

Aus dem Institut für Immunologie des  
Zentrums für Klinisch-Theoretische Medizin des  
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE)  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernhard Fleischer

Nukleotide im Immunsystem –  
Untersuchung zur Bedeutung von ATP und NAD für die  
Lymphozytenfunktion anhand einer natürlich vorkommenden  
Mutation im murinen Purinorezeptor P2X7

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Claudia Bechstedt

aus Bad Oldesloe

Hamburg, 2006

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:**

12.02.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:**

*Prof. Dr. F. Haag*

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:**

*Prof. Dr. F. Nolte*

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:**

*Prof. Dr. B. Fleischer*

# 1. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>4.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1.</b>	<b>Apoptose und ihre Bedeutung im Immunsystem.....</b>	<b>10</b>
4.1.1.	Mechanismen der Apoptose .....	10
4.1.2.	Bedeutung des programmierten Zelltodes für das Immunsystem .....	12
<b>4.2.</b>	<b>Die Familie der purinergen Rezeptoren .....</b>	<b>14</b>
4.2.1.	Historische Aspekte der Purinorezeptoren.....	14
4.2.2.	Klassifikation der Purinorezeptoren.....	16
4.2.3.	P2X Rezeptoren .....	18
<b>4.3.</b>	<b>Der P2X7-Rezeptor.....</b>	<b>20</b>
4.3.1.	Struktur.....	21
4.3.2.	Agonisten und Antagonisten .....	24
4.3.3.	Expression des P2X7-Rezeptors .....	25
4.3.4.	Signaltransduktionsmechanismen .....	25
4.3.5.	Nachgeschaltete Effekte der P2X7-Rezeptor Aktivierung.....	28
4.3.6.	Phänotyp von P2X7-Rezeptor defizienten Mäusen .....	31
4.3.7.	Pathophysiologische Assoziationen mit dem P2X7-Rezeptor .....	32
4.3.8.	Die P451L-Mutation im murinen P2X7-Rezeptor .....	33
<b>4.4.</b>	<b>ATP – Herkunft und Verbleib in vivo.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5.</b>	<b>ARTs – ADP-Ribosyltransferasen.....</b>	<b>38</b>
4.5.1.	Die ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation.....	38
4.5.2.	NAD als Substrat für extrazelluläre Enzyme .....	39
4.5.3.	Enzymfamilie der ARTs .....	40
4.5.4.	NICD: NAD-induced T cell death .....	43
<b>4.6.</b>	<b>Gene gun: die DNA-Immunisierung als interessante Alternative zur Proteinimmunisierung.....</b>	<b>45</b>
4.6.1.	Technik der DNA-Immunisierung .....	45
4.6.2.	Vergleich von DNA- und Proteinimmunisierung .....	47
<b>5.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>49</b>
5.2.1.	Adhäsionszellen .....	49
5.2.2.	Suspensionszellen .....	50
5.2.3.	RAW Zellen .....	50

<b>5.3.</b>	<b>Transfektion .....</b>	<b>50</b>
5.3.1.	Lipofektamin-Transfektion von HEK-T-Zellen.....	50
5.3.2.	Elektroporation von DC27.10 Zellen.....	51
<b>5.4.</b>	<b>Präparation muriner Lymphozyten.....</b>	<b>52</b>
5.4.1.	Depletion der B-Zellen.....	52
5.4.2.	Präparation muriner Thymozyten .....	53
<b>5.5.</b>	<b>Western Blot Analysen .....</b>	<b>53</b>
5.5.1.	Material .....	53
5.5.2.	Methoden .....	55
<b>5.6.</b>	<b>Immunpräzipitation.....</b>	<b>56</b>
5.6.1.	Material .....	56
5.6.2.	Methode .....	56
<b>5.7.</b>	<b>PCR zur P2X7 Genotypisierung.....</b>	<b>57</b>
5.7.1.	Material .....	57
5.7.2.	PCR-Ansatz.....	57
5.7.3.	PCR-Programm.....	58
<b>5.8.</b>	<b>Immunfluoreszenzuntersuchungen.....</b>	<b>58</b>
5.8.1.	Antikörper .....	58
5.8.2.	Methode .....	58
<b>5.9.</b>	<b>Produktion des RH18 Anti-P2X7-Serums.....</b>	<b>59</b>
<b>5.10.</b>	<b>L-selectin (CD62L) Abstoßung.....</b>	<b>59</b>
5.10.1.	Material .....	59
5.10.2.	Methode .....	59
<b>5.11.</b>	<b>Bestimmung der ART-Aktivität.....</b>	<b>60</b>
5.11.1.	Material .....	61
5.11.2.	Methode .....	61
<b>5.12.</b>	<b>YO-PRO 1 Assay .....</b>	<b>61</b>
5.12.1.	Material .....	61
5.12.2.	Methode .....	61
<b>5.13.</b>	<b>ATP-induzierte IL1<math>\beta</math>-Prozessierung.....</b>	<b>62</b>
5.13.1.	Material .....	62
5.13.2.	Methode .....	62
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
<b>6.1.</b>	<b>Charakterisierung der P451L Mutation anhand der transfizierten HEK-T-Zellen und muriner Primärzellen .....</b>	<b>64</b>
6.1.1.	Nachweis der P2X7 Expression im Western Blot.....	64
6.1.2.	YO-PRO 1 Aufnahme in den transfizierten HEK-T-Zellen.....	67
6.1.3.	Vergleich der ATP- und NAD-induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung auf T-Lymphozyten von BALB/c und C57/BL6 Mäusen .....	70
6.1.4.	ATP induzierte IL-1 $\beta$ Prozessierung – ein Vergleich von BALB/c und C57/BL6 Vollblut.....	73
6.1.5.	Untersuchung der Inzidenz der Mutation in verschiedenen Mausstämmen.....	76

6.1.6.	Ermittlung geeigneter PCR-Bedingungen, um die Punktmutation im P2X7-Rezeptor mittels PCR nachzuweisen.....	76
6.1.7.	P2X7 Genotypisierung verschiedener Mausstämme.....	78
<b>6.2.</b>	<b>Charakterisierung verschiedener Zelllinien auf P2X7 Expression, Genotyp und Funktion.....</b>	<b>80</b>
6.2.1.	Nachweis des P2X7-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien im Western Blot....	80
6.2.2.	P2X7 Genotypisierung der im Western Blot getesteten Zellen .....	82
6.2.3.	ATP induzierte YO-PRO 1 Aufnahme in den untersuchten Zelllinien.....	84
6.2.4.	Immunpräzipitation von P2X7 mit einem anti-Peptid-Antiserum(alomone labs)	86
<b>6.3.</b>	<b>Untersuchung eines neuen, mittels DNA-Vakkzinierung erzeugten P2X7-Antiserums.....</b>	<b>88</b>
6.3.1.	Immunsereum der Ratte RH18 – erstmals Nachweis des nativen P2X7-Rezeptors im FACS .....	88
6.3.2.	Das RH18 Immunsereum bindet bei 37°C spezifischer als bei 4°C.....	90
6.3.3.	..... Vergleich der beiden P2X7-Antiseren RH18 „second boost“ und RH18 „final bleed“.....	90
6.3.4.	Vergleich der P2X7 Oberflächenexpression im FACS .....	92
6.3.5.	Test der RH18 Antiseren an den bisher untersuchten Zelllinien.....	93
6.3.6.	Untersuchung, ob das RH18-Serum die ATP-induzierte YO-PRO 1 Aufnahme blockieren kann .....	96
6.3.7.	Versuch der Blockade der ATP induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung mit dem RH18 Antiserum.....	98
6.3.8.	Versuch der P2X7 Immunpräzipitation mit RH18 „second boost“ Serum im Vergleich zum alomone labs Serum.....	100
<b>6.4.</b>	<b>Etablierung einer P2X7 und ART2.2 doppelt positiven Zelllinie als experimentelles Werkzeug für die Untersuchung der NAD-induzierten P2X7-Aktivierung.....</b>	<b>103</b>
6.4.1.	Untersuchung der ART2.2 Aktivität auf den P2X7 und ART2.2 doppelt positiven HEK-T-Zellen.....	105
6.4.2.	Versuch einer NAD-induzierten YO-PRO 1 Aufnahme in den P2X7 und ART2.2 doppelt positiven HEK-T-Zellen .....	105
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>109</b>
<b>7.1.</b>	<b>Die P451L-Punktmutation im murinen P2X7-Rezeptor schränkt dessen Funktion ein .....</b>	<b>109</b>
<b>7.2.</b>	<b>P2X7-Funktionsstudien mit transfizierten HEK-T-Zellen sind nicht unproblematisch.....</b>	<b>110</b>
7.2.1.	Bedeutet die gemeinsame Expression von P2X7 und ART2.2 für HEK-T-Zellen einen Selektionsnachteil? .....	111
7.2.2.	Alternative Zellmodelle für die Untersuchung des Zusammenwirkens von P2X7 und ADP-Ribosylierung .....	112
<b>7.3.</b>	<b>Auch andere eingezüchtete Mausstämme tragen die 451L-Mutation im P2X7-Rezeptor .....</b>	<b>112</b>
<b>7.4.</b>	<b>Alle untersuchten Zelllinien exprimieren P2X7-Rezeptoren, die sich jedoch in ihrer Aktivität unterscheiden .....</b>	<b>113</b>
<b>7.5.</b>	<b>Ein neues Antiserum ermöglicht die Darstellung des nativen P2X7-Rezeptors .</b>	<b>114</b>

7.6.	<b>P2X7, ADP-Ribosylierung und NICD als mögliche Kontrollmechanismen von Autoreaktivität</b> .....	<b>116</b>
7.7.	<b>Perspektiven</b> .....	<b>117</b>
8.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>120</b>
9.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>121</b>
10.	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>136</b>
11.	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>137</b>
12.	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>138</b>
	<b><u>Appendix</u> ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>139</b>

