte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus *in vitro* mit 50 µM NAD behandelt und in einem Volumen

von 1 ml in das Peritoneum einer Maus gespritzt. Nach 60 Minuten wurden die Mäuse getötet, die Peritonealmakrophagen ausgespült und mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen CD11b angefärbt. Die ausgespülten Zellen wurden dann im FACS analysiert. Zur Kontrolle des PS-Flashens wurde ein Teil der T-Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert. Die Wildtyp T-Zellen reagierten auf die NAD-Behandlung mit dem nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.55 A**: Panel 2), während die ART2-defizienten T-Zellen nicht auf NAD reagierten (**Abb.55 A**: Panel 1).

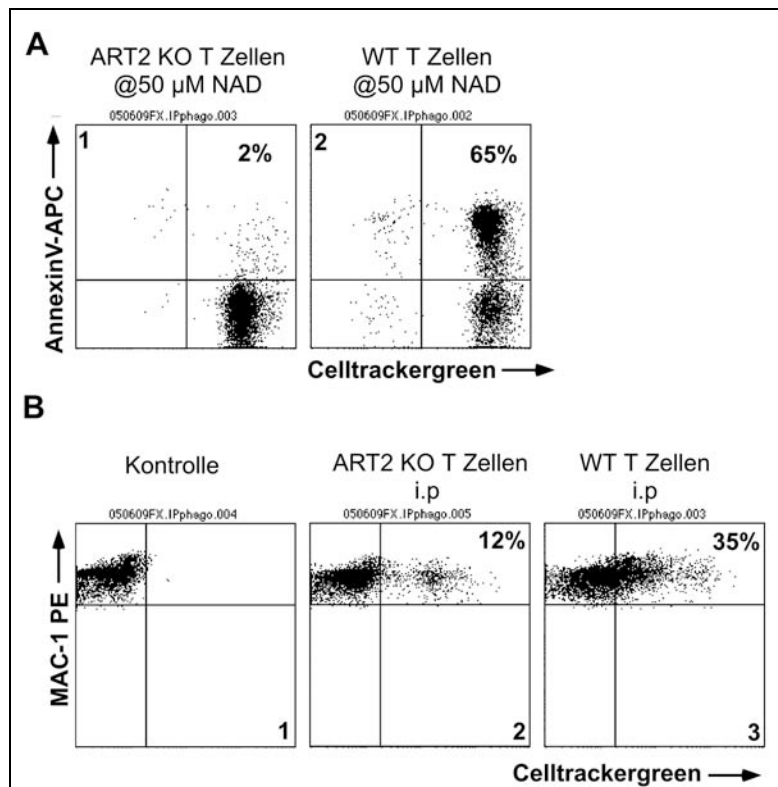


Abb. 55: In vivo Phagozytose NAD-behandelter T-Zellen durch residente Peritonealmakrophagen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 µM NAD behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Jeweils 5×10^6 NAD behandelte Celltrackergreen gefärbte WT und ART2-defiziente T-Zellen wurden in 1 ml RPMI in das Peritoneum zweier Empfängermäuse gespritzt. Nach 60 Minuten „Koinkubation“ der T-Zellen mit den residenten Peritonealmakrophagen im Peritoneum der Mäuse, wurden die Zellen aus dem Peritoneum herausgespült, mit Fc-Block und PE-gekoppeltem MAC-1 Antikörper angefärbt und im FACS analysiert (**B**). Bei der Auswertung wurde dann auf MAC-1 positive Zellen gegatet. Die Prozentzahlen entsprechen der Zahl von Peritonealmakrophagen, die NAD-behandelte T-Zellen phagozytiert haben.

Es zeigte sich, dass auch i.p. injizierte T-Zellen *in vivo* phagozytiert werden können. Die NAD-behandelten Wildtyp T-Zellen wurden hierbei effizienter phagozytiert als die ART2-defizienten T-Zellen (vergleiche **Abb.55 B**: Panel 2 und 3).

3.3.4 Schicksal nach i.v. Injektion apoptotischer T-Zellen

In einem weiteren Versuch sollte das Schicksal Phosphatidylserin nach außen kehrende Zellen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden $3,5 \times 10^7$ NAD-behandelte, mit Celltrackergreen angefärbte T-Zellen einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus in einem Volumen von 300 μ l PBS in die Schwanzvene jeweils einer Empfängermaus gespritzt. Das entspricht ca. 1/10 des Blutvolumens sowie in etwa dem zehnfachen der zirkulierenden T Lymphozyten. Nach 15 Minuten wurden den Mäusen retroorbital Blut abgenommen. Anschließend wurden die Mäuse getötet und die Leberlymphozyten isoliert. Zur Isolation von Blut- und Leberlymphozyten wurden Erythrozyten mit hypotonem Puffer lysiert. Anschließend wurde der Anteil an mit Celltrackergreen gefärbten Zellen an den Gesamtlymphozyten mittels FACS-Analyse festgestellt. Ein Teil der behandelten T-Zellen wurde zur Kontrolle mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert. Es zeigte sich wieder, dass die NAD-Behandlung nur bei BALB/c Wildtyp T-Zellen zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin führte (**Abb.56 A**).

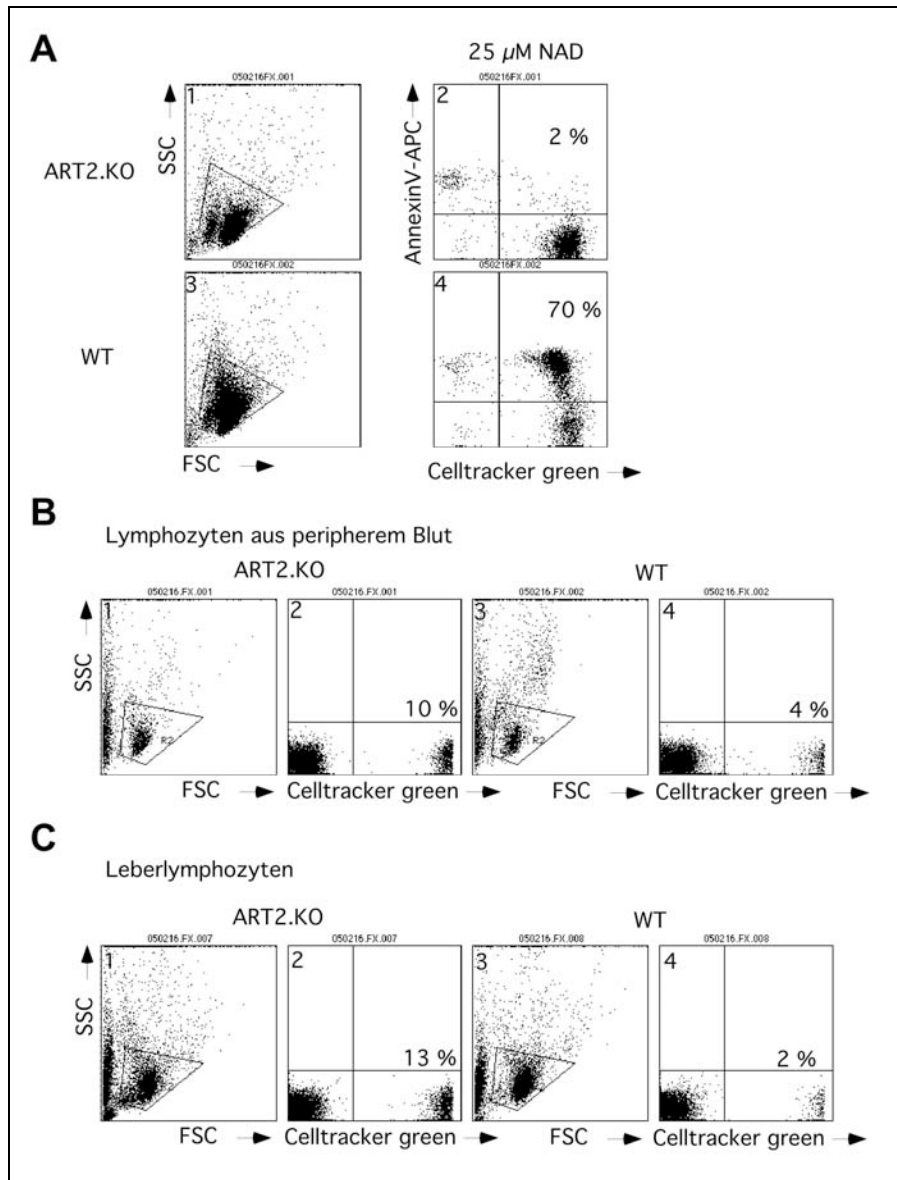


Abb. 56: Schicksal i.v. injizierter NAD-behandelter T-Zellen. Aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus wurden mit dem Farbstoff Celltrackergreen grün angefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 μ M NAD behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-APC angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Jeweils $3,5 \times 10^7$ NAD behandelte Celltrackergreen gefärbte WT und ART2-defiziente T-Zellen wurden in 300 μ l PBS in die Schwanzvene jeweils einer Empfängermaus gespritzt. Nach 15 Minuten wurde retroorbital Blut entnommen und die Mäuse anschließend getötet. Lymphozyten wurden aus Blut (**B**) und Leber (**C**) isoliert und im FACS untersucht. Prozentzahlen repräsentieren die Zahl Celltrackergreen gefärbter Zellen gegenüber ungefärbten Zellen.

Der Anteil der wiedergewonnenen mit Celltrackergreen gefärbten T-Zellen war sowohl in peripherem Blut (**Abb.56 B**), als auch in Leber (**Abb.56 C**) sehr gering. Der überwiegende Anteil der i.v. injizierten Zellen war offensichtlich innerhalb von 15 Minuten aus dem Kreislauf eliminiert worden. Es zeigte sich jedoch deutlich, dass der Anteil ART2-defizienter Zellen, die zurückgewonnen worden waren, 3-4 mal höher war als der Anteil an Wildtyp T-Zellen (vergleiche **Abb.56 B,C**: Panel 2 und 4). Dies entspricht ungefähr dem Verhältnis der Zellen, die auf NAD-Behandlung kein Phosphatidylserin nach außen gekehrt hatten: 30 % der Wildtyp Zellen zeigten kein Phosphatidylserin auf der Außenseite der Cytoplasmamembran, während 96% der ART2-

defizienten T-Zellen AnnexinV negativ waren (vergleiche **Abb. 56 A**: Panel 2 und 4).

3.4 Zellkulturmodelle der NAD-vermittelten durch ART2 katalysierten Signaltransduktion

3.4.1 Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien

Um Zellkulturmodelle der NAD-vermittelten durch ART2 katalysierten Signaltransduktion zu etablieren, wurde eine Reihe Lymphomzelllinien auf Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP untersucht. Die Zelllinien waren im Stickstofftank unseres Instituts für viele Jahre aufbewahrt worden. Es wurden unter anderem zwei Varianten der YAC-1 Zellen, die durch Infektion einer A/Sn Maus mit dem Moloney Leukämie-Virus (MLV) generiert worden waren, verwendet (Kiessling, Klein et al. 1975). Eine Variante wurde von einer anderen am UKE beheimateten Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, die andere wurde von der American Type Culture Collection bezogen. LB-Alpha Zellen waren aus einer BALB/c Lymphom-Zelllinie generiert worden, die mit dem Alpha-4-Integrin retroviral transfiziert wurde (Gosslar, Jonas et al. 1996). Die verwendeten SL-12.2 α Zellen sind als spontanes Lymphom aus einer AKR/s Maus beschrieben worden (MacLeod, Weinroth et al. 1985). EL-4 Zellen wurden aus einer C57BL/6 Maus isoliert, die mit 9,10-dimethyl-1,2-benzathrazen behandelt worden war (Gorer 1950). Bei den MD27-Zellen handelt es sich um ein Hybridom, das aus der Fusion einer Lymphomzelllinie der AKR/s Maus (BW5147 Lymphomzellen) mit cytotoxischen T-Zellen aus der Milz einer BALB/c Maus generiert worden war (Kaufmann, Berke et al. 1981).

In einem ersten Schritt wurde die Sensitivität der Zelllinien auf extrazelluläres NAD und ATP getestet. Untersucht wurde hierbei das nach außen Kehren von Phosphatidylserin und die Bildung von Membranporen, die durch eine Aufnahme von Ethidiumbromid detektiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden jeweils 4×10^5 Lymphomzellen pro Ansatz für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 μ M NAD oder 500 μ M ATP inkubiert. Zusätzlich waren zur Blockade der ART2- und P2X7-vermittelten Effekte auch Zellen für 60 Minuten mit ART2-spezifischen Antikörpern und dem P2X7-Inhibitor KN62 vorinkubiert worden, bevor sie anschließend für 30 Minuten mit den Agonisten behandelt wurden. Für die letzte Minute der 30 minütigen Inkubation wurde 1 μ g/ml Ethidiumbromid zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindpuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert. Es konnten zwei Zelllinien identifiziert werden, die auf die Behandlung mit extrazellulärem NAD mit PS-Flashing reagierten: YAC-1.HH und MD27-Zellen (**Abb.57**: Panel 4 und 52), wobei bei den MD27-Zellen nur eine Subpopulation der Zellen reagiert. Auch bei den EL4.ATCC Zellen reagiert eine ganz kleine Subpopulation auf extrazelluläres NAD (**Abb.57** Panel 36).

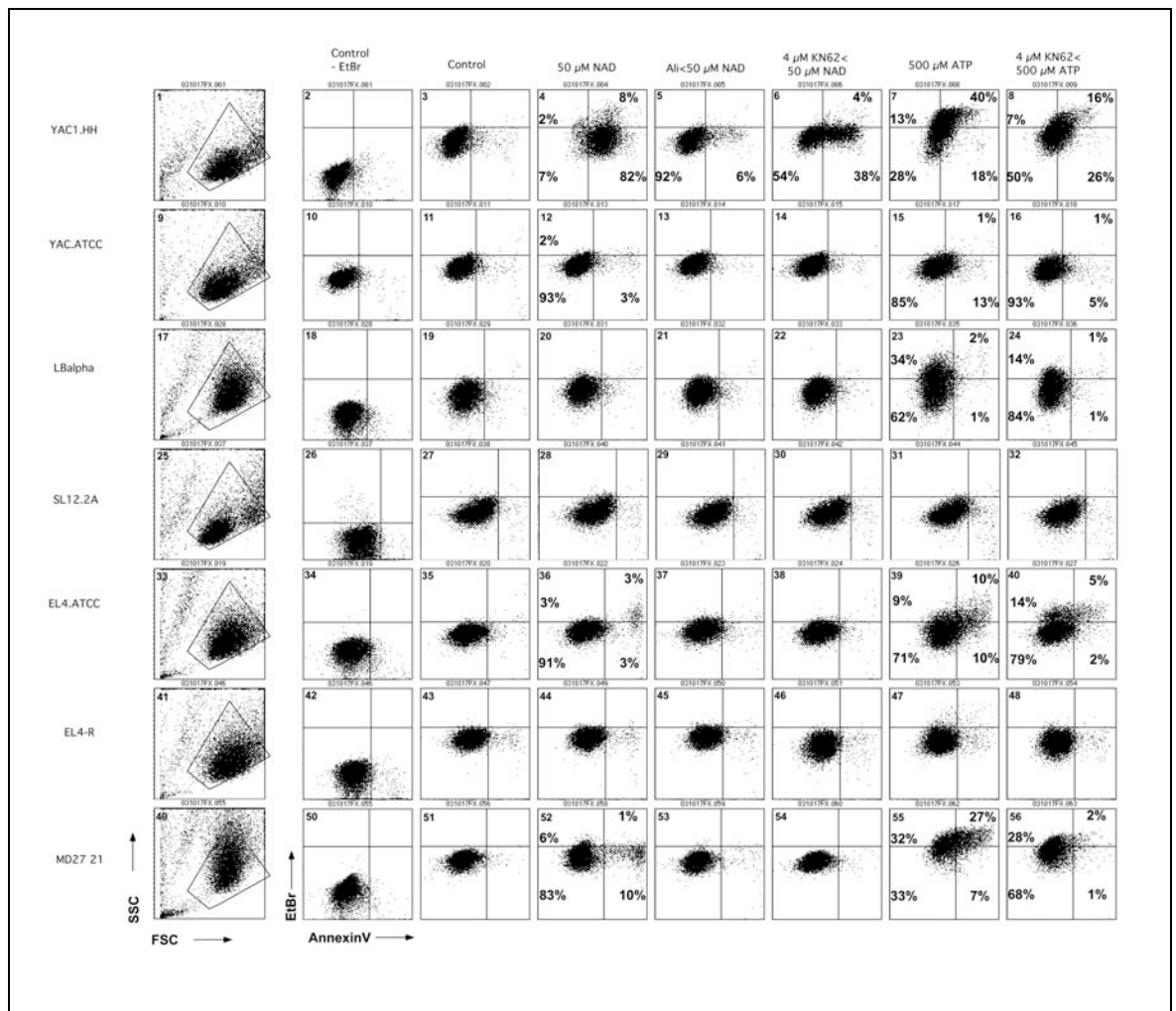


Abb. 57: Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien auf Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP. Jeweils 4×10^5 Lymphomzellen wurden für 30 Minuten bei 37°C mit NAD oder ATP inkubiert. Zur Blockade wurden die Zellen zuvor in Anwesenheit von einem ART2-spezifischen Antikörper (Ali) oder dem P2X7-Inhibitor KN62 für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für die letzte Minute der Inkubation mit den Agonisten NAD und ATP wurde Ethidiumbromid zu den Zellen gegeben, um Porenbildung in den Zellen nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-FITC angefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentzahlen der nicht reagierenden Zellen betrug, wenn nicht anders angegeben, über 98%.

Darüber hinaus reagierten YAC.HH, LB-Alpha, EL4.ATCC und MD27 auf extrazelluläres ATP neben dem nach außen Kehren von Phosphatidylserin auch mit Aufnahme von Ethidiumbromid (**Abb.57**: Panels 7, 23, 39 und 55). Die durch NAD-vermittelten Effekte ließen sich durch ART2-spezifische Antikörper blockieren (Vergleiche **Abb.57**: Panel 4 und 5, 36 und 37, 52 und 53). Darüber hinaus ließen sich sowohl die durch NAD (Vergleiche **Abb.57**: Panel 4 und 6, 36 und 38, 52 und 54) als auch die durch ATP (Vergleiche **Abb.57**: Panel 7 und 8, 23 und 24, 39 und 40, 55 und 56) ausgelöste Effekte größtenteils durch den P2X7-Inhibitor KN62 blockieren.

Die Lymphomzelllinien sollten nun genauer charakterisiert werden. Hierzu wurden die Zellen auf Expression von P2X7 und ART2 und auf ART2-Aktivität untersucht. Die Zellen wurden mit einem P2X7-spezifischen Kaninchenserum und ART2-spezifischen, monoklonalen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden gebundene Antikörper unter Verwendung der entsprechenden Fluorochrom-

gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Zur Analyse der ART2-Aktivität wurden die Lymphomzellen für 20 Minuten mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert, gewaschen und anschließend mit dem 1G4-Antikörper, der etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine erkennt, inkubiert. Gebundene Antikörper wurden auch hier durch entsprechende Sekundärantikörper nachgewiesen. Zum Ausschließen toter Zellen waren die Zellen auch mit Propidiumjodid angefärbt worden. Es zeigte sich hierbei, dass sowohl YAC-1.HH- als auch MD27-Zellen, die nach Inkubation von NAD mit nach außen Kehren von Phosphatidylserin reagiert hatten, eine hohe Expression von P2X7 und ART2 aufwiesen (**Abb.58**: Panels 2,3 und 26,27). Neben der Expressionsstärke von P2X7 determiniert auch das exprimierte P2X7-Allel die Sensitivität gegenüber NAD und ATP. In **Abbildung 58** ist daher auch angegeben, ob die Zelllinie das Wildtyp 451P-Allel oder das mutierte 451L-Allel aufweist.

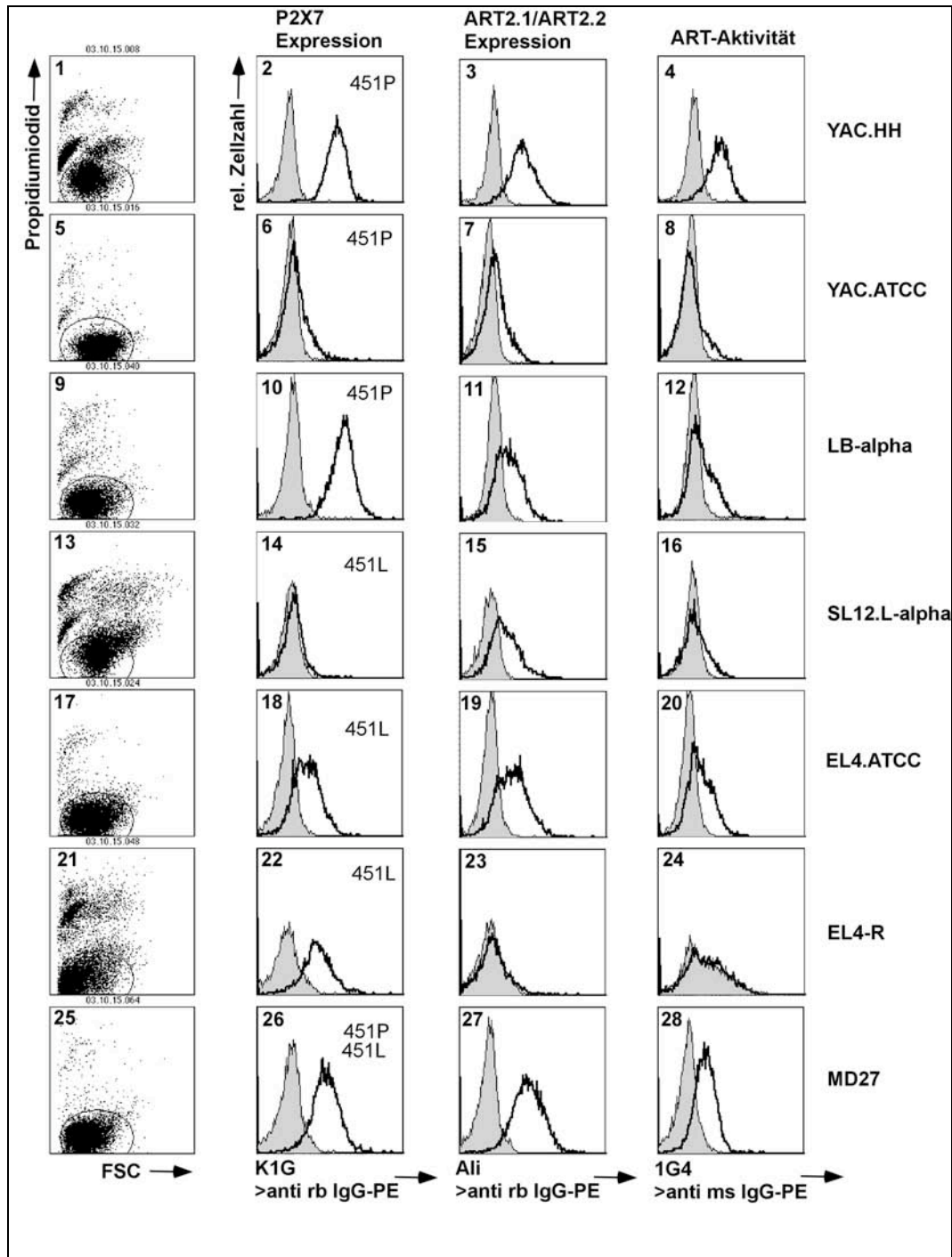


Abb. 58: Untersuchung der Expression von P2X7, ART2 und ART2-Aktivität in verschiedenen Lymphomzelllinien. Für die Analyse der Expression wurden jeweils 4×10^5 Lymphomzellen pro Ansatz für 30 Minuten mit ART2-spezifischen monoklonalen Antikörpern oder P2X7-spezifischem Immenserum inkubiert, gewaschen und mit einem PE-gekoppelten anti-Ratten-IgG- (gegen die ART2 Antikörper) oder anti-Kaninchen-IgG-Sekundär-Antikörper (P2X7-spezifisches Immenserum) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Propidiumjodid angefärbt, um tote Zellen ausschließen zu können und im FACS analysiert. Zur Analyse der ART2-Aktivität wurden die Lymphomzellen für 20 Minuten mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert, gewaschen und anschließend mit dem 1G4-Antikörper, der etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine erkennt, angefärbt. Hier wurde ein PE-konjugierter anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper verwendet. Nach erneutem Waschen und Propidiumjodid-Färbung wurden die Zellen im FACS analysiert.

Die Zellen, die gar nicht oder schwach auf NAD reagierten, zeigten meist keine oder nur schwache Expression von P2X7 (**Abb.58**: Panel 14), ART2 (**Abb.58**: Panel 23) oder beidem (**Abb.58**: Panel

6 und 7). Die EL4.ATCC-Zellen allerdings, die schwach auf NAD und ATP reagierten, zeigten eine gute ART2- und P2X7-Expression (**Abb.58**: Panel 18 und 19). Diese Zellen exprimieren jedoch die 451L-Variante des P2X7 Rezeptors, der eine sehr geringe Sensitivität gegenüber ATP und damit verbunden auch geringe Aktivierbarkeit durch NAD-vermittelte ADP-Ribosylierung aufweist. Die LB-Alpha-Zellen wiesen eine starke Expression von P2X7 und mittlere Expression von ART2 auf (**Abb.58** Panel 10,11), reagierten jedoch nicht auf NAD, obwohl sie das sensitive 451P-Allel von P2X7 haben. Interessanterweise reagierten diese Zellen nach ATP-Behandlung auch nur mit Aufnahme von Ethidiumbromid und nicht mit dem nach außen Kehren von Phosphatidylserin, was auf das Fehlen eines „downstreameffectors“ hinweisen könnte. Dies erklärt möglicherweise auch die fehlende Reaktion auf NAD. Die YAC-1.ATCC-Zelllinie wies nur sehr schwache P2X7- und ART2-Expression (**Abb.58**: Panel 6,7), obwohl die Schwester-Zelllinie YAC-1.HH beides gut exprimierte. Insgesamt zeigte sich in den Experimenten zur Expression von ART2 und P2X7 und zur Empfindlichkeit gegenüber extrazellulären Nukleotiden, dass eine gute Expression von ART2 und P2X7 essentiell für die Reaktion auf extrazelluläres NAD war.

Im Folgenden wurden nun die beiden Lymphomzelllinien YAC-1.HH und MD27, die gut auf NAD reagiert hatten, genauer untersucht. Bereits an den T-Zellen etablierte Experimente wurden nun mit den Lymphomzellen durchgeführt, um zu untersuchen, inwiefern sie geeignete Zellkulturmodelle für die bei T-Zellen beobachtete ART2-vermittelte und P2X7-abhängige Signaltransduktion darstellen.

3.4.2 MD27-Lymphomzellen

3.4.2.1 *Vergleichende Untersuchung von MD27 und T-Zellen bezüglich Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP*

Zunächst sollte die Reaktion auf extrazelluläres NAD und ATP vergleichend mit T-Zellen untersucht werden. Daher wurden aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Maus und MD27-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAD (**Abb.59**) und ATP (**Abb.60**) inkubiert. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C mit den Agonisten inkubiert, anschließend mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Es zeigte sich, dass die Inkubation von MD27-Zellen auch mit hohen Dosen NAD zu keinem Verlust der Membranintegrität führte, was sich durch fehlende Anfärbung mit Propidiumjodid bemerkbar machte (**Abb.59** Panel 6).

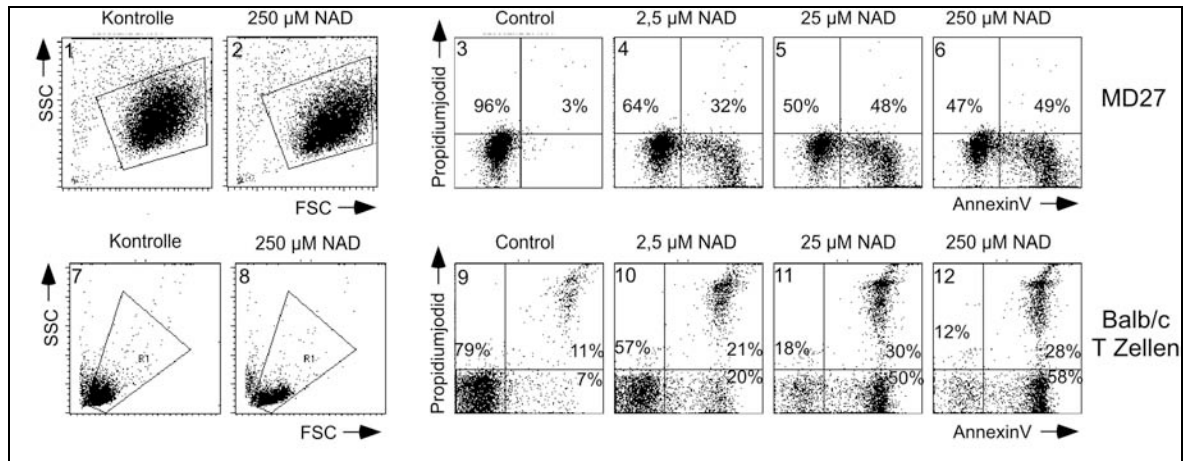


Abb. 59: Vergleich der Empfindlichkeit von MD27 und T-Zellen gegenüber NAD. MD27-Zellen (Panel 1-6) und T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus (Panels 7-12) wurden für 1 Stunde bei 37°C mit angegebenen Konzentrationen NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Es zeigte sich bei den MD27-Zellen auch ein, im Vergleich zu T-Zellen, höherer Anteil an Zellen, die gegenüber NAD-Behandlung resistent waren (Vergleiche **Abb.59**: Panel 6 und 12). Sowohl MD27-Zellen als auch T-Zellen reagierten gleichermaßen bereits auf niedrige NAD-Konzentrationen (**Abb.59**: Panel 4 und 10). Auch nach ATP-Behandlung mit einer millimolaren Konzentration zeigte sich bei den MD27-Zellen kein Verlust der Membranintegrität (**Abb.60** Panel 6). Diese war nach einstündiger Inkubation bei einer Konzentration von 250 μ M ATP bei 40 % der T-Zellen bereits nicht mehr gegeben (**Abb.60**: Panel 11).

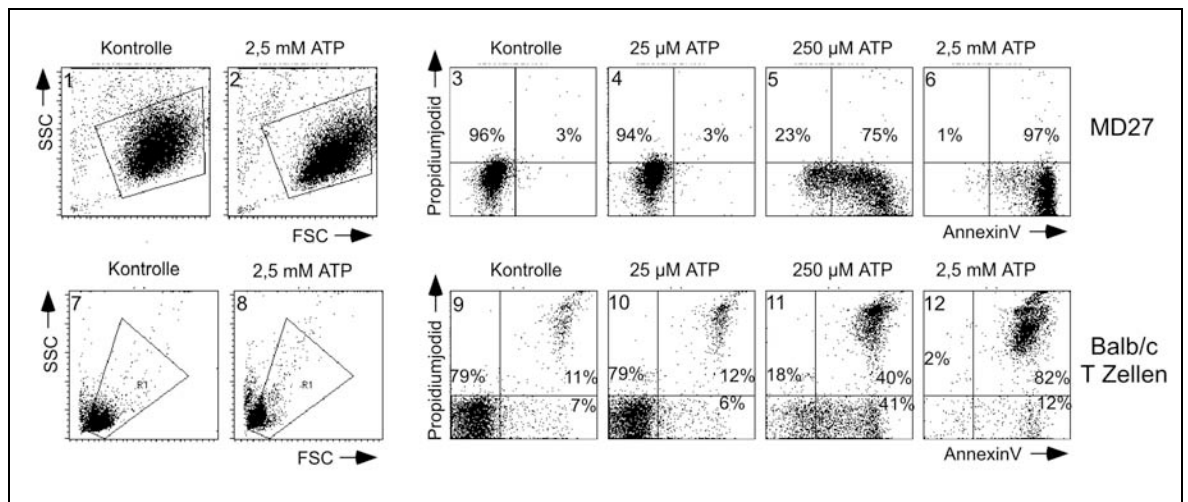


Abb. 60: Vergleich der Empfindlichkeit von MD27 und T-Zellen gegenüber ATP. MD27-Zellen und T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus wurden für 1 Stunde bei 37°C mit angegebenen Konzentrationen ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die vitalen AnnexinV-negativen Zellen.