## 2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha,\beta$ -meATP	$\alpha,\beta$ -Methylen-ATP
2-MeSADP	2-Methylthio-ADP
2-meSATP	2-Methylthio-ATP
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BNI	Bernhard -Nocht-Institut
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
eNAD	etheno-NAD
ERK	extracellular signal regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas associated death domain protein
FB	final bleed Serum
FCS	Fetales Kälberserum
FLIP	FLICE (=Caspase 8) inhibiting protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HEK-T-Zellen	humane embryonale Nieren (kindney) – Zellen
ICE	IL-1 converting enzyme
IfI	Institut für Immunologie, UKE / Hamburg
IFN	Interferon
IL	Interleukin
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KN62	1-(N,O-bis(5-Isoquinolin-Sulfonyl)N-Methyl-L-Tyrosyl)-4-Phenylpiperazine
KO-Maus	Knock out Maus
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mART2.2	murine ADP-Ribosyltransferase 2.2
MHC	major histocompatibility complex

NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF	nukleärer Transkriptionsfaktor
NICD	NAD-induced T cell death
NO	Stickstoffmonoxid
OxATP	Adenosintriphosphat-2',3'-Dialdehyd
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIS	Präimmunserum
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PO	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SH3	Src homologe Domäne 3
TLZ	T-Lymphozyten
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing-ligand
UTP	Uridintriphosphat



### **3. ZIELSETZUNG**

Diese Arbeit befasst sich mit der Wirkung von Nukleotiden im Immunsystem, im speziellen mit dem ATP-Rezeptor P2X7 und der ADP-Ribosyltransferase ART2.

Der P2X7-Rezeptor gehört zur Familie der purinergen Rezeptoren und vermittelt nach Aktivierung durch ATP neben immunmodulierenden Effekten wie Zytokinfreisetzung Zellyse und programmierten Zelltod. ART2 ist ein GPI-verankertes Membranprotein auf reifen T-Lymphozyten, das die ADP-Ribose Gruppe von extrazellulärem NAD auf Argininreste der Zielproteine überträgt und so deren Funktion in den meisten Fällen inaktiviert. Diese posttranslationale Proteinmodifikation hemmt die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und induziert deren Apoptose.

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Michel Seman in Paris zeigten einen deutlichen Unterschied in der T-Zell Antwort auf ATP zwischen BALB/c und C57/BL6 Mäusen, was im weiteren Verlauf zur Entdeckung einer Punktmutation im P2X7-Rezeptor (P451L) führte. Daneben verdichteten sich die Hinweise, dass der P2X7-Rezeptor als Zielprotein der ADP-Ribosyltransferase ART2 verantwortlich für die NAD-induzierte Apoptose sein könnte, eine Theorie, die 2001 erstmals veröffentlicht wurde [2] und mittlerweile bestätigt ist [178].

Für meine Arbeit stellte mir Sahil Adriouch aus Paris freundlicherweise HEK-T-Zellen zur Verfügung, die stabil die P2X7-Rezeptoren aus BALB/c und C57/BL6 exprimieren.

Die Ziele meiner Arbeit waren wie folgt:

1. Weitere Charakterisierung der Punktmutation im murinen P2X7-Rezeptor anhand der transfizierten HEK-T-Zellen und muriner Primärzellen
2. Untersuchung der Inzidenz der Mutation in verschiedenen Mausstämmen und Zelllinien
3. Untersuchung eines neuen, mittels DNA-Vakkzinierung erzeugten Antiserums gegen murinen P2X7-Rezeptor
4. Etablierung einer P2X7 und ART2 doppelt positiven Zelllinie zur weiteren Untersuchung der Beziehung zwischen ART2 und dem P2X7-Rezeptor

## 4. EINLEITUNG

Da Apoptose zu den zentralen Effekten der P2X7-Rezeptor Aktivierung gehört, wird dieser Mechanismus des Zelltodes und seine Bedeutung im Kontext des Immunsystems kurz dargestellt. Anschließend folgt eine Übersicht über die Familie der purinergen Rezeptoren und den P2X7-Rezeptor. Die ADP-Ribosylierung als Mechanismus der posttranslationalen Modifikation wird vorgestellt, wobei auf den Zusammenhang von ART2 und P2X7 näher eingegangen wird. Zum Schluss wird die Methode der DNA-Vakkzinierung erläutert und mit der Proteinimmunisierung verglichen.

### 4.1. Apoptose und ihre Bedeutung im Immunsystem

#### 4.1.1. Mechanismen der Apoptose

Aufgrund morphologischer Untersuchungen entwickelten die Pathologen Kerr, Wyllie und Currie 1972 die Theorie, dass für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines vielzelligen Organismus ein aktiver Prozess existieren müsse, der zum selektiven Sterben von ungewollten körpereigenen Zellen führt. Sie taufte diesen vom Organismus selbst induzierten Vorgang *Apoptose* (griech. für „Herabfallen“ von Blütenblättern). Im Gegensatz zur *Nekrose* stellt Apoptose eine programmierte, nach festen Regeln ablaufende Form des Zelltodes dar.

**Tabelle 1** stellt die kardinalen Merkmale von Apoptose und Nekrose gegenüber (aus [6]).

Sowohl für die Auslösung der Apoptose als auch für die intrazelluläre Signalkaskade stehen den Säugetieren zahlreiche Mechanismen zur Verfügung; welche biologische Rolle diese Redundanz von Apoptosesystemen spielt ist eine offene Frage. Daneben existieren eine Reihe von anti-apoptotischen Faktoren, die als Gegenspieler wirken. Sicher ist, dass es sich um ein hochkomplexes und fein reguliertes Netzwerk handelt, in dem eine Vielzahl von Informationen über den Zustand der Zelle zusammenwirken; in einigen Fällen entscheiden erst das biochemische Umfeld und/oder kinetische Abläufe, ob ein Molekül pro- oder anti-apoptotisch wirkt, wie beispielsweise Donze et al für die Proteinkinase R gezeigt haben [51].

**Tabelle 1:** Gegenüberstellung kardinaler Merkmale von Apoptose und Nekrose (aus [6])

Kennzeichen	Nekrose	Apoptose
Stimuli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxine</li> <li>• schwere Hypoxie</li> <li>• ATP-Mangelzustände</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion über spezifische Todesrezeptor/ -liganden Systeme</li> <li>• Entzug von Wachstumsfaktoren</li> <li>• Physikalische Einwirkungen, z.B. Radioaktivität</li> </ul>
Energieerfordernis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ATP abhängig</li> </ul>
Gewebereaktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entzündung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Entzündung</li> </ul>
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellschwellung</li> <li>• Platzen von Organellen</li> <li>• Tod konjunkter Gewebebezirke</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellschrumpfung und Chromatinkondensation</li> <li>• Apoptotische Körperchen</li> <li>• Tod von einzelnen, isolierten Zellen</li> </ul>
Plasmamembran	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lysiert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• intakt</li> <li>• oberflächliche Bläschenbildung</li> </ul>
DNA-Muster	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zufällige Fragmentgröße</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• strickleiterähnliches Fragmentmuster</li> <li>• regelmäßige Größenverteilung der Fragmente</li> </ul>

Der „klassische“ Apoptoseweg beginnt mit der Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor mit intrazellulärer Todesdomäne, der daraufhin trimerisiert. Der bekannteste Todesrezeptor ist das Typ I Membranprotein CD95 (=Apo1, Fas) aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren; als Liganden dienen z.B. CD95-Ligand, Tumornekrosefaktor (TNF) oder TRAIL. Zusammen mit Adaptermolekülen (z.B.FADD) und Procaspase 8 bildet der trimerisierte Rezeptor einen so genannten „death inducing signalling complex (DISC)“, der die Caspase 3 und folgend eine Caspasenkaskade aktiviert, was letztlich zu apoptotischen Veränderungen der Zellbiologie und –morphologie führt [114]. Neben dem Caspase-Weg (Caspase = cysteinhaltige Aspartase) stehen auch andere intrazelluläre Signalkaskaden zur Verfügung, wobei u.a. Nicht-Caspase-Proteasen und reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) eine Rolle spielen [127]. Sowohl bei den Caspase-abhängigen wie -unabhängigen Wegen sind häufig Mitochondrien involviert, die über Veränderungen ihres Membranpotentials und die Freisetzung von pro-apoptotischen Substanzen wie Cytochrom c oder Smac [114, 127] den weiteren Verlauf des programmierten Zelltodes beeinflussen. Als anti-apoptotische Substanzen wirken u.a. FLIP (FLICE=Caspase 8 inhibiting protein), lösliches CD95 und Mitglieder der bcl-2-Familie. Im Immunsystem wirken nach Aktivierung von peripheren T-Lymphozyten durch den T-Zell-Rezeptor mehrere proapoptotische Wege, wenn nicht durch Bindung von

kostimulatorischen Molekülen an CD28 die T-Zellen vor diesem „activation induced cell death“ (AICD) bewahrt werden.

Weniger bekannt ist die Rolle von Purinen als Auslöser zytotoxischer Mechanismen, obwohl darüber zahlreiche Arbeiten veröffentlicht wurden [27, 28, 34, 36, 46, 47, 49, 102, 121, 122, 138, 167, 200, 223]. Diese agieren über P1- und P2- Rezeptoren, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

Gerade am Beispiel des ATP-vermittelten Zelltodes wird deutlich, dass die strikte Unterscheidung von Apoptose und Nekrose aus analytisch-systematischen Gründen zwar hilfreich ist, der biologische Realität jedoch nicht entspricht; Leist und Jäättelä schlagen daher eine differenziertere Unterteilung vor [127], andere Autoren sprechen von „Aponekrose“ [65].

#### **4.1.2. Bedeutung des programmierten Zelltodes für das Immunsystem**

Im Folgenden werden schlaglichtartig einzelne Beispiele zu diesem Thema genannt, das ob seiner Komplexität Thema einer Habilitationsschrift sein könnte; ein Anspruch auf Vollständigkeit wird folglich nicht erhoben!

- Bereits in der Entwicklung der Lymphozyten spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. Unreife Thymozyten beispielsweise, deren T-Zell-Rezeptor unzureichend mit körpereigenem MHC reagiert, sterben mangels Überlebenssignalen („death by neglect“), während Zellen, bei denen eine zu starke Interaktion besteht und die somit potentiell autoreaktiv sind, durch aktive Mechanismen abgeschaltet werden.
- Wird das Immunsystem herausgefordert, muss die Balance zwischen notwendiger klonaler Expansion und einer zu starken Reaktion besonders der zytotoxischen T-Zellen sorgfältig bewahrt werden, da ansonsten eine Schädigung des Organismus entweder durch die eingedrungenen Mikroorganismen oder durch die Abwehrmechanismen des Körpers resultiert. Die Hepatitis B Infektion ist Beispiel für eine solche Situation: das Virus selber ist kaum zytopathisch, erst durch die Reaktion des Immunsystems kommt es zur Zerstörung der Hepatozyten und zur klinischen Hepatitis; andererseits gelingt bei schwacher Immunantwort keine Elimination des Virus, was eine chronischen Hepatitis zur Folge hat.

- Bei Aktivierung des Immunsystems dürfen nur die spezifisch gegen das Antigen gerichteten Immunzellen expandieren, unspezifische Zellen müssen abgeschaltet werden, um die Gefahr der Autoreaktivität zu verringern. Auch am Ende einer Infektion ist zum „Abschalten“ der Immunantwort und zum „switch“ von Effektorzellen zu Gedächtniszellen „aktiver“ Zelltod notwendig.
- Vielen Krankheiten liegt ein Zuviel oder Zuwenig an programmiertem Zelltod zugrunde. Beispiele für einen Mangel an gezieltem Zelltod sind Autoimmun- sowie proliferative und maligne Erkrankungen; Resistenz gegenüber Chemotherapeutika kann beispielsweise in anti-apoptischen Mechanismen des Tumors, wie z.B. einer Überproduktion von FLIP oder löslichem CD95, begründet sein.
- Bei AIDS kommt es dagegen zu einem Zuviel an Apoptose. Virale Genprodukte (z.B. HIV-1 Tat) dringen in nicht infizierte Zellen ein und bewirken in diesen eine Hypersensitivität gegenüber der T-Zell-Rezeptor induzierten, CD95 vermittelten Apoptose [114].
- Mit der Möglichkeit der Organtransplantation hat sich die Medizin ein neues Feld geschaffen, in dem der Grat zwischen Proliferation und Apoptose äußerst schmal ist. Tödlich verlaufende Infekte auf der einen, Organabstoßung und Graft-versus-host-disease auf der anderen Seite verlangen ein pharmakologisches „Feintuning“ der Immunantwort.

Aus den angeführten Beispielen wird deutlich, dass der Regulation des gezielten Zelltodes eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus zukommt. Bei jedem Reparaturvorgang, bei jeder regulären Zellerneuerung muss die zunächst notwendige Proliferation gestoppt werden. Gastrointestinaltrakt und Haut sind beeindruckende Beispiele, wie leistungsfähig und zuverlässig dieses System funktioniert.

## **4.2. Die Familie der purinergen Rezeptoren**

### **4.2.1. Historische Aspekte der Purinorezeptoren**

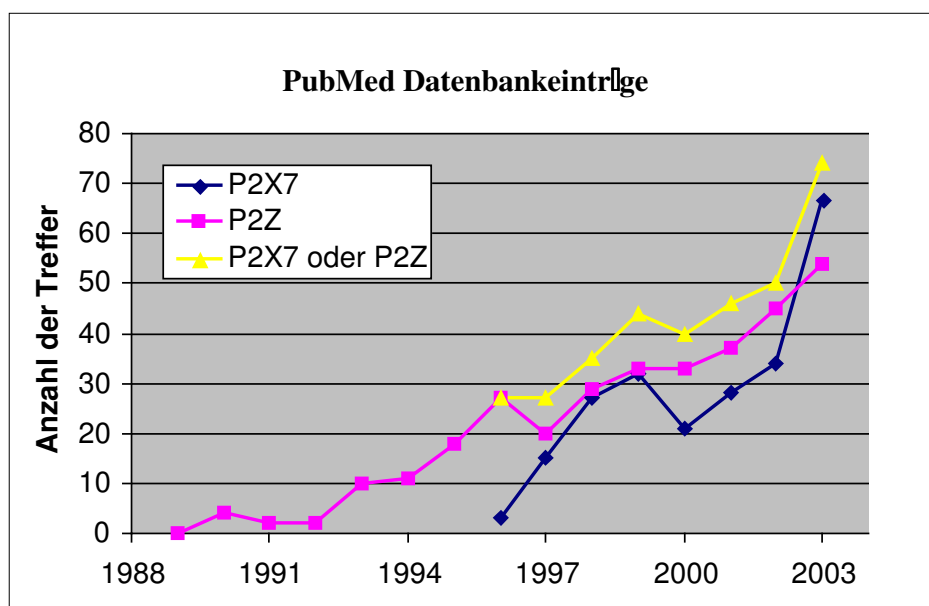
Stimulation verschiedenster Gewebe mit extrazellulären Purinen (ATP, ADP und Adenosin) oder Pyrimidinen (UTP, UDP) löst komplexe Reaktionen aus, z.B. Kontraktion glatter Muskulatur, Neurotransmission im peripheren und zentralen Nervensystem, exokrine und endokrine Sekretion, Immunantwort, Entzündung, Thrombozyten-Aggregation, Schmerz und Modulation kardialer Funktionen [42, 52, 67, 75, 101, 166, 175]. Diese Reaktionen können mit verschiedenen Purinorezeptoren in den unterschiedlichen Geweben in Verbindung gebracht werden.

Nachdem Holton 1959 gezeigt hatte, dass ATP während der antidromen Stimulation von sensorischen Nerven an der Ohrarterie von Kaninchen freigesetzt wird [91], geriet ATP neben seiner zentralen Rolle im Energiestoffwechsel auch in den Blick der Signaltransduktions-Forschung. 1978 sprach Burnstock erstmals von „purinergen Rezeptoren“ und klassifizierte sie als P1- und P2- Rezeptoren [25]. Eine weitere Unterteilung der P1-Rezeptoren in A1 und A2 Subgruppen erfolgte 1979/80 durch van Calcar et al und Londos et al [130, 207], Burnstock und Kennedy wiederum gliederten 1985 die P2-Rezeptoren in P2X und P2Y [26]. Der P2X7-Rezeptor wurde als P2Z-Rezeptor erstmals 1986 erwähnt, der - durch ATP<sup>4-</sup> aktiviert - Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen permeabilisiert [75]. Grundlagen dieser Klassifikation waren pharmakologische Untersuchungen, die die Aktivierung der Rezeptoren durch eine Rangfolge von Agonisten und Antagonisten beschrieben.

Die heute gebräuchliche Einteilung wurde durch die Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglicht und beruht auf Homologien der klonierten Rezeptoren [167]. So wiesen Surprenant et al 1996 nach, dass der P2Z Rezeptor in die Familie der P2X-Rezeptoren gehört und daher als P2X7-Rezeptor zu bezeichnen ist [200]. Dennoch gehören die pharmakologischen Untersuchungen bis heute zu den Standardexperimenten, wenn es um die „Beweisführung“ einer Beteiligung von Purinorezeptoren an beobachteten Effekten geht.

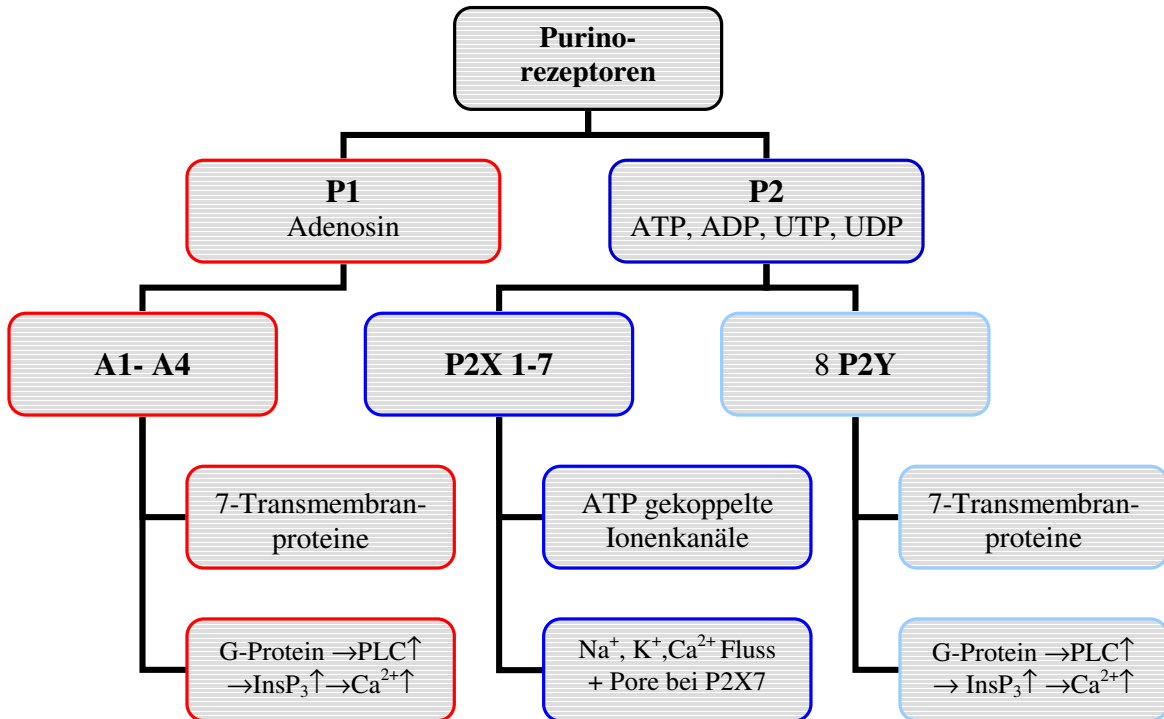
Das Interesse an und das Wissen über Nukleotiden und ihre Rolle in der Signaltransduktion, an Purinorezeptoren und speziell den P2X7-Rezeptor haben in den vergangenen Jahren sprunghaft zugenommen. Die folgende Grafik zeigt exemplarisch die Anzahl der gefundenen Arbeiten bis 2003 bei einer PubMed Datenbanksuche nach P2X7 und/oder P2Z. Insgesamt waren bis Ende 2003 441 Arbeiten unter dem Suchbegriff „P2X7 oder P2Z“ verzeichnet.