Nach Inkubation mit hohen Dosen ATP reagierten fast alle MD27-Zellen mit nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb.60**: Panel 6). Weder MD27-Zellen noch T-Zellen reagierten auf niedrige Konzentrationen ATP (**Abb.60**: Panel 4,10).

3.4.2.2 Untersuchung der Reversibilität nach Entfernen der Agonisten NAD und ATP

Es war in Kapitel 3.1.1.4 (**Abb.13**) gezeigt worden, dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin nach Entfernen des Agonisten ATP schnell reversibel ist, während das Entfernen von NAD nicht, oder zu sehr langsamer Re-Internalisierung von Phosphatidylserin führt. Es sollte nun im Folgenden untersucht werden, inwieweit dies auch für MD27-Zellen gilt. Daher wurden MD27-Zellen für den Zeitraum von 5 Minuten oder 30 Minuten mit 250 μM ATP und 25 μM NAD inkubiert, gewaschen und für eine Gesamtzeit von 1 Stunde oder 5 Stunden weiter inkubiert. Als Positivkontrolle wurden auch Zellen für den gesamten Zeitraum von 1 oder 5 Stunden mit NAD und ATP behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Das Entfernen des Agonisten ATP führte auch bei MD27-Zellen zur Reversion des PS-Flashens. Sogar nach einer 30 minütigen Inkubation mit ATP konnten die Zellen sich innerhalb weiterer 30 Minuten nach Entfernen des Agonisten fast vollständig erholen (**Abb.61 A**: Panel 3). Nach weiteren 4 Stunden hatten sich alle Zellen wieder erholt (**Abb.61 B**: Panel 3).

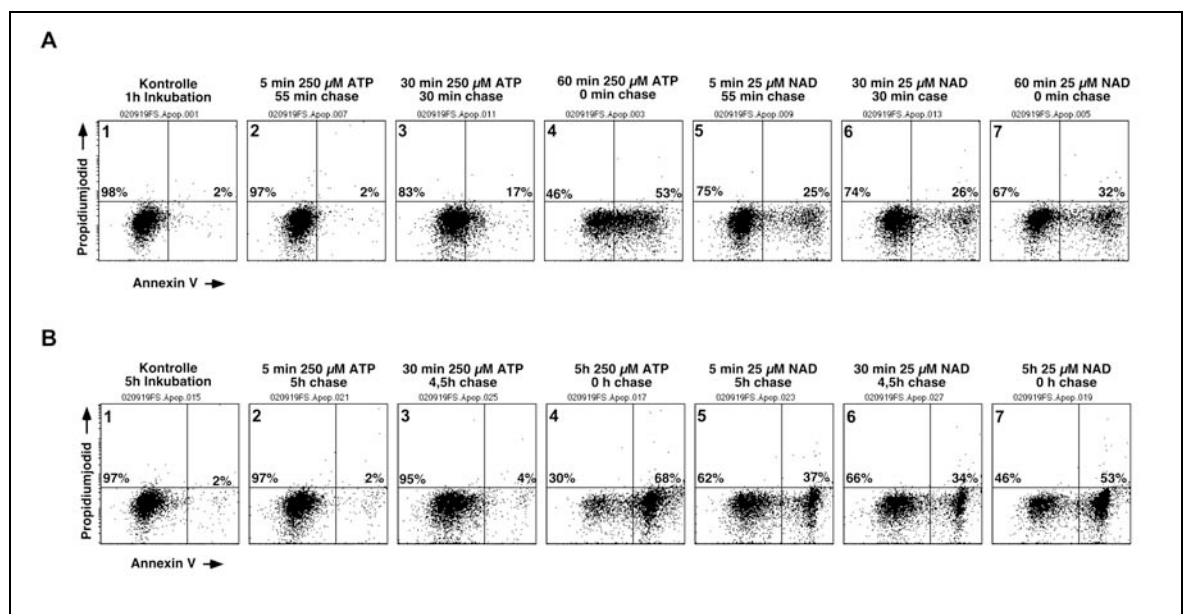


Abb. 61: Untersuchung der Reversibilität des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin nach kurzer NAD- oder ATP-Exposition. MD27-Zellen wurden für 5 oder 30 Minuten mit angegebenen Konzentrationen NAD und ATP behandelt, gewaschen und für eine Gesamtinkubationszeit von 1 Stunde (**A**) oder 5 Stunden (**B**) weiter inkubiert. Als Kontrolle wurden auch Zellen für die gesamte Zeit von 1 Stunde oder 5 Stunden ohne und mit NAD oder ATP behandelt. Nach der Gesamtinkubationszeit von 1 oder 5 Stunden wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Wie bereits bei der Behandlung von T-Zellen mit NAD führte auch bei den MD27-Zellen das Entfernen des Agonisten NAD nicht zu einer Re-Internalisierung des Phosphatidylserins. Eine fünfminütige Inkubation mit NAD reichte aus, um auch noch 5 Stunden bei 37% der Zellen das nach außen Kehren von Phosphatidylserin aufrecht zu erhalten (**Abb.61 B**: Panel 5). Es zeigte sich darüber hinaus, dass auch eine Inkubation von MD27-Zellen für 5 Stunden mit NAD oder ATP zu keinem Verlust der Membranintegrität führte (**Abb.61 B**: Panel 4,7).

3.4.2.3 Blockade des NAD-induzierten nach außen Kehrens von Phosphatidylserin bei MD27-Zellen

Im weiteren Verlauf sollte nun die NAD-vermittelte Signaltransduktion auch bei MD27-Zellen genauer betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden MD27-Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit 25 μM NAD behandelt. Die Zellen wurden vor der NAD-Behandlung für 1 Stunde bei 37°C mit 25 μM etheno-NAD, einem ART2-spezifischen Kaninchenserum oder mit dem P2X7-Inhibitor KN62 behandelt. Im Anschluss an die Inkubation mit NAD wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

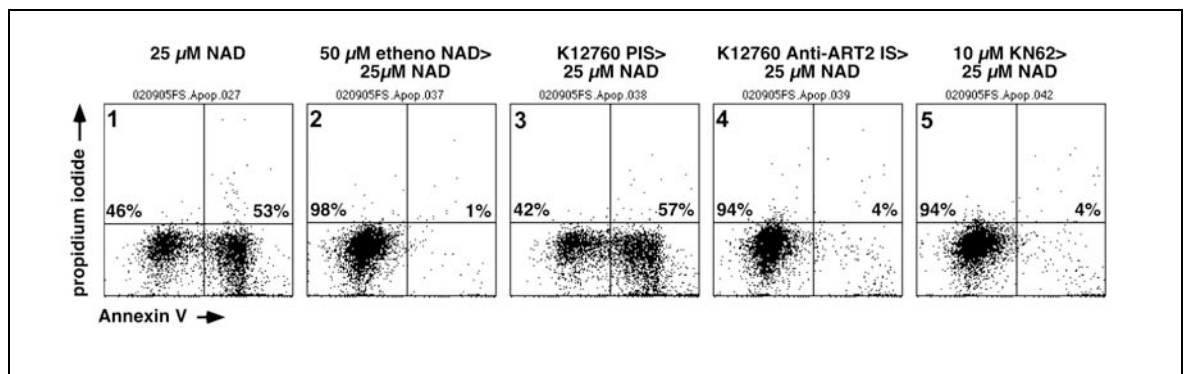


Abb. 62: Blockade des NAD-induzierten nach außen Kehrens von Phosphatidylserin. MD27-Zellen wurden für 1 Stunde mit 25 μM NAD bei 37°C behandelt. Zur Blockade wurden die Zellen zuvor für 1 Stunde mit etheno-NAD, ART2-spezifischem Antiserum oder mit dem P2X7-Inhibitor KN62 inkubiert. Nach der Inkubation mit NAD wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl ART2-spezifische Antikörper (**Abb.62:** Panel 4) als auch der P2X7-Inhibitor KN62 (**Abb.62:** Panel 5) die NAD-vermittelte Signaltransduktion inhibierte. Die Vorinkubation der Zellen mit dem NAD-Analogen etheno-NAD (**Abb.62:** Panel 2) blockierte das nach außen Kehren von Phosphatidylserin höchstwahrscheinlich durch etheno-ADP-Ribosylierung von P2X7.

3.4.2.4 Untersuchung der Zellzyklusabhängigkeit des NAD-induzierten nach außen Kehrens von Phosphatidylserin bei MD27-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten mit den MD27-Zellen war auffallend, dass es selbst bei subklonierten MD27-Zellen immer eine große Population von Zellen gab, die nicht auf NAD reagierte. Dies war verwunderlich, da 100% der Zellen sowohl P2X7 als auch ART2 auf einem hohen Level exprimierten (**siehe Abb.58**). Um zu untersuchen, inwieweit diese fehlende Sensitivität möglicherweise Zellzyklus-abhängig war, wurde ein Experiment zur Zellzyklusblockade durchgeführt. Hierzu wurden MD27-Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Zellzyklus-Inhibitoren behandelt (Yerly-Motta, Pavy et al. 1999). 1mM Nocodazole verhindert die Ausbildung des Spindelapparates in der Mitose. Die Zellen werden daher in der G_2 -Phase des Zellzyklus blockiert. 1mM Hydroxy-Harnstoff hemmt die Synthese von dNTPs und blockiert die Zellen damit in der S-Phase des Zellzyklus. Behandlung der Zellen mit 100 nM Staurosporin führt zur Inhibierung

cyklinabhängiger Kinasen, wodurch die Zellen in der G₁-Phase stehen bleiben. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde ein Teil der Zellen mit 80% Methanol fixiert und die DNA mit 1 µg/ml Propidiumjodid angefärbt, um in einer FACS-Analyse des DNA-Gehaltes die Zellzyklus-Blockade zu kontrollieren. Die übrigen Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µM NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Die Analyse des Zellzyklus ergab, dass die Inhibitoren die Zellen jeweils in den erwarteten Phasen des Zellzyklus blockiert hatten (**Abb.63 A**). Die unbehandelten Zellen zeigten eine für proliferierende Zellkulturzellen übliche Verteilung von G₁-, S- und G₂-Phase (**Abb.63 A**: Panel 2). Die Phasen lassen sich am relativen DNA-Gehalt der Zellen erkennen. 70% der Nocodazol behandelten Zellen waren in der G₂-Phase blockiert (**Abb.63 A**: Panel 1). Hydroxy-Harnstoff blockierte die Zellen in der G₁- und S-Phase (**Abb.63 A**: Panel 3), während der G₁-Peak bei mit Staurosporin behandelten Zellen mit 64% deutlich größer war als in der unbehandelten Kontrolle, bei der 32% in der G₁-Phase waren (Vergleiche **Abb.63 A**: Panel 2 und 4).

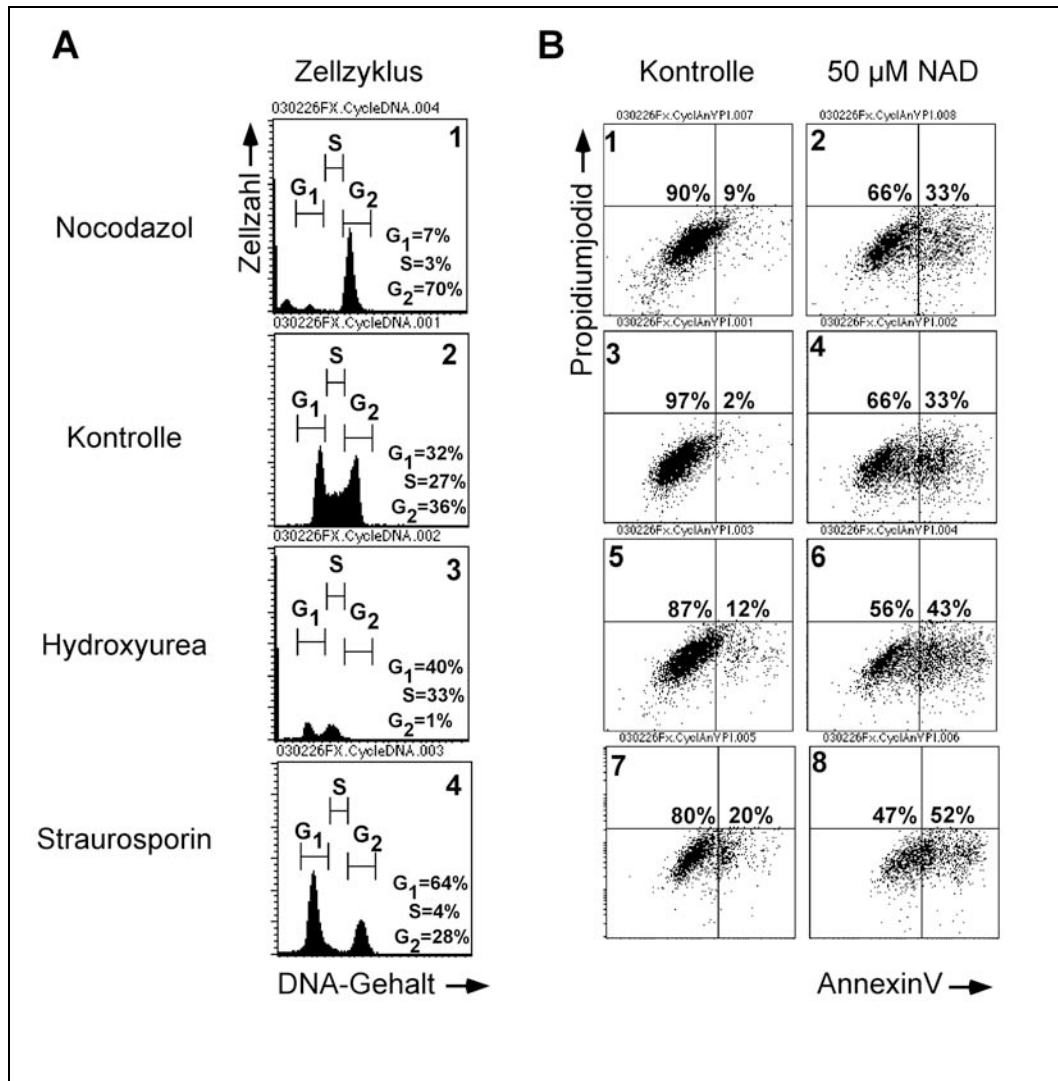


Abb. 63: Untersuchung der Zellzyklusabhängigkeit der Empfindlichkeit von MD27-Zellen gegenüber NAD. MD27-Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre mit unterschiedlichen Zellzyklus-Inhibitoren behandelt, um die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zu blockieren. Zur Analyse des Zellzyklus wurde ein Teil der Zellen Methanol-fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt mit Hilfe des FACS-Geräts bestimmt (**A**). Die übrigen Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µM NAD inkubiert, mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber NAD zeigte sich in jeder Phase des Zellzyklus eine Population resistenter Zellen (**Abb.63 B**). Hierbei war zu beachten, dass die mit Staurosporin behandelten Zellen bereits ohne NAD-Behandlung einen Hintergrund von 20% apoptotischen Zellen aufwiesen (**Abb.63 B**: Panel 7). In allen Ansätzen gab es eine Population nicht PS-flasher Zellen (**Abb.63 B**: Panel 2,4,6 und 8). Offensichtlich war die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber extrazellulärem NAD nicht vom Zellzyklus abhängig und muss andere Ursachen haben.

3.4.3 YAC-1.HH-Zellen

Die zweite auf extrazelluläres NAD reagierende Zelllinie, die der Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien identifiziert wurde, war YAC-1.HH. Es sollte auch hier die NAD-vermittelte Signaltransduktion mit bereits etablierten Verfahren genauer untersucht werden.

3.4.3.1 Vergleichende Untersuchung von YAC-1.H- und T-Zellen bezüglich Empfindlichkeit gegenüber NAD

Um die NAD-vermittelte Signaltransduktion bei YAC-1.HH-Zellen genauer zu untersuchen, wurden vergleichende Experimente mit T-Zellen durchgeführt. Dazu wurden aufgereinigte T-Zellen aus den Lymphknoten einer BALB/c Wildtyp Maus und YAC-1.HH-Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 25µM NAD inkubiert. Zur Blockade wurden die Zellen zuvor für 1 Stunde mit ART2-spezifischen Antikörpern behandelt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit AnnexinV-Bindpuffer gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der YAC-1.HH-Zellen mit NAD zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin führt (**Abb.64 A**: Panel 6). Bei den YAC-1.HH-Zellen reagierten jedoch, anders als bei den MD27-Zellen im vorangegangenen Kapitel, fast alle Zellen. Auch bei diesen Lymphomzellen führte weder NAD-Behandlung noch die Behandlung mit ATP (hier nicht gezeigt, siehe aber **Abb.69**) zu einem durch Anfärbbarkeit mit Propidiumjodid nachweisbaren Verlust der Membranintegrität, wie dies bei den T-Zellen zu sehen war (**Abb.64 A**: Panel 2). Bei T-Zellen und Lymphomzellen konnte das PS-Flashen durch die Vorinkubation mit ART2-spezifischen Antikörpern verhindert werden (**Abb.64 A**: Panel 4,8).

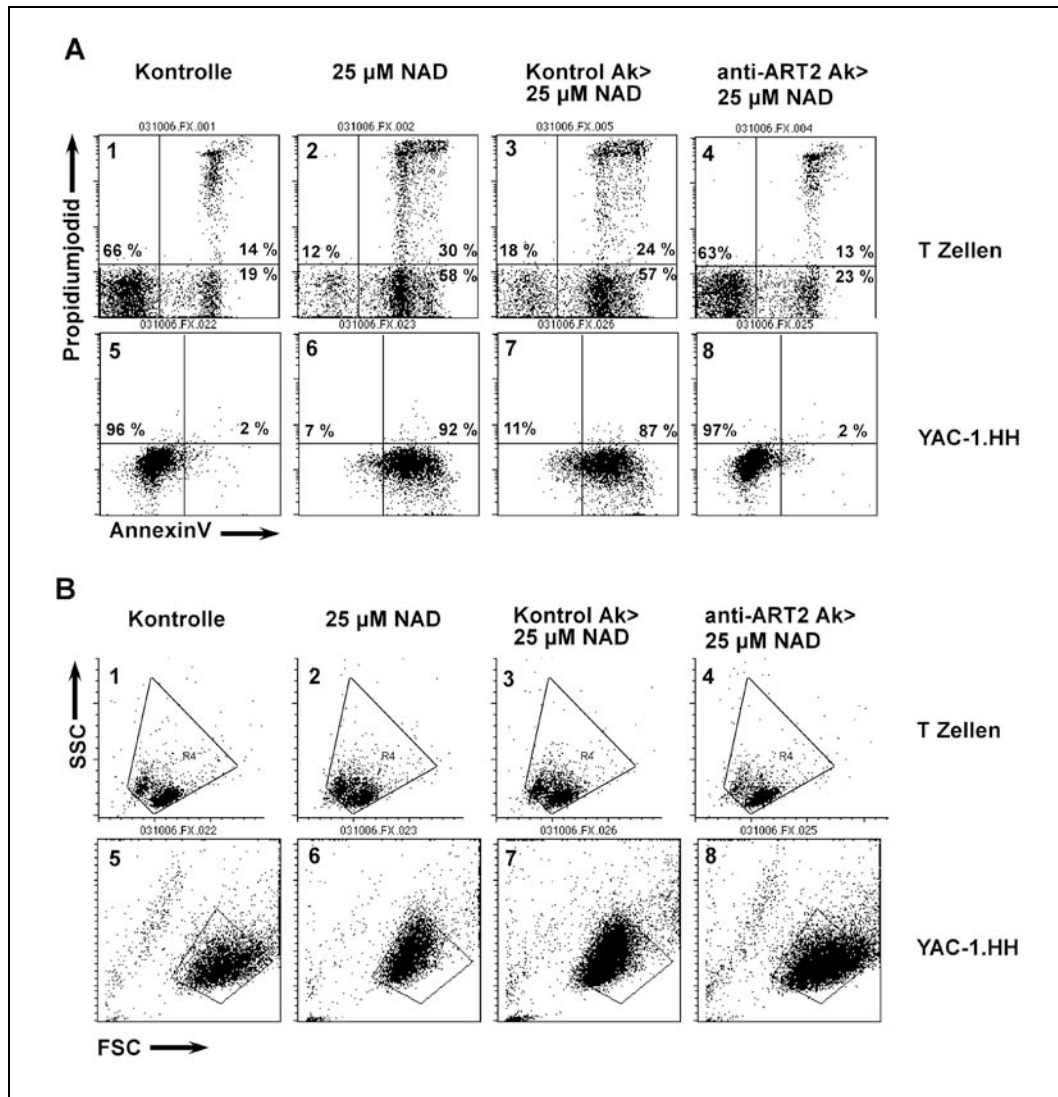


Abb. 64: Vergleichende Untersuchung von YAC-1.HH- und T-Zellen bezüglich Empfindlichkeit gegenüber NAD und ATP. YAC-1.HH-Zellen und aufgereinigten T-Zellen einer BALB/c Wildtypmaus wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 25 µM NAD behandelt. Zur Blockade wurden die Zellen zuvor mit ART2-spezifischen Antikörpern für 1 Stunde vorinkubiert. Im Anschluss an die NAD-Inkubation wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert. Ausgewertet wurden zum einen die Färbung mit AnnexinV und Propidiumjodid (**A**), zum anderen die morphologischen Veränderungen im Forward-/Sidescatter (**B**).

Die Behandlung mit NAD führte zu einem Schrumpfen der Zellen, was durch einen verringertes Signal im Forward-Scatter festgestellt werden konnte. Dies zeigte sich besonders deutlich bei den YAC-1.HH-Zellen (vergleiche **Abb.64B**: Panel 5 und 6), konnte aber auch bei den T-Zellen festgestellt werden (vergleiche **Abb.64B**: Panel 1 und 2). Interessanterweise konnte das Schrumpfen durch ART2-spezifische Antikörper verhindert werden (**Abb64 B**: Panel 4,8).

3.4.3.2 Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin und morphologischer Veränderungen bei YAC-1.HH-Zellen

Um die Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin und der Änderungen der Zellmorphologie bei YAC-1.HH-Zellen genauer zu untersuchen, wurden Echt-Zeit-Experimente durchgeführt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 700 μl 37°C warmem RPMI aufgenommen, welches bereits 2 mM CaCl_2 , 1 $\mu\text{g/ml}$ AnnexinV-FITC und 10 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid enthielt. Nachdem die Zellen für 5 Minuten in einem FACS-Röhrchen im Wasserbad auf 37°C gehalten wurden, begann die Echtzeit-Messung im FACS. Um die Temperatur in den Röhrchen bei 37°C zu halten, wurde während der Messung ein im Wasserbad auf 37°C erhitztes Gel-Kissen um die Röhrchen gewickelt. Durch die Wahl eines Zeit-Intervalls von 500 ms für die Echtzeitmessung ergab sich eine Gesamtmesszeit von 8,5 Minuten. Nach einer ersten Minute für die Messung der Basisfluoreszenz wurde das Röhrchen für kurze Zeit aus dem Durchflusszytometer genommen und die entsprechende Menge einer Stocklösung NAD bzw. ATP in einem kleinen Volumen hinzupipettiert und die Messung für 7 weitere Minuten fortgesetzt.

Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Behandlung von YAC-1.HH-Zellen mit ATP und NAD innerhalb von wenigen Sekunden zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin führt. Der Effekt war nach der ATP-Behandlung etwas schneller als nach Behandlung mit NAD (**Abb.65 A**).

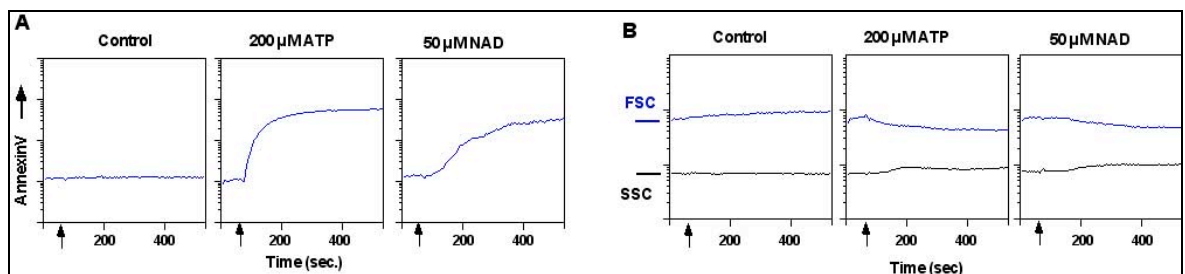


Abb. 65 Echtzeit-Untersuchung des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin und der morphologischen Veränderung nach NAD- und ATP-Behandlung. YAC-1.HH-Zellen wurden in warmem AnnexinV-FITC, Propidiumjodid und 2mM CaCl_2 enthaltendem RPMI-Medium in FACS-Röhrchen aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Während der FACS-Echtzeit-Messung wurde nach 1 Minute (siehe Pfeile) das Röhrchen für wenige Sekunden aus dem FACS-Gerät entfernt und die entsprechende Menge an ATP oder NAD als konzentrierte Stocklösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Echtzeitmessung umgehend fortgeführt. Mit Hilfe eines im Wasserbad vorgewärmten Heizpacks wurde die Temperatur in dem Röhrchen bei 37°C gehalten. **(A)** zeigt den Verlauf der mittleren Fluoreszenz über die Zeit von 8 Minuten. In **(B)** werden Forwardscatter und Sidescatter als Funktionen über die Zeit dargestellt.

Bezüglich der morphologischen Änderungen zeigte sich nach dem Hinzupipettieren des Agonisten ATP innerhalb von Sekunden eine Änderung sowohl im Forward-Scatter, anhand dessen die Zellgröße abgeschätzt werden kann, als auch im Sidescatter, der die Granularität der Zellen nachweist (**Abb.65 B**). Dieser Effekt war nach NAD-Behandlung auch sichtbar, trat jedoch erst nach Minuten ein.

3.4.3.3 Calciumflux-Untersuchung nach ATP- und NAD-Behandlung bei YAC-1.HH-Zellen

Zur Untersuchung des Calciumflux in YAC-1.HH-Zellen nach ATP- und NAD-Behandlung wurden die Zellen mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo3 angefärbt und in einem kleinen Volumen auf Eis gehalten. Die Zellen wurden dann für die Echtzeitmessung in einem größeren Volumen 37°C warmem oder 4°C kaltem PBS mit 1% FCS, 1 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach einer Minute Echtzeitmessung im FACS wurden die FACS-Röhrchen kurz aus dem FACS-Gerät entfernt, die angegebenen Konzentrationen an ATP oder NAD wurden hinzugegeben und die Messung fortgesetzt. Die Temperatur in den Röhrchen war durch vorgewärmte bzw. vorgekühlte Gel-Kissen, die um das FACS-Röhrchen gewickelt wurden, konstant gehalten worden. Zur Kontrolle wurde das Calcium-Ionophor Ionomycin verwendet.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Inkubation von YAC-1.HH-Zellen mit extrazellulärem ATP zu einem Calciumflux binnen weniger Sekunden führte (**Abb.66**: Panel 3,4). Der maximal messbare Calciumflux nach ATP-Behandlung wurde bei einer Konzentration von 500 µM erreicht. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Aktivierung des P2X7 Rezeptors auch bei YAC-1.HH-Zellen temperaturabhängig war. Der Calciumflux wurde bei 4°C inhibiert (**Abb.66**: Panel 5).

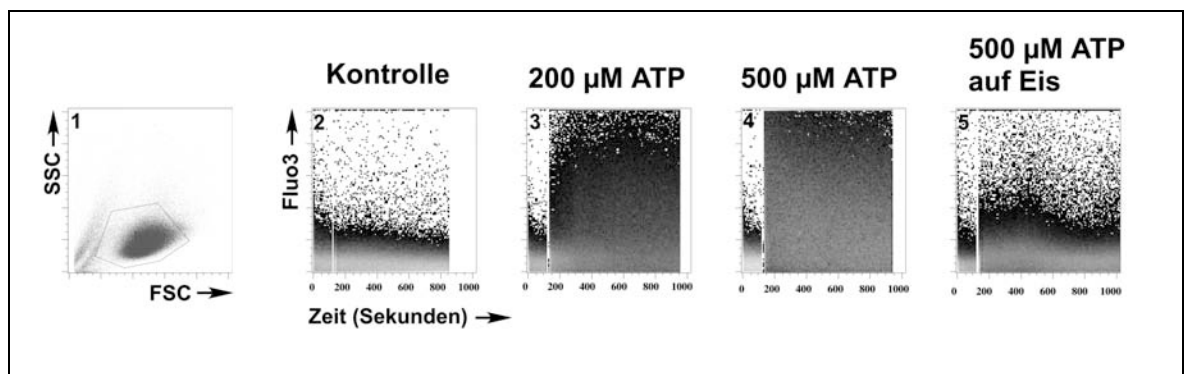


Abb. 66: Calciumflux nach ATP-Behandlung von YAC1-HH Zellen. YAC1-HH Zellen wurden mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo3 angefärbt und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden für die jeweilige Echtzeitmessung im FACS-Gerät in 37°C warmem oder 4° kaltem RPMI mit 1mM CaCl₂ aufgenommen. Nach 1 Minute wurde dann ATP in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben (Zeitpunkt an weißer Lücke im Plot zu erkennen). Während der Messung wurde die angegebene Temperatur durch ein Wärme- oder Kältepack gewährleistet. Calciumflux in die Zellen wird durch ein Ansteigen der Fluoreszenz nachgewiesen.

Behandlung von YAC-1.HH-Zellen mit NAD führte ebenfalls zu einem deutlich detektierbaren Calciumflux. Dieser war jedoch im Vergleich zur ATP-Behandlung erst nach einer Verzögerung sichtbar (**Abb.67**: Panel 4). Niedrigere Konzentrationen von NAD lösten ebenfalls Calciumflux aus, der jedoch noch stärker verzögert auftrat (**Abb.67**: Panel 3). Das Calcium-Ionophor Ionomycin führte wie erwartet zu einem raschen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (**Abb.67**: Panel 5).

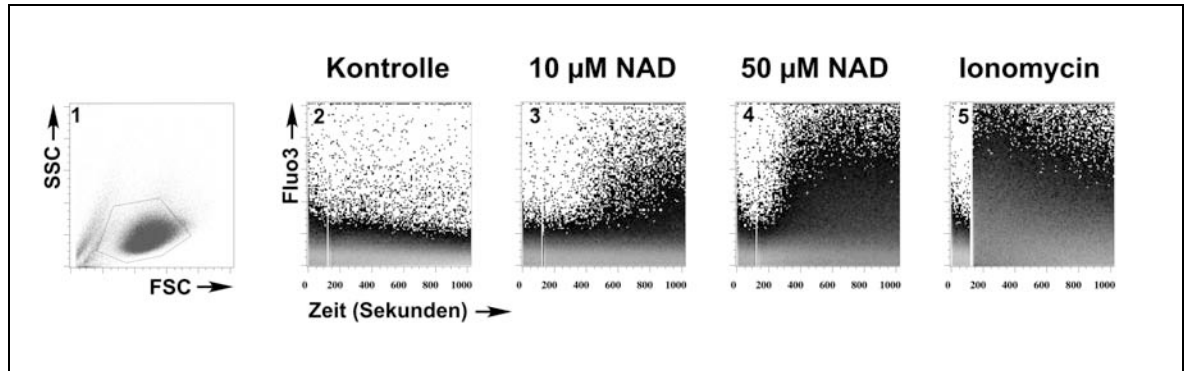


Abb. 67: Calciumflux nach NAD-Behandlung von YAC1-HH Zellen. YAC1-HH Zellen wurden mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo3 angefärbt und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden für die jeweilige Echtzeit-Messung im FACS-Gerät in 37°C warmem RPMI mit 1mM CaCl₂ aufgenommen. Nach 1 Minute wurde dann NAD oder das Calcium-Ionophor Ionomycin hinzugegeben (Zeitpunkt an weißer Lücke im Plot zu erkennen). Während der Messung wurde die angegebene Temperatur durch ein Wärmepack gewährleistet. Calciumflux in die Zellen wird durch ein Ansteigen der Fluoreszenz nachgewiesen.