**Abbildung 1:** Anzahl der PubMed Einträge bis 2003 für P2X7 und / oder P2Z



## 4.2.2. Klassifikation der Purinorezeptoren

Eine Übersicht über die Einteilung der Purinorezeptoren gibt folgendes Diagramm:



Abkürzungen: PLC = Phospholipase C; InsP<sub>3</sub> = Inositol 1,4,5-Triphosphat;

Die purinergen Rezeptoren unterteilen sich in die Adenosinrezeptoren der **P1**-Familie und die Nukleotidrezeptoren der **P2**-Familie, die mit den ATP-gekoppelten Ionenkanälen der **P2X**-Rezeptoren und den G-Protein gekoppelten, 7-Transmembranrezeptoren **P2Y** in zwei weitere Hauptgruppen gegliedert ist. Die P2X-Rezeptoren besitzen eine niedrigere Affinität gegenüber ihrem Liganden als P2Y-Rezeptoren, vermitteln jedoch schneller Reaktionen als die auf second messengers angewiesenen P2Y-Rezeptoren.

Sieben P2X- und 8 P2Y-Rezeptoren sind mittlerweile kloniert und pharmakologisch charakterisiert (**siehe Tabelle 2**, modifiziert aus [81]). Bei der Interpretation der Potenz der Agonisten ist jedoch - wenn die Aktivität von Ecto-Nucleotidasen nicht supprimiert worden ist - Vorsicht geboten, da die Agonisten diesen gegenüber unterschiedlich stabil sind. Auch die Anwesenheit von divalenten Kationen beeinflusst die Konzentration an frei verfügbaren Agonisten, z.B. bindet Ca<sup>2+</sup> an die aktive Form des ATP, das ionisierte ATP<sup>4+</sup> [77].

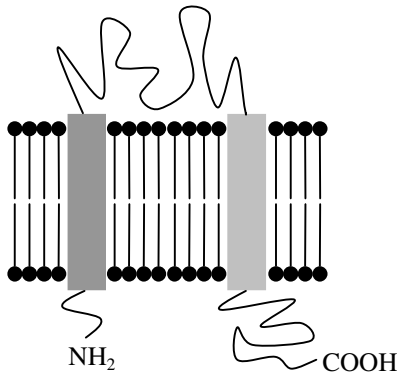


**Tabelle 2:** Nomenklatur und Pharmakologie der P2-Rezeptoren (modifiziert aus [81])

Rezeptor	Rangfolge der Agonistenaktivität	Antagonisten	Signaltransduktion	Anzahl der Aminosäuren
P2X1	2-meSATP > ATP > $\alpha,\beta$ -meATP	TNP-ATP, MRS2220	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Fluss	399
P2X2	2-meSATP > ATP $\alpha,\beta$ -meATP inaktiv	PPADS	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> Fluss	401, 472 (Splicevarianten)
P2X3	2-meSATP > ATP > $\alpha,\beta$ -meATP	TNP-ATP, TNP-GTP	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Fluss	397
P2X4	ATP > 2-meSATP > $\alpha,\beta$ -meATP	keine	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> Fluss	388
P2X5	ATP > 2-meSATP > ADP	keine	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Fluss	417, 455 (Splicevarianten)
P2X6	ATP > 2-meSATP > ADP	keine	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Fluss	379
P2X7	BzATP > ATP > 2-meSATP > ADP	KN62, OxATP, Brilliant blue G, PPADS	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Fluss; Porenformation	595
P2Y1	2-MeSADP > ADP > ATP, UTP inaktiv	MRS2216, MRS2179, A3P5P, A2P5P, A3P5P	PLC / InsP <sub>3</sub> Ca <sup>2+</sup>	362
P2Y2	4-thioUTP > UTP= ATP >> 2-meSATP UDP, ADP inaktiv	Suramin	PLC / InsP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>	373
P2Y4	UTP=UDP > GTP=ATP UDP, ADP inaktiv	Reactive blue-2	PLC / InsP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>	352
P2Y6	UDP >> UTP > ADP ATP inaktiv	keine	PLC / InsP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>	379
P2Y11	ATP=2-meSATP > ADP	keine	PLC / InsP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>	371
P2Y12	2-MeSADP > ADP	ATP, AR-C 69931 MX	Adenylatzyklase	343 (Rattus norv.) 341 (Mensch) 347 (Maus)
P2Y13	ADP > ATP>>UTP,UDP	keine	Adenylatzyklase	331, 333 (Mensch) 335 (Maus)
P2Y14	UDP-Glukose >> UTP, ATP, UDP, ADP	keine	Adenylatzyklase	305

### 4.2.3. P2X Rezeptoren

Alle sieben bisher klonierten P2X-Rezeptoren haben zwei hydrophobe Transmembran-domänen mit intrazellulärem C- und N-Terminus und der ATP-Bindungsstelle extrazellulär in der verbindenden hydrophilen Schleife (**Abbildung 2**).



**Abb. 2** Aufbau der P2X-Rezeptoren

In dieser sind 10 Cysteinreste konserviert, 14 Glycinreste und 2 bis 6 potentielle N-gekoppelte Glykosilierungsstellen; es wird vermutet, dass die Cysteinreste 5 Disulfidbrücken formen, die sterisch wichtig für die Ausprägung der ATP-Bindungsstelle und die Formation des Ionenkanals sind. Die Reste K64, K66, R294 und K311 sind ebenfalls in allen P2X-Rezeptoren konserviert, Mutagenese-

Experimente in P2X1 und P2X2-Rezeptoren lassen diese Reste als wichtige Stellen für die Nucleotid-Bindung erscheinen [56, 104].

Alle P2X-Rezeptoren zeigen untereinander große Homologien (26-47%, **Tabelle 3**) in ihrer Primärstruktur, differieren aber in der Länge ihres C-Terminus, der zwischen 30 Aminosäuren (P2X6) und 240 Aminosäuren (P2X7) variiert, wobei sich der P2X7-Rezeptor mit seinem langen C-Terminus am deutlichsten von den anderen P2X-Rezeptoren unterscheidet.

**Tabelle 3:** Homologien der klonierten P2X-Rezeptoren aus der Ratte in % (aus [108])

P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7	
100	31,8	37,3	46,6	35,8	39,8	32,1	<b>P2X1</b>
	100	40,6	39,2	37,1	35,1	26,3	<b>P2X2</b>
		100	40,5	37,5	35,1	31	<b>P2X3</b>
			100	45,6	40,9	38,1	<b>P2X4</b>
				100	45,4	26,8	<b>P2X5</b>
					100	28,2	<b>P2X6</b>
						100	<b>P2X7</b>

Für P2X2 und P2X4 sind alternative Splicing-Varianten beschrieben worden [19, 44, 181], die möglicherweise für unterschiedliches pharmakologisches Verhalten der Rezeptoren in verschiedenen Geweben verantwortlich sind.

Alle P2X-Rezeptoren fungieren als Ionenkanäle und es erscheint unwahrscheinlich, dass ein einzelnes 2-Transmembranprotein diese Aufgabe erfüllt. Blue native Polyacrylamid Gelelektrophoresen haben einige aktive Rezeptoren als Komplexe aus drei oder mehr identischen Untereinheiten gezeigt [151]. Auch die Assoziation von unterschiedlichen P2X Rezeptoren ist beschrieben (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4:** Assoziationen unterschiedlicher P2X Rezeptoren (nach [154])

P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7	
X	X	X		X	X		<b>P2X1</b>
	X	X		X	X		<b>P2X2</b>
		X		X			<b>P2X3</b>
			X	X	X		<b>P2X4</b>
				X	X		<b>P2X5</b>
							<b>P2X6</b>
						X	<b>P2X7</b>

P2X-Rezeptoren sind ATP-gekoppelte Ionenkanäle, die schnellen (innerhalb von 10-100ms) und selektiven Fluss von Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) durch die Plasmamembran erlauben und so zu einer Depolarisation und einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^+$ -Konzentration führen. Im Gegensatz zur Veränderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes durch die G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren benötigen die P2X-Rezeptoren keine „second messengers“ und spielen somit für die schnellen Signalkaskaden im Nervensystem, in der Muskelkontraktion und in der Thrombozytenaggregation eine wichtige Rolle.

Eine weitergehende Öffnung für den Ionentransport durch die Zellmembran nach länger andauernder ATP-Stimulation ist das einzigartige Charakteristikum einzelner P2X-Rezeptoren, insbesondere des P2X7-Rezeptors. Aber auch klonierte P2X2- und P2X4-Rezeptoren haben nach Transfektion in HEK-Zellen solche Porenformation gezeigt, für die die zweite Transmembrandomäne (TM2) eine kritische Rolle zu spielen scheint [209].

Kinetisch können die P2X-Rezeptoren in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen in die schnell desensibilisierenden P2X1 und P2X3 (innerhalb von 50-300 ms) und andererseits in

die langsam, d.h. innerhalb einiger Sekunden desensibilisierenden Rezeptoren P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 und P2X7. Beide Gruppen unterscheiden sich auch in ihren pharmakologischen Profilen, wobei die Mechanismen der Desensibilisierung noch schlecht verstanden werden [81].