3.4.3.4 Abstoßen von CD62L nach Behandlung mit NAD oder dem Phorbol ester PMA

Eine der Folgen der NAD-Behandlung bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen des NAD-induzierten Zelltods von murinen T-Zellen war das Abstoßen von CD62L von der Zelloberfläche. Es sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus auch bei den YAC-1.HH-Zellen nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurden YAC-1.HH-Zellen für 30 Minuten in Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 μM NAD oder 100 ng/ml des Phorbol esters PMA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD62L angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert. Tatsächlich konnte das bei T-Zellen beobachtete Abstoßen von CD62L nach NAD-Behandlung auch bei den YAC-1.HH-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 68**). Die Aktivierung der Zellen mit PMA führte zu einem vergleichbaren Shedding von CD62L. Die Tatsache, dass YAC-1.HH-Zellen nach NAD-Behandlung und PMA-Stimulation CD62L abstoßen und somit eine mit T-Zellen vergleichbare Reaktion zeigen, spricht für eine gute Eignung der YAC-1.HH-Zellen als Zellkulturmodelle für die NAD-vermittelte ART2-abhängige Signaltransduktion.

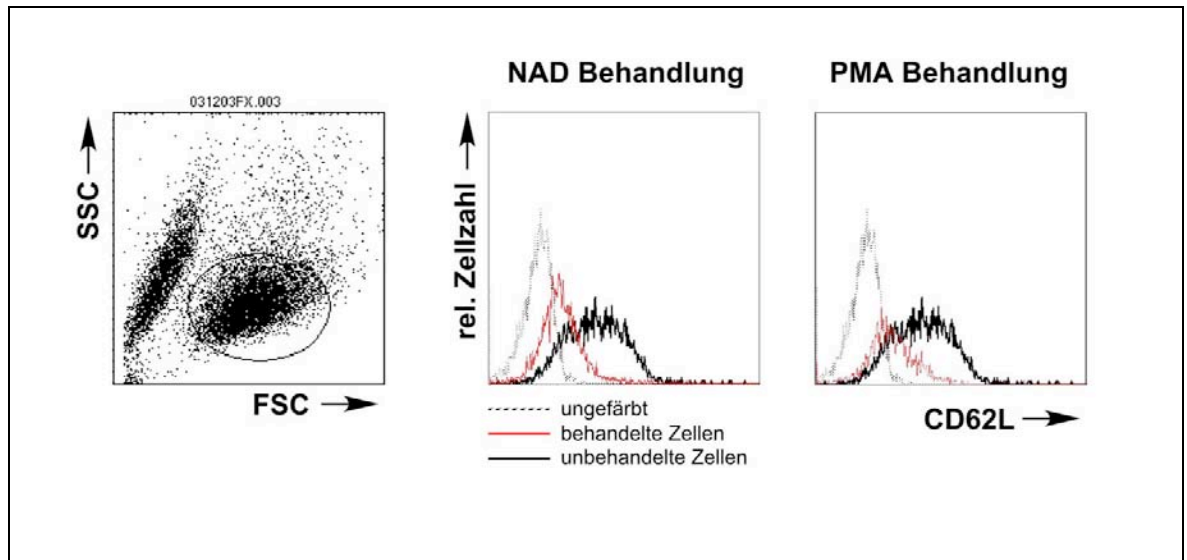


Abb. 68: Abstoßen von CD62L nach Behandlung mit NAD oder dem Phorbolster PMA. YAC-1.HH-Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von 100µM NAD oder 100 ng/ml Phorbol-12-myristat-12-acetat (PMA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Fluorochrom-gekoppelten, gegen CD62L gerichteten Antikörper angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz gegen die relative Zellzahl.

3.4.3.5 Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber NAD durch Transfektion von P2X7

Die beiden Varianten der YAC-1 Zellen, YAC-1.HH-Zellen und YAC-1.ATCC-Zellen, boten eine gute Möglichkeit, die Interaktion zwischen ART2 und P2X7 nachzuweisen, indem die gegenüber NAD-resistenten YAC-1.ATCC-Zellen stabil mit P2X7 transfiziert wurden. Die cDNA des Wildtyp P2X7 war in den Expressionsvektor pcDNA6 kloniert worden und die YAC-1.ATCC-Zellen waren mittels Elektroporation stabil transfiziert und anschließend durch FACS-Sortierung 5 mal auf hohe P2X7-Expression sortiert worden. **Abbildung 69 B** zeigt eine Übersicht der Expression von ART2 und P2X7 bei den nun 3 YAC-1-Varianten. YAC-1.HH-Zellen exprimierten sowohl P2X7 als auch ART2 auf einem mittelstarken Niveau (**Abb.69 B**: Panel 1,2). Die YAC-1.ATCC-Zellen hingegen zeigten nur schwache Expression von ART2 und kaum nachweisbare P2X7-Expression (**Abb.69B**: Panel 4,5). Interessanterweise steigerte die FACS-Sortierung der P2X7-Transfektanten auf hohe P2X7-Expression auch die endogene ART2-Expression (**Abb.69 B**: Panel 7,8).

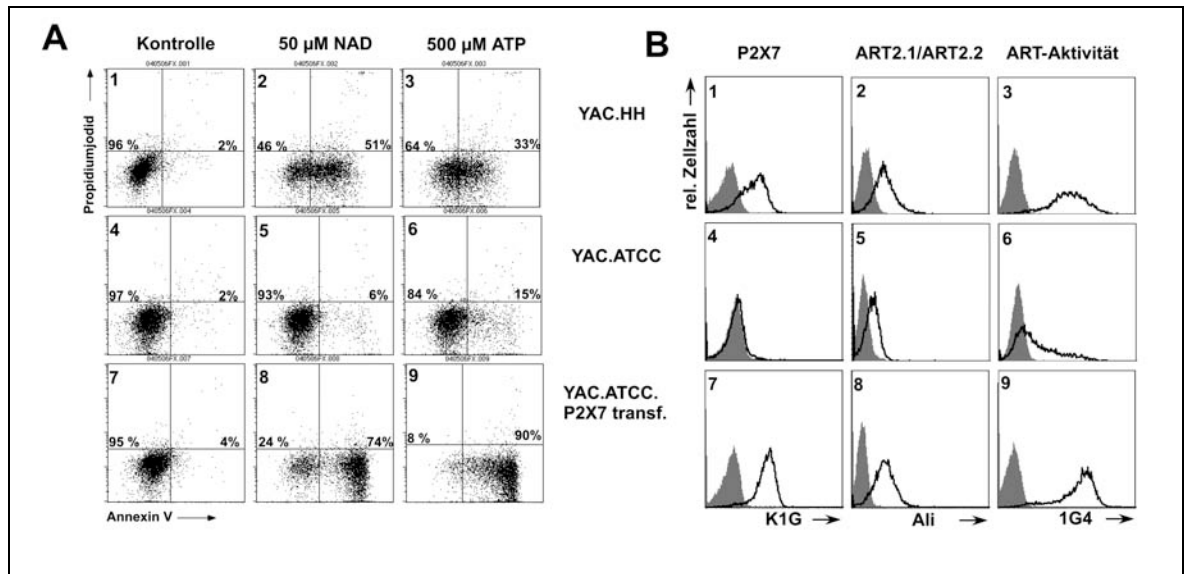


Abb. 69: Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber NAD durch Transfektion von P2X7. YAC-1.HH-, YAC-1.ATCC- und YAC-1.ATCC.P2X7-Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von NAD oder ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen, mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid angefärbt und im FACS analysiert (**A**). Parallel wurden die Zellen auch mit Antikörpern gegen P2X7 (**B** Panels 1,4,7) und ART2 (**B** Panels 2,5,8) inkubiert und mit entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt (graue Kurve: nur Sekundärantikörper). Zur Messung der ART-Aktivität wurden die Zellen für 20 Minuten mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Fluorochrom-gekoppelten 1G4-Antikörper, der etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine erkennt, angefärbt (**B** Panels 3,6,7)(graue Kurve ohne etheno-NAD). Tote Zellen wurden durch Propidiumjodid-Färbung ausgeschlossen.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass durch die Komplettierung der beiden Interaktionspartner ART2 und P2X7, durch stabile Transfektion von YAC-1.ATCC-Zellen mit P2X7, die Sensitivität gegenüber NAD wieder hergestellt werden konnte (vergleiche **Abb.69A**: Panel 5 und 8).

3.4.3.6 Patch-Clamp-Untersuchung bei YAC-1.HH-Zellen

Im Rahmen des Aufbaustudienganges Molekularbiologie am ZMNH hatte ich die Möglichkeit, im Labor von Dr. Robert Bähring Patch-Clamp-Untersuchungen durchzuführen. Da sich T-Zellen für Patch-Clamp-Untersuchungen aufgrund ihrer geringen Größe nicht eignen, wurden YAC-1.HH-Zellen verwendet. Da für Patch-Clamp-Messungen adhärent wachsende Zellen benötigt wurden, die YAC-1.HH-Zellen aber als Suspensionszellen wachsen, wurden die Zellen mit Hilfe eines anti-LFA-1-Antikörpers an Kulturschalen gebunden, die über Nacht mit einem Sekundärantikörper ge-coated worden waren.

Bei der Patch-Clamp-Untersuchung an Zellen kann das chemische Potential zwischen intrazellulärer Lösung und extrazellulärer Lösung über die Zellmembran einer gesamten Zelle gemessen werden. Hierzu wurde eine Elektrode mit Hilfe einer Glaspipette in das Innere der Zelle gebracht. Die Pipette wurde hierzu direkt an die Zellmembran geführt und durch Anbringen eines Unterdrucks wurde eine elektrische Isolierung der Elektrode in der Pipette zur extrazellulären Flüssigkeit hergestellt. Es wurde dann durch weiter erhöhten Unterdruck ein Stück („Patch“) aus der Zellmembran herausgerissen, so dass die Elektrode nun in „Ganzzell-Konfiguration“ war. Es

konnte nun der Widerstand, den die gesamte Zellmembran erzeugt, gemessen werden. In diesen Experimenten wurden die Zellen dann mit Hilfe einer Perfusionspumpe mit 1mM NAD oder 1mM ATP überspült. Die Öffnung von P2X7 ließ sich durch einen Strom nachweisen. Dargestellt ist die über die Elektrode injizierte negative Ladung, die notwendig ist, das Potential der Zelle konstant zu halten.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP zur einer Kanalöffnung binnen weniger Millisekunden führte. Nach dem Entfernen des Agonisten schloss sich der Kanal umgehend (Abb.70 C).

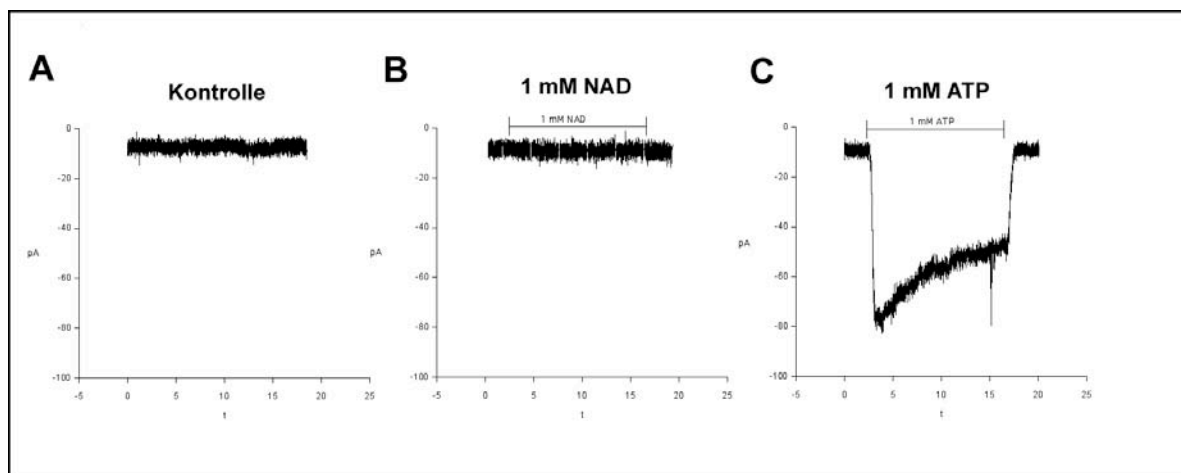


Abb. 70: Patch-Clamp-Untersuchung bei YAC1-HH Zellen. YAC-1 HH Zellen wurden für 1 Stunde mit einem Ratten-Antikörper gegen das Integrin LFA-1 inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine Mini-Kulturschale gegeben, die über Nacht mit einem anti-Ratten-IgG Antikörper ge-coated worden waren. Es wurde den Zellen 1 Stunde Zeit gegeben, sich auf der Kulturschale abzusetzen. Einzelne nun adhärenente Zellen wurden dann mit Hilfe einer Patch-Clamp-Glaspipette in „Ganz-Zell-Konfiguration“ gepatcht. Der elektrische Widerstand über die gesamte Zellmembran wurde gemessen. Jeweils für 10-15 Sekunden wurde mit Hilfe einer Perfusionspumpe EC-Puffer (A), 1 mM NAD (B) oder 1 mM ATP (C) in einem Flüssigkeitsstrom über die Zelle gegeben. Änderungen des Widerstands über die Zellmembran kommen hierbei durch Öffnen von P2X7 zustande.

Dieser Effekt konnte durch Überspülen der Zellen mit 1 mM NAD zumindest in dieser kurzen Zeitspanne nicht ausgelöst werden (Abb.70 B). Das Überspülen der Zellen mit extrazellulärer Lösung führte zu keiner Kanalöffnung (Abb.70 A). Insgesamt zeigt diese Untersuchung eine unterschiedliche Kinetik der P2X7-Kanalöffnung nach Stimulation mit ATP oder NAD.

3.5 Herausforderung des Immunsystems ART2-defizienter Tiere

ART2-defiziente Mäuse sind unter den sterilen Haltungsbedingungen der Versuchstierhaltung phänotypisch unauffällig. Sie zeigen eine normale Verteilung der T-Zell Subpopulationen in Thymus und Peripherie (Ohlrogge, Haag et al. 2002). Um eine mögliche Rolle der ART2-vermittelten Signaltransduktion bei Immunreaktionen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Pilotexperimente zur Herausforderung des Immunsystems ART2-defizienter Mäuse durchgeführt.

3.5.1 Immunisierung mit einem T-Zell abhängigen Antigen: Ovalbumin-TNP

Als Herausforderungen des Immunsystems wurden Immunisierungen mit Ovalbumin-TNP und *Staphylococcus aureus* Entertoxin B (SEB) durchgeführt. Es sollte zunächst untersucht werden, ob die T-Zellen ART2-defizienter Mäuse in der Lage sind, als T-Helfer-Zellen B-Zellen zu aktivieren, damit diese Antigen-spezifische Antikörper produzieren. Zu diesem Zweck wurden vier Wildtyp und vier ART2-defiziente Mäuse mit dem T-Zell abhängigen Antigen Ovalbumin-TNP immunisiert. Den Mäusen wurde vor der ersten Immunisierung retroorbital Blut abgenommen, um Präimmun-Seren (PIS) zu gewinnen. Die Mäuse wurden dann an Tag 0 mit 30 µg Ovalbumin-TNP in 300 µl komplettem Freund's Adjuvans (CFA) subcutan immunisiert. An Tag 10 wurde wieder Blut entnommen, um Seren nach der Grundimmunisierung zu gewinnen. Der erste Boost wurde dann an Tag 14 unternommen. Hierbei wurden 30 µg Ovalbumin-TNP in 300 µl unkompletten Freund's Adjuvans (i.FA) subcutan gespritzt. Weitere 10 Tage später wurde an Tag 24 das Immuneserum nach dem ersten Boost entnommen. An Tag 28 wurde der zweite Boost mit wiederum 30 µg Ovalbumin-TNP in 300 µl i.FA durchgeführt. Die Immuneseren des zweiten Boosts wurden an Tag 38 gewonnen.

Um Antigen-spezifische Antikörper in den Seren der immunisierten Tiere nachzuweisen, wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA durchgeführt und in einem ELISA-Reader bei 420/650 nm ausgewertet.

Es zeigte sich in diesem Immunisierungs-Experiment, dass die ART2-defizienten Mäuse eine den Wildtypmäusen vergleichbare Immunreaktion auf das T-Zell abhängige Antigen Ovalbumin-TNP zeigten. Bereits nach der Grundimmunisierung konnten bei allen Mäusen Antigen-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (**Abb.71**). Nach dem ersten und zweiten Boost konnten die Antikörper auch in höheren Verdünnungen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass alle Tiere mit einer Antikörperantwort reagierten, wobei es innerhalb beider Gruppen starke individuelle Unterschiede gab.

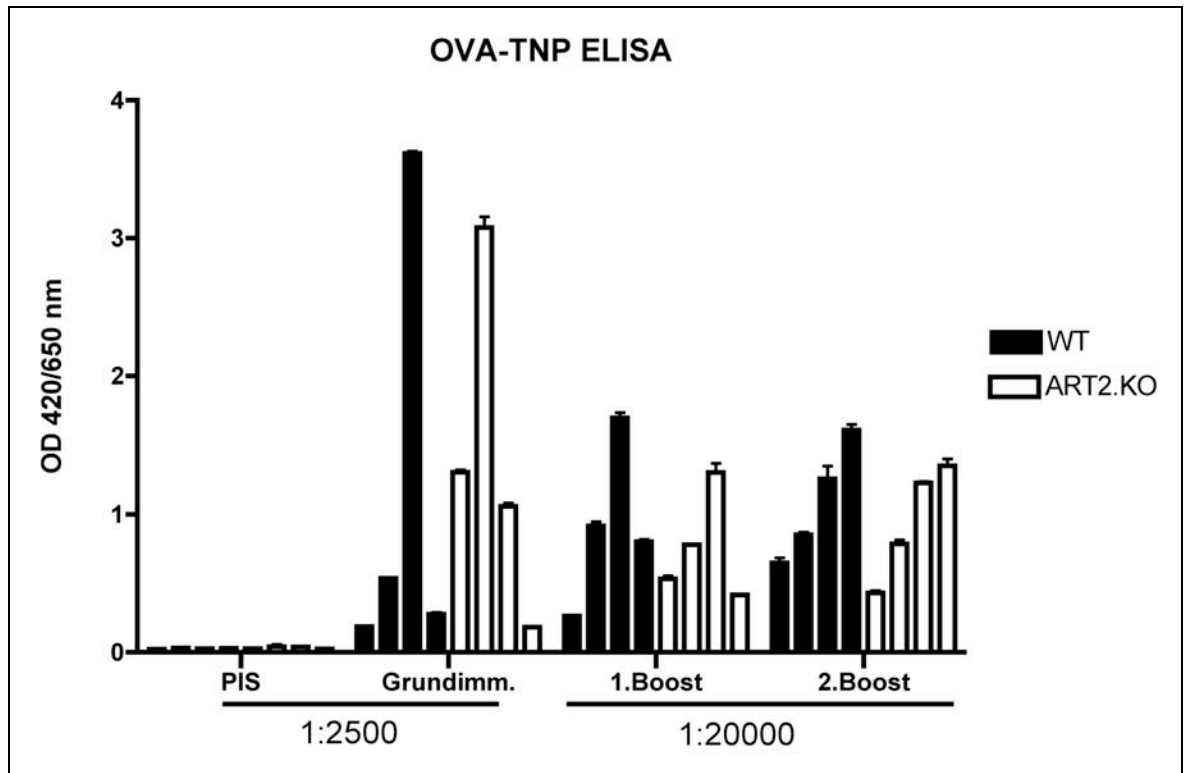


Abb. 71: Bestimmung spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit dem T-Zell abhängigen Antigen Ovalbumin-TNP. Immunseren von je 4 BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen wurden durch Blutentnahme vor der Immunisierung und jeweils 10 Tage nach der Erst-Immunsierung und den Booster-Immunsierungen mit 30µg Ovalbumin-TNP gewonnen. Angegebene Verdünnungen der Seren wurden auf 96 well Platten, die über Nacht mit 1µg/Napf mit Ovalbumin-TNP gecoatet worden waren, gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation wurde vielfach gewaschen und für eine weitere Stunde mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Maus-IG-Antikörper inkubiert. Nach erneutem mehrfachen Waschen wurde ein Enzymsubstrat für 20 Minuten hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit Stopplösung beendet. Ausgewertet wurde im Photometer die Extinktion bei 420/650 nm. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Doppelbestimmung der Werte.

Es zeigte sich, dass ART2-defiziente T-Zellen die Fähigkeit haben, als T Helfer-Zellen eine Antikörperantwort zu unterstützen.

3.5.2 Superantigen (SEB) vermittelte Expansion und Deflation der den V β 8 T-Zellrezeptor exprimierenden T-Zell-Population

Als weiteres Modell einer Herausforderung des Immunsystems wurde eine Immunisierung mit dem Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) durchgeführt (Spaner, Sheng-Tanner et al. 2002). Bakterielle Superantigene werden nicht als Peptide prozessiert auf MHC-Molekülen präsentiert, sondern binden direkt MHC und T-Zellrezeptor (Janeway 2001). SEB aktiviert durch Binden an einen bestimmten T-Zellrezeptor mit V β -8 Kette polyklonal V β 8+ T-Zellen. Es kommt zu einer raschen Proliferation der V β 8+ T-Zellpopulation. Nach kurzer Zeit sterben diese Zellen durch Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) und die Population geht wieder zurück.

Um zu untersuchen, ob die Superantigen vermittelte Expansion und Deflation der den V β 8 T-Zellrezeptor tragenden T-Zellen auch bei ART2-defizienten Mäusen stattfindet, wurden ART2-defiziente und BALB/c Wildtyp Mäuse mit SEB immunisiert.

In **Abbildung 72** ist der Injektionsplan dieses Experiments dargestellt. Je 16 Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden i.p. mit 50 µg SEB immunisiert. Nach 3, 4, 10 und 14 Tagen wurden jeweils 4 Mäuse getötet und Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten gewonnen. An Tag 10 wurden jeweils 8 ART2-defiziente und 8 Wildtyp Tiere erneut mit 50 µg SEB i.p. immunisiert, um zu untersuchen, ob die den (AICD) überlebenden Vβ8⁺ T-Zellen in Wildtyp und ART2-defizienten Tieren gleichermaßen anergisiert wurden.

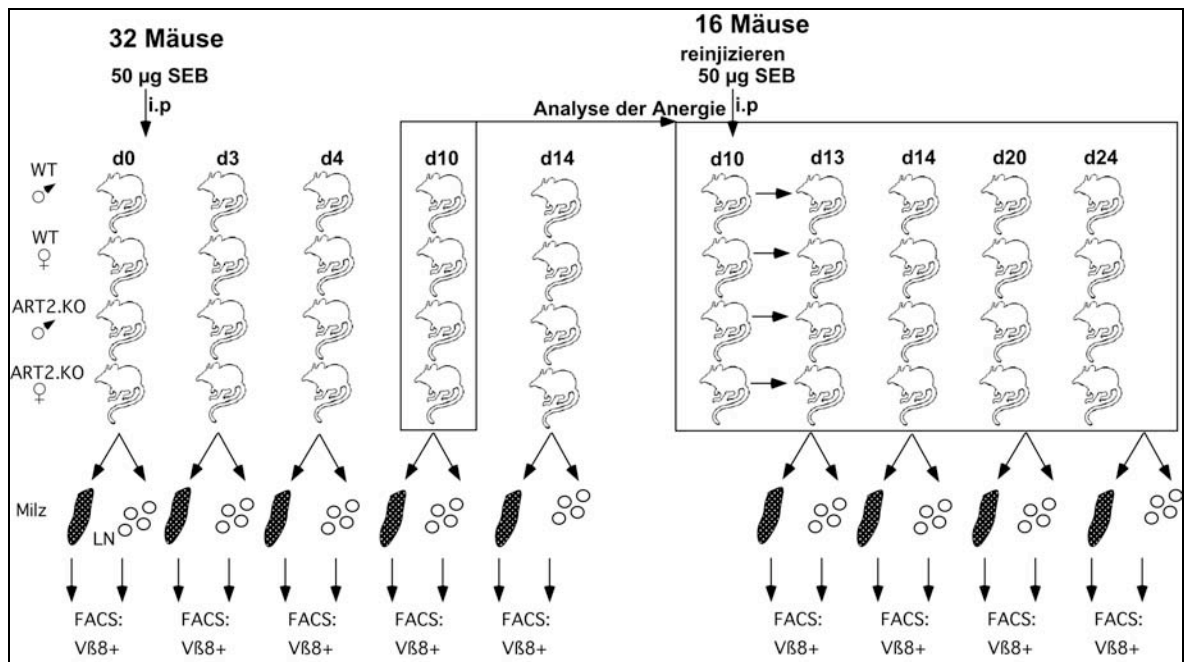


Abb. 72: Injektionsplan für die Herausforderung des Immunsystems durch *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Je 16 Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden mit 50 µg SEB i.p. immunisiert. Jeweils 8 Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden nach 10 Tagen erneut immunisiert. An Tag 0, 3, 4, 10, 14 nach der Grundimmunisierung und Tag 3, 4, 10 und 14 nach der zweiten Immunisierung wurden jeweils 4 Tiere getötet und Lymphknoten und Milz für die Untersuchung der T-Zellen entnommen.

Die isolierten Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen den Vβ8 T-Zell Rezeptor, CD3, CD4 und CD8 angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl Wildtyp als auch ART2-defiziente Mäuse auf eine Immunisierung mit SEB gleichermaßen mit einer Proliferation der Vβ8⁺ T-Zellen reagierten. Deutlich wird dies durch den relativen Anstieg der Vβ8-tragenden T-Zellpopulationen an Tag 3 nach der Immunisierung (**Abb.73**). Dies konnte sowohl in Lymphknoten (**Abb.73 B,C**) als auch Milz (**Abb.73 D,E**) sowie bei CD4⁺ T-Helfer- und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden. Die Expansion der Vβ8⁺ T-Zellen ging jeweils innerhalb eines Tages wieder zurück. Der Anteil der Vβ8⁺ T-Zellen war 14 Tage nach der Immunisierung niedriger als vor der Immunisierung.

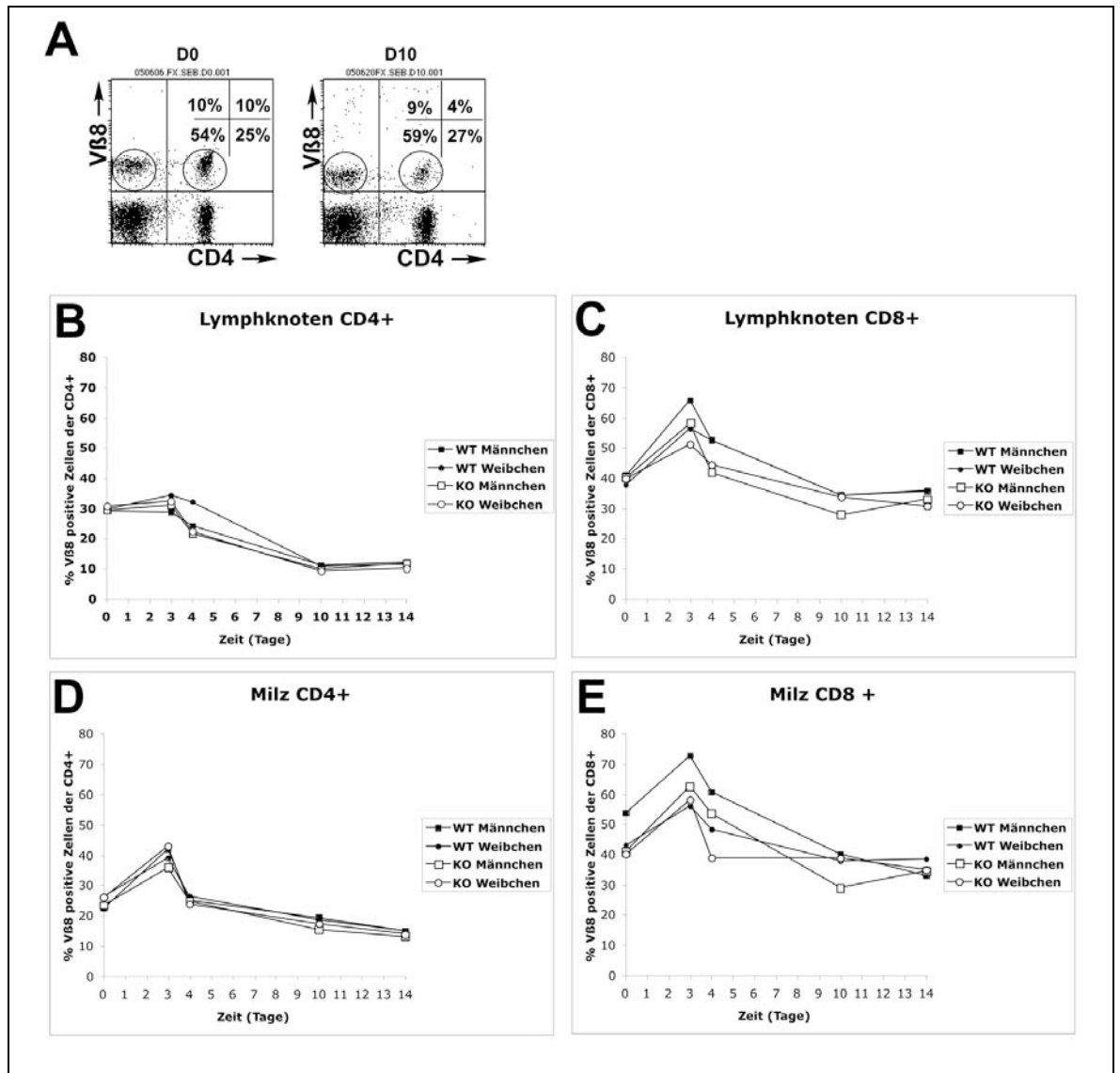


Abb. 73: Vergleichende Untersuchung zur Expansion der V β 8 T-Zellrezeptor tragenden T-Zellen nach Immunisierung mit SEB. Je 8 BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden an Tag 0 mit 50 μ g SEB i.p. immunisiert. Vor und an Tag 3, 4, 10, 14 nach der Grundimmunisierung wurden jeweils 2 Tiere getötet und Lymphknoten (B,C) und Milz (D,E) entnommen. Gesamtlymphozyten wurden aus Milz und Lymphknoten gewonnen und mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und den V β 8 T-Zell-Rezeptor angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. Prozentzahlen entsprechen jeweils dem Anteil V β 8 T-Zellrezeptor tragenden Zellen der T-Helfer (B,D) und cytotoxischen T-Zellpopulation (C,E). Gegattet wurde auf die eingekreisten Populationen (A).

Bei den nach 14 Tagen erneut immunisierten Tieren konnte festgestellt werden, dass sowohl bei Wildtyp als auch bei ART2-defizienten Mäusen die V β 8+ T-Zellen fast vollständig anergisiert waren. Es kam nach der Injektion zu keinem bzw. einem sehr viel schwächeren Anstieg der V β 8+ Zellen. Dieser Effekt war in Lymphknoten und Milz sowohl bei den CD4+ T-Zellen als auch bei den CD8+ T-Zellen festzustellen (Abb.74).