Die Angaben über die Expression der P2X-Rezeptoren im Gewebe sind in der Literatur zum Teil widersprüchlich (vergleiche z.B. [81, 102]); Einigkeit herrscht darüber, dass P2X1 bis P2X6 in Zellen des Nervensystems, der glatten- und der Skelettmuskulatur und in Thrombozyten vorkommen, während der P2X7-Rezeptor in immunassoziierten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Mikroglia), außerdem im Gehirn, in Erythrozyten und Fibroblasten.

### **4.3. Der P2X7-Rezeptor**

Der P2X7-Rezeptor ist das letzte klonierte Mitglied der P2X-Familie; die Gene des P2X7-Rezeptors wurden aus Makrophagen von Ratte und Mensch 1996 bzw. 1997 kloniert und in HEK-Zellen exprimiert [170, 199]. Aufgrund von RT-PCR Analysen und pharmakologischer Untersuchungen identifizierten Surprenant et al 1996 den in Lymphozyten beschriebenen zytolytischen P2Z-Rezeptor als P2X7-Rezeptor [200].

Der P2X7-Rezeptor unterscheidet sich in einigen Punkten deutlich von anderen P2X-Rezeptoren. Während andere P2X-Rezeptoren von ATP-Konzentrationen unter 50µM aktiviert werden, benötigt der P2X7-Rezeptor Konzentrationen im millimolaren Bereich, um vollständig aktiviert zu werden [86, 170, 200]. Darüber hinaus kann der P2X7-Rezeptor in wenigstens zwei unterschiedlichen Konformationen in Bezug auf die Leitfähigkeit vorliegen; nach kurzer ATP Stimulation fungiert er als nonselektiver Kationenkanal, während er nach anhaltendem ATP Stimulus sich wie eine Pore verhält, die Molekülen bis zu einer Größe von 800 Da die Passage erlaubt. Am Ende führt eine ständige P2X7-Rezeptoraktivierung zum Zelltod.

Die maximale Größe der sich bildenden Pore ist auch abhängig von der Zellart, die den P2X7-Rezeptor exprimiert. Bisher ist in Lymphozyten nur eine Molekülaufnahme bis zu einer Größe von Ethidiumbromid (314 Da) oder YO-PRO 1 (375 Da) gezeigt [35, 45, 214], während in Makrophagen [194], epithelialen Thymuszellen [12] und Dendritischen Zellen [40] größere Moleküle wie Lucifer yellow (443 Da) oder Fura-2<sup>5-</sup> (637 Da) passieren

können. Dieses könnte damit erklärt werden, dass der Rezeptor in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Komplexe mit anderen Proteinen eingeht, so wie Kim et al es 2001 für die P2X7-Rezeptoren in Ratten-Peritonealmakrophagen und Knochenmarkszellen gezeigt haben, die im Gegensatz zu den P2X7-Rezeptoren in Gliazellen und Astrozyten multimerische Komplexe bilden [110].

### 4.3.1. Struktur

Das Gen des P2X7-Rezeptors enthält 13 Exone, wobei die Exone 12 und 13 den auffallend langen C-Terminus kodieren. Die folgende Tabelle zeigt die chromosomale Lokalisation und Eintragsnummern der Genbank Datenbank für die P2X7-Rezeptoren von Mensch, Ratte (*rattus norvegicus*) und Maus (*mus musculus*):

**Tabelle 5:** Chromosomale Lokalisation und Accession number des P2X7-Rezeptors

Spezies	Chromosomale Lokalisation	Accession number
Mensch	12q24	XP012121
Ratte	12q16	NP062129
Maus	5	NP035157

Gu vergleicht in seiner Dissertation die Sequenzen und beschreibt eine 80%ige Übereinstimmung des humanen P2X7-Rezeptors mit denen von Maus und Ratte [81].

Der P2X7-Rezeptor durchspannt mit zwei Transmembrandomänen die Zellmembran, hat C- und N-Terminus intrazellulär und lagert sich mit drei oder mehr identischen Untereinheiten zusammen [110, 151]. Ob der P2X7-Rezeptor mit anderen P2X-Rezeptoren Komplexe bildet, ist umstritten; während Torres et al 1999 davon ausgehen, dass der P2X7-Rezeptor keine Heteropolymere bildet [205], spekulierten Di Virgilio et al 2001 über eine Zusammenlagerung von P2X1 oder P2X4 mit P2X7-Rezeptoren [49].

Der P2X7-Rezeptor ist in der Zellmembran mit anderen Proteinen assoziiert. Durch Immunpräzipitation von Ratten-P2X7 aus transfizierten (humanen) HEK-Zellen wurden als Bestandteile des Proteinkomplexes das extrazelluläre Matrixprotein Laminin  $\alpha 3$ , drei Proteine des Zytoskeletts ( $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Aktinin 4, Supervillin), eine Integrinuntereinheit ( $\beta 2$ ), das Gerüstprotein MAGuK (membrane-associated guanylate kinase P55 subfamily member

3), drei Chaperone (Hsp90, Hsp70, Hsc71) und zwei Signalproteine ( Protein Tyrosin Phosphatase  $\beta$  „RPTP $\beta$ “ und Phosphatidylinositol 4-Kinase „PI4K“) identifiziert [109].

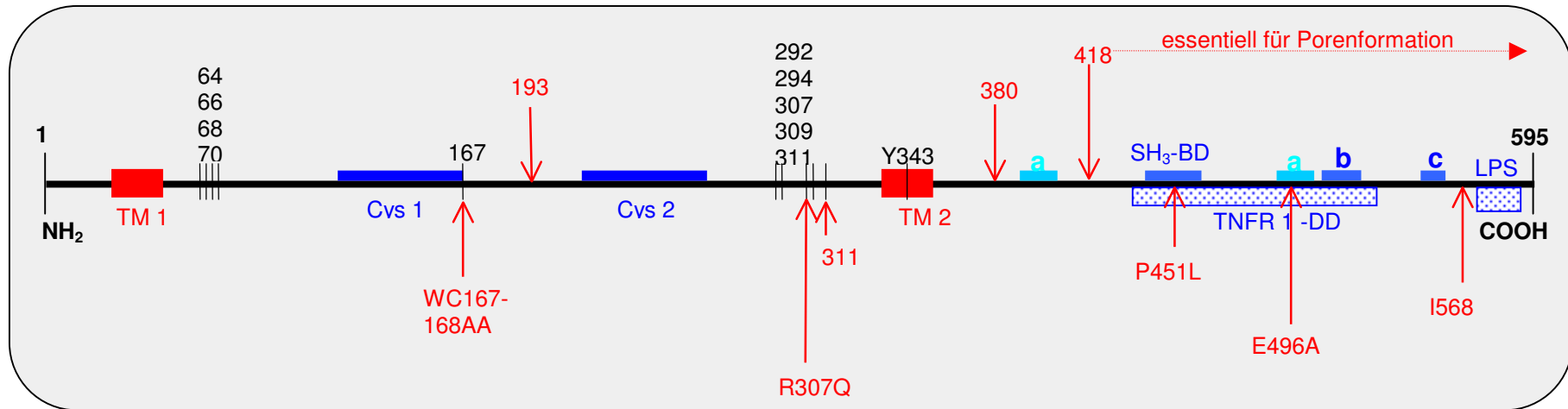
Der P2X7-Rezeptor weist zu anderen P2X-Rezeptoren Homologien von 30–40% auf; der deutlichste Unterschied liegt im langen C-Terminus (240 Aminosäuren). Von diesem sind wenigstens die letzten 177 Aminosäuren entscheidend für die Porenformation [200], die ein besonderes Charakteristikum des P2X7-Rezeptors darstellt. Werden die letzten 177 Aminosäuren entfernt, ist keine Porenformation mehr möglich, während die Funktion des Kationenkanals unbeeinflusst bleibt [111, 200]. Diese ist immer noch intakt, wenn der Rezeptor auf die ersten 380 Aminosäuren verkürzt wird, also nur ein kleines Stück des C-Terminus (25 Aminosäuren) erhalten bleibt [186]. Diese Untersuchungen bestätigen, dass Kationenkanal und Pore zwei unabhängige Funktionalitäten des Rezeptors darstellen. Der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 551 und 558 spielt nach den Untersuchungen von Smart et al für Funktion und Oberflächenexpression eine besondere Rolle [186]. Welche Rolle die Dichte der Oberflächenexpression für die Funktionen des P2X7-Rezeptors spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt [80, 128, 186].

Denlinger et al zeigten 2001, dass der C-Terminus des P2X7-Rezeptors mehrere Protein- und Lipid-Interaktionsmotive enthält, unter ihnen eine potentielle Bindungsstelle für bakterielle Lipopolysaccharide [43]. Die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchte Punktmutation P451L liegt innerhalb einer Region, die Homologien zur TNF-Rezeptor-Todesdomäne zeigt und gleichzeitig einer SH3-Bindeprotein-Domäne ähnelt.

Die extrazelluläre Schleife beherbergt die ATP-Bindungsstelle, ein Austausch beispielsweise der Reste K193 und K311 unterdrückt bei vorhandener Oberflächenexpression Kanal- und Porenöffnung nach ATP oder BzATP Stimulus [219].