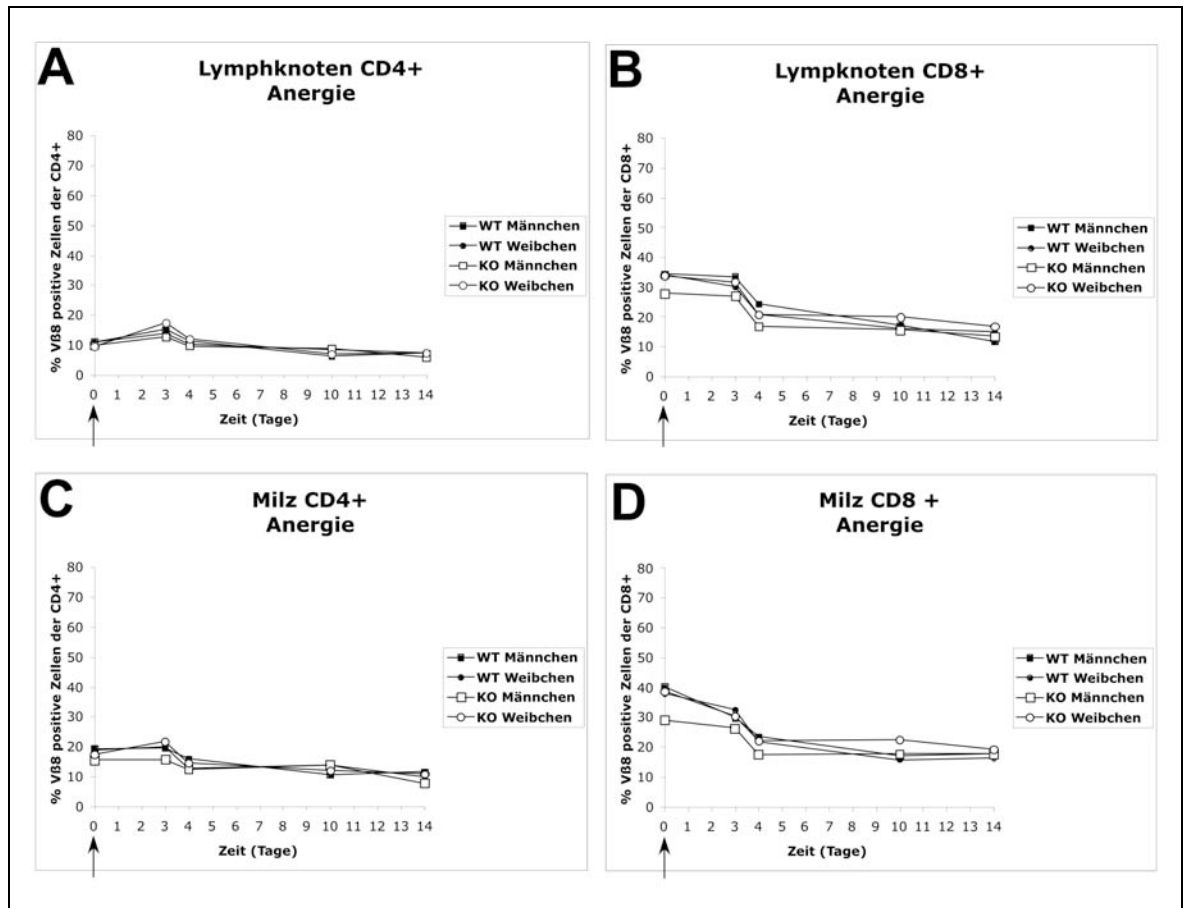


Abb. 74: Vergleichende Untersuchung der Anergie nach erneuter Immunisierung mit SEB. Je 8 BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse, die mit 50 µg SEB i.p. grundimmunisiert worden waren, wurden nach 10 Tagen erneut mit 50µg SEB i.p. immunisiert (Pfeil). Vor und an Tag 3, 4, 10, 14 nach der Boosterimmunisierung wurden jeweils 2 Tiere getötet und Lymphknoten und Milz entnommen. Gesamtlmphozyten wurden aus Milz und Lymphknoten gewonnen und mit Antikörpern gegen CD8, CD4 und den Vβ8 T-Zell-Rezeptor angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. Prozentzahlen entsprechen jeweils dem Anteil Vβ8 T-Zell-Rezeptor tragenden Zellen der T-Helfer und cytotoxischen T-Zellpopulation.

Dieses Experiment zeigt, dass ART2-defiziente T-Zellen weitgehend normal durch Superantigene aktiviert und anergisiert werden können.

3.5.3 Concanavalin A induzierte Autoimmunhepatitis

Im Folgenden sollten nun Herausforderungen des Immunsystems untersucht werden, während deren Verlauf es zur Lyse von Zellen und damit zu einer Freisetzung von NAD kommen könnte. Ein interessantes Modell stellt die durch Concanavalin A induzierte Autoimmunhepatitis dar. Das Lektin Concanavalin A kann durch Bindung an T-Zellrezeptoren diese vernetzen und T-Zellen polyklonal aktivieren. Dies führt binnen 24 Stunden zu einer T-Zell abhängigen Autoimmunhepatitis, bei der es zu einer massiven Infiltration von Makrophagen in die Leber und zu Gewebeschädigungen kommt (Tiegs, Hentschel et al. 1992). Das Fortschreiten der Autoimmunhepatitis kann durch Messung der Leberenzyme im Serum verfolgt werden (Chen, McCallip et al. 2001).

In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, inwieweit die polyklonale T-Zell-Aktivierung und Lymphozyten-Infiltration in die Leber nach Concanavalin A Injektion in Wildtyp und ART2-

defizienten Tieren vergleichbar verläuft. Zu diesem Zweck wurde je 2 ART2-defizienten und 2 Wildtyp Mäusen 12 mg/Kg ConA in einem Volumen von 200 µl PBS in die Schwanzvene injiziert. Zur Kontrolle wurde je einer Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus 200 µl PBS injiziert (**Abb.75**: Panel 1,4). Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und Lymphozyten aus Milz und Leber isoliert. Die Lymphozyten wurden anschließend mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor sowie gegen den Aktivierungsmarker CD69 angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert (**Abb.75** und **76**).

Es zeigte sich in diesem Experiment, dass sowohl in ART2-defizienten als auch bei Wildtyp-Tieren die Injektion von Concanavalin A zu einer Aktivierung von T-Zellen führte. Hierbei konnte bei ART2-defizienten Mäusen ein mit Wildtyp Mäusen vergleichbarer Anteil aktivierter T-Zellen und CD3 negativer B-Zellen festgestellt werden (**Abb.75**: Panel 2,3 und 5,6).

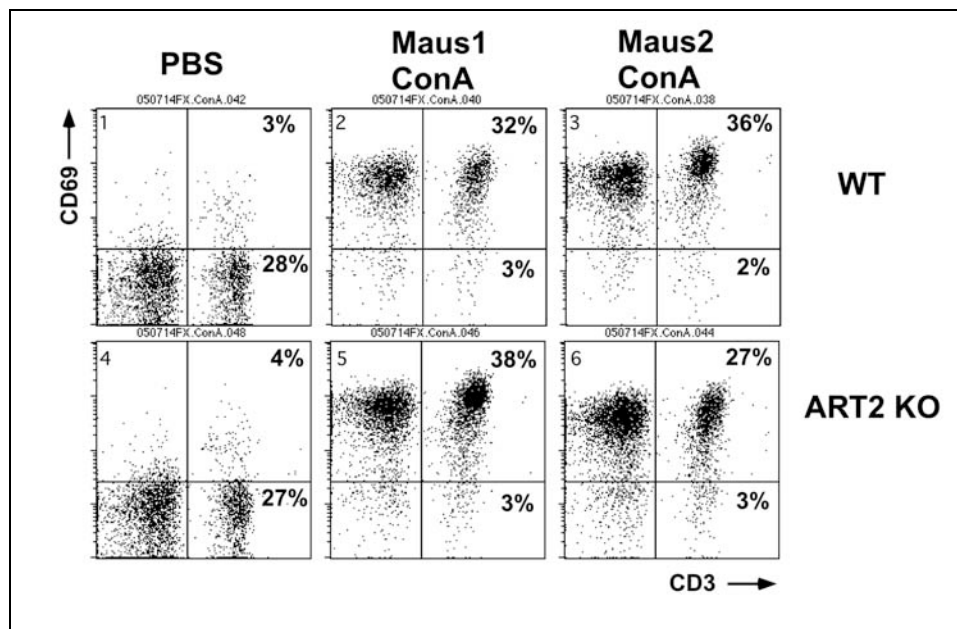


Abb. 75: Vergleichende Untersuchung zur Aktivierung von Milzlymphozyten nach i.v. Injektion von Concanavalin A. Je 2 BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen wurden 25 mg/kg Concanavalin A i.v. in die Schwanzvene injiziert. Zur Kontrolle wurde jeweils einer BALB/c Wildtyp und einer ART2-defizienten Maus PBS injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und Lymphozyten aus der Milz gewonnen. Die Lymphozyten wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD69 angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert.

Auch die Vermehrung aktivierter T-Lymphozyten in der Leber war in ART2-defizienten und Wildtyp Mäusen sehr ähnlich. Die Zahl der aus der gesamten Leber isolierten Lymphozyten stieg von 10^6 Lymphozyten bei den mit PBS injizierten Tieren sowohl in ART2-defizienten als auch in Wildtyp Tieren auf $1,9 - 2,1 \times 10^6$ Lymphozyten bei den mit ConA behandelten Tieren an. Ähnlich wie in der Milz zeigten auch Leberlymphozyten eine deutlich verstärkte Expression des CD69 Aktivierungsantigens (**Abb.76**: Panel 2,3 und 5,6). Interessanterweise zeigte sich bei der ART2-defizienten Kontrollmaus, welcher PBS injiziert worden war, ein erhöhter Prozentsatz aktivierter T-Zellen in der Leber (vergleiche **Abb.76**: Panel 1 und 4), während in der Milz kein Unterschied festzustellen war (vergleiche **Abb.75**: Panel 1 und 4).

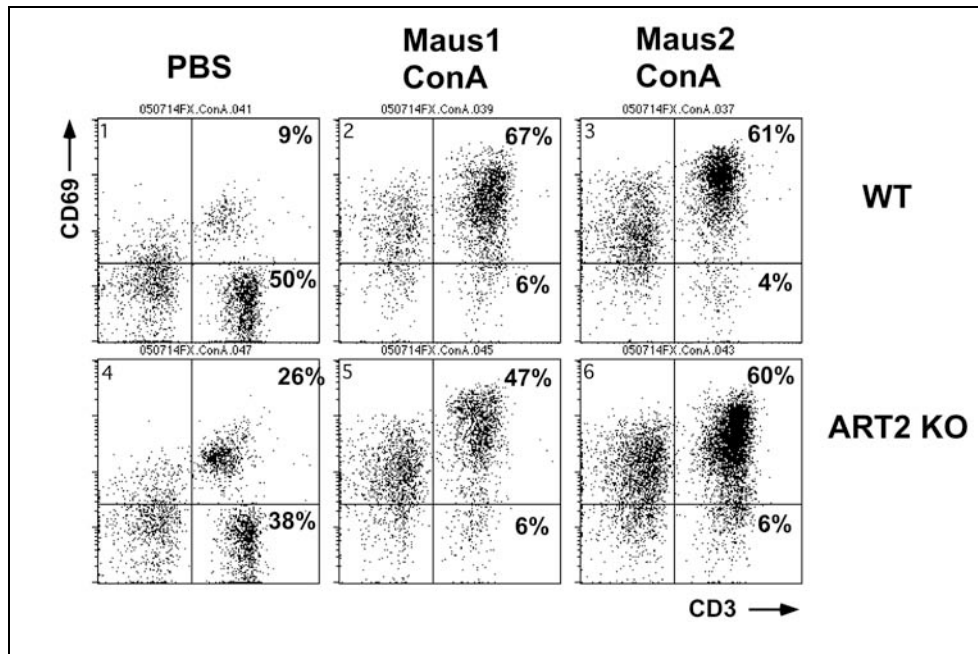


Abb. 76: Vergleichende Untersuchung zur Aktivierung von Leberlymphozyten nach i.v. Injektion von Concanavalin A. Je 2 BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen wurden 25 mg/kg Concanavalin A i.v. in die Schwanzvene injiziert. Zur Kontrolle wurde jeweils einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus PBS injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und Lymphozyten aus der Leber gewonnen. Es handelt sich hierbei um dieselben Tiere wie in **Abb.75**. Die Lymphozyten wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD69 angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert

Um den Verlauf der Leberschädigung zu verfolgen, wurde in einem weiteren Experiment den Mäusen 8 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion von 25 mg/kg ConA retroorbital Blut entnommen um die Aktivität des Leberenzym L-Aspartat-2-Oxoglutarat Aminotransferase (AST) im Plasma der Tiere zu bestimmen (**Abb.77**). Diese Bestimmung wurde vom Zentrallabor des UKE durchgeführt. Darüber hinaus wurden im Institut für Pathologie, UKE Paraffin-Schnitte von den Lebern der Mäuse angefertigt und Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Es zeigte sich hierbei, dass die intravenöse Injektion von Concanavalin A zu stark erhöhten Werten der Leberenzymaktivität im Serum der behandelten Tiere führte (**Abb.77 A**). Diese waren bereits nach 8 Stunden nachweisbar, steigerten sich aber nach 24 Stunden noch weiter. Beide ART2-defizienten Mäuse zeigten ebenfalls deutlich gesteigerte AST-Aktivität nach ConA-Injektion. Bei der ART2-defizienten Maus Nr.2 war ein Teil der Injektion des Concanavalin A ins Schwanzgewebe statt in die Schwanzvene gedrungen, sodass eine niedrigere Dosis ConA in die Blutbahn gelangt war. Bei den Paraffin-Schnitten zeigten sich 24 Stunden nach der Injektion von ConA nekrotische Veränderungen der Lebern (vergleiche **Abb.77 B**: Panel 1 und 3,5 bzw. 2 und 4,6). Trotz der geringeren Plasma-AST-Aktivität bei der ART2-defizienten Maus Nr.2 zeigten sich auch in der Histologie deutliche nekrotische Veränderungen (**Abb.77 B**: Panel 6).

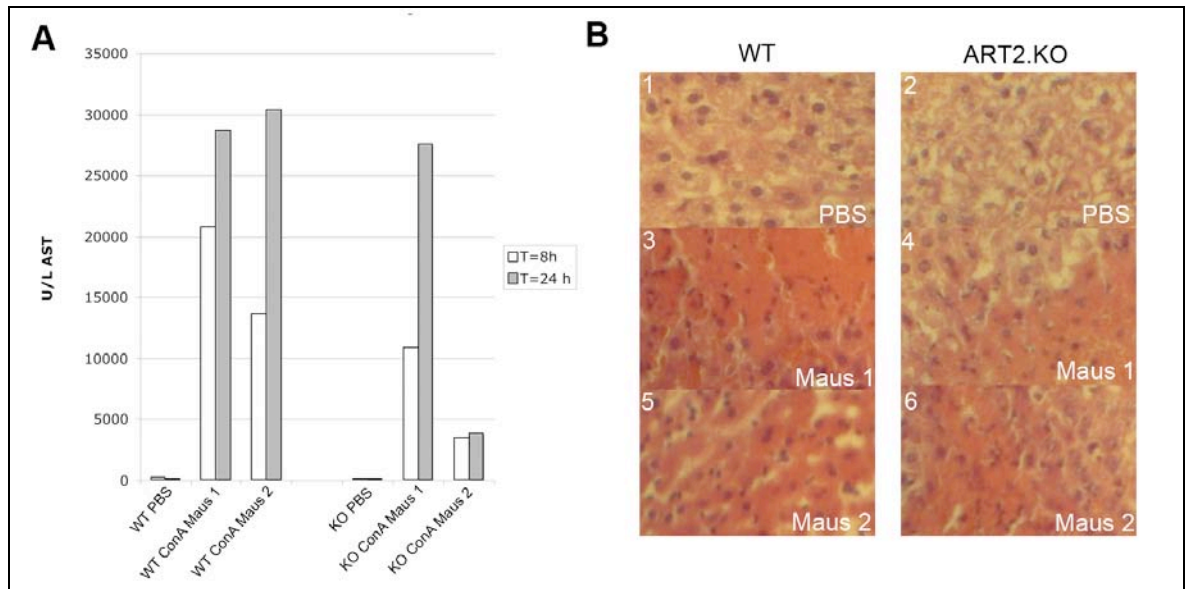


Abb. 77: Bestimmung des Blut-Plasma AST und histologische Untersuchung der Leber nach i.v. Injektion von Concanavalin A. Je 2 BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen wurden 25 mg/Kg Concanavalin A i.v. in die Schwanzvene injiziert. Zur Kontrolle wurde jeweils einer BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Maus PBS injiziert. Nach 8 und 24 Stunden wurde retroorbital Blut entnommen und der AST-Gehalt im Blutplasma bestimmt (**A**). Angegeben ist die Aktivität im Plasma in Units/L. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und Paraffinschnitte der formalinfixierten Lebern angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (**B**).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass ART2-defiziente Mäuse, wie auch Wildtyp Mäuse, nach ConA Injektion Zeichen der T-Zell-Aktivierung und Vermehrung in der Leber sowie deutliche Zeichen einer Leberschädigung zeigen.

3.5.4 Infektion von ART2-defizienten und Wildtyp BALB/c Mäusen mit *Plasmodium berghei*

Ein Infektions-Modell, in dessen Verlauf es zu einer massiven Lyse von Erythrozyten kommt, ist die Infektion mit dem murinen Malaria-Erreger *Plasmodium berghei* (Jacobs, Graefe et al. 2002). Der Erreger infiziert als Merozoit Erythrozyten, vermehrt sich darin und verlässt dann die Erythrozyten um weitere zu befallen. Hierbei kommt es zur Lyse von Erythrozyten.

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jacobs am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg durchgeführt. In drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils BALB/c Wildtyp und ART2-defizienten Mäusen 10^5 infizierte Erythrozyten i.p. injiziert. Es wurde dann jeweils nach 7, 10 und 14 Tagen (in einem Experiment nach 8, 12 und 20 Tagen) Blutausstriche von einem Tropfen Blut der Mäuse, das durch Anritzen der Schwanzvene gewonnen worden war, gemacht. Nach Trocknung, Fixierung und Giemsa-Färbung der Ausstriche wurde der Prozentsatz mit Merozoiten befallener Erythrozyten bestimmt. Außerdem wurde das Überleben der Mäuse nach Infektion dokumentiert.

In diesen Experimenten zeigte sich, dass die ART2-defizienten Mäuse die Infektion in allen drei Experimenten einige Tage länger überlebten als die Wildtypmäuse (**Abb.78 A,B,C**). Die jeweils variierende Überlebensdauer bei den Wildtyp Tieren in den unterschiedlichen Experimenten ließ

sich durch unterschiedliche Sub-Stämme der verwendeten Plasmodien erklären.

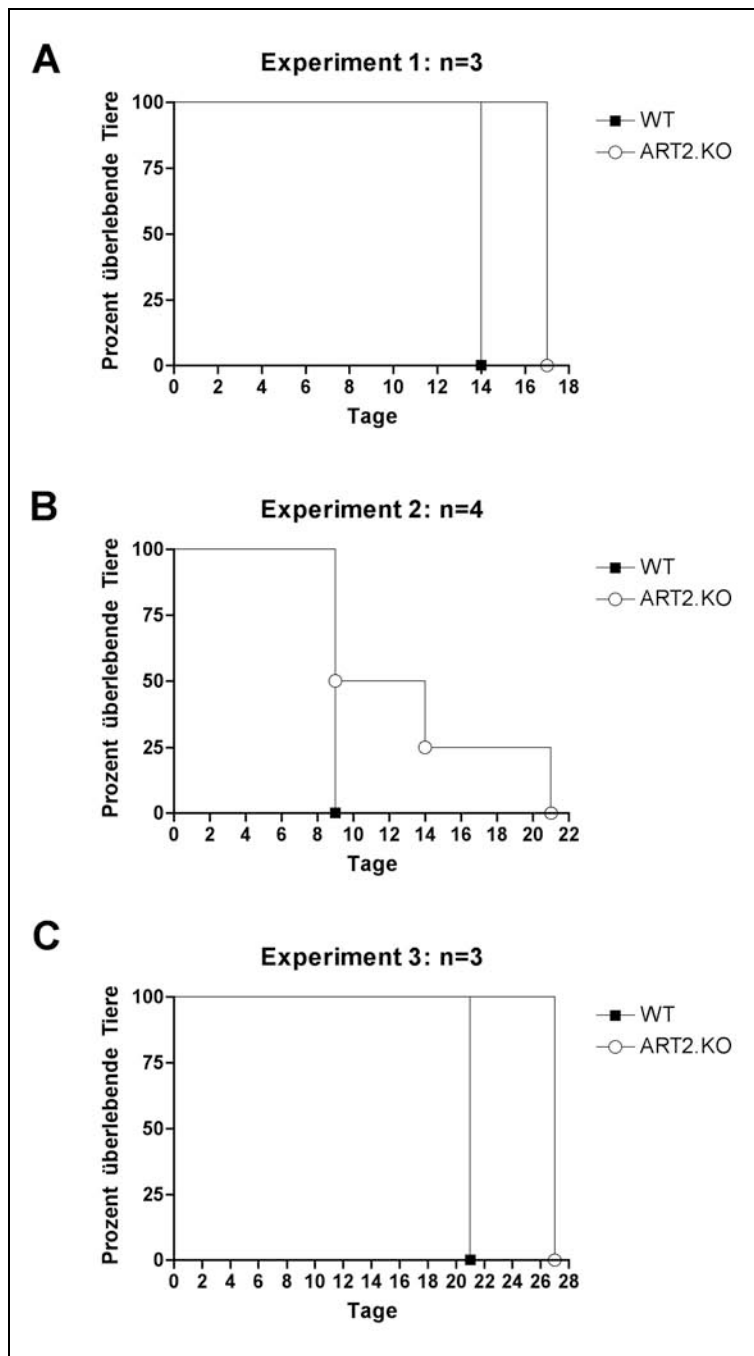


Abb. 78: Überlebenszeit nach Infektion mit Plasmodium berghei. BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden an Tag 0 mit 1×10^5 Plasmodium infizierten Erythrozyten i.p. infiziert. In drei unabhängigen Experimenten wurde das Überleben der Mäuse verfolgt. Die Zahl der Mäuse pro Mausstamm ist durch **n** angegeben.

Bei der Überwachung der Parasitämie der infizierten Tiere zeigte sich tendenziell eine leichte Verzögerung des Anstiegs infizierter Erythrozyten bei den ART2-defizienten im Vergleich zu Wildtyp Tieren (**Abb.79**). Darüber hinaus zeigten die überlebenden ART2-defizienten Mäuse im Spätverlauf der Infektion weitaus höhere Parasitämien als die Wildtyp Mäuse (**Abb.79 A,B**). Im dritten Experiment (**Abb.79 C**) wurde keine Parasitämiebestimmung im Spätstadium (> Tag 20) durchgeführt.

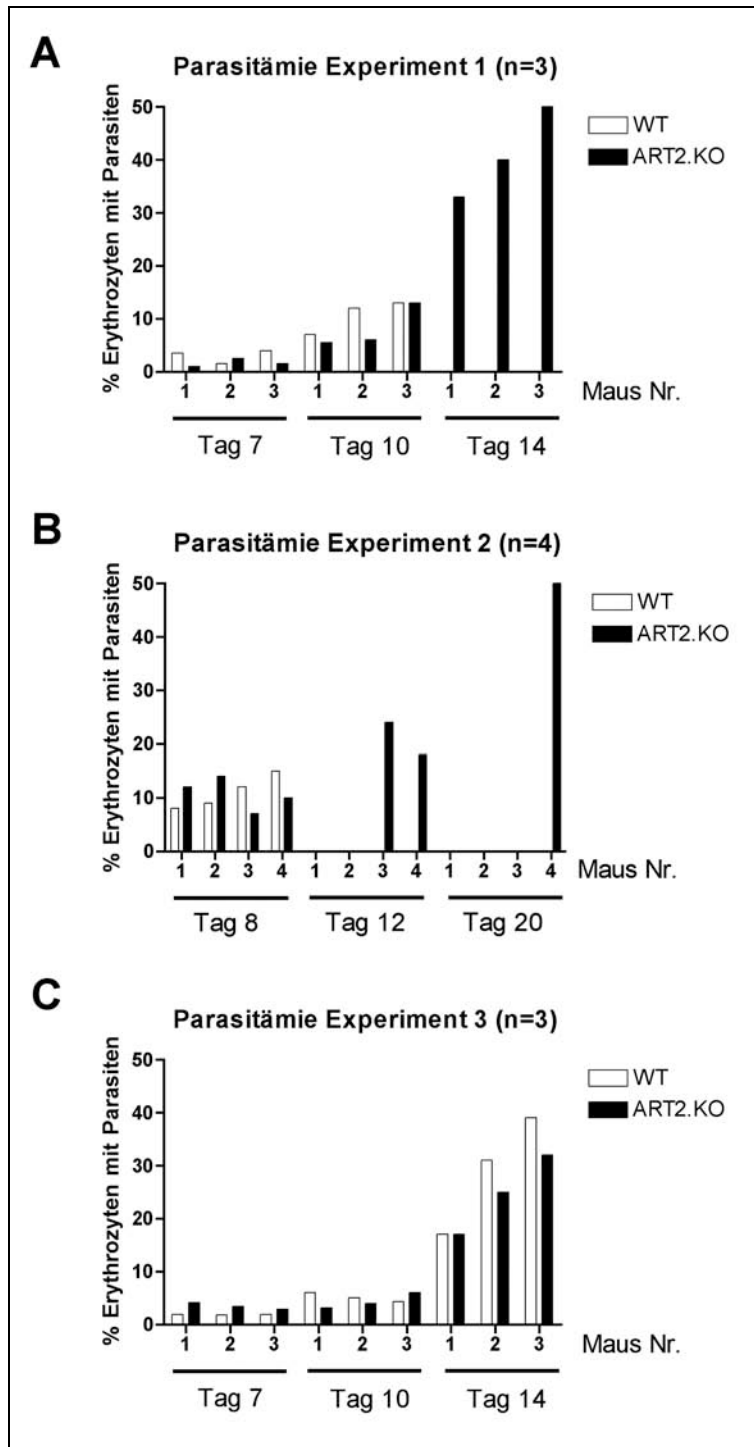


Abb. 79: Parasitämie nach Infektion mit *Plasmodium berghei*. BALB/c Wildtyp und ART2-defiziente Mäuse wurden an Tag 0 mit 1×10^5 Plasmodium infizierten Erythrozyten i.p. infiziert. In drei unabhängigen Experimenten wurde an den jeweils angegebenen Tagen die Parasitämie der Mäuse mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen bestimmt. Die Zahl der Mäuse pro Mausstamm ist durch n angegeben. Fehlende Balken kommen durch verstorbene Tiere (siehe Abb.78) zustande.

3.6 Generierung ART2-transgener Mäuse

Um weitere Hinweise über die Funktion von ART2 zu erhalten, wurden transgene Mäuse hergestellt, die ART2 in Zellen des Immunsystems überexprimieren. Hierfür wurden ART2.2 Konstrukte verwendet, die sich bereits in der Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien bewährt hatten (Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Kahl, Nissen et al. 2000; Krebs, Koestner et al. 2003; Bannas, Adriouch et al. 2005). Das transgene ART2.2 wird dabei mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehen, um es von der endogenen ART2.2 zu unterscheiden (**Abb.80**). Experimente mit stabil transfizierten Zelllinien hatten gezeigt, dass dieser Epitop-Marker die Enzymaktivität der ART2.2 nicht beeinträchtigt. Zwei Varianten der ART2.2 wurden für die Generierung transgener Mäuse verwendet. Im einen Konstrukt wird ART2.2 in seiner natürlichen Form als GPI-verankertes Membranprotein exprimiert (**Abb.80 A**).

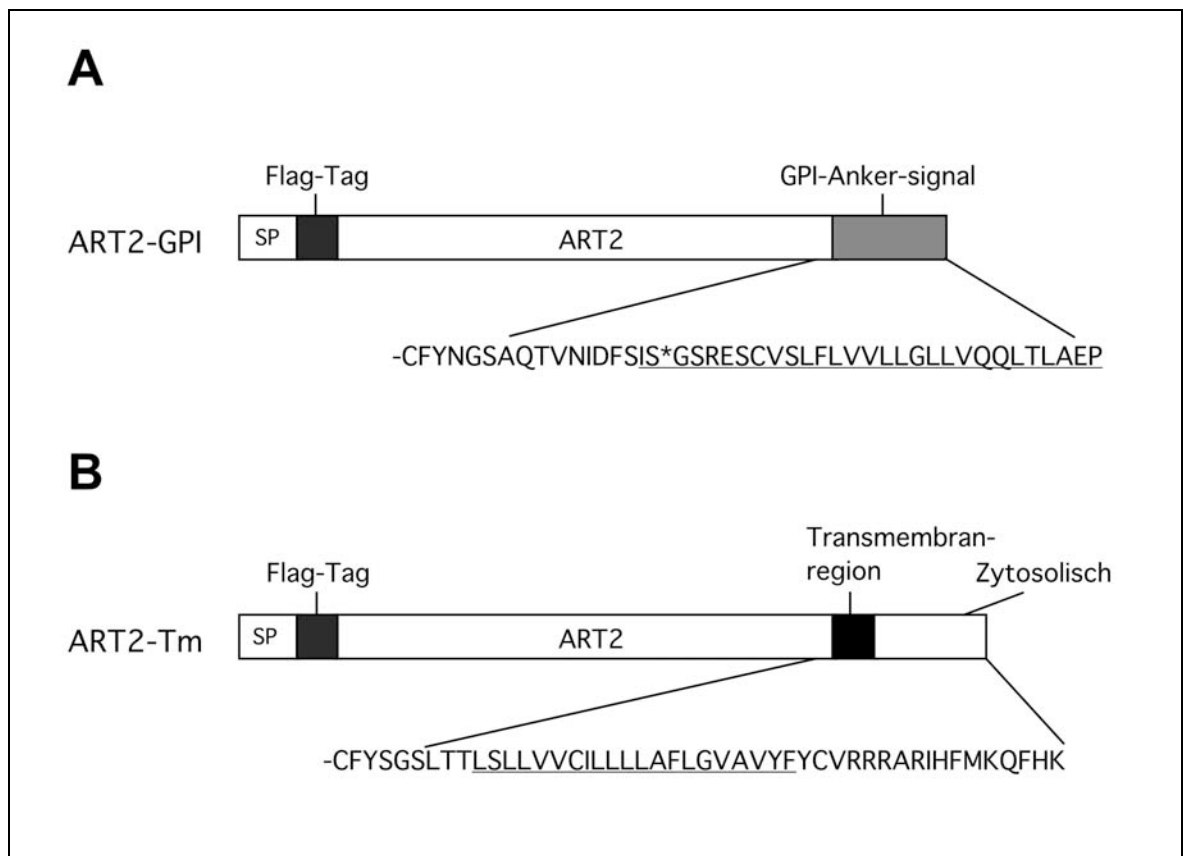


Abb. 80: Gegenüberstellung der erwarteten ART2-Proteine nach transgener Integration. Zwei Konstrukte wurden für die Generierung transgener Mäuse verwendet. Das ART2-GPI-Protein entspricht dem natürlich exprimierten murinen ART2.2, welches die Signalsequenz für einen GPI-Anker enthält, jedoch mit einem zusätzlichen FLAG-Tag (**A**). Bei dem ART2-TM-Protein wurde das C-terminale Ende durch den C-Terminus des CD8a, der eine Transmembranregion enthält, ersetzt (**B**). Angegeben ist die veränderte Aminosäuresequenz der transgenen Proteine. (Modifiziert nach Bannas et al. 2005)

In einem zweiten Konstrukt wurden die membrannahen Aminosäuren und die GPI-Signalsequenz gegen die Transmembranregion des CD8 ausgetauscht. Dieses transmembran-verankerte Typ1-Membranprotein ist, anders als das native ART2.2, nicht mit Glykosphingolipid-rafts assoziiert und kann nach T-Zell-Aktivierung nicht mehr von einer Metalloprotease von der Zelloberfläche abgestoßen werden (**Abb.80 B**)(Bannas, Adriouch et al. 2005).