**Abbildung 3** fasst die in der Literatur beschriebenen Merkmale und Mutationen des P2X7-Rezeptors zusammen.

Abbildung 3 : Struktur des P2X7-Rezeptors



- **TM1** Transmembrandomäne 2: 27-47[43]
- **TM2** Transmembrandomäne 2: 333-352 [43]
- **Cys 1:** Cysteinreicher Abschnitt 119-168 [43]
- **Cys 2:** Cysteinreicher Abschnitt 216-269 [43]
- **a:** Verbindung zum Zytoskelett, wichtig für Rezeptor trafficking“ 389-405 , 494-508 [43]
- **b:** weitere hydrophobe Domäne; 510-530 [153]
- **c:** wichtig für Oberflächenexpression 551-558 [186]
- **SH<sub>3</sub>-Bindedomäne:** 441-460 [43]
- **TNFR 1-DD:** der Todesdomäne des TNF-Rezeptors ähnlich; 436-531[43]
- **LPS:** mögliches LPS-Bindungsmotiv [43]
- 64, 66...: wichtig für Nucleotid-Bindung in P2X-Rezeptoren [43, 102]
- Y343: Phosphorylierungsstelle [109]
- **193, 311:** Austausch der AS beeinträchtigt Kanal-und Porenfunktion bei erhaltener Expression [219]
- **380:** nur der Bereich bis hier wird für den Ionenkanal benötigt [111]
- **418** Abschnitt jenseits von hier ist essentiell für die Porenformation [109, 200]
- **WC167-168AA:** Kanal- und Porenformation beeinträchtigt [169]
- **R307Q:** beeinträchtigte Kanal-und Porenfunktion bei erhaltener Expression; in Kombination mit I568N funktionsloser Rezeptor und mangelnde PLD-Aktivierung [82]
- **P451L:** Beeinträchtigung in Kanal-und Porenfunktion, CD62L-shedding und PS-Ausstülpung; Expression evtl. leicht vermindert, PLD-Aktivierung normal [3, 125]
- **E496A:** verminderte Porenformation und IL-1beta Produktion; evtl. Assoziation mit CLL [80]
- **I568N:** verminderte Oberflächenexpression [217]

### 4.3.2. Agonisten und Antagonisten

Der P2X7-Rezeptor ist im Vergleich mit den anderen P2X-Rezeptoren am empfindlichsten gegenüber sterischen Veränderungen des ATPs [202]. Agonisten benötigen das Adenin als Base, D-Ribose als Zucker und die 5'-Triphosphat-Seitenkette. Das ATP-Analogon 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) aktiviert in unterschiedlichen Geweben sowohl den nativen als auch klonierte P2X7-Rezeptoren 10-100fach potenter als ATP [52]. Die Reihenfolge der potentesten Agonisten des P2X7-Rezeptors lautet BzATP > ATP >> 2-meSATP > ADP [71] und unterscheidet sich damit von anderen P2X-Rezeptoren (vergleiche **Tabelle 2**). Die Beobachtung, dass der P2X7-Rezeptor der Maus weniger empfindlich reagiert als diejenigen aus Mensch oder Ratte, wird dadurch relativiert, dass der murine P2X7-Rezeptor, der in diesen Untersuchungen eingesetzt wurde, den in der vorliegenden Arbeit näher charakterisierten 451L Genotyp trägt, der einen Defekt in vielen P2X7-Rezeptorfunktionen nach sich zieht [86, 87].

Unter den Antagonisten spielen das 2',3'-Dialdehyd-Derivat des ATPs (auch oxidiertes ATP (OxATP) genannt) und Isoquinolin-Sulphonamid KN-62 die größte Rolle.

OxATP reagiert mit Lysinresten an der ATP-Bindungsstelle, bildet eine Schiff'sche Base und führt so zu einer vollständigen und irreversiblen Blockade des P2X7-Rezeptors. KN-62 gilt als Inhibitor der Calcium-Calmodulin Kinase II [90] und blockiert sämtliche Funktionen des P2X7-Rezeptors. Ein Struktur analogon von KN-62, KN-04, das keinen Effekt auf die Calcium-Calmodulin Kinase II ausübt, inhibiert den humanen P2X7-Rezeptor ähnlich potent wie KN-62 [81]. Brilliant Blue G ist als dritter nonkompetitiver Antagonist zu nennen.

Für OxATP ist bekannt, dass es eine Reihe weiterer Proteinfunktionen modifiziert, unter ihnen Phosphoglycerat-Kinase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Histon-Kinase, mitochondriale Kinase und ecto-ATPasen [11, 112, 117, 131]. Der Antagonismus am P2X7-Rezeptor wird daher möglicherweise über die Blockade anderer ATP-abhängiger Enzyme oder Signalproteine vermittelt.

Alle drei Antagonisten sind selektiv für P2X-Rezeptoren, im Gegensatz zu Suramin und Reactive Blue 2, die sowohl P2Y- als auch P2X-Rezeptoren blockieren.

Keiner der Agonisten oder Antagonisten ist für sich alleine spezifisch für einen purinergen Rezeptor; die Kombination verschiedener Agonisten und Antagonisten jedoch



führt zu pharmakologischen Profilen, die charakteristisch für die einzelnen Rezeptoren sind.

Augenmerk ist dabei auch auf die experimentellen Bedingungen zu legen, die die Aktivität des P2X7-Rezeptors beeinflussen, beispielsweise Temperatur oder Elektrolytgehalt des Puffers. Höchste Aktivität des P2X7-Rezeptors ist durch einen Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-freien Sucrosepuffer zu erzielen [88].

### **4.3.3. Expression des P2X7-Rezeptors**

P2X7-Rezeptor mRNA und Protein ist in Zellen des Immunsystems und hämatopoetischen Zellen weit verbreitet. Die Expression des Rezeptors wurde durch Leitfähigkeitsuntersuchungen und RT-PCR-Analysen untersucht und publiziert von kultivierten Monozyten/Makrophagen [40, 77, 89], Phagozyten [39], dendritischen Zellen [40], Mastzellen [203], Eosinophilen [63], B-Lymphozyten [213] und T-Lymphozyten [9]. Der P2X7-Rezeptor wurde durch funktionelle Untersuchungen, RT-PCR-Analysen und Northern blotting auch in Fibroblastenzelllinien [172, 188], Endothelzellen [171] und Epithelialzellen [12, 182] gefunden. Andere P2X-Rezeptoren sind im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet, und auch der P2X7-Rezeptor wurde in Ratten-Astrozyten mehrerer Hippocampusregionen [116] und Neuronen der Retina beschrieben [20].

### **4.3.4. Signaltransduktionsmechanismen**

Der Ionenkanal, der sich nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors bildet, bevorzugt divalente Kationen wie Ca<sup>2+</sup> und Ba<sup>2+</sup> gegenüber monovalenten Kationen [135, 150]. Dem unmittelbar nach Aktivierung einsetzendem Ionenstrom (<1s) folgt ein zweiter Leitfähigkeitszustand, der größeren Molekülen wie z.B. YO-PRO 1 die Passage längs der Plasmamembran erlaubt, was allgemein als „Porenöffnung“ bezeichnet wird [156, 203, 215]. Die maximale Größe dieser Pore unterscheidet sich je nach untersuchtem Gewebe (vergleiche 4.3). In nativen Rezeptoren ist diese Porenöffnung bisher ausschließlich für den P2X7-Rezeptor beschrieben. Drei Argumente sprechen dafür, dass es sich bei dem Ionenkanal und der Porenöffnung um unterschiedliche Prozesse handelt: erstens führt ein Abschneiden des C-Terminus (vom Rest 413 oder 418) zu einem Verlust der YO-PRO 1 Aufnahme bei erhaltenem Ionenstrom [186, 200], zweitens inhibiert extrazelluläres

Calmidazolium den durch BzATP ausgelösten Ionenstrom um mehr als 90% ohne Einfluss auf die YO-PRO 1-Aufnahme [208] zu nehmen und drittens ist nur die Porenformation und nicht der Ionenkanal in seiner Funktion temperaturabhängig; bei niedrigen Temperaturen (20°C) ist nur die Aktivität des Ionenkanals zu beobachten [215].

Buell und Rassendren haben daher 1998 die interessante Hypothese formuliert, dass der P2X7-Rezeptor Produkt einer Genfusion ist, in der die den Ionenkanal bildenden Exone 1-12 mit dem für die Porenöffnung verantwortlichen Exon 13 kombiniert wurden [24].

Ungeklärt ist nach wie vor die Frage, ob die Pore Teil des Rezeptors, Produkt einer Zusammenlagerung mehrerer P2X7-Rezeptoren oder eine eigene Identität ist.

Die intrazelluläre Signalkaskade nach P2X7-Rezeptor Aktivierung ist Gegenstand vieler Untersuchungen, ohne dass sich bisher ein Modell daraus ableiten ließe. Folgend ein Überblick über Proteine, von denen gezeigt wurde, dass sie an Signalübertragungsvorgängen nach P2X7-Aktivierung beteiligt sind.

- **Phospholipase D (PLD)** Le Stunff et al zeigten 2004 an murinen Thymozyten, dass ATP P2X7-vermittelt die Phosphatidylcholin-hydrolysierende Phospholipase D (PC-PLD) aktiviert [125], ein vollständig  $Ca^{2+}$ -abhängiger Prozess. Dieser ist unabhängig vom P2X7 vermittelten Zelltod. Ebenfalls beschrieben ist die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -unabhängigen PLD durch ATP; beide Prozesse geschehen innerhalb von Minuten nach der Stimulation von Makrophagen oder B-Lymphozyten mit ATP. Die Stimulation der  $Ca^{2+}$ -abhängigen PLD ist direkt proportional zu dem Einströmen von divalenten Kationen durch den P2X7-Ionenkanal [54, 55, 70].

Die Aktivierung der PLD spielt vermutlich eine Rolle als ein Mechanismus bei der P2X7-abhängigen Tötung von intrazellulären Mycobakterien [57, 118].

Hung et al beschrieben, dass die P2X7-induzierte Aktivierung der PLD sowohl abhängig als auch unabhängig von der Proteinkinase C (PKC) funktioniert [99]. Erste Hinweise auf eine Beteiligung der PLD lieferten el-Moatassim und Dubyak bereits 1992 [54], was in den folgenden Jahren immer wieder aufgegriffen wurde [59, 96, 196].

- **Stress aktivierte Proteinkinase (SAPK)/ JNK Aktivierung** Humphreys et al beobachteten 2000, dass kurze Stimulation (10-30 Minuten) mit extrazellulärem ATP in einer murinen Makrophagenzelllinie zu einer Aktivierung der SAPK und der JNK-Signalkaskade führt, was sie als P2X7-induziert nachweisen konnten. Diese Effekte

waren unabhängig von der ebenfalls stattfindenden Aktivierung Caspase-1 und -3-ähnlicher Proteasen [98].