Die beiden ART2.2 cDNAs wurden aus den vorhandenen Expressionskonstrukten in den Vektor pHSE3' umkloniert. Hierbei gerät die Expression der transgenen ART2.2 unter die Kontrolle des in allen hämatopoetischen Zellen aktiven MHC I Promoters und I μ Enhancers (Pircher, Burki et al. 1989; Wolenski, Cramer et al. 2003). Hierzu wurden die cDNAs mit Hilfe von Sequenz-spezifischen Primern aus den bereits vorhandenen Expressionskonstrukten heraus PCR-amplifiziert. Über die Primersequenzen wurden Schnittstellen für die Enzyme Sal I und Bcl I am 5'- und am 3'-Ende eingeführt. Die cDNAs wurden mit Bcl I und Sal I geschnitten und in den mit Sal I und Bam HI geschnittenen pHSE3'-Vektor ligiert. Eine Karte der erhaltenen Konstrukte ist in **Abbildung 8** im Kapitel Material und Methoden abgebildet.

Die Pronukleus-Injektion in C57BL/6 x DBA Eizellen zur Generierung transgener Mäuse wurde in der Transgenic Mouse Facility im Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) von Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer durchgeführt. Hierzu wurden die bakteriellen Sequenzen des Vektors durch Xho I Verdau mit anschließender präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese entfernt und aufgereinigte DNA in Pronuklei befruchteter Eizellen injiziert. Die Eizellen wurden dann auf Ammen übertragen.

Um die Nachkommen auf Integration des Transgens zu untersuchen, wurde aus den Konstrukten durch Restriktionsverdau und anschließender präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese geeignete 1,5 und 2,5 Kb große Sonden für Southernblot-Analysen hergestellt. Die Sonden wurden mit Hilfe von randomisierten Primern und Klenow-DNA-Polymerase ³²P-markiert. In Southernblot-Analysen von EcoRI- oder PstI-verdauter Mausschwanz-DNA konnten, nach Hybridisierung mit diesen Sonden, Mäuse mit transgenen Integrationsereignissen durch Autoradiographie identifiziert werden (**Abb.81**).

3.6.1 Transgene ART2 mit GPI-Anker

Durch Pronukleusinjektion des ART2-GPI Konstrukts wurden 4 weibliche Foundertiere und 1 männliches Foundertier hergestellt, die das Transgen integriert hatten. Es waren 4 Weibchen und ein Männchen. Nicht alle Tiere, die das Transgen integriert hatten, vererbten dieses auch an die Nachkommen. **Abbildung 81** zeigt eine Southernblot-Analyse der Foundertiere #37 und #31 und einiger Nachkommen. Die Ergebnisse zeigten, dass das Foundertier #31 das Transgen zwar trug aber nicht an seine Nachkommen weitergab, während das Foundertier #37 auch transgene Nachkommen hatte. Die Banden im Southernblot zeigten die erwartete Größe von 1,15 Kb.

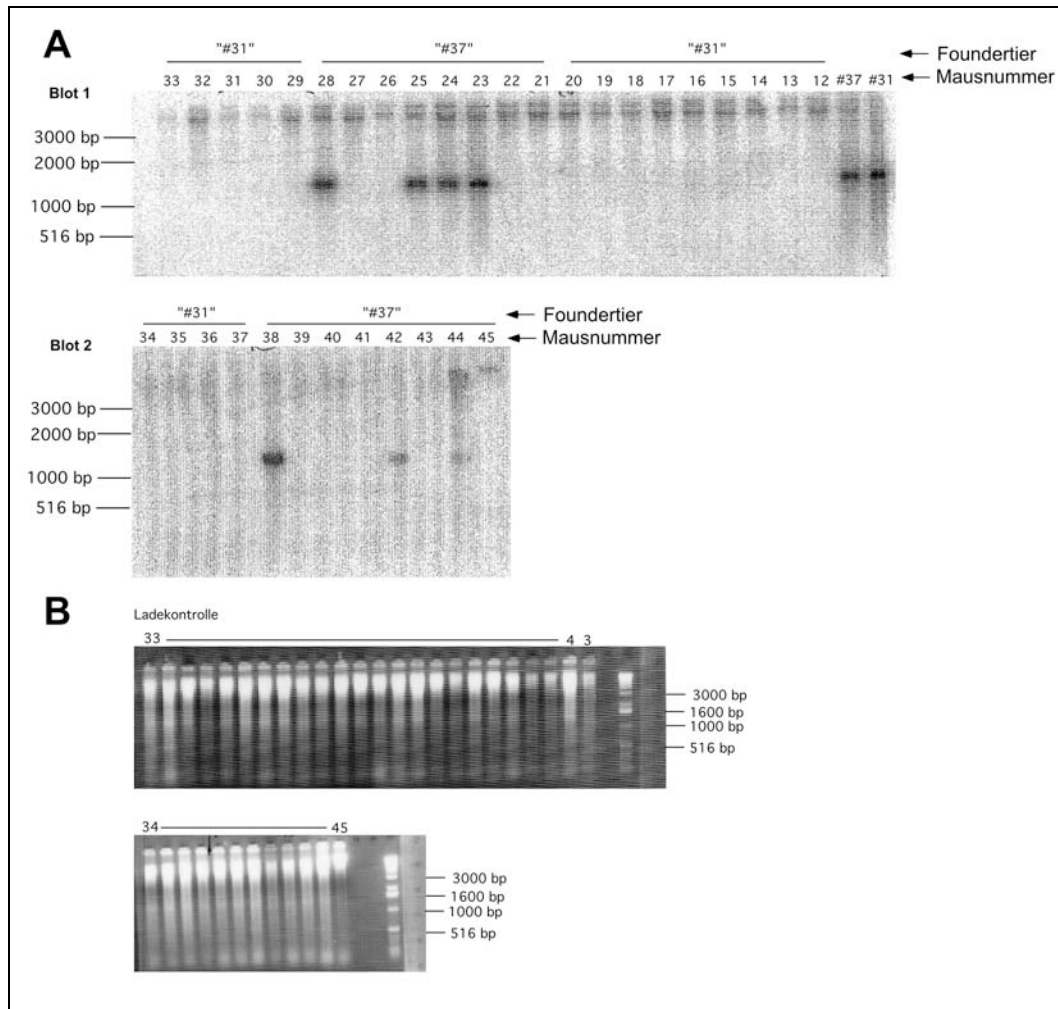


Abb. 81: Southernblot Analysen von Nachkommen ART2.GPI-transgener Founder-Tiere. Genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien von Nachkommen der Foundertiere #31 und #37 wurde mit Eco RI verdaut und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, um die Beladung des Gels zu kontrollieren (**B**). Anschließend wurde die DNA auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde über Nacht mit radioaktiv markierter Sonde (1,15 KB) bei 68°C hybridisiert und stringent mit 0,5 SSC/ 1% SDS bei 68°C gewaschen. Gebundene Sonde wurde mittels eines Phospho-Imagers detektiert (**A**). Angegeben sind die Nummern der Nachkommen und der jeweiligen Founder-Eltern.

Um die Expression der transgenen GPI-verankerten ART2 zu untersuchen, wurde ein im Southernblot als positiv getestetes Tier getötet und Lymphknoten, Milz und Thymus entnommen. Zum Vergleich wurden ART2-defiziente und BALB/c Wildtypmäuse untersucht. Die aus diesen Geweben gewonnenen Lymphozyten wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen B220, CD3, ART2 und den FLAG-Tag (M2) angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. Zur Untersuchung der ART2-Aktivität wurde ein Teil der Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 μ M etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine erkennt, angefärbt und im FACS analysiert (**Abb.82**).

Es konnte in Lymphknoten und Milz nur eine schwache Anfärbung mit dem M2-Antikörper nachgewiesen werden. Da das transgene Tier auch das endogene ART2 trug, ließ sich die Expression der transgenen ART2 im Vergleich zur Wildtypmaus nur schwer beurteilen. Im Thymus der Tiere konnte dagegen eine Expression der transgenen ART2 festgestellt werden. Die

Anfärbung mit dem M2-Antikörper zeigte, dass fast alle Thymuslymphozyten die transgene ART2 exprimierten (**Abb.82 D**: Panel 1).

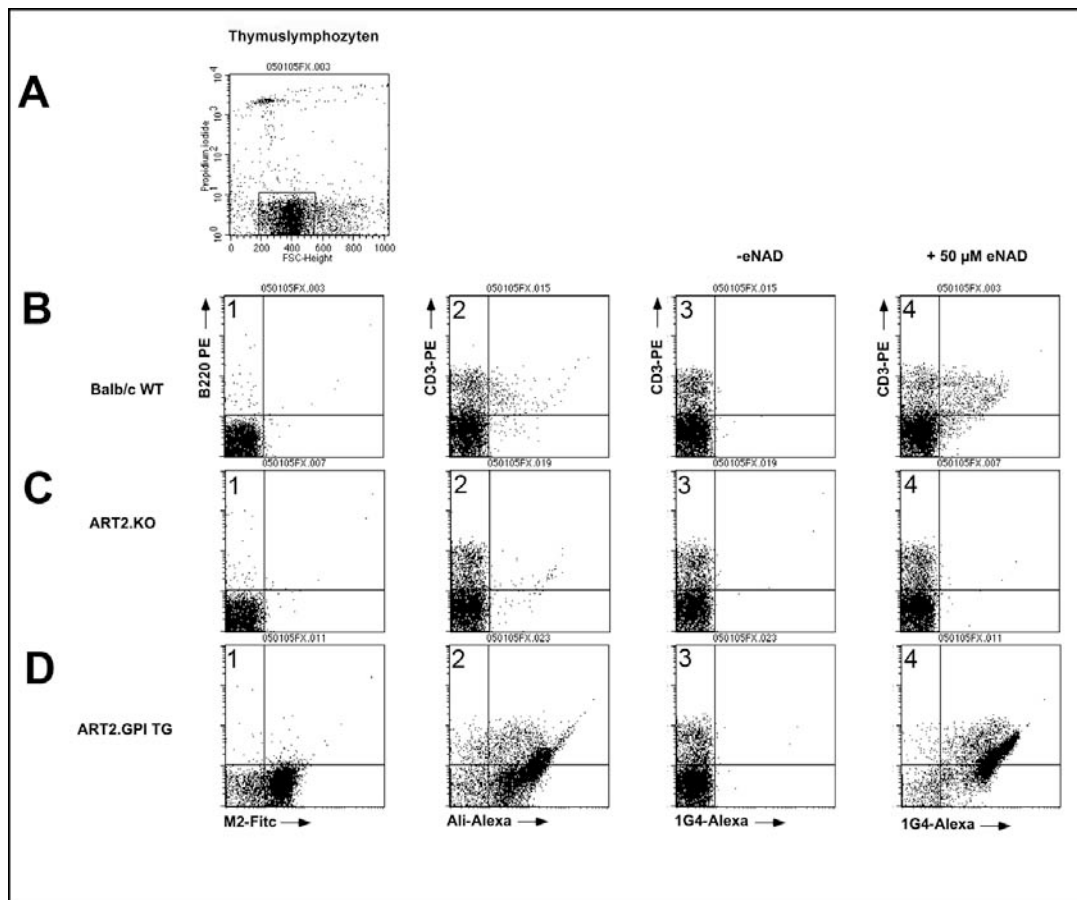


Abb. 82: Expression der transgenen ART2-GPI im Thymus. Thymuslymphozyten wurden aus einer BALB/c Wildtyp einer ART2-defizienten und einer ART2.GPI-transgenen Maus gewonnen. Die Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen ART2 und den FLAG-Tag angefärbt, gewaschen und im FACS analysiert. Zur Untersuchung der ART-Aktivität wurden die Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 μM etheno-NAD für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen, mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der ADP-ribosylierte Proteine erkennt, (1G4) angefärbt, erneut gewaschen und im FACS analysiert.

Die generelle Expression von ART2 und die ART2-Aktivität im Thymus der Wildtypmaus war nur sehr schwach auf reifen CD3 hochpositiven Zellen nachweisbar (**Abb.82 B**: Panel 2 und 4). Lymphozyten des ART2-defizienten Tieres zeigten erwartungsgemäß keine ART-Aktivität (**Abb.82 C**: Panel 1 und 4). Bei der transgenen Maus hingegen konnte eine hohe ART2-Expression bei CD3 positiven und negativen Thymozyten festgestellt werden (**Abb.82 D**: Panel 2). Auch die ART2-Aktivität war sehr hoch (**Abb.82 D**: Panel 4).

3.6.2 Transgene ART2 mit der Transmembrandomäne des CD8b

Durch Pronukleusinjektion des ART2-TM Konstrukts wurden 5 Foundertiere, die das Transgen integriert hatten, hergestellt. Zum Nachweis transgener Nachkommen, der von den Ammen ausgetragenen Nachkommen aus den injizierten Eizellen, wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt. Die Mausschwanz-DNAs wurden mit Pst I verdaut und nach Auftrennung in einem 1% Agarosegel auf NYTRAN-Plus-Membran gebロットet worden. Die transgenen Banden wurden mit der 2,5 Kb Sonde detektiert. Mäuse Nr. 6, 8, 30, 45 und 56 zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 3,5 Kb (**Abb.83**), die auf transgene Integration des ART2.TM schließen lässt.

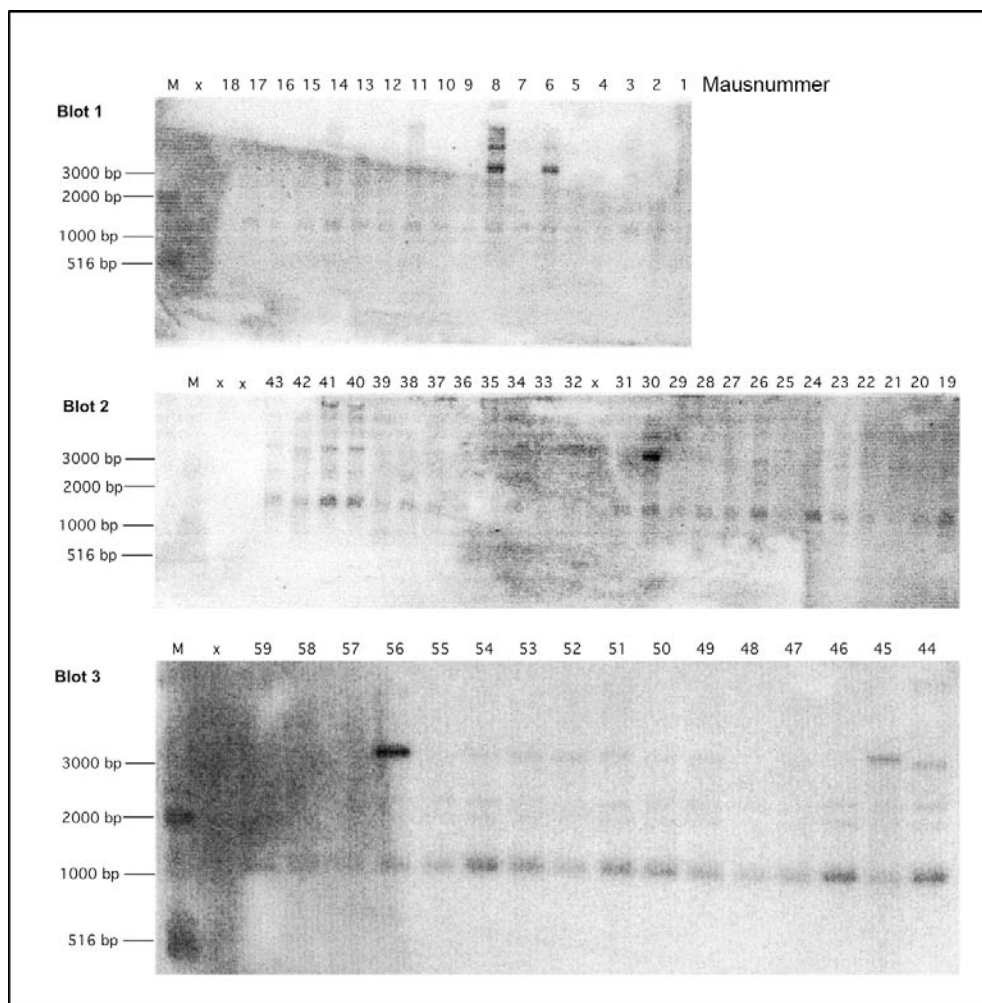


Abb. 83: Southernblot Analyse von Nachkommen TM transgener Founder-Tiere. Genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde mit Pst I verdaut und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle der Beladung mit genomischer DNA wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt. Anschließend wurde die DNA auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Die Membran wurde über Nacht mit radioaktiv markierter Sonde (2,5 KB) bei 68°C hybridisiert und stringent mit 0,5 SSC/ 1% SDS bei 68°C gewaschen. Gebundene Sonde wurde mittels eines Phospho-Imagers detektiert. Angegeben sind die Nummern der untersuchten Mäuse.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass ADP-Ribosyltransferasen an der Feinsteuerung des Immunsystems beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass durch lytische und nicht-lytische Prozesse NAD in den extrazellulären Raum gelangen kann und dort durch ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung des P2X7 Purinozeptors naive T-Zellen in die Apoptose treiben kann. Es konnte ferner gezeigt werden, dass diese apoptotischen Zellen effizient durch Makrophagen entfernt werden können. In der Diskussion der Ergebnisse dieser Dissertation wird die Gliederung der Hauptkapitel des Ergebnisteils im Wesentlichen beibehalten.

4.1 Molekulare Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes (NICD)

Im Mittelpunkt des NAD-induzierten Zelltods steht die Aktivierung des P2X7 Rezeptors. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass P2X7 nicht nur durch den bereits beschriebenen Agonisten ATP aktiviert werden kann, sondern auch durch eine posttranslationale Proteinmodifikation – die von der ADP-Ribosyltransferase ART2 katalysierte NAD-abhängige ADP-Ribosylierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede bei der NAD- und ATP-vermittelten Aktivierung des P2X7 Rezeptors dargestellt werden. Im ersten Teil dieses Kapitels werden diese Unterschiede diskutiert. Darüber hinaus wurden die Konsequenzen langfristiger ATP- und NAD-Behandlung von T-Zellen analysiert. Der hierdurch induzierte Tod der Zellen wies viele wesentliche Merkmale der Apoptose aber auch Merkmale eines nekrotischen Todes auf. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden diese Merkmale im Bezug auf eine Klassifikation des NAD-induzierten Zelltodes diskutiert. Im letzten Teil dieses Kapitels wird dann schließlich auf weitere Konsequenzen einer temporären Aktivierung des P2X7 Rezeptors eingegangen, die nicht zum Zelltod führen und möglicherweise andere biologische Funktionen haben.

4.1.1 Aktivierung des P2X7 Purinozeptors durch ATP und NAD

Molekularer Mechanismus

Wie in **Abbildung 9** zu sehen, führt eine Inkubation von T-Zellen mit NAD zu einem raschen nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran und später zum Verlust der Membranintegrität. Dass dieser Prozess von der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen abhängig ist, zeigt sich in der Resistenz ART2-defizienter T-Zellen gegenüber einer NAD-Behandlung (Adriouch, Ohlogge et al. 2001). Es ist bekannt, dass ART2 nach der Aktivierung von T-Zellen durch eine Metalloprotease von der Zelloberfläche abgestoßen wird (Kahl, Nissen et al. 2000). Die verminderte Zelloberflächenexpression von ART2 nach T-Zellaktivierung (**Abb. 17**) führt auch zu einer verminderten Sensitivität der Zellen gegenüber NAD (**Abb. 18**). Dies bestätigt, dass Empfindlichkeit gegenüber NAD durch ART2 vermittelt wird. Interessanterweise führt die Inkubation von T-Zellen mit dem NAD-Analogon etheno-NAD zu keinem nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb. 20**). Die Vorinkubation von Zellen mit etheno-NAD vor einer Inkubation mit NAD blockiert sogar die NAD-vermittelten Effekte (**Abb.15**).

Aus der Tatsache, dass das etheno-NAD gegenüber NAD nur an der Adenosin-Gruppe modifiziert ist und für ART2 als ebenso gutes Substrat wie NAD dient (Krebs, Koestner et al. 2003), lässt sich schließen, dass ein „downstream effector“, der für die Signaltransduktion aktiviert werden muss, die veränderte Adenosin-Gruppe nicht erkennt. Die Vorinkubation mit etheno-NAD führt zur etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen, die dann vor anschließender ADP-Ribosylierung während der Inkubation mit NAD geschützt sind. Es ist bekannt, dass die Familie der Purinorezeptoren empfindlich gegenüber der Modifizierung der Adenosin-Gruppe ihrer Liganden sind (North and Surprenant 2000). Ein Mitglied dieser Familie, der P2X7 Rezeptor, ist auf Lymphozyten exprimiert und es ist bekannt, dass er nach Aktivierung durch hohe Dosen ATP ein nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin vermitteln kann (Di Virgilio, Chiozzi et al. 2001). Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem „downstream effector“ der NAD-abhängigen ADP-Ribosylierung um P2X7 handeln könnte. Die Ergebnisse in **Abbildung 14** zeigen, dass dieser „downstream effector“ tatsächlich P2X7 ist. Eine Vorinkubation von T-Zellen mit P2X7 spezifischen Antikörpern blockiert sowohl die durch NAD als auch die durch ATP-vermittelten Effekte. ART2 spezifische Antikörper blockieren darüber hinaus die durch NAD ausgelöste Aktivierung des P2X7 Rezeptors. Die Tatsache, dass eine Vorinkubation von T-Zellen mit dem P2X7 spezifischen Inhibitor KN62 die Zellen resistent gegenüber einer anschließenden Inkubation mit NAD macht, untermauert die Annahme, dass ART2 und P2X7 die „molekularen Spieler“ der NAD-vermittelten Signaltransduktion sind (**Abb. 15**). Einen weiteren Hinweis darauf liefern auch die vergleichenden Untersuchungen kongener Stämme. Eine niedrigere ART2 Expression bei T-Zellen von NOD.CBA.Tyr Mäusen im Vergleich zu NOD Mäusen (**Abb.34**) führt zu einer geringeren Sensitivität gegenüber NAD (**Abb.35**), obwohl die beiden Mausstämme das gleiche P2X7 Allel aufweisen. Dies wird durch die vergleichbare Sensitivität der T-Zellen beider Stämme gegenüber ATP deutlich. Die beiden Mausstämme mit dem defekten P451L P2X7 zeigen trotz unterschiedlicher ART2-Expression eine vergleichbar geringe Sensitivität gegenüber NAD. Die Empfindlichkeit gegenüber NAD wird also sowohl durch das ART2 als auch das P2X7 Allel determiniert.

Vergleich der Aktivierung von P2X7 durch NAD und ATP

In vergleichenden Untersuchungen der beiden Agonisten NAD und ATP traten interessante Unterschiede zu Tage. Bei der Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ATP muss ein Schwellenwert von 50 μM überschritten werden, um überhaupt einen Effekt zu erzielen (**Abb. 10**). Bei höheren Konzentrationen ist schnell die maximale Aktivierung erreicht. Niedrigere Konzentrationen zeigen überhaupt keinen Effekt: Es scheint eine „Alles oder Nichts“-Antwort auf extrazelluläres ATP zu geben. Bei der Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch NAD hingegen zeigt sich bereits bei Konzentrationen von 1 μM NAD eine Aktivierung des P2X7 Rezeptors. Mit steigender Konzentration kommt es zu einer stetigen Zunahme der Zahl reagierender Zellen. Die unterschiedlichen Dosis-Wirkungskurven lassen sich durch die Verschiedenheit der beiden Liganden erklären. ATP ist ein löslicher Ligand und es muss eine der Affinität des Liganden zum Rezeptor entsprechende Mindestkonzentration erreicht werden, um den Rezeptor zu aktivieren. NAD jedoch wird von ART2 als Substrat für die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen

verwendet. Hierbei wird ein kovalent gebundener Ligand für P2X7 präpariert. Bereits bei niedrigen Konzentrationen NAD kann so eine ausreichende lokale Konzentration kovalent gebundener Liganden bereitgestellt werden, die P2X7 aktivieren. Wenn ATP in ausreichender Konzentration vorliegt, scheint dieser lösliche Ligand jedoch ein potenterer Agonist zu sein. In **Abbildung 15** ist zu sehen, dass sich bei niedrigen Konzentrationen des P2X7-Inhibitors KN62 das durch NAD ausgelöste nach außen Kehren von Phosphatidylserin vollständig verhindern lässt, während die durch ATP-vermittelten Effekte sich nur partiell blockieren lassen. Bei höheren Konzentrationen des Inhibitors lässt sich dann auch das ATP-vermittelte nach außen Kehren von Phosphatidylserin komplett blockieren (**Abb. 31**). Weiterhin vermag die Vorinkubation der Zellen mit dem NAD-Analogen etheno-NAD zwar die durch NAD ausgelösten Effekte zu verhindern, nicht jedoch die Folgen einer ATP-Behandlung (**Abb. 15**).

Das Konzept des löslichen Liganden ATP und des durch ADP-Ribosylierung kovalent gebundenen Liganden bestätigt sich durch die Ergebnisse der „Pulse-Chase“-Experimente (**Abb. 13**). Der lösliche Ligand ATP kann nach einer kurzen Inkubation fortgewaschen werden, was zur Deaktivierung des P2X7 Rezeptors und damit verbunden zu einem wieder Einziehen von Phosphatidylserin auf die Innenseite der Zytoplasmamembran führt. Das Entfernen von NAD führt zu keiner Deaktivierung des P2X7 Rezeptors, da die durch ADP-Ribosylierung kovalent gebundene ADP-Ribosegruppe nicht fortgewaschen werden kann. Hierbei ist es wichtig festzustellen, dass nur eine kovalent gebundene ADP-Ribosegruppe den P2X7 Rezeptor zu aktivieren vermag. Lösliche ADP-Ribose ist kein Agonist dieses Rezeptors (Seman, Adriouch et al. 2003). Die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch den kovalent gebundenen Liganden kann jedoch auch nach erfolgter ADP-Ribosylierung noch blockiert werden. So führt die Zugabe des P2X7-Inhibitors KN62 in „Pulse-Chase“-Experimenten nach Behandlung von Zellen mit NAD auch noch nach bereits erfolgter ADP-Ribosylierung von Membranproteinen zu einem wieder Einziehen des Phosphatidylserins auf die Innenseite der Zytoplasmamembran (**Abb. 16**).

Auch bei der Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin zeigen sich bei den beiden Agonisten Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Beide führen zu einem rapiden nach außen Kehren von Phosphatidylserin, was beim Vergleich mit durch Bestrahlung in die Apoptose getriebenen Zellen deutlich wird (**Abb. 11**). Andererseits lassen sich durch Echt-Zeit-Untersuchungen auch deutliche Unterschiede der Wirkung von ATP und NAD nachweisen. So führt die Inkubation von T-Zellen mit ATP zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin binnen Sekunden, während eine Inkubation mit NAD erst nach einer Verzögerung von wenigen Minuten zum nach außen Kehren führt (**Abb.12**). Dies lässt sich leicht durch die Tatsache erklären, dass das NAD selbst keinen Liganden für den P2X7 Rezeptor darstellt: ART2-defiziente T-Zellen zeigen keine Reaktion auf NAD. Vielmehr muss der Ligand erst durch ART2-katalysierte ADP-Ribosylierung präpariert werden.

Die Ergebnisse der Experimente, bei denen radioaktiv markiertes NAD als Substrat für die ADP-Ribosylierung verwendet wurde, zeigen, dass neben anderen Zelloberflächenproteinen auch P2X7 ADP-ribosyliert wird (**Abb. 33**). Bei der Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch den durch ADP-Ribosylierung präparierten Liganden gibt es somit zwei Möglichkeiten. Es ist einerseits denkbar,

dass P2X7 selbst ADP-ribosyliert wird und die kovalent gebundene ADP-Ribosegruppe den Rezeptor aktiviert (**Abb.84 A**). Andererseits könnte ein bestimmtes Zelloberflächenprotein ADP-ribosyliert werden, das in räumlicher Nähe zum P2X7 Rezeptor steht. Die kovalent gebundene ADP-Ribosegruppe der ADP-ribosylierten Aminosäure in diesem Protein könnte P2X7 aktivieren (**Abb.84 B**).

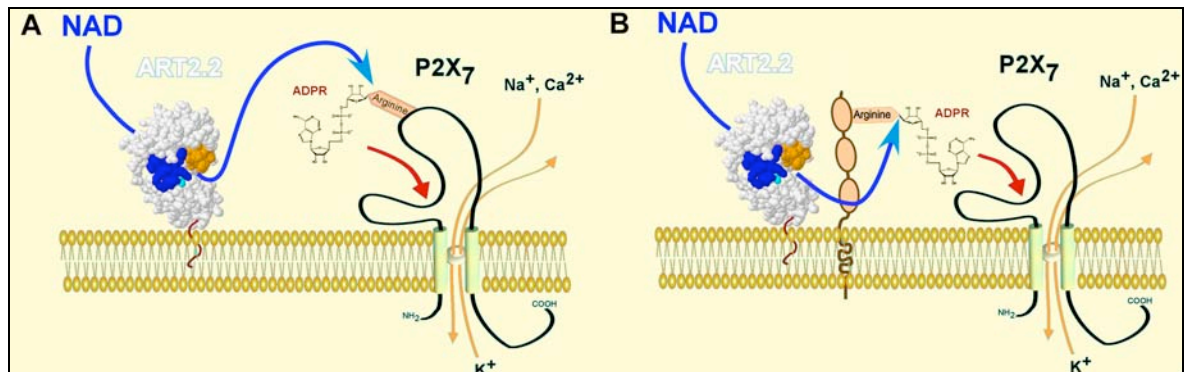


Abb. 84: Schematische Darstellung der möglichen direkten und indirekten Aktivierung des P2X7 Purinorezeptors durch ADP-Ribosylierung. (A) P2X7 selbst wird ADP-ribosyliert und dadurch aktiviert. **(B)** Ein benachbartes Zelloberflächenprotein wird ADP-ribosyliert. Die ADP-Ribosegruppe aktiviert P2X7 (Modifiziert von Adriouch 2003).