- **p56<sup>lck</sup> Kinase, MAP-Kinasen** Als Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Prozess zeigten Budagian et al 2003 an Jurkat-Zellen, dass ATP im millimolaren Bereich innerhalb von Minuten zur Phosphorylierung und Aktivierung von p56<sup>lck</sup> und den MAP-Kinasen ERK (extracellular signal-regulated kinase) und JNK (c-Jun N-terminal kinase) führt [23]. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Expression der **Transkriptionsfaktoren c-Jun** und c-Fos und eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität des activator proteins 1 (AP1) gemessen. P56<sup>lck</sup> wird als ein entscheidender Faktor in der Aktivierung der nachgeordneten Proteine angesehen.

Donnelly-Roberts et al zeigten an humanen THP-1 Zellen, dass MAP-Kinasen und Caspasen-Signalwege für die P2X7-induzierte Porenformation notwendig sind [50].

Als weitere MAP-Kinasen, die im „Signaling“ des P2X7-Rezeptors eine Rolle spielen, werden p42/p44-Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen erwähnt [18, 159]. Die Beteiligung von p38 MAP-Kinase wird kontrovers gesehen [8, 23, 159, 163].

- **NF-kappaB** Der nukleäre Transkriptionsfaktor ist seit 1997 als Teil der P2X7-Signalkaskade in der Diskussion. Ferrari et al beschrieben 1997 die selektive Aktivierung der Untereinheit NF-kappaB p65 durch extrazelluläres ATP in Makrophagen [61]. Die meisten Arbeiten zeigen eine Aktivierung von NF-kappaB durch ATP, alleine Budagian et al [23] beobachteten eine reduzierte DNA-Bindungsaktivität. Die Arbeitsgruppe von Bertics untersucht den Zusammenhang zwischen LPS-Stimulation der Zelle und purinergen Signalmechanismen; sie zeigten einerseits, dass es zu einer parallelen Aktivierung von NF-kappaB und dem Inhibitor I kappa B alpha kommt [4], andererseits, dass das Zusammenwirken von P2X7- mit P2Y-Rezeptoren einen effektiven Mechanismus der Abwehr bakterieller Infektionen darstellt [83].

#### 4.3.5. Nachgeschaltete Effekte der P2X7-Rezeptor Aktivierung

- **Abstoßung („shedding“) von L-selectin (CD62L) und CD23** L-selectin (CD62L) ist ein C-Typ Lectin auf Lymphozyten, das durch Interaktion mit einem Liganden auf spezialisierten Endothelzellen (high endothelial venules, HEV) den Eintritt der Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten vermittelt. CD23 ist ein IgE-Rezeptor niedriger Affinität und gilt als B-Zell Aktivierungsmarker. Beide Moleküle werden in erhöhtem Maße in Seren von Patienten mit B-Zell chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL) gemessen. Die ATP-induzierte P2X7-Aktivierung führt über verschiedene Metalloproteasen zu einem Verlust sowohl von CD62L als auch von CD23 [78, 103]. P2X7 KO-Mäuse zeigen ein reduziertes CD62L-shedding [121], was als Hinweis auf die physiologische und/oder pathophysiologische Rolle des P2X7-Rezeptors zu sehen ist.
- **Stimulation von Caspasen** Ferrari et al zeigten 1999, dass der ATP-induzierten Apoptose via P2X7 eine Aktivierung von Caspasen vorausgeht [62]. Der Ausstrom von  $K^+$  durch den P2X7-Ionenkanal führt möglicherweise zur Zellkondensation und zur Aktivierung der Caspase-Kaskade [16, 106]; dies kann einen irreversiblen Schritt des ATP-induzierten Zelltods bedeuten.
- **Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung** Lipopolysaccharide (LPS) bewirken in Makrophagen zahlreiche Reaktionen, darunter die Stimulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), ein Enzym, das für die bakterizide Wirkung der Makrophagen eine große Rolle spielt. Die Beobachtungen, dass ATP und BzATP konzentrationsabhängig die LPS-abhängige NO-Freisetzung stimulieren und dies durch OxATP blockiert wird, sprechen stark für eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors in diesem Prozess [83, 95, 192].
- **IL1- $\beta$  / IL-18 Freisetzung** IL1- $\beta$  und IL-18 sind strukturell ähnliche pro-inflammatorische Zytokine, die beide durch das IL-1-converting enzyme (ICE, Caspase-1) prozessiert werden müssen, um in der aktiven Form vorzuliegen. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors triggert die Freisetzung beider Zytokine [60, 140, 191]. Die Stimulation von Caspasen ist möglicherweise für die ATP-induzierte Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  in IL-1 $\beta$  in aktivierten Makrophagen verantwortlich [50, 161].

Untersuchungen an P2X7-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass in Abwesenheit von P2X7 die ATP-induzierte Prozessierung von IL-1 $\beta$  in Peritonealmakrophagen nicht mehr stattfindet. Dieser Mangel an IL-1 beeinträchtigt in vivo die Zytokin-Signalkaskaden in P2X7-defizienten Mäusen [191]. Ein Polymorphismus im C-Terminus des human Rezeptors (Glu496Ala) führt zu einer reduzierten Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit ATP, was mit einem geringeren Ausstrom von K<sup>+</sup> aus den untersuchten Monozyten assoziiert ist [185].

- **Abschnüren („blebbing“) der Zellmembran** MacKenzie et al beschrieben 2001, dass es in P2X7-transfizierten HEK-Zellen, nicht jedoch in P2X2-Transfektanten, 4 bis 20 Sekunden nach BzATP-Stimulation zu einem irreversiblen Verlust von Zellmembran kommt. Sowohl unprozessiertes als auch reifes IL-1 $\beta$  wurde in den abgestoßenen Vesikeln nachgewiesen [138]. Die P2X7-vermittelte Bildung und Freisetzung von Mikrovesikeln stellt möglicherweise einen generellen Weg für die Sekretion von zytoplasmatischen sekretorischen Proteinen dar. Die Serin-/Threonin-Kinase ROCK 1 scheint für diesen Vorgang eine wichtige Rolle zu spielen [145]. Wilson et al beschrieben im Zusammenhang mit dem „blebbing“ eine Interaktion des P2X7 C-Terminus mit epithelialen Membranproteinen (EMP1-3 und PMP-22) [218].
- **Mehrkernige-Riesenzellbildung** Im Rahmen chronisch entzündlicher Reaktionen können Makrophagen zu Epitheloidzellen differenzieren, die in einigen Fällen zu mehrkernigen Riesenzellen fusionieren. Dies stellt einen wichtigen diagnostischen Aspekt bei Infektionen wie z.B Tuberkulose dar, ohne dass jedoch die Mechanismen der Fusion bekannt sind. Falzoni et al beschrieben 1995, dass OxATP die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen aus humanen Makrophagen komplett blockieren kann [58]. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen P2X7-Rezeptor, Riesenzellbildung und spontanem Zelltod liefern Untersuchungen an murinen J774 Makrophagen. Bei P2X7 hoch exprimierenden Zellen erhöht die Fusion zu mehrkernigen Riesenzellen die Sterberate deutlich, während in Populationen mit wenig P2X7-Rezeptor kaum spontaner Zelltod nachzuweisen ist [33]. Die Möglichkeit von Monozyten, mehrkernige Riesenzellen zu formieren, ist in Sarkoidosepatienten 3-4fach erhöht, ebenso wie die Empfindlichkeit gegenüber BzATP induzierter Zytotoxizität [143].

- **ATP induzierte Zytotoxizität** Der P2X7-Rezeptor spielt in der ATP induzierten Apoptose in Lymphozyten [35, 160, 174], Monozyten [76], Makrophagen [13, 98], murinen Thymozyten [164, 223], Fibroblasten [165] und dendritischen Zellen [40, 152] eine wichtige Rolle. Generell gilt, dass die zytotoxischen Effekte von ATP in diesen Zellen durch den P2X7-Rezeptor vermittelt werden [46]. Die intrazellulären Mechanismen dieses Zelltodes sind bisher nicht eindeutig geklärt. Sicher scheint, dass die Caspasen-Kaskade eine wichtige Rolle spielt [62, 212]; ob die Aktivierung der PLD an der ATP-induzierten Zytotoxizität beteiligt ist, ist Gegenstand der Diskussion [59, 125]. Interessant ist die These von Schrier et al, dass der Haupteffekt des ATP-vermittelten Zelltodes in einer Neuroblastomzelllinie nicht durch den P2X7-Rezeptor, sondern durch den Abbau des ATPs zu Adenosin bewirkt wird [173].

Der Zusammenhang von **Adenosinrezeptoren der P1 Familie** und zytotoxischen Effekten ist ebenfalls Gegenstand zahlreicher Untersuchungen; Konsens ist, dass diese Rezeptoren an der Regulation von Gewebe-/ Zell-Differenzierung beteiligt sind und Adenosinkonzentration, Expressionsmuster der Adenosinrezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen über pro- oder antiapoptotische Wirkung entscheiden [141, 142]; häufig genannte proapoptotische Adenosinrezeptoren sind der A2- und der A3-Rezeptor.

Auch der **P2X1-Rezeptor** ist mit ATP-induzierter Apoptose assoziiert, und zwar in der Thymozytenentwicklung. Chvatchko et al hatten 1996 beschrieben, dass der P2X1-Rezeptor in der Apoptose von Thymozyten, nicht aber in der von peripheren T-Zellen eine Rolle spielt [36]; 2000 wurde dies weiter differenziert, als gezeigt wurde, dass doppelt negative Thymozyten eine P2X7-Charakteristik im Zelltod aufweisen, doppelt positive sowohl eine P2X1- und P2X7- Charakteristik, während einzeln CD4- oder CD8-positive Zellen eher ein P2X1-typisches Verhalten zeigen [149].