Schließlich ist auch denkbar, dass benachbarte P2X7-Moleküle jeweils ihrem unmittelbaren Nachbarn ihren immobilisierten Liganden darbieten. Dies könnte – ähnlich einem Ring von Elefanten – die Oligomerisierung von P2X7 zu einem Kanal bzw. zu einer Pore induzieren und/oder stabilisieren. Die ADP-Ribosylierung durch ART2 erfolgt Arginin-spezifisch. Auch die P2X7 Rezeptoren von Ratte und Mensch können durch ART2 ADP-ribosyliert werden (Dr. Sahil Adriouch – persönliche Kommunikation). In der extrazellulären Schlaufe des P2X7 Rezeptors von Maus, Ratte und Mensch existieren 11 konservierte Arginine. In **Abbildung 85** ist die extrazelluläre Schlaufe des P2X7 Rezeptors und ein Alignment der Proteinsequenzen von Maus, Ratte und Mensch dargestellt. Die Aufklärung der 3D-Struktur des P2X7 Rezeptors und die Identifizierung des im P2X7 Rezeptor ADP-ribosylierten Arginins könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

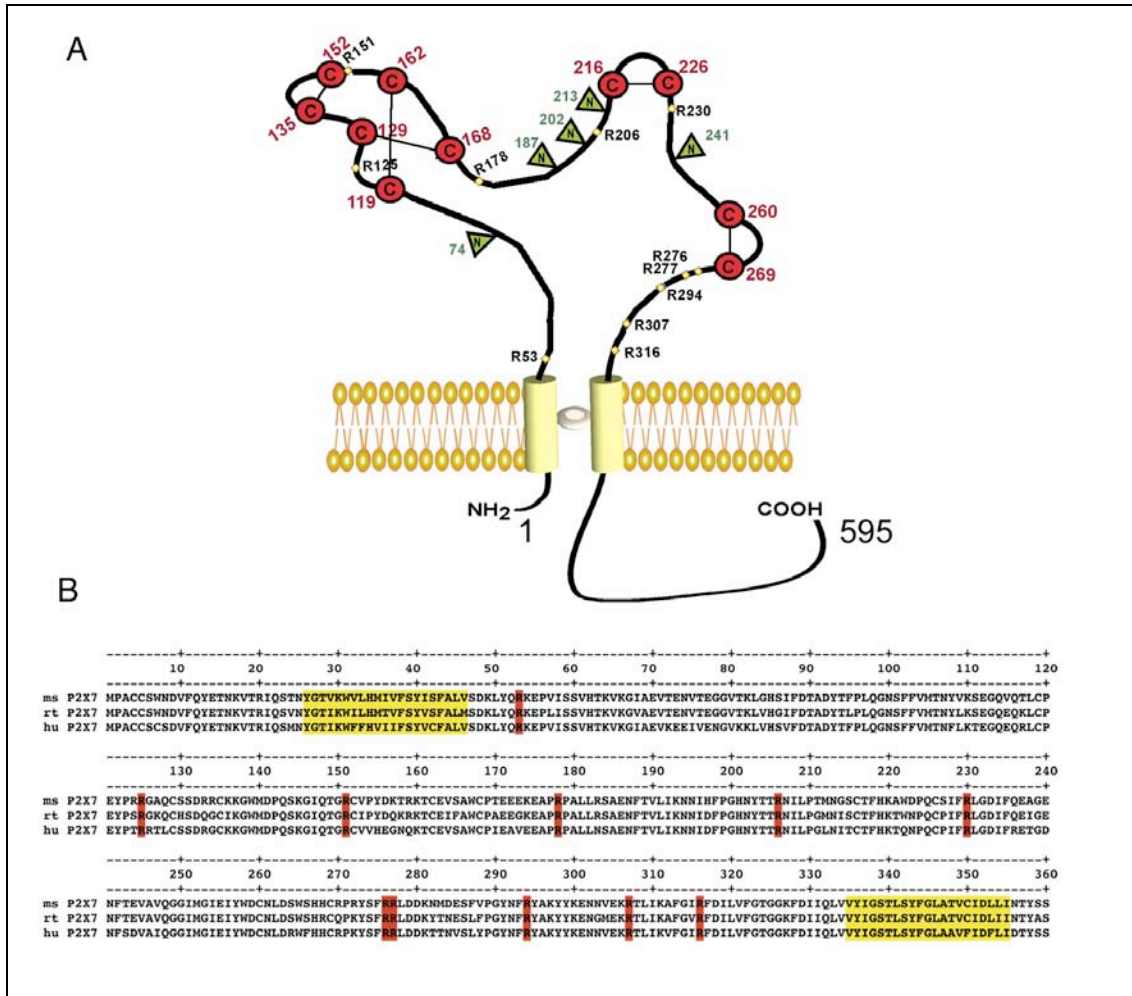


Abb. 85: P2X7 Purinorezeptor.(A) Sekundärstruktur des murinen P2X7 Purinorezeptors. Eingezeichnet sind die Cysteine und vorhergesagten Disulfidbrücken sowie die Arginine, die als Ziel der ADP-Ribosylierung dienen können. Als grüne Dreiecke sind putative N-Glykosylierungsstellen dargestellt (B) Alignment der Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domäne des P2X7 Rezeptors von Maus, Ratte und Mensch. Gelb eingezeichnet sind die vorhergesagten Transmembrandomänen. Die in allen drei Spezies konservierten Arginine sind rot markiert worden. (Modifiziert nach (Adriouch, Dubberke et al. 2005))

4.1.2 Apoptotische und nekrotische Merkmale des NICD

Bei der Analyse der molekularen Mechanismen des NAD-induzierten Zelltodes muriner T-Zellen konnten neben dem raschen nach außen Kehren von Phosphatidylserin auch weitere klassische Merkmale der Apoptose nachgewiesen werden. So wurde die Verringerung des Zellvolumens (Okada, Maeno et al. 2001), die Aktivierung von Caspasen (Nicholson 1999), der Zusammenbruch der mitochondrialen Membranintegrität (Marchetti, Hirsch et al. 1996) sowie DNA-Fragmentierung (Peitsch, Muller et al. 1993) beobachtet. Ein Merkmal für einen nekrotischen Zelltod wurde mit dem Verlust der Membranintegrität detektiert. Die untersuchten Merkmale konnten auch nach Behandlung von T-Zellen mit ATP beobachtet werden. Bei der Behandlung von T-Zellen mit höheren Dosen ATP wurde auch eine Freisetzung endogener Enzyme festgestellt. Auch das Freisetzen des zytoplasmatischen Inhalts einer Zelle zählt zu den Merkmalen einer Nekrose.

Klassische Merkmale der Apoptose

Ein klassisches Merkmal der Apoptose stellt das nach außen Kehren von Phosphatidylserin dar, das in Säugetieren, Vögeln und Insekten konserviert ist (van den Eijnde, Boshart et al. 1998). Allerdings tritt dieses Merkmal bei klassischen Apoptosewegen, wie der strahlungsinduzierten Apoptose durch DNA-Schäden (Heinrichs and Deppert 2003) oder der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose (Uthaisang, Nutt et al. 2003), erst nach mehreren Stunden auf (**Abb. 11**). Die Behandlung von T-Zellen mit NAD und ATP führt hingegen binnen Minuten oder Sekunden (**Abb. 12**) zu einem nach außen Kehren von Phosphatidylserin. Interessanterweise ist das nach außen Kehren von Phosphatidylserin temperaturabhängig und kann bei 4°C blockiert werden (**Abb. 40**). Die Bedeutung dieses rasanten Prozesses und seine mögliche Signalwirkung wird in Kapitel 4.1.3 und 4.3 ausführlicher diskutiert.

Ein weiteres klassisches Merkmal, um Apoptose von Nekrose abzugrenzen, ist die Veränderung des Zellvolumens. Während Zellen bei einem nekrotischen Zelltod anschwellen und platzen (Dive, Gregory et al. 1992), schrumpfen Zellen während der Apoptose (Dive, Gregory et al. 1992; Okada, Maeno et al. 2001). Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das Schrumpfen der Zelle nicht nur Folge sondern auch Auslöser eines apoptotischen Zelltods sein kann (Friis, Friborg et al. 2005). Behandlung von T-Zellen und Lymphomzellen mit extrazellulärem NAD und ATP führt zu einem verringerten Forwardscatter, was auf Schrumpfen der Zellen (**Abb. 22, 65**), also auf einen apoptotischen Mechanismus hinweist.

Im Zentrum der Caspase-abhängigen und Caspase-unabhängigen Apoptose steht der Verlust der mitochondrialen Membranintegrität (Donovan and Cotter 2004; Green and Kroemer 2004; Kim, Emi et al. 2005). Auch im Rahmen des NAD-induzierten Zelltods kommt es zu einem mit dem Mitochondrienfarbstoff „BD Mitosensor“ detektierbaren Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (**Abb. 28**). Durch den Verlust der Membranintegrität kann es zur Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien kommen. Darunter sind Cytochrom c (Rehm, Dussmann et al. 2003), welches durch Assoziation mit Apaf-1 und Procaspase-9 zum Apoptosom

Effektor-Caspasen aktivieren kann (Korsmeyer, Wei et al. 2000) sowie EndoG (Li, Luo et al. 2001) und AIF (Joza, Susin et al. 2001), die Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung bewirken. Es ist durchaus möglich, dass die Freisetzung proapoptotischer Moleküle auch beim NAD-induzierten Zelltod eine Rolle spielt, da der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zeitlich direkt vor dem Verlust der mitochondrialen Integrität und der damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren einzuordnen ist (Goldstein, Waterhouse et al. 2000).

Als eines der wichtigsten Merkmale der Apoptose gilt die Aktivierung von Caspasen (Nicholson 1999). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es nach NAD- und ATP-Behandlung von T-Zellen zu einer schnellen Aktivierung von Caspasen kommt (**Abb. 25**). Diese ist nach der Inkubation von T-Zellen mit ATP deutlicher nachweisbar als bei der NAD-Behandlung. Bei Verwendung eines Caspase-1 spezifischen Peptids zeigt sich, dass ein Teil der aktiven Caspasen offenbar von Caspase-1 gestellt wird (**Abb. 26**). Caspase-1, die auch als ICE (Interleukin-1 Converting Enzyme) bekannt ist, zählt zu den inflammatorischen Caspasen. Es ist bekannt, dass Caspase-1 in Makrophagen nach Stimulierung des P2X7 Rezeptors mit ATP aktiviert wird und Pro-Interleukin1- β in die biologisch aktive Form umsetzt (Verhoef, Estacion et al. 2003). Da Interleukin-1 nicht in T-Zellen exprimiert wird, übt die Caspase-1 in T-Zellen möglicherweise andere Funktionen aus. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Caspase-1 auch proapoptotisch die Effektor-Caspase Caspase 3 aktivieren kann (Winter, Rhee et al. 2004; Syed, Hahn et al. 2005). Die Ergebnisse der Experimente zur Kinetik der Caspaseaktivierung deuten an, dass das PS-Flashing schneller als die Aktivierung von Caspasen erfolgt (vergleiche **Abb.12** und **Abb.23,24**). Während sich bereits 5 Minuten nach einer ATP- oder NAD-Behandlung viele AnnexinV-positive T-Zellen nachweisen lassen, sind zu diesem Zeitpunkt noch keine oder nur wenige T-Zellen, die durch das Caspase-spezifische Fam-VAD-FMK Peptid angefärbt sind vorhanden(**Abb.27**).

Ein typisch spätes Merkmal für die Spätphase der Apoptose stellt die DNA-Fragmentierung dar. Inkubation von T-Zellen mit NAD und ATP führt auch zu einer Fragmentierung der genomischen DNA (**Abb. 29**). Diese geschieht mit vergleichbarer Kinetik, wie die DNA-Fragmentierung bei der durch Bestrahlung induzierten Apoptose. Nach Inkubation mit NAD oder ATP tritt die Fragmentierung jedoch nicht so vollständig ein, wie das bei der bestrahlungsinduzierten Apoptose der Fall ist. Die DNA-Fragmentierung nach NAD- und ATP-Behandlung kann durch von Caspase-aktivierten DNasen wie CAD (Nagata, Nagase et al. 2003) oder durch Caspase-unabhängige aus Mitochondrien freigesetzte DNasen wie EndoG bewerkstelligt werden(Li, Luo et al. 2001).

Klassische Merkmale der Nekrose

Neben den genannten Anzeichen der Apoptose, die nach Behandlung von T-Zellen mit NAD und ATP nachweisbar sind, lassen sich aber auch Merkmale eines nekrotischen Zelltods feststellen. Der Ausschluss des DNA-Farbstoffs Propidiumjodid wird häufig als Merkmal vitaler Zellen gewertet. Umgekehrt wird die Färbung von Zellen als Zeichen des Verlustes der Membranintegrität und Vitalität interpretiert. Die Anfärbbarkeit der zellulären DNA mit Propidiumjodid ist nach einer

NAD- oder ATP-Behandlung nach einer halben Stunde nachweisbar und steigert sich im weiteren Verlauf (**Abb.11**). An frühen Zeitpunkten der NAD- oder ATP-Behandlung ist noch keine Veränderung der Membranintegrität nachweisbar (**Abb.12 B**). Die Freisetzung von cytoplasmatischen Enzymen ist das zweite nekrotische Merkmal, das untersucht wurde. Die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) zeigt sich nach Inkubation mit hohen Dosen NAD und ATP, wobei die ATP-Behandlung zu einer viel deutlicheren Freisetzung führt (**Abb. 30**). Es ist davon auszugehen, dass für die Auslösung nekrotischer Anzeichen der Zellen durch NAD und ATP höhere Dosen und längere Exposition als für sämtliche, oben beschriebenen, apoptotischen Folgen erforderlich sind. Der Verlust der Membranintegrität lässt sich möglicherweise durch die Bildung von Membranporen nach anhaltender Aktivierung des P2X7 Rezeptors erklären. Die Ausbildung von Membranporen nach dauerhafter P2X7-Aktivierung wird in **Kapitel 4.1.3** genauer diskutiert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich während des NAD-induzierten Zelltods viele klassische Merkmale der Apoptose nachweisen lassen. Bei den Experimenten zeigten sich jedoch auch Merkmale, die im allgemeinen für einen nekrotischen Zelltod beschrieben werden. Die Grenze zwischen Apoptose und Nekrose ist grundsätzlich nicht deutlich getrennt. So gibt es als „Paraptose“ bezeichnete Formen des Zelltods, bei denen klassische Merkmale der Apoptose wie das nach außen Kehren von Phosphatidylserin und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in Abwesenheit von anderen klassischen Merkmalen, wie Aktivierung von Caspasen und DNA-Fragmentierung, auftreten (Wang, Li et al. 2004). Weiterhin werden apoptotische Formen des Zelltodes beschrieben, bei denen unterschiedliche Konzentrationen der Apoptose auslösenden Substanzen entweder zur klassischen Apoptose oder zu einer Mischform zwischen Apoptose und Nekrose, zur „Aponekrose“, führt. Die Behandlung solcher aponekrotischer Zellen mit Caspase-Inhibitoren verschiebt das Erscheinungsbild des Zelltodes in Richtung Nekrose (Formigli, Papucci et al. 2000). Vor diesem Hintergrund betrachtet, lässt sich der NAD-induzierte Zelltod (NICD) eher als Apoptose klassifizieren. Die in Kapitel 4.3 diskutierten Ergebnisse zur Klärung des Schicksals der Zellen, die durch NICD sterben, unterstützen diese Klassifikation.

4.1.3 Kurzfristige Aktivierung des P2X7 Rezeptors: Signaltransduktion, die nicht zum Zelltod führt.

Nach außen Kehren von Phosphatidylserin

Neben den oben beschriebenen Folgen der langfristigen Aktivierung von P2X7, die zum Zelltod führen, zeigen sich nach temporärer Aktivierung des P2X7 Rezeptors Effekte, die eine andere biologische Bedeutung als den Zelltod haben. Das beim NICD zeitlich als erstes nachweisbare nach außen Kehren von Phosphatidylserin ist zwar ein klassisches Merkmal der Apoptose, hat jedoch noch weitere, nicht mit der Apoptose verknüpfte Bedeutungen. So ist das nach außen Kehren von Phosphatidylserin bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Frasch, Henson et al. 2004) sowie bei der Kapazitation von Spermien (Gadella and Harrison 2002) und bei der Fusion von Myoblasten zu Myotuben während der Myogenese (van den Eijnde, van den Hoff et al. 2001) gezeitigt worden. Eine weitere beschriebene Bedeutung nach außen gekehrten Phosphatidylserins

liegt in der Signalwirkung als „friss mich“-Signal für Makrophagen (Fadok, de Cathelineau et al. 2001). Auf diese Bedeutung wird in **Kapitel 4.3** genauer eingegangen. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin durch kurzfristige Aktivierung von P2X7 durch ATP einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Lymphozyten hat. Hierbei soll die Extravasation von Lymphozyten durch eine verstärkte endotheliale Adhäsion begünstigt werden (Elliott, Surprenant et al. 2005). Eine solche verstärkte Adhäsion wurde zwischen dem Phosphatidylserin auf der Außenseite von Erythrozyten und endotheliale Thrombospondin nachgewiesen (Manodori, Barabino et al. 2000). Möglicherweise führt auch das durch Aktivierung von P2X7 induzierte Shedding von CD62L (siehe unten) und anderen Membranproteinen zu einem veränderten Migrationsverhalten.

Calciumflux

Ein weiteres zu beobachtendes Merkmal ist der durch Aktivierung des P2X7 Rezeptors ausgelöste Calciumflux. In **Abbildung 21** ist deutlich zu sehen, dass sowohl die Behandlung mit ATP als auch mit NAD zu einem raschen Influx von Calcium führt. Wie auch schon bei den Echtzeit-Experimenten zur Aufklärung der Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin zeigt sich der Calciumflux nach Behandlung der Zellen mit ATP bereits binnen weniger Sekunden, während bei der Behandlung mit NAD erst die ADP-Ribosylierung erfolgen muss, um den Liganden für P2X7 zu präparieren und daher Calciumflux erst nach 2-3 Minuten auftritt. Ebenso wie das nach außen Kehren von Phosphatidylserin ist der Calciumflux temperaturabhängig. Es ist beschrieben worden, dass Calciumflux das nach außen Kehren von Phosphatidylserin durch Aktivierung eines als Scramblase bezeichneten Enzyms direkt bewirken kann (Bratton, Fadok et al. 1997). Darüber hinaus gibt es eine calciumabhängige Signaltransduktion, die zu sogenanntem „zeiotischen“ Blebbing nach kurzfristiger Aktivierung von P2X7 führt. Diese calciumabhängige Signaltransduktion unterscheidet sich von dem calciumunabhängigen apoptotischen Blebbing, das über die ROCK-1-Kinase vermittelt wird (Mackenzie, Young et al. 2005). Eine weitere, nicht apoptotische Konsequenz einer kurzfristigen P2X7-Aktivierung ist die calciumabhängige Phosphorylierung der p56-Lck-Kinase, welche über den MAP-Kinaseweg eine Proliferation der Zellen auslösen kann (Budagian, Bulanova et al. 2003).

Abstoßen von CD62L

Eine beschriebene direkte Folge der Aktivierung des P2X7 Rezeptors ist das Abstoßen (Shedding) des Zelloberflächenproteins CD62L (Gu, Bendall et al. 1998). CD62L gilt als sogenannter „Homing-Rezeptor“ für Lymphknoten, der für die Migration von T-Zellen in lymphoides Gewebe notwendig ist. Abspaltung von CD62L verhindert den Eintritt von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe (Galkina, Tanousis et al. 2003). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass dem Shedding von CD62L das nach außen Kehren von Phosphatidylserin vorausgehen muss (Elliott, Surprenant et al. 2005). Möglicherweise wird das für das Shedding verantwortliche Enzym TACE durch das nach außen Kehren von Phosphatidylserin aktiviert. CD62L-Shedding in Verbindung mit der verbesserten Migration von T-Zellen, die Phosphatidylserin nach außen gekehrt haben in nicht-lymphatische Gewebe, verändert das Migrationsverhalten der T-Zellen. Die Ergebnisse dieser

Arbeit bestätigen das beschriebene ATP-vermittelte Shedding von CD62L. Darüber hinaus zeigt sich, dass auch die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ADP-Ribosylierung CD62L-Shedding auslösen kann (**Abb. 31**). Dass dieser Effekt durch die Aktivierung von P2X7 ausgelöst wird, zeigt sich in der Tatsache, dass das Shedding durch Anwesenheit des P2X7-Inhibitors KN62 verhindert wird.

Porenbildung

Ein interessantes Merkmal des P2X7 Rezeptors ist die beschriebene Ausbildung von Membranporen nach anhaltender Aktivierung durch ATP. Es bilden sich hierbei Membranporen aus, durch die Moleküle bis 900 Da die Membran passieren können (Steinberg, Newman et al. 1987). In **Abbildung 19** ist die Ausbildung von Membranporen nach Behandlung der T-Zellen mit ATP und NAD daran zu erkennen, dass der DNA-Farbstoff Ethidiumbromid in die Zellen gelangen kann. Dies geschieht nach Behandlung von T-Zellen mit ATP bereits innerhalb 1 Minute. Die durch NAD-vermittelte Porenöffnung stellt sich erst nach 5 Minuten ein, was sich auch hier durch die indirekte Wirkung von NAD als Substrat für die ADP-Ribosylierung des P2X7 Rezeptors erklären lässt. Erst wenn der kovalent gebundene Ligand präpariert wurde, kommt es zur Ausbildung einer Membranpore. Interessanterweise kommt es nach Aktivierung des P2X7 Rezeptors jedoch zu einer im Vergleich zur Kinetik bei Ethidiumbromid verzögerten Aufnahme von Propidiumjodid. In **Abbildung 12** zeigt sich nach 8 Minuten weder bei der Behandlung mit NAD noch bei der Behandlung mit ATP eine Aufnahme dieses DNA-Farbstoffes. Selbst nach 30 Minuten Inkubation kommt es nur bei hohen ATP-Konzentrationen zu einer Aufnahme von Propidiumjodid (**Abb. 11**). In **Abbildung 86** sind die Strukturformeln von Ethidiumbromid und Propidiumjodid schematisch dargestellt.

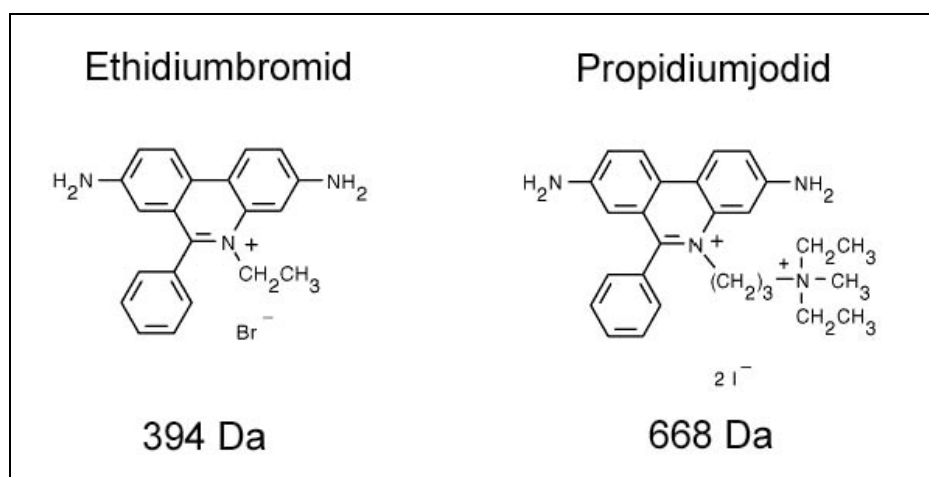


Abb. 86: Strukturformeln der DNA-Farbstoffe Ethidiumbromid und Propidiumjodid. Beide Farbstoffe interkalieren in die DNA und beginnen nach Bindung an DNA zu fluoreszieren. Angegeben ist auch die molekulare Größe beider Farbstoffe in Dalton (Da).

Möglicherweise ist die Ausbildung von Membranporen nicht ein sprunghaftes Ereignis, sondern eine durch chronische Aktivierung induzierte ständige Ausdehnung (Virginio, MacKenzie et al. 1999), in deren Verlauf zunächst das kleinere Ethidiumbromid und erst bei Erreichen der ausreichenden Porengröße Propidiumjodid passieren kann. Möglicherweise handelt es sich bei der Pore nicht um P2X7 selbst, sondern um ein anderes Membranprotein (Faria, Defarias et al.

2005)(Abb.87).

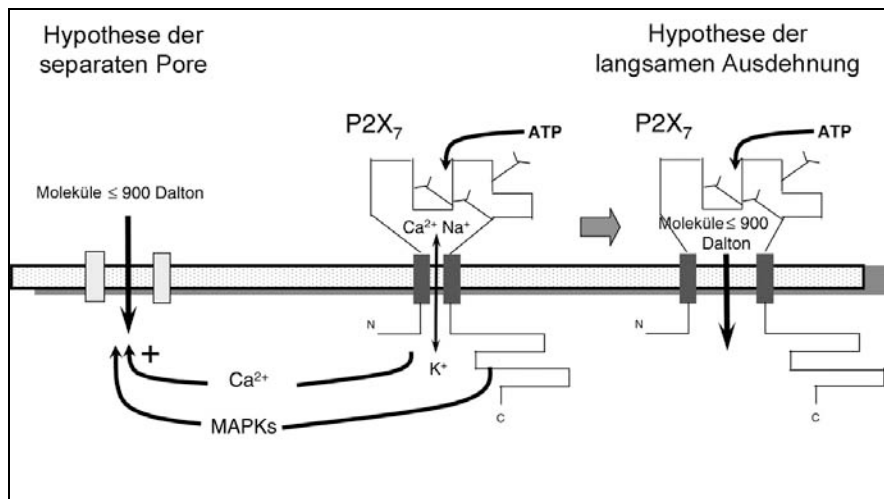


Abb. 87 Unterschiedliche Modelle zum Mechanismus der Porenformierung nach P2X7-Aktivierung. Dargestellt sind zwei mögliche Mechanismen der Porenformierung nach ATP-vermittelter Aktivierung von P2X7. Bei der Hypothese der langsamen Ausdehnung bildet P2X7 selbst nach anhaltender Stimulierung durch ATP eine langsam wachsende Pore. Die Hypothese der separaten Pore geht davon aus, dass intrazelluläre „second-messenger“ nach Aktivierung von P2X7 die Bildung einer Membranpore durch ein anderes Protein bewirken (modifiziert nach (Liang and Schwiebert 2005)).

Aufgrund neuester Erkenntnisse wird vermutet, dass die Anfärbung von Zellen mit diesen fluoreszierenden Farbstoffen nicht nur auf Membranporen zurückzuführen ist. Es gibt Hinweise, dass die Inaktivierung des sogenannten MDR-Transporters (multidrug resistance transporter) zu einer Akkumulation der fluoreszierenden Farbstoffe in der Zelle beiträgt. Diese Inaktivierung des MDR-Transporters soll, wie auch schon die Aktivierung der TACE beim Shedding von CD62L, abhängig vom nach außen Kehren von Phosphatidylserin sein (Elliott, Surprenant et al. 2005).

Neben den in dieser Arbeit untersuchten nicht-apoptischen Merkmalen einer kurzfristigen Aktivierung des P2X7 Rezeptors werden auch weitere nicht mit der Apoptose verbundene Funktionen für P2X7 beschrieben. Dazu zählt zum einen das „Mikrovesikelshedding“ bei Makrophagen (MacKenzie, Wilson et al. 2001). Hierbei kommt es beim Blebbing nach P2X7-Aktivierung zur Abschnürung kleiner Membranvesikel. Diese Vesikel enthalten aktives Interleukin-1- β . Das Mikrovesikelshedding könnte einen Sekretionsmechanismus von IL-1- β darstellen, das kein sekretorisches Leaderpeptid besitzt und dessen Sekretion daher nicht über den üblichen ER-Golgi Weg verläuft (MacKenzie, Wilson et al. 2001). Auch bei Mast-Zellen sind nicht-apoptische Funktionen der kurzfristigen Aktivierung des P2X7 Rezeptors beschrieben worden (Cockcroft and Gomperts 1979). So führt die kurzfristige Aktivierung von P2X7 bei murinen Mastzellen zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und TNF- α (Bulanova, Budagian et al. 2005).

Die beschriebenen vielfältigen Folgen einer kurzen Stimulation des P2X7 Rezeptors in zahlreichen Zellen des Immunsystems bieten Ansätze für weitere Untersuchungen der Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ATP oder indirekt durch NAD.

4.2 Endogene Quellen von NAD und ATP

Da ART2 und P2X7 auf extrazellulär anwesende Nukleotide angewiesen sind, stellt sich die Frage, wo diese Nukleotide herkommen. Es werden lytische und nicht-lytische Mechanismen beschrieben, die zur Freisetzung endogener Nukleotide führen können (Cotrina, Lin et al. 1998; Bruzzone, Guida et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei plausible Modelle etabliert, die zeigen, dass extrazelluläre Nukleotide aus endogenen Quellen bereitgestellt werden können. Ein Modell besteht aus der Ultraschall-Lyse von Erythrozyten. Die Lyse von Erythrozyten und anderen Zellen kann sowohl bei Infektionen als auch bei humoralen und zellulären Immunreaktionen auftreten. Sie wird z.B. durch Plasmodien, Viren, Komplement-Faktoren oder durch von zytotoxischen T-Zellen freigesetzte Perforine ausgelöst. Die Freisetzung von Nukleotiden durch Gewebeverletzungen stellt die zweite in dieser Arbeit untersuchte Möglichkeit dar. Durch Beobachtungen an frisch präparierten primären Zellen aus Lymphknoten und Milz wird diese Möglichkeit bestätigt.

4.2.1 Erythrozytenlysate

Experimente mit Erythrozytenlysaten zeigen, dass diese Lysate ausreichende Mengen an NAD und ATP enthalten, um eine Aktivierung des P2X7 Rezeptors und damit verbundene Folgen auszulösen. Die Ergebnisse in **Abbildung 36** zeigen, dass die Inkubation von T-Zellen mit Erythrozytenlysate zu einer Aktivierung des P2X7 Rezeptors führt, was sich durch das nach außen Kehren von Phosphatidylserin und das Abstoßen von CD62L bemerkbar macht. Beide Prozesse lassen sich durch den P2X7-Inhibitor KN62 blockieren, wodurch die Beteiligung des P2X7 Rezeptors untermauert wird. Interessanterweise führt ein Verdünnen der eingesetzten Lysate dazu, dass ART2-defiziente T-Zellen keinerlei Reaktion auf die Inkubation mit den Lysaten zeigen. Dies lässt sich durch das Vorhandensein von sowohl ATP als auch NAD in den Lysaten erklären. In konzentrierten Lysaten ist eine ausreichend hohe Konzentration von ATP enthalten, um P2X7 in T-Zellen zu aktivieren. Werden die Lysate weiter verdünnt, fällt die Konzentration an ATP unter den Schwellenwert, der zur Aktivierung benötigt wird. Daher reagieren die ART2-defizienten T-Zellen nicht mehr auf die Lysate. Allerdings ist in den verdünnten Lysaten immer noch eine ausreichende Konzentration an NAD vorhanden, um bei den Wildtyp T-Zellen ART2-vermittelt P2X7 zu aktivieren. Die Wirkung der Lysate lässt sich also in einen ATP-Effekt und einen NAD-Effekt trennen. Dieses wird durch vergleichende Dosis-Wirkungs-Experimente deutlich. Während ART2-defiziente T-Zellen resistent gegenüber NAD sind, zeigt sich bei Wildtyp T-Zellen auch bei sehr niedrigen NAD Konzentrationen eine Aktivierung des P2X7 Rezeptors (**Abb. 37 A**). Andererseits zeigt sich bei der Behandlung mit ATP eine vergleichbare Dosis-Wirkung bei Wildtyp und ART2-defizienten T-Zellen. Wenn der Schwellenwert unterschritten wird, kommt es zu keiner Aktivierung des P2X7 Rezeptors mehr (**Abb. 37 B**). Bei den Lysaten hat man offensichtlich mit einem Gemisch von NAD und ATP zu tun. Bei stärkerer Verdünnung der Lysate wird der ATP-Schwellenwert rasch unterschritten und es dominiert der NAD-Effekt. ART2-defiziente T-Zellen reagieren dann nicht mehr auf die Lysate (**Abb. 37 D**). Dieses Phänomen kann auch durch die Verwendung einer Mischung aus NAD und ATP nachvollzogen werden (**Abb. 37 C**). Durch Vergleich der Dosis-

Wirkungs-Kurven lässt sich die Konzentration von NAD und ATP in den Erythrozyten auf ca 2 mM ATP und 300 μ M NAD schätzen. Obwohl NAD in niedrigerer Konzentration vorhanden ist, kann es seine Wirkung auch in höheren Verdünnungen entfalten. *In vivo* ist davon auszugehen, dass die Konzentration von NAD und ATP mit der Entfernung von der Quelle der freigesetzten Nukleotide abnimmt. Ferner nimmt die Konzentration von NAD und ATP nach dem Lyse-Ereignis mit der Zeit ab, da die in den Lysaten enthaltenen Nukleotide einer raschen Degradation durch endogene NADasen, ATPasen und Phosphodiesterasen unterliegen. Die Vorinkubation der verwendeten Lysate führt bereits nach 10 Minuten zu einer starken Reduktion der Fähigkeit P2X7 zu aktivieren (**Abb.38**). Nach 60 Minuten sind NAD und ATP bereits vollständig degradiert. Da NAD bereits nach einem kurzen Puls P2X7 durch ADP-Ribosylierung dauerhaft aktivieren kann, ermöglicht es unter diesen Bedingungen eine im Vergleich zu ATP nachhaltigere Aktivierung von P2X7.

4.2.2 Freisetzung durch beschädigte Zellen

Die Freisetzung von Nukleotiden durch beschädigte Zellen zeigte sich auch indirekt beim Vergleich frisch präparierter, unbehandelter ART2-defizienter, CD38-defizienter und Wildtyp T-Zellen. In **Abbildung 39** z.B. ist bei Wildtypzellen eine Population spontan Phosphatidylserin nach außen kehrender Zellen zu sehen. Der Anteil dieser „spontan apoptotischen“ Zellen ist bei frisch präparierten CD38-defizienten T-Zellen noch deutlich größer, während diese Population bei ART2-defizienten Zellen kaum nachweisbar ist. Interessanterweise ist dieses spontane nach außen Kehren von Phosphatidylserin temperaturabhängig. Werden Zellen bei 4°C präpariert und bei 4°C gehalten, so zeigen weder Wildtyp noch CD38-defiziente T-Zellen ein spontanes nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb. 40 A**). Auch die Inkubation dieser Zellen mit exogenem NAD führt bei 4°C zu keinem nennenswerten nach außen Kehren von Phosphatidylserin (**Abb. 40 B**). Allerdings führt eine anschließende Inkubation der Zellen bei 37°C zum nach außen Kehren von Phosphatidylserin, auch wenn das NAD zuvor gewaschen wurde. Offensichtlich erfolgt die ADP-Ribosylierung bereits effizient bei 4°C, während die Aktivierung von P2X7 jedoch eine Temperatur von 37°C benötigt. In diesem Experiment zeigt sich darüber hinaus, dass Zellen, die nach einer NAD-Behandlung bei 37°C Phosphatidylserin nach außen gekehrt haben, dieses bei einer anschließenden Inkubation bei 4°C nicht wieder einziehen. Es lässt sich daraus schließen, dass die bei 4°C frisch präparierten Zellen in **Abbildung 40 A** auch vor der Präparation noch kein Phosphatidylserin nach außen gekehrt haben. Vielmehr ist davon auszugehen, dass während der Präparation Zellen beschädigt werden, wodurch extrazelluläres NAD freigesetzt wird. ART2-defiziente T-Zellen sind durch das NAD unberührt, da keine ADP-Ribosylierung stattfinden kann. Auf Wildtypzellen wird das NAD von ART2 genutzt, um P2X7 zu ADP-ribosylieren. Dieses wird jedoch erst bei einer Temperatur von 37°C durch nach außen Kehren von Phosphatidylserin sichtbar. CD38-defiziente T-Zellen sehen sich während der Präparation einer höheren Konzentration extrazellulären NADs ausgesetzt, da mit CD38 eine potente NADase fehlt (Cockayne, Muchamuel et al. 1998). So steht bei der Präparation von CD38-defizienten T-Zellen eine größere Konzentration für die ADP-Ribosylierung durch ART2 und somit der Aktivierung von P2X7 zur Verfügung. Werden die T-Zellen aus CD38-defizienten Mäusen nach der Präparation mit

etheno-NAD inkubiert, kann dies die ADP-Ribosylierung von P2X7 nicht mehr verhindern, da diese bereits während der Präparation geschehen ist (**Abb. 41**). Die Tatsache, dass die Inkubation der Zellen mit KN62 das nach außen Kehren von Phosphatidylserin auch nachträglich noch rückgängig macht, untermauert die Schlussfolgerung, dass dieser Effekt durch einen ADP-ribosylierten P2X7 Rezeptor zustande kommt.

4.2.3 Mögliche Folgen der Freisetzung von NAD

CD38 kontrolliert in Wildtyp Mäusen die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung, indem es die lokale Verfügbarkeit des Substrats NAD limitiert (Krebs, Adriouch et al. 2005). Es ist daher möglich, dass die T-Zellen einer CD38-defizienten Maus auch *in vivo* höheren NAD-Konzentrationen ausgesetzt sind und dadurch ein vermehrter NAD-induzierter Zelltod (NICD) von ART2 positiven T-Zellen zu erwarten ist. Die durch das Verschwinden der sensitiven Zellen entstehende „Lücke“ könnte durch kompensatorisch homöostatisch proliferierende Zellen gefüllt werden. Es wird spekuliert, dass die kompensatorische homöostatische Proliferation von autoreaktiven Zellen einen Mechanismus der Diabetesentwicklung in der NOD Maus darstellt (King, Ilic et al. 2004). Danach zeigen T-Zellen von NOD Mäusen eine verminderte Überlebensfähigkeit und es kommt daher zu einer vermehrten Proliferation potentiell autoreaktiver Zellen. Wird das Immunsystem der Mäuse stimuliert, wird die Lücke durch antigenspezifische nicht-autoreaktive T-Zellen aufgefüllt, was erklärt, warum die Mäuse nur unter spezifischer pathogenfreier Haltung Diabetes entwickeln. Interessanterweise führt das Einkreuzen der CD38-Defizienz auf den NOD-Hintergrund zu einer beschleunigten Entwicklung des Diabetes (Persönliche Kommunikation Dr. Edward Leiter). Dies lässt sich durch das verstärkte Auftreten des NAD-induzierten Zelltods (NICD) ART2 positiver Zellen erklären. Es wurde gezeigt, dass die CD4+CD25+ Regulator T-Zellen, die das Überschießen von Immunreaktionen verhindern, extrem empfindlich gegenüber dem NAD-induzierten Zelltod (NICD) sind (Aswad, Kawamura et al. 2005). Andererseits zeigen autoreaktive Zellen einen aktivierten Phänotyp. Da ART2 nach der Aktivierung von T-Zellen abgestoßen wird, sind diese Zellen unempfindlich gegenüber NAD. So kommt es einerseits zu einer Abnahme der Population von Regulator T-Zellen, andererseits zu einer Akkumulation von autoreaktiven T-Zellklonen, was das beschleunigte Auftreten des Diabetes in diesen Mäusen erklärt (persönliche Kommunikation Dr. Edward Leiter). Dass diese Beschleunigung von der ART2-vermittelten ADP-Ribosylierung abhängt, zeigt sich in der Tatsache, dass NOD Mäuse, in die nicht nur die CD38-Defizienz, sondern auch die ART2-Defizienz eingekreuzt wurde, keinen Diabetes entwickeln. Überraschend ist hierbei allerdings, dass diese Mäuse überhaupt keinen Diabetes mehr entwickeln, während ART2-defiziente NOD Mäuse einen gegenüber Wildtyp NOD unveränderten Verlauf des Diabetes aufweisen (Kawamura, Aswad et al. 2005). Diese komplette Resistenz gegenüber einer Diabeteserkrankung lässt sich möglicherweise durch andere ART2-unabhängige Effekte von extrazellulärem NAD oder durch die Kombination protektiver Loci innerhalb der eingekreuzten chromosomalen Abschnitte erklären.

Abschließende Betrachtung zu Kapitel 4.2

NAD und ATP erfüllen alle Anforderungen an einen extrazellulären Messenger. So gibt es einen großen Gradienten über die Zellmembran mit niedrigen extrazellulären und hohen intrazellulären Konzentrationen. In den Zellen existiert ein großer „Pool“, der, wenn ausgeschüttet, für kurze Zeit eine hohe lokale Konzentration erzeugt. NAD und ATP sind extrazellulär instabil und werden durch spezifische Enzyme schnell wieder entfernt, um ein kurzes Signal zu gewährleisten. Für ATP und indirekt auch für NAD stellt der P2X7 Rezeptor einen spezifischen Rezeptor für diese extrazellulären Messenger dar. *In vivo* scheint NAD als extrazellulärer Messenger praktische Vorteile gegenüber ATP zu haben. So ist NAD noch in viel geringeren Konzentrationen, also vermutlich auch über weitere Entfernungen, wirksam. Da NAD und ATP extrazellulär schnell degradiert werden, ist deren Wirkzeit als extrazellulärer Messenger stark begrenzt. Hier zeigt sich wiederum ein Vorteil für NAD als effizienter Messenger, da eine kurze Wirkzeit von NAD ausreicht, um P2X7 langfristig zu aktivieren. **Abbildung 88** gibt einen Überblick über die mögliche Funktion von NAD als Messenger: NAD wird durch nicht-lytische oder lytische Prozesse aus endogenen Quellen freigesetzt, dient noch in mikromolarer Konzentration ART2 als Substrat, die durch ADP-Ribosylierung des P2X7 Rezeptors die Signaltransduktion veranlasst. Die Verfügbarkeit von NAD wird durch CD38 streng reguliert.

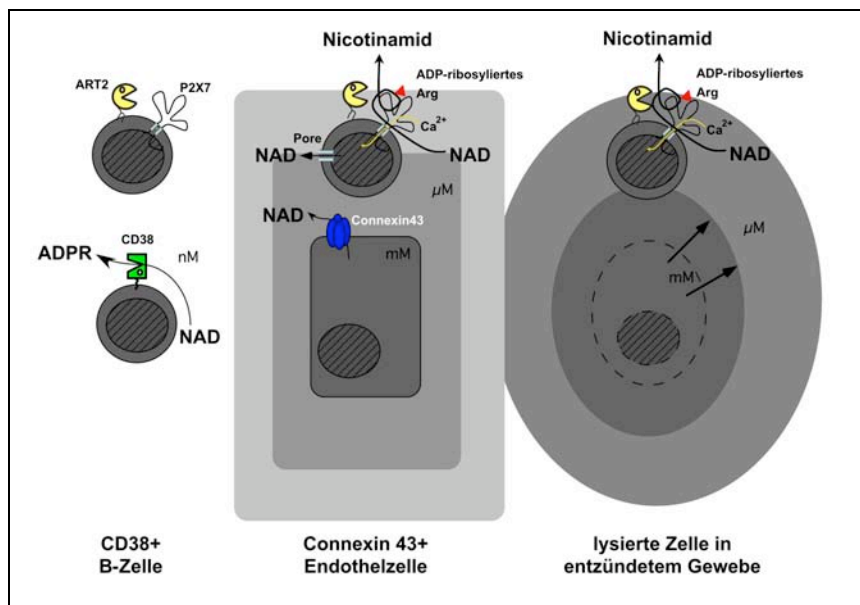


Abb. 88: Endogene Quellen von extrazellulärem NAD. NAD kann von lysierten Zellen in entzündetem Gewebe oder auch durch kontrollierte Prozesse, z.B. durch Connexin43-Kanäle, oder durch P2X7 induzierte Poren freigesetzt werden. Millimolare Konzentrationen in den Zellen und in direkter räumlicher Nähe zu einer lysierten Zelle sind durch dunkelgraue Schattierung dargestellt. Mikro- und nanomolare Konzentrationen durch entsprechend hellere Grauschattierungen. Mikromolare Konzentrationen von NAD sind ausreichend für ART2 katalysierte Aktivierung des P2X7 Rezeptors und daraus folgenden Zelltod. CD38, eine auf B-Zellen exprimierte potente NADase, entfernt das Substrat für die ART2 und limitiert damit die ART2-vermittelte Signaltransduktion. Die Produkte der CD38-vermittelten NAD Hydrolyse (ADPR, cADPR) könnten ihrerseits Signaltransduktionen auslösen.

4.3 Schicksal der durch Purine in die Apoptose getriebenen Zellen

Bei der Definition der Apoptose wird als das essentielle Merkmal die Erkennung und Phagozytose intakter Zellen oder apoptotischer Körperchen ohne die Freisetzung des Zellinhaltes der apoptotischen Zelle genannt (Savill, Dransfield et al. 2002). Das nach außen Kehren von Phosphatidylserin während der Apoptose gilt als ein „friss mich“ Signal für Makrophagen. Die Ergebnisse der Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass Zellen, die nach Inkubation mit NAD oder ATP Phosphatidylserin nach außen kehren, effizient erkannt und phagozytiert werden. Dies unterstützt die Klassifikation des NAD-induzierten Zelltodes (NICD) als Apoptose.

In vitro Phagozytose durch kultivierte Peritonealmakrophagen

Dass das nach außen Kehren von Phosphatidylserin auch im Fall der Phagozytose NAD behandelter T-Zellen das „friss mich“ Signal darstellt und nicht etwa ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine, kann man aus den beiden Tatsachen schließen, dass T-Zellen auch nach Behandlung mit ATP effizient phagozytiert werden (**Abb. 44**) und dass Zellen, die mit NAD inkubiert werden und somit ADP-ribosylierte Zelloberflächenproteine besitzen, nach anschließender Blockade der Aktivierung des P2X7 Rezeptors nicht phagozytiert werden (**Abb. 50**). Die Experimente zur selektiven Phagozytose der Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen zeigen, wie genau die Makrophagen ihre Beute „abtasten“: Auch in einem Durcheinander von vitalen und apoptotischen Zellen werden nur die Phosphatidylserin nach außen kehrenden Zellen gefressen (**Abb. 53**). Wie sich anhand der Ergebnisse in **Abbildung 49** feststellen lässt, erfolgt die Phagozytose der apoptotischen Zellen sehr effizient. Bei den vergleichenden Versuchen zur Reversibilität des „friss mich“-Signals - Phosphatidylserin auf der Außenseite - nach einem kurzen Puls NAD und ATP zeigen sich deutliche Unterschiede. Zellen, die für kurze Zeit extrazellulärem ATP ausgesetzt sind, ziehen das Phosphatidylserin innerhalb von einer halben Stunde wieder ein und werden bei der Koinkubation mit Makrophagen nicht mehr phagozytiert. Andererseits reicht eine sehr kurze Anwesenheit einer niedrigen NAD-Konzentration zur dauerhaften Aktivierung des P2X7 Rezeptors und damit zu einem Aufrechterhalten des „friss mich“-Signals (**Abb. 50**). Kinetik-Experimente zeigen, dass die Phagozytose ein schneller Prozess ist (**Abb. 46,47**). Das deutet auf die Möglichkeit hin, dass auch Zellen, die nur für kurze Zeit extrazellulärem ATP ausgesetzt sind, bereits nach kurzer Zeit phagozytiert werden können, wenn sie sich in räumlicher Nähe zu Makrophagen befinden.

Phagozytose durch residente Peritonealmakrophagen

Die Experimente mit frisch isolierten Peritonealmakrophagen zeigen, dass die Makrophagen zur Bewerkstelligung ihrer Aufgabe keiner weiteren *in vitro* Voraktivierung bedürfen. Sowohl mit NAD als auch ATP behandelte Zellen werden durch frisch isolierte Makrophagen schnell und effizient phagozytiert (**Abb. 54**). Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch i.p. gespritzte apoptotische Zellen durch residente Peritonealmakrophagen unter physiologischen Bedingungen effizient phagozytiert werden können (**Abb. 55**). Allerdings weisen frisch isolierte Makrophagen eine Heterogenität bezüglich der Phagozytose-Leistung. So zeigen sich bei den Phagozytose-

Experimenten in Suspension nur 40% der frisch isolierten Peritonealmakrophagen zur Aufnahme von apoptotischen T-Zellen bereit, während über 80% der kultivierten Peritonealmakrophagen phagozytierten (vergleiche **Abb.54** und **Abb.49**). Ob und inwiefern sich nicht-phagozytierende und phagozytierende Makrophagen bezüglich Aktivierung und Differenzierung unterscheiden, bleibt zu klären.

In vivo Phagozytose i.v. gespritzter Zellen.

Bei den Experimenten zur *in vivo* Phagozytose i.v. injizierter T-Zellen zeigt sich insgesamt ein großer Verlust von über 95% der injizierten Zellen. Dies ist sowohl bei den ART2-defizienten vitalen Zellen als auch bei den apoptotischen Wildtyp Zellen der Fall. Es wird beschrieben, dass große Anteile i.v. injizierter Lymphozyten zunächst im Kapillarnetz der Lunge stecken bleiben und erst nach 24 Stunden aus der Lunge heraus migrieren (Tietz and Hamann 1997). Bei den aus peripherem Blut und Leber wiedergewonnenen injizierten Zellen zeigt sich aber trotzdem ein deutlicher Unterschied zwischen vitalen und apoptotischen Zellen (**Abb. 56**). Die Zahl der wiedergewonnenen apoptotischen Zellen entspricht nur 30% der wiedergewonnenen vitalen Zellen. Dieses korreliert mit dem Anteil der Zellen, die kein Phosphatidylserin nach außen kehren. Während 98 % der vitalen Zellen kein Phosphatidylserin nach außen kehren, sind es bei den apoptotischen Zellen 30% (**Abb. 56**).

Abschließende Betrachtung zu Kapitel 4.3

Unabhängig davon, ob es sich beim NAD-induzierten Zelltod um einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod handelt, werden die Zellen sehr schnell phagozytiert, wenn sie in Kontakt mit Makrophagen kommen. Die Daten aus den Experimenten der i.v. Injektion apoptotischer Zellen stützen hierbei die *in vitro* gesammelten Daten. Es wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob es in Folge der Phagozytose apoptotischer Zellen zur Produktion von Zytokinen kommt. So wird beschrieben, dass es nach Phagozytose apoptotischer Zellen zur Unterdrückung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt, welches durch von den Makrophagen sekretiertes TGF- β bewirkt wird, dagegen kommt es nach Phagozytose nekrotischer Zellen zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Fadok, Bratton et al. 2001). Andere Autoren beschreiben, dass es nach Phagozytose nekrotischer Zellen nicht zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt (Brouckaert, Kalai et al. 2004) und dass auch nach Phagozytose apoptotischer Zellen weder pro-inflammatorische noch anti-inflammatorische Zytokine produziert werden (Brouckaert, Kalai et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnten im Überstand von Makrophagen nach Koinkubation mit apoptotischen Zellen weder die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine Interferon- γ , IL-1 β und IL-12 noch Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β nachgewiesen werden. Dies spricht im Fall des NAD-induzierten Zelltods für das „leise“ Entfernen dieser Zellen ohne direkte Folge für die Zytokinsekretion (Kurosaka, Takahashi et al. 2003). Es bleibt noch zu klären, ob die Fähigkeit der Makrophagen, die apoptotische T-Zellen phagozytiert haben, auf einen inflammatorischen Reiz hin (z.B. LPS)TNF- α zu sezernieren.

4.4 Zellkulturmodelle

Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien

Die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Lymphomzelllinien auf Empfindlichkeit gegenüber NAD zeigen, dass für eine funktionierende ART2-vermittelte Signaltransduktion sowohl eine ausreichende ART2-Expression als auch eine ausreichende Expression des P2X7 Rezeptors benötigt wird. Hierbei ist es im Zellkulturmodell offensichtlich wichtig, dass der P2X7 Rezeptor als Wildtyp P451 Allel vorliegt, um die ART2-vermittelte Signaltransduktion durchzuführen. *In vivo* hingegen wird für Regulator T-Zellen auch bei Mausstämmen, die das mutierte L451 Allel des P2X7 Rezeptors besonders stark exprimieren, eine starke Sensitivität gegenüber NAD beschrieben (Aswad, Kawamura et al. 2005). In **Abb. 57** ist zu erkennen, dass nur die Zelllinien YAC-1.HH und MD27 sowohl auf NAD als auch auf ATP reagieren. Dies erklärt sich durch die ausreichende Expression von ART2 und P2X7 und das Vorhandensein des Wildtyp P2X7 Allels (**Abb. 58**). Zellen, die wie die LB-alpha Zellen zwar den Wildtyp P2X7 exprimieren, jedoch eine zu niedrige ART2-Expression haben, reagieren nur auf ATP (**Abb. 57**). Die EL4.ATCC-Zellen exprimieren sowohl ART2 als auch P2X7 in ausreichender Stärke. Da hier jedoch das mutierte L451 P2X7 Allel vorliegt, reagieren die Zellen nicht auf NAD und nur schwach auf ATP. Die Ergebnisse der Experimente mit den beiden Zelllinien MD27 und YAC1-HH, die auf NAD reagieren, werden im Folgenden diskutiert.

MD27

Im Vergleich mit T-Zellen zeigt sich bei der Behandlung von MD27-Zellen mit NAD und ATP eine ähnliche Reaktion bezüglich des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin (**Abb. 59,60**). Dies geschieht bereits bei niedrigen Konzentrationen von NAD. Interessanterweise reagiert jedoch nur ein Teil der MD27-Zellen auf NAD, während der Großteil auf ATP reagiert. Ein deutlicher Unterschied in der Reaktion auf NAD und ATP betrifft hier jedoch die durch Anfärbbarkeit mit Propidiumjodid gemessene Membranintegrität, die bei T-Zellen bereits nach kurzer Zeit zusammenbricht, während sie bei MD27-Zellen auch noch nach Inkubation mit millimolaren Konzentrationen ATP gegeben ist. Die Experimente zur Reversibilität (**Abb. 61**) bestätigen das Konzept eines löslichen Liganden ATP und eines durch ADP-Ribosylierung kovalent gebundenen Liganden, das durch Untersuchungen bei T-Zellen etabliert wurde. Auch die Blockadeexperimente bestätigen, dass ART2 und P2X7 die Hauptspieler in der Signaltransduktion sind (**Abb. 62**). Eine interessante, die MD27-Zellen betreffende Frage bleibt jedoch offen: Warum reagiert immer nur ein Teil der MD27-Zellen mit PS-Flashing auf NAD, obwohl alle Zellen ART2- und P2X7 exprimieren (**Abb. 58**)? Selbst nach einer Subklonierung reagierte immer nur ein Teil der Zellen. Das Experiment zur Untersuchung einer möglichen Korrelation der Sensitivität gegenüber NAD mit dem Zellzyklus zeigt, dass in allen Stadien des Zellzyklus nur ein Teil der Zellen reagiert (**Abb. 63**). Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten sogar subklonierter Zellen gegenüber NAD bietet die Herkunft der Zelllinie. Es handelt sich um ein Hybridom aus einer Lymphomzelllinie der AKR Maus und einer T-Zelle aus der BALB/c Maus. Die AKR Maus trägt das mutierte 451L Allel des P2X7 Rezeptors, während die BALB/c Maus das Wildtypallel besitzt. Es könnte durch

sogenannte „Allele Exklusion“ zur Inaktivierung jeweils eines der Allele durch Methylierung in der Promotorregion kommen. Zellen, die den Wildtyp exprimieren, wären dann sensitiv, die Zellen mit mutiertem P2X7 dagegen nicht. Dies könnte möglicherweise durch Sortierung der Zellen nach reagierenden und nicht-reagierenden Zellen durch AnnexinV-Magnetobeads und anschließender RT-PCR untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in einem Unterschied in der Verfügbarkeit von Downstream Faktoren. Für den P2X7 Rezeptor der Ratte konnte in HEK Zellen die Interaktion mit 11 Proteinen nachgewiesen werden, was auf einen regelrechten Signal-Komplex hinweist (Kim, Jiang et al. 2001). Dies könnte auch die Beobachtung erklären, dass die Transfektion von P2X7 je nach Zelltyp zu unterschiedlicher Sensitivität gegenüber ATP führt. So sind humane HEK Zellen weniger sensitiv, während zum Beispiel die Hühnerlymphomzelllinie DT40 mit Aktivierung von Caspasen, DNA-Fragmentierung und apoptotischem Zelltod reagiert (Hillman, Harada et al. 2003).

YAC-1.HH

Im Vergleich zu primären Zellen zeigen die YAC-1.HH-Zellen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber extrazellulärem NAD (**Abb. 64**). Hier reagieren alle Zellen auf NAD und ATP, wobei es, wie schon bei den MD27-Zellen, zu keinem Verlust der Membranintegrität kommt. Bei dieser Zelllinie zeigt sich das bei T-Zellen beobachtete Schrumpfen der Zellen (**Abb. 64,65**). Weiterhin bestätigten Echtzeituntersuchungen zur Kinetik des nach außen Kehrens von Phosphatidylserin (**Abb. 65**) und Calciumflux (**Abb. 66,67**) die mit T-Zellen gewonnenen Erkenntnisse. Dass die YAC-1.HH-Zellen ein sehr gutes Modell für die Signaltransduktion darstellen, zeigt sich auch in der Fähigkeit, nach NAD-Behandlung CD62L abzustoßen (**Abbildung 68**).

Interessanterweise existiert eine Variante der YAC-1-Zellen, die nicht auf ATP und NAD reagiert: YAC1.ATCC. Die in **Abbildung 69** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch Komplettierung der beiden Interaktionspartner ART2 und P2X7 - durch Transfektion mit einem P2X7 Expressionskonstrukt - die Sensitivität gegenüber NAD wieder hergestellt werden kann. Die YAC-1.ATCC-Zellen stellen damit ein sehr gutes Werkzeug für die Analyse der Signaltransduktion dar. Durch Transfektion dieser Zellen mit P2X7-Expressionskonstrukten, in denen mit den jeweiligen Argininen die möglichen Ziele der ADP-Ribosylierung mutiert wurden, könnte endgültig abgeklärt werden, ob die ADP-Ribosylierung des P2X7 für die Signaltransduktion verantwortlich ist.

Die YAC-1.HH-Zellen lassen sich aufgrund ihrer Größe auch für Patch-Clamp-Untersuchungen verwenden. Wie in **Abbildung 70** zu sehen ist, lässt sich bei diesen Zellen in einer Patch-Clamp-Untersuchung eine Aktivierung des P2X7 Rezeptors nach Superfusion mit ATP innerhalb weniger Millisekunden nachweisen. Dass sich in diesen Experimenten nach einer NAD Superfusion keine Aktivierung des P2X7 Rezeptors nachweisen lässt, kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die Patch-Clamp-Messung für langsamere Prozesse, wie die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch ADP-Ribosylierung, nicht das geeignete Werkzeug darstellt. Die nicht nachweisbare Kanalöffnung nach NAD-Behandlung kann dadurch erklärt werden, dass die Patch-Clamp-Experimente aus technischen Gründen nur bei Raumtemperatur durchgeführt werden können und jeweils einzelne Zellen gemessen werden. Bei Calciumflux Untersuchungen nach NAD-

Behandlung kann sogar bei 37°C erst nach ca. 1 Minute ein Calciumflux nachgewiesen werden (**Abb. 67**). Nur wenige Zellen reagieren zu diesem frühen Zeitpunkt mit Calciumflux. Dies erklärt möglicherweise, dass bei einer Einzel-Zellanalyse wie der Patch-Clamp-Technik, die darüber hinaus nur einen Zeitraum von wenigen Sekunden abdeckt, keine durch NAD ausgelöste Kanalöffnung nachweisbar ist.

4.5 Herausforderung des Immunsystems

Immunisierungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Pilot-Experimente zur Herausforderung des Immunsystems stellen wichtige Vorarbeiten für die weitere Analyse der ART2-defizienten Mäuse dar. Die bisher erhobenen Daten zeigen, dass ART2-defiziente Mäuse eine vergleichbare Antikörperantwort auf das T-Zellabhängige Antigen Ovalbumin-TNP durchführen können (**Abb.71**) und dass sie auf Immunisierung mit dem Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) mit einer Expansion von V β 8⁺ T-Zellen reagieren können, und diese Population anschließend – vermutlich durch Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) – wieder reduziert wird. Darüber hinaus zeigen ART2-defiziente Mäuse die bei Wildtyp Mäusen beschriebene Fähigkeit, die überlebenden V β 8⁺ T-Zellen zu anergisieren (Kawabe and Ochi 1990). Auch die Pilotexperimente zur Concanavalin A (ConA) induzierten Autoimmunhepatitis zeigen eine Aktivierbarkeit von T-Zellen in Milz und Leber (**Abb.75,76**) ART2-defizienter Tiere sowie nekrotische Veränderungen, die in histologischen Schnitten sichtbar sind (**Abb.77B**) und Schädigungen der Leber, die sich durch erhöhte Leberenzymaktivität im Blutplasma feststellen lassen (**Abb.77A**).

Infektion mit *Plasmodium berghei*

Bei der Infektion von ART2-defizienten und Wildtyp Mäusen mit dem Malariaerreger *Plasmodium berghei* zeigt sich in den bisher durchgeführten Experimenten eine etwas längere Überlebenszeit ART2-defizienter Mäuse (**Abb.78**). Dieser Unterschied in der Überlebensdauer korreliert mit einer leicht verzögerten Parasitämie bei ART2-defizienten Tieren (**Abb.79**) sowie mit einer deutlich höher tolerierten Parasitämie im Spätstadium. Es ist beschrieben worden, dass es im späten Verlauf der Malariaerkrankung durch *Plasmodium berghei* zu einer starken Reduktion der CD4⁺ T-Helfer-Zellen kommt (Jacobs, Graefe et al. 2002). Als eigentliche Todesursache bei der Infektion mit *Plasmodium berghei* wird die Überforderung des Organismus mit toxischen Dosen proinflammatorischer Zytokine beschrieben. Mäuse, bei denen durch einen monoklonalen Antikörper Interleukin-12 (IL-12) depletiert wird, überleben bei gleichbleibender Parasitämie länger als die nicht IL12-depletierten Kontrollen (Yoshimoto, Takahama et al. 1998). Untersuchungen mit IL-12-defizienten Mäusen bestätigten diese Ergebnisse (Adachi, Tsutsui et al. 2001). Einen Ansatz für nachfolgende Experimente könnte die vergleichende Bestimmung der Zytokinproduktion nach Infektion darstellen. Um mögliche Folgen der ART2-Defizienz für die Immunabwehr der Tiere zu untersuchen, wäre möglicherweise auch die Verwendung einer anderen Art Plasmodien interessant: *Plasmodium yoelii*. Hier verläuft die Erkrankung nicht immer tödlich (Swardson, Wassom et al. 1997). Im Verlauf spielt eine T-Zell-abhängige Immunantwort eine Rolle, da die Depletion von T-Zellen einen tödlichen Verlauf der Erkrankung bewirkt (persönliche Kommunikation mit Dr.Jacobs,BNI).

4.6 ART2-transgene Mäuse

Die Generierung ART2-transgener Mäuse stellt noch eine Vorarbeit zur weiteren Charakterisierung der Funktion von ART2 dar. Diese Mäuse stellen unter anderem ein interessantes Werkzeug dar, um die Bedeutung der Membranverankerung von ART2 mit einem GPI-Anker genauer zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass ART2 als GPI-verankertes Enzym mit „Detergenzienresistenten Mikrodomänen“, sogenannten „Lipid Rafts“ assoziiert ist (Bannas, Adriouch et al. 2005). Durch diese Lokalisation wird die Auswahl der Zielproteine und die Aktivität von ART2 im Zellkulturmodell beeinflusst. Vergleichende Untersuchungen von ART2 transgenen Mäusen mit GPI-verankerter oder transmembranverankerter ART2 können neue Erkenntnisse in Bezug auf die Bedeutung der „Raft“-Assoziation bringen. Darüber hinaus kann die Überexpression von ART2 als „Shedding“-resistente Transmembranvariante möglicherweise neue Erkenntnisse für die Bedeutung des ART2-„Sheddings“ im Immunsystem liefern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich zwei transgene Mauslinien, die ART2 in ihrer natürlichen GPI-verankerten Form überexprimieren, hergestellt, die das Transgen stabil ins Genom integriert haben und an ihre Nachkommen weitervererben (**Abb.81**). Hierbei zeigt sich eine, im Gegensatz zur niedrigen Expression in Wildtyptieren, auffällig hohe ART2-Expression im Thymus (**Abb.82**). Die Mäuse werden zur Zeit auf den ART2.KO Hintergrund eingekreuzt.

Bei der Linie mit dem transmembranverankerten ART2 (ART2.TM) wurden fünf Foundertiere erzeugt, die zur Zeit auf Expression überprüft werden. Die Nachkommen von zwei Foundertieren enthalten jedoch das Transgen nicht. Ein Foundertier produziert nur tote Nachkommen. Möglicherweise hat das Transgen bei der Integration ein bei der Embryonalentwicklung wichtiges Gen inaktiviert. Zwei weitere Foundertiere vererben das Transgen, allerdings exprimieren die transgenen Nachkommen das ART2 nicht oder nur schwach auf peripheren Blutzellen. Dies könnte zum Beispiel an der Integration des Transgens in räumlicher Nähe zu regulatorischen *cis*-wirkenden DNA-Elementen liegen.

4.7 Biologische Bedeutung von ART2

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben die Aufstellung einer Hypothese zur biologischen Funktion des durch ART2 katalysierten NAD-induzierten Zelltodes (NICD). Da ART2-defiziente Mäuse eine normale Menge und Verteilung der T-Zell-Subpopulationen aufweisen, spielt NICD offensichtlich keine Rolle bei der Generierung und Regulation des T-Zell Repertoires (Ohlrogge, Haag et al. 2002). Vielmehr ist es vorstellbar, dass NICD *in vivo* vor allem in Situationen auftritt, in denen NAD von Zellen freigesetzt wird. Solche Situationen könnten zum Beispiel bei Gewebeverletzungen oder inflammatorischen Prozessen vorkommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass NAD aus lysierten (**Abb.36**) oder beschädigten (**Abb.40**) Zellen tatsächlich NICD auslösen kann. In Situationen, in denen NAD durch lytische Mechanismen freigesetzt wird, kommt es auch zur Freisetzung intrazellulärer Proteine. Diese könnten in Verbindung mit lokal hohen Konzentrationen inflammatorischer Zytokine zur Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führen. Da aktivierte T-Zellen ART2 von der Oberfläche abgestoßen haben (Kahl, Nissen et al. 2000), sind sie resistent gegenüber NICD (Haag, Freese et al. 2002). ADP-Ribosylierung von P2X7 und anschließender Zelltod würde also nur bei ART2 exprimierenden, nicht aktivierten T-Zellen, sogenannten „Bystander T-Zellen“ auftreten. Durch diesen Mechanismus könnten potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert werden oder auch durch Entfernung irrelevanter naiver T-Zellen „Platz“ für die Expansion relevanter, antigenspezifischer T-Zellen geschaffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch ein mögliches Schicksal der Zellen in einem sehr frühen Stadium des NICD aufgezeigt werden. Die ART2 positiven Bystander T-Zellen in einer inflammatorischen Umgebung würden Phosphatidylserin nach außen kehren und könnten effizient durch Makrophagen aus dem Verkehr gezogen werden. NICD könnte allerdings auch ein zweiseitiges Schwert darstellen, wenn bereits aktivierte autoreaktive T-Zellen vorhanden sind, die ART2 von der Zelloberfläche abgestoßen haben und es zur Eliminierung von NICD sensitiven T-Regulator-Zellen kommt. In so einer Situation könnten Autoimmunerkrankungen möglicherweise noch verstärkt werden. Dies könnte die beschleunigte Inzidenz des Diabetes in CD38-defizienten Mäusen erklären (persönliche Kommunikation mit Dr. Leiter, The Jackson Laboratory). In **Abbildung 89** ist die Hypothese zur biologischen Funktion von NICD zusammenfassend und schematisch dargestellt.

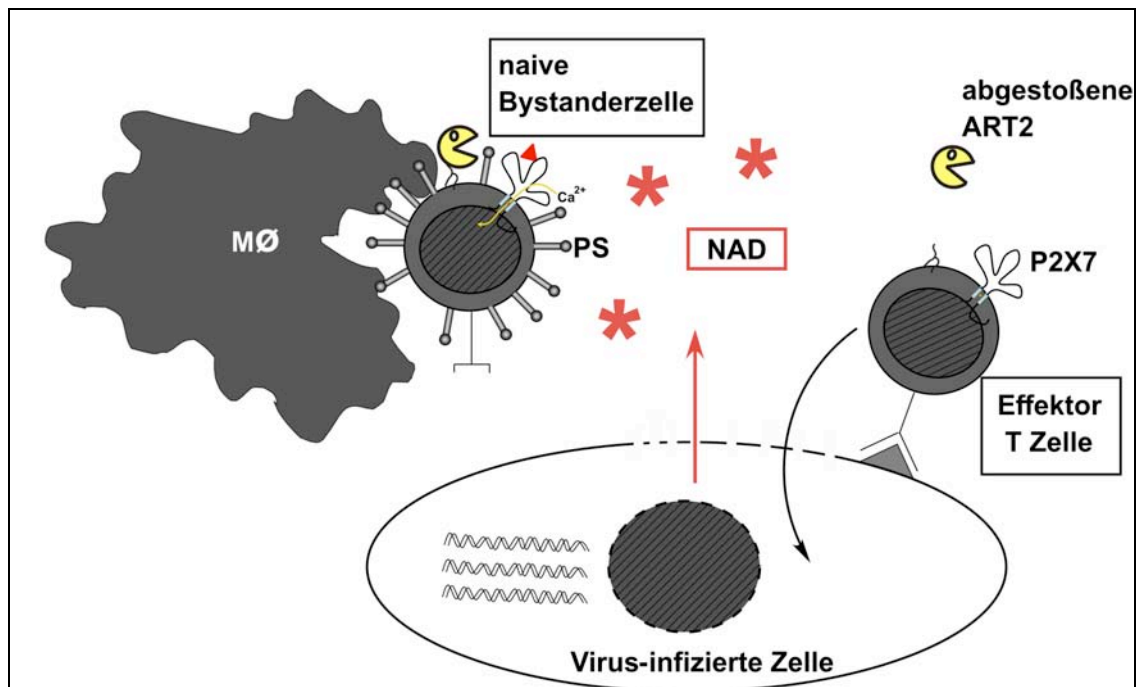


Abb. 89: Bystander-Hypothese. Im Rahmen von Immunreaktionen kommt es zur Lyse von Virus infizierten Zellen. Hierbei wird intrazelluläres NAD freigesetzt. Naive Bystanderzellen mit ART2 auf der Oberfläche ADP-ribosylieren den P2X7 Purinozeptor, was zur Aktivierung von P2X7, Calciumflux und dem nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin führt. Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellen dient als „friss mich“ Signal für Makrophagen, die die Zelle entfernen. Aktivierte T-Zellen haben ART2 mittels Metalloprotease von der Zelloberfläche abgestoßen. Die Virus-spezifischen T-Zellen sind daher resistent gegenüber dem NAD-induzierten Zelltod (NICD).

4.8 Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurden wertvolle Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen und zur Funktion der durch ART2 katalysierten NAD-induzierten Apoptose von T-Zellen gewonnen. Es wurden ferner wertvolle Werkzeuge für nachfolgende Untersuchungen bereitgestellt. So zum Beispiel die YAC-1.ATCC-Zellen, die nach Transfektion eines funktionalen P2X7 Rezeptors empfindlich gegenüber NAD sind. Durch Transfektion von mutierten P2X7 Expressionskonstrukten kann geklärt werden, welches Arginin ADP-ribosyliert wird. Weiterhin kann mit Hilfe dieses Zellkulturmodells untersucht werden, ob die ADP-Ribosylierung von P2X7 selbst für die Aktivierung notwendig ist oder ob die ADP-Ribosylierung von benachbarten Zelloberflächenproteinen den kovalent gebundenen Liganden bereitstellen kann. Die ART2 transgenen Mäuse erlauben vergleichende Untersuchungen zur Bedeutung „der Raft“-Assoziation von ART2. Mit der Identifizierung von ART2 und P2X7 als Hauptspieler des NAD-induzierten Zelltodes bieten diese neue Angriffspunkte für eine mögliche Immunmodulation durch spezifische Inhibitoren. Es werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit auch neue Fragen aufgeworfen, etwa die nach der Bedeutung des Abstoßens von CD62L und dem nach außen Kehren von Phosphatidylserin für die Migration von Zellen. Interessant ist auch die Frage, inwiefern die durch P2X7 Aktivierung veränderten Membranfunktionen (PS-Flashing, CD62L-Shedding) die Interaktion von T-Zellen mit Makrophagen oder anderen Antigen-präsentierenden Zellen im lokalen Kontext der „Immunologischen Synapse“ beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" *Pharmacol. Ther.* **64**(3): 445-475.
- Ablamunits, V., M. Bridgett, et al. (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.
- Adachi, K., H. Tsutsui, et al. (2001). "Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism." *J Immunol* **167**(10): 5928-34.
- Adriouch, S., C. Dox, et al. (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., G. Dubberke, et al. (2005). "Probing the expression and function of the P2X7 purinoreceptor with antibodies raised by genetic immunization." *Cell Immunol.*
- Adriouch, S., W. Ohlrogge, et al. (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. and I. Just (2000). *Bacterial Protein Toxins*. Berlin, Springer Verlag.
- 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.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Anderson, M. E. and T. J. Sahaan (2003). "Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors." *Peptides* **24**(3): 487-501.
- Asubel, F. M. (1999). *Current Protocols In Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Aswad, F., H. Kawamura, et al. (2005). "High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors." *J Immunol* **175**(5): 3075-83.
- Babiychuk, E. B. and A. Draeger (2000). "Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains." *J Cell Biol* **150**(5): 1113-24.
- Bannas, P., S. Adriouch, et al. (2005). "Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts." *Blood* **105**(9): 3663-70.
- Baricordi, O. R., D. Ferrari, et al. (1996). "An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes." *Blood* **87**(2): 682-90.
- Bazan, J. F. and N. F. Koch (1997). "Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families." *Adv Exp Med Biol* **419**: 99-107.
- Bhardwaj, A. and B. B. Aggarwal (2003). "Receptor-mediated choreography of life and death." *J Clin Immunol* **23**(5): 317-32.
- Bossy-Wetzel, E. and D. R. Green (2000). "Detection of apoptosis by annexin V labeling." *Methods. Enzymol.* **322**: 15-8.
- Bratton, D. L., V. A. Fadok, et al. (1997). "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." *J Biol Chem* **272**(42): 26159-65.
- Brouckaert, G., M. Kalai, et al. (2004). "Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1089-100.

- Brown, S., I. Heinisch, et al. (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-3.
- Bruzzone, S., L. Guida, et al. (2001). "Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells." Faseb. J. **15**(1): 10-12.
- Budagian, V., E. Bulanova, et al. (2003). "Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B." J Biol Chem **278**(3): 1549-60.
- Bulanova, E., V. Budagian, et al. (2005). "Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells." J Immunol **174**(7): 3880-90.
- Burkle, A. (2001). "Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation." Bioessays **23**(9): 795-806.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach. B. L. Straub RW. New York, Raven Press. **1978**: 107-199.
- Bursch, W., A. Ellinger, et al. (2000). "Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?" Ann N Y Acad Sci **926**: 1-12.
- Burstein, D., J. P. Mordes, et al. (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, et al. (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.
- Chang, M. K., C. Bergmark, et al. (1999). "Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6353-8.
- Chen, D., R. J. McKallip, et al. (2001). "CD44-deficient mice exhibit enhanced hepatitis after concanavalin A injection: evidence for involvement of CD44 in activation-induced cell death." J. Immunol. **166**(10): 5889-5897.
- Chen, J., P. C. Reifsnyder, et al. (2005). "'Agouti NOD': identification of a CBA-derived Idd locus on Chromosome 7 and its use for chimera production with NOD embryonic stem cells." Mamm Genome **16**(10): 775-83.
- Chilson, O. P. and A. E. Kelly-Chilson (1989). "Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes." Eur J Immunol **19**(2): 389-96.
- Chimini, G. (2002). "Apoptosis: repulsive encounters." Nature **418**(6894): 139-41.
- Choe, S., M. J. Bennett, et al. (1992). "The crystal structure of diphtheria toxin." Nature **357**(6375): 216-22.
- Cirman, T., K. Oresic, et al. (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." J Biol Chem **279**(5): 3578-87.
- Cockayne, D. A., T. Muchamuel, et al. (1998). "Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses." Blood **92**(4): 1324-33.
- Cockcroft, S. and B. D. Gomperts (1979). "ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells." Nature **279**(5713): 541-2.
- Coico, R. (2001). Current Protocols In Immunology. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Collo, G., S. Neidhart, et al. (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**(9): 1277-83.
- Cotrina, M. L., J. H. Lin, et al. (1998). "Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15735-40.
- 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.
- Dexter, T. M. and E. Spooner (1987). "Growth and differentiation in the hemopoietic system." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 423-41.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, et al. (1998). "Cytolytic P2X purinoceptors." *Cell Death Differ* **5**(3): 191-9.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, et al. (2001). "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." *Blood* **97**(3): 587-600.
- Dive, C., C. D. Gregory, et al. (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." *Biochim Biophys Acta* **1133**(3): 275-85.
- Domenighini, M. and R. Rappuoli (1996). "Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages." *Mol Microbiol* **21**(4): 667-74.
- Donovan, M. and T. G. Cotter (2004). "Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death." *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 133-47.
- Elliott, J. I., A. Surprenant, et al. (2005). "Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes." *Nat Cell Biol* **7**(8): 808-16.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2001). "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases." *J Immunol* **166**(11): 6847-54.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." *Nature* **405**(6782): 85-90.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." *J Biol Chem* **276**(2): 1071-7.
- Faria, R. X., F. P. Defarias, et al. (2005). "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?" *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(2): C260-71.
- Ferrari, D., A. La Sala, et al. (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, et al. (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.
- Formigli, L., L. Papucci, et al. (2000). "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncytic process of cell death sharing apoptosis and necrosis." *J Cell Physiol* **182**(1): 41-9.
- Frasch, S. C., P. M. Henson, et al. (2004). "Phospholipid flip-flop and phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) co-localize to uropod rafts in formylated Met-Leu-Phe-stimulated neutrophils." *J Biol Chem* **279**(17): 17625-33.
- French, L. E. and J. Tschopp (2003). "Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors." *Cell Death Differ* **10**(1): 117-23.
- Friis, M. B., C. R. Friberg, et al. (2005). "Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts." *J Physiol* **567**(Pt 2): 427-43.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." *Biol Reprod* **67**(1): 340-50.
- Galkina, E., K. Tanousis, et al. (2003). "L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes." *J Exp Med* **198**(9): 1323-35.
- Glowacki, G., R. Braren, et al. (2002). "The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse." *Protein Sci* **11**(7): 1657-70.
- Goding, J. W., R. Terkeltaub, et al. (1998). "Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family." *Immunol. Rev.* **161**: 11-26.

- Goldstein, J. C., N. J. Waterhouse, et al. (2000). "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant." Nat Cell Biol **2**(3): 156-62.
- Gorer, P. A. (1950). "Studies in antibody response of mice to tumour inoculation." Br J Cancer **4**(4): 372-9.
- Gosslar, U., P. Jonas, et al. (1996). "Predominant role of alpha 4-integrins for distinct steps of lymphoma metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4821-6.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Greiner, D. L., E. S. Handler, et al. (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, et al. (1987). "Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats." J Exp Med **166**(2): 461-75.
- Gu, B., L. J. Bendall, et al. (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.
- Gudipaty, L., J. Munetz, et al. (2003). "Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1beta secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells." Am J Physiol Cell Physiol **285**(2): C286-99.
- Haag, F., V. Andresen, et al. (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, et al. (2002). "T Cells of Different Developmental Stages Differ in Sensitivity to Apoptosis Induced by Extracellular NAD." Dev. Immunol. **9**(4): 197-202.
- Haag, F., F. Koch-Nolte, et al. (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, et al. (1994). "Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species." J Mol Biol **243**(3): 537-46.
- Heinrichs, S. and W. Deppert (2003). "Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals." Oncogene **22**(4): 555-71.
- Hillman, K. A., H. Harada, et al. (2003). "Chicken DT40 cells stably transfected with the rat P2X7 receptor ion channel: a system suitable for the study of purine receptor-mediated cell death." Biochem Pharmacol **66**(3): 415-24.
- Hogan, B., R. Beddington, et al. (1994). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Holling, T. M., E. Schooten, et al. (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, et al. (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): 807-17.
- Honjo, T., Y. Nishizuka, et al. (1968). "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis." J. Biol. Chem. **243**: 3553-3555.
- Huber, R., J. Romisch, et al. (1990). "The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes." Embo J **9**(12): 3867-74.
- Huynh, M. L., V. A. Fadok, et al. (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." J Clin Invest **109**(1): 41-50.

- Jacobs, T., S. E. Graefe, et al. (2002). "Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade." J. Immunol. **169**(5): 2323-2329.
- Jacobson, M. K. and E. L. Jacobson (1989). ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and Biological Significance. New York, Springer Verlag.
- Janeway, C. P. T., W.M and S.M (2001). Immunobiology. New York, Garland Publishing.
- Jorgensen, N. R., S. T. Geist, et al. (1997). "ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells." J Cell Biol **139**(2): 497-506.
- Joyner, A. L. (1993). Gene targeting: a practical approach. Oxford, IRL Press.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-54.
- Kahl, S., M. Nissen, et al. (2000). "Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation." J. Immunol. **165**(8): 4463-9.
- Kahlenberg, J. M. and G. R. Dubyak (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C1100-8.
- Kaufmann, Y., G. Berke, et al. (1981). "Cytotoxic T lymphocyte hybridomas that mediate specific tumor-cell lysis in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2502-6.
- Kawabe, Y. and A. Ochi (1990). "Selective anergy of V beta 8+, CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice." J. Exp. Med. **172**(4): 1065-1070.
- Kawamura, H., F. Aswad, et al. (2005). "P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide." J Immunol **174**(4): 1971-9.
- Kiessling, R., E. Klein, et al. (1975). "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." Eur J Immunol **5**(2): 112-7.
- Kim, M., L. H. Jiang, et al. (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." Embo J. **20**(22): 6347-6358.
- Kim, R. (2005). "Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy." Cancer **103**(8): 1551-60.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2005). "Role of mitochondria as the gardens of cell death." Cancer Chemother Pharmacol: 1-9.
- King, C., A. Ilic, et al. (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." Cell **117**(2): 265-77.
- Koch, F., F. Haag, et al. (1990). "Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**(3): 964-967.
- Koch-Nolte, F., T. Duffy, et al. (1999). "A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation." J. Immunol. **163**: 6014-6022.
- Koch-Nolte, F. 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, et al. (1993). "Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization." Genomics **18**(2): 404-6.
- Koch-Nolte, F., J. Klein, et al. (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, et al. (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): 7686-93.
- Koch-Nolte, F., P. Reche, et al. (2001). "ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets." J. Biotech. **in press**.

- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-73.
- Krebs, C., S. Adriouch, et al. (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol **174**(6): 3298-305.
- Krebs, C., W. Koestner, et al. (2003). "Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine." Anal Biochem **314**(1): 108-15.
- Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." Nat Med **11**(7): 725-30.
- Kurosaka, K., M. Takahashi, et al. (2003). "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages." J Immunol **171**(9): 4672-9.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-7.
- Lazarowski, E. R., R. C. Boucher, et al. (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Mol Pharmacol **64**(4): 785-95.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
- Liang, L. and E. M. Schwiebert (2005). "Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?"" Am J Physiol Cell Physiol **288**(2): C240-2.
- Loetscher, P., R. Alvarez-Gonzalez, et al. (1987). "Poly(ADP-ribose) may signal changing metabolic conditions to the chromatin of mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(5): 1286-9.
- Ludden, P. W. (1994). "Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes." Mol Cell Biochem **138**(1-2): 123-9.
- MacKenzie, A., H. L. Wilson, et al. (2001). "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding." Immunity **15**(5): 825-35.
- Mackenzie, A. B., M. T. Young, et al. (2005). "Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors." J Biol Chem **280**(40): 33968-76.
- MacLeod, C. L., S. E. Weinroth, et al. (1985). "SL12 murine T-lymphoma: a new model for tumor cell heterogeneity." J Natl Cancer Inst **74**(4): 875-82.
- Manodori, A. B., G. A. Barabino, et al. (2000). "Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin." Blood **95**(4): 1293-300.
- March, S., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2005). "P-selectin mediates leukocyte rolling in concanavalin-A-induced hepatitis." Liver Int **25**(5): 1053-60.
- Marchetti, P., T. Hirsch, et al. (1996). "Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis." J Immunol **157**(11): 4830-6.
- Mathes, M. (1997). Gezielte Elimination der beiden RT6-Gene der Maus durch homologe Rekombination. Fachbereich Biologie. Hamburg, Universität Hamburg.
- Mayran, N., R. G. Parton, et al. (2003). "Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells." Embo J **22**(13): 3242-53.
- Meyers, K. M., H. Holmsen, et al. (1982). "Comparative study of platelet dense granule constituents." Am J Physiol **243**(3): R454-61.
- Mizumoto, N., T. Kumamoto, et al. (2002). "CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness." Nat. Med. **8**(4): 358-365.
- Moller, E., J. Bohme, et al. (1990). "Speculations on mechanisms of HLA associations with autoimmune diseases and the specificity of "autoreactive" T lymphocytes." Immunol Rev **118**: 5-19.

- Moreira, M. E. and M. A. Barcinski (2004). "Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems." An Acad Bras Cienc **76**(1): 93-115.
- Morgan, R. O. and M. P. Fernandez (1995). "Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*." Mol Biol Evol **12**(6): 967-79.
- Moss, J. and M. Vaughan (1990). ADP-ribosylating toxins and G proteins: Insights into signal transduction. Washington DC, American Society for Microbiology.
- Moss, J., A. Zolkiewska, et al. (1997). "ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles." Adv. Exp. Med. Biol. **419**(25): 25-33.
- Motoike, T., S. Loughna, et al. (2000). "Universal GFP reporter for the study of vascular development." Genesis **28**(2): 75-81.
- Mueller-Dieckmann, C., H. Ritter, et al. (2002). "Structure of the Ecto-ADP-ribosyl Transferase ART2.2 from Rat." J. Mol. Biol. **322**(4): 687-696.
- Nagashima, T., T. Aranami, et al. (2004). "Analysis of T cell responses to a superantigen, staphylococcal enterotoxin B." J. Clin. Exp. Hematopathol. **44**: 25-32.
- Nagata, S., H. Nagase, et al. (2003). "Degradation of chromosomal DNA during apoptosis." Cell Death Differ **10**(1): 108-16.
- Nemoto, E., Y. Yu, et al. (1996). "Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function- associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells." J Immunol **157**(8): 3341-9.
- Newman, P. J. (1997). "The biology of PECAM-1." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S25-9.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-42.
- Nicke, A., H. G. Baumert, et al. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." Embo J **17**(11): 3016-28.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-67.
- North, R. A. and A. Surprenant (2000). "Pharmacology of cloned P2X receptors." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **40**: 563-80.
- Oei, S. L., J. Griesenbeck, et al. (1997). "The role of poly(ADP-ribosylation)." Rev Physiol Biochem Pharmacol **131**: 127-73.
- Ohlrogge, W., F. Haag, et al. (2002). "Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice." Mol. Cell. Biol. **22**(21): 7535-7542.
- Okada, Y., E. Maeno, et al. (2001). "Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)." J Physiol **532**(Pt 1): 3-16.
- Okamoto, S., O. Azhipa, et al. (1998). "Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function." J. Immunol. **160**(9): 4190-4198.
- Ortolan, E., P. Vacca, et al. (2002). "CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality." Cell Biochem Funct **20**(4): 309-22.
- Otto, H., P. A. Reche, et al. (2005). "In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs)." BMC Genomics **6**: 139.
- Peitsch, M. C., C. Muller, et al. (1993). "DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts." Nucleic Acids Res **21**(18): 4206-9.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ **10**(1): 26-35.
- Petrilli, V., Z. Herceg, et al. (2004). "Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice." J Clin Invest **114**(8): 1072-81.
- Pircher, H., K. Burki, et al. (1989). "Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen." Nature **342**(6249): 559-61.

- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* **50**(3): 413-92.
- Rand, J. H. (2000). "The pathogenic role of annexin-V in the antiphospholipid syndrome." *Curr Rheumatol Rep* **2**(3): 246-51.
- Redegeld, F. A., C. C. Caldwell, et al. (1999). "Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?" *Trends Pharmacol Sci* **20**(11): 453-9.
- Reers, M., S. T. Smiley, et al. (1995). "Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye." *Methods Enzymol* **260**: 406-17.
- Rehm, M., H. Dussmann, et al. (2003). "Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis." *J Cell Biol* **162**(6): 1031-43.
- Reifsnnyder, P. C., J. C. Flynn, et al. (1999). "Genotypic and phenotypic characterization of six new recombinant congenic strains derived from NOD/Shi and CBA/J genomes." *Mamm Genome* **10**(2): 161-7.
- Ruf, A., V. Rolli, et al. (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.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-40.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., A. R. Coulson, et al. (1980). "Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing." *J Mol Biol* **143**(2): 161-78.
- Sauer, B. (1993). "Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase." *Methods Enzymol* **225**: 890-900.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 965-75.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." *Nature* **343**(6254): 170-3.
- Scheuplein, F., S. Adriouch, et al. (2003). "Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2." *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 296-9.
- Schilling, W. P., T. Wasyllyna, et al. (1999). "Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): C766-76.
- Seman, M., S. Adriouch, et al. (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor." *Immunity* **19**(4): 571-82.
- Serreze, D. V. and E. H. Leiter (2001). "Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice." *Curr Dir Autoimmun* **4**: 31-67.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* **68**(5): 855-67.
- Sixma, T. K., K. H. Kalk, et al. (1993). "Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin." *J Mol Biol* **230**(3): 890-918.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* **98**(3): 503-17.

- Spaner, D., X. Sheng-Tanner, et al. (2002). "Aberrant regulation of superantigen responses during T-cell reconstitution and graft-versus-host disease in immunodeficient mice." *Blood* **100**(6): 2216-2224.
- Stein, P. E., A. Boodhoo, et al. (1994). "The crystal structure of pertussis toxin." *Structure* **2**(1): 45-57.
- Steinberg, T. H., A. S. Newman, et al. (1987). "ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes." *J Biol Chem* **262**(18): 8884-8.
- Stojilkovic, S. S., M. Tomic, et al. (2005). "Molecular Dissection of Purinergic P2X Receptor Channels." *Ann N Y Acad Sci* **1048**: 116-30.
- Stowers, L., T. E. Holy, et al. (2002). "Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2." *Science* **295**(5559): 1493-500.
- Surprenant, A., F. Rassendren, et al. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." *Science* **272**(5262): 735-8.
- Swardson, C. J., D. L. Wassom, et al. (1997). "Plasmodium yoelii: resistance to disease is linked to the mtv-7 locus in BALB/c mice." *Exp Parasitol* **86**(2): 102-9.
- Syed, F. M., H. S. Hahn, et al. (2005). "Proapoptotic effects of caspase-1/interleukin-converting enzyme dominate in myocardial ischemia." *Circ Res* **96**(10): 1103-9.
- Takeda, K., Y. Hayakawa, et al. (2000). "Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5498-503.
- Tang, X., M. S. Halleck, et al. (1996). "A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity." *Science* **272**(5267): 1495-7.
- Thiele, H. G., F. Haag, et al. (1997). "Expression profiles of RT6 and other T lymphocyte surface markers in the black rat (*Rattus rattus*)." *Transplant. Proc.* **29**(3): 1697-8.
- Tiegs, G., J. Hentschel, et al. (1992). "A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A." *J. Clin. Invest.* **90**(1): 196-203.
- Tietz, W. and A. Hamann (1997). "The migratory behavior of murine CD4+ cells of memory phenotype." *Eur J Immunol* **27**(9): 2225-32.
- Todd, J. A. and L. S. Wicker (2001). "Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models." *Immunity* **15**(3): 387-95.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302**(5909): 575-81.
- Tong, W. M., U. Cortes, et al. (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, et al. (1994). "Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells." *J. Biol. Chem.* **269**(44): 27451-27457.
- Uthaisang, W., L. K. Nutt, et al. (2003). "Phosphatidylserine exposure in Fas type I cells is mitochondria-dependent." *FEBS Lett* **545**(2-3): 110-4.
- van den Eijnde, S. M., L. Boshart, et al. (1998). "Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved." *Apoptosis* **3**(1): 9-16.
- van den Eijnde, S. M., M. J. van den Hoff, et al. (2001). "Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation." *J Cell Sci* **114**(Pt 20): 3631-42.
- Verhoef, P. A., M. Estacion, et al. (2003). "P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release." *J Immunol* **170**(11): 5728-38.
- Villunger, A., E. M. Michalak, et al. (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." *Science* **302**(5647): 1036-8.
- Virginio, C., A. MacKenzie, et al. (1999). "Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor." *J Physiol* **519 Pt 2**: 335-46.
- Vollmayer, P., T. Clair, et al. (2003). "Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases." *Eur J Biochem* **270**(14): 2971-8.

- von Boehmer, H., I. Aifantis, et al. (2003). "Thymic selection revisited: how essential is it?" Immunol Rev **191**: 62-78.
- Wang, J., E. Nemoto, et al. (1997). "Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferase." Adv. Exp. Med. Biol. **419**: 191-201.
- Wang, Y., X. Li, et al. (2004). "An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1525-32.
- Wilkinson, A., J. Day, et al. (2001). "Bacterial DNA ligases." Mol Microbiol **40**(6): 1241-8.
- Williamson, P. and R. A. Schlegel (2004). "Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor." J Biol **3**(4): 14.
- Winter, R. N., J. G. Rhee, et al. (2004). "Caspase-1 enhances the apoptotic response of prostate cancer cells to ionizing radiation." Anticancer Res **24**(3a): 1377-86.
- Wolenski, M., S. O. Cramer, et al. (2003). "Enhanced activation of CD83-positive T cells." Scand J Immunol **58**(3): 306-11.
- Wu, Z., J. Earle, et al. (2002). "Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage." Mol Cell Biol **22**(8): 2441-9.
- Yerly-Motta, V., J. J. Pavy, et al. (1999). "Screening of five specific cell cycle inhibitors using a T cell lymphoma cell line synchrony/release assay." Biotech Histochem **74**(3): 119-28.
- Yoshimoto, T., Y. Takahama, et al. (1998). "A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection." J Immunol **160**(11): 5500-5.
- 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.
- Zatman, L. J., N. O. Kaplan, et al. (1953). "Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleotidase by nicotinamide, an exchange reaction." J Biol Chem **200**(1): 197-212.
- Zhou, Q., J. Zhao, et al. (2002). "Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1." Blood **99**(11): 4030-8.
- 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, et al. (1992). "Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(23): 11352-11356.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte. Ich danke Ihm für die Überlassung des interessanten Themas, die kontinuierliche Anleitung und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit und nicht zuletzt die Erziehung zu gutem wissenschaftlichen Arbeiten. Ich danke ihm auch besonders für die Möglichkeit, im Rahmen meiner Doktorarbeit zahlreiche internationale Kongresse und Kurse zu besuchen, sowie einen vom Boehringer Ingelheim Fonds gesponserten 2 monatigen Forschungsaufenthalt in den Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA, durchzuführen. Eine wissenschaftlich besonders fruchtbare Erfahrung waren für mich die regelmäßigen Kneese-Treffen in seinem Wochenendhaus, wo wir mit unseren Kooperationspartnern aus Paris bei gutem Essen und Wein die aktuellen Forschungsergebnisse diskutiert haben.

Weiter danke ich Frau MTA Dunja Freese dafür, dass Sie mich in die Kunst der Mauspräparation und Durchflusszytometrie eingeführt hat. Ich danke Ihr für die Durchführung der Experimente, die in **Abb.14** und **Abb.41** gezeigt sind, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten aus **Abb.10**, **Abb.13**, **Abb.37** und **Abb.38**. Mein Dank gilt auch Frau MTA Fenja Braasch für die Transfektion und FACS-Sortierung der YAC-1.ATCC.P2X7-Zellen.

Ich danke Dr. Robert Bähring, der mir im Rahmen eines Praktikums des Aufbaustudiengangs Molekularbiologie am ZMNH, die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente ermöglichte. Herrn Dr. Stefan Heinrichs, Heinrich-Pette-Institut, danke ich für die Unterstützung bei den Experimenten zur DNA-Fragmentierung. Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. Thomas Jakobs der die Infektionen mit *Plasmodium berghei* am Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg durchgeführt hat. Ich danke Frau Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer für Ihre große Hilfe bei der Generierung der transgenen Mäuse in der „Transgenic Mouse Facility“ des ZMNH.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Herrn Peter Bannas, Herrn Dr. Sahil Adriouch und Herrn Dr. Stefan 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.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung (DFG No310/6).

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern, Jörg und Heide Scheuplein, dafür danken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mir auch während der Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich möchte auch meiner Frau, Anjani Scheuplein, für Ihre ständige Unterstützung und Geduld danken.