**P2X2 und P2X4-Rezeptoren** wurden als beteiligte Proteine beim hypoglykämischen und /oder ischämischen Untergang von Nervenzellen entdeckt [29, 30]. Hinweise für eine Beteiligung an Nukleotid-induzierter Apoptose gibt es auch für **P2Y1-, P2Y2- und P2Y4-Rezeptoren** [29, 93, 176].

ATP-Dosierung, Länge der ATP-Stimulation und Rezeptor-Subtyp entscheiden darüber, ob ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod eingeschlagen wird [48].

- **Tötung von Mykobakterien und Parasiten** Die ATP-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt neben Apoptose in Makrophagen auch zur Tötung von

intrazellulärem *Mycobacterium bovis* [122]. Ebenso ist aktiver P2X7-Rezeptor für die Tötung von *Mycobacterium tuberculosis* erforderlich [187]. Wird der P2X7-Rezeptor in mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Makrophagen aktiviert, führt dies zu einer Aktivierung der PLD [118] und der Stress-aktivierten-Protein-Kinase (SAPK) [98], zu einer Fusion von Phagosomen und Lysosomen [57, 119 ] und letztlich zum Tod sowohl des Makrophagen als auch der eingeschlossenen Erreger. Pro-inflammatorische Faktoren, wie z.B. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die ebenfalls der Abwehr intrazellulärer Parasiten dienen, erhöhen die P2X7-Expression in Makrophagen [13, 58, 97], so dass insgesamt der P2X7-abhängigen Zytotoxizität eine wichtige Rolle bei der Kontrolle solcher Infektionskrankheiten zugestanden wird.

#### **4.3.6. Phänotyp von P2X7-Rezeptor defizienten Mäusen**

Die physiologische Rolle des P2X7-Rezeptors ist bisher ungeklärt. Eine Möglichkeit, der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen, besteht in der gezielten Ausschaltung des P2X7-Gens, so dass kein funktioneller Rezeptor an der Zelloberfläche erscheint. Zwei verschiedene Arbeitsgruppen haben P2X7-defiziente Mäuse hergestellt und darüber publiziert.

Die Arbeitsgruppe aus dem Labor der Pfizer Inc veröffentlichte 2001, dass die P2X7-KO-Mäuse eine veränderte Zytokinproduktion aufweisen, und dass sie insbesondere nicht mehr in der Lage sind, ATP-vermittelt reifes IL-1 $\beta$  zu produzieren [191]. In einer folgenden Untersuchungen zeigte sie, dass auch das ATP-induzierte L-selectin (CD62L)-shedding reduziert ist und die Tiere sowohl in der Empfänglichkeit als auch im Krankheitsverlauf bei einer durch Antikörper ausgelösten Arthritis weniger betroffen sind als die Wildtypiere. Daher spekulieren sie über eine regulatorische Rolle des P2X7-Rezeptors im Verlauf einer Entzündungsreaktion [121].

Le Stunff et al zeigten an den gleichen KO-Mäusen, dass deren Thymozyten gegenüber ATP-vermitteltem Zelltod resistent sind [125]; Le Feuvre et al hatten das zuvor an Makrophagen dieser Mäuse untersucht [123].

Die zweite P2X7-defiziente Maus wurde im Glaxo Institute of Applied Pharmacology der Universität Cambridge produziert und unterstreicht die wichtige Rolle, die der P2X7-Rezeptor in der Regulation der NO-Synthase spielt [180]. Fairbairn et al beschrieben in ihren Untersuchungen, dass der P2X7-Rezeptor für das ATP-induzierte Töten von

Mykobakterien essentiell ist und Makrophagen der P2X7-defizienten Mäuse deutlich verminderte bakterizide Eigenschaften haben [57].

Beide KO-Mausstämme wurden hinsichtlich ihres Knochenstoffwechsels untersucht. Während Gartland et al die im Glaxo Institut produzierten Mäuse für gesund befand [72], beschreiben Ke et al für die Mäuse aus dem Pfizer Institut einen auffälligen Skelettphänotyp mit Defekten im Periostaufbau und einer gesteigerten Knochen-trabekelresorption [107]. Einigkeit herrscht in beiden Gruppen, dass der P2X7-Rezeptor nicht für die Bildung von mehrkernigen Osteoklasten verantwortlich ist.

Einschränkend muss zu diesen Beobachtungen gesagt werden, dass beide KO-Mäuse auf Mausstämme zurückgekreuzt wurden, die die P451L Mutation tragen (C57/BL6 oder DBA/2) und somit die Auswirkungen der P2X7-Defizienz möglicherweise unterschätzt werden, da sie mit einem zumindest partiell defekten Rezeptor im sogenannten Wildtyp verglichen werden.

#### **4.3.7. Pathophysiologische Assoziationen mit dem P2X7-Rezeptor**

Die Rolle des P2X7-Rezeptors in der Pathophysiologie ist bisher ebenso ungeklärt wie in der Physiologie. Zahlreiche Publikationen bringen ihn mit unterschiedlichsten Krankheiten in Verbindung, worüber Tabelle 6 eine Übersicht geben soll.

Die Frage, ob es eine Korrelation zwischen der E496A-Mutation im P2X7-Rezeptor und der B-CLL gibt, ist gegenwärtig Gegenstand kontroverser Diskussion. Die Arbeitsgruppe von Wiley publiziert seit 1998 [79, 160, 216] über einen Zusammenhang von Mutationen im P2X7-Rezeptor und CLL und wird darin von Thunberg et al [204] und Adinolfi et al [1] unterstützt. Vier neuere Publikationen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen sehen dagegen keinen Einfluss auf Inzidenz, klinischen Verlauf oder Überlebensrate [155, 177, 193, 222].

Auch die Frage, welchen Einfluss der P2X7-Rezeptor auf neurodegenerative Vorgänge nimmt, ist seit der Veröffentlichung von Le Feuvre et al 2003 vorsichtiger einzuschätzen, der anhand von Untersuchungen mit P2X7 KO-Mäusen zu dem Schluss kam, dass der P2X7-Rezeptor trotz seines Einflusses auf die IL-1 $\beta$  Sekretion kein primärer Mediator des experimentell ausgelösten Zelltodes ist [124].



**Tabelle 6:** pathophysiologische Assoziationen mit dem P2X7-Rezeptor

Krankheit	Jahr der Beschreibung	Referenz
zusammen mit P2X4 beteiligt an <b>Muskeldystrophie Duchènne</b>	2004	[220]
P2X7 als früher Marker tumoröser Veränderungen im <b>Brustgewebe</b>	2004	[184]
P2X7 als früher Marker für <b>Prostata-CA</b>	2004	[183]
Durch Modulation der Zytokinsekretion in Makrophagen und Mikroglia Einfluss auf die Neuroimmunpathologie bei <b>M.Alzheimer</b>	2004, 2003	[168] [159]
<b>Neuronenschutz</b> nach Insult, da P2X7-aktivierte Mikroglia Neuronen via TNF-Freisetzung vor toxisch wirkendem Glutamat schützt	2004	[201]
<b>Diabetes mellitus:</b> u.a. vaskuläre Komplikationen; Retinopathie	2000-2004	[41, 53, 189, 190, 195]
<b>Sarkoidose:</b> therapeutischer Effekt von Allopurinol und Captopril durch Herabregulation des P2X7-Rezeptors in Makrophagen	2001, 2004	[143, 144]
<b>Leukämie (B-CLL)</b>	2000-2004	[1, 79, 155, 177, 193, 204, 216, 222]

#### 4.3.8. Die P451L-Mutation im murinen P2X7-Rezeptor

Bei der Untersuchung der NAD induzierten Effekte auf T-Lymphozyten entdeckten Seman und Adriouch 2000, dass sich im Gegensatz zu BALB/c Mäusen bei C57/BL6 Mäusen keine bzw. nur eine stark verminderte Apoptose auslösen lässt. Weitere Untersuchungen in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass zur Vermittlung dieser NAD-induzierten Apoptose zwei Komponenten notwendig sind: ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) (siehe Abschnitt 4.5) und ein nachgeschalteter Effektor, der in den C57/BL6 Mäusen defekt ist [2]. Die Notwendigkeit von ARTs konnte u.a. dadurch belegt werden, dass ART-spezifische Antikörper den NAD-abhängigen Zelltod hemmten; erste Hinweise auf den Effektor lieferte die Beobachtung, dass etheno-NAD, ein an der Adeningruppe modifiziertes NAD, das von ARTs genauso wie NAD verstoffwechselt wird, keine Apoptose auszulösen vermochte; der Effektor musste also die Veränderung im Adenin erkennen, was bei den Purinorezeptoren gegeben ist.

Die Tatsache, dass NAD an T-Lymphozyten Effekte auszulösen vermag, die typisch für eine P2X7-Rezeptor-Aktivierung sind (z.B. Porenöffnung und Kalziumfluss) [178], machte den P2X7-Rezeptor als „Kandidaten“ wahrscheinlich.

Sequenzierungen der P2X7-Rezeptor-cDNA zeigten eine Mutation im Allel der C57/BL6 Maus (T1352C), die zu einem Austausch von Prolin zu Leucin an Position 451 führt. Die Mutation liegt damit im C-Terminus an einer Stelle, die Homologien mit einer TNFR-1-Todesdomäne und einer SH3-Domäne aufweist (siehe **Abbildung 3**). Sahil Adriouch zeigte an T-Lymphozyten von BALB/c und der C57/BL6 Mäusen, dass diese Mutation die Funktion des P2X7-Rezeptors empfindlich beeinflusst; so ist die Porenöffnung, der Kalziumfluss und die Auslösung der Apoptose (gemessen anhand der Ausstülpung von Phosphatidylserin) reduziert [3].

Sequenzvergleiche ergaben, dass an der Position 451 das BALB/c-Allel (451P) mit der P2X7-Sequenz von Ratte und Mensch übereinstimmt [3].

Die folgende Tabelle 7 fasst die bei Beginn meiner Doktorarbeit bekannten Tatsachen zur P451L Mutation im P2X7-Rezeptor zusammen.

**Tabelle 7:** Eigenschaften der P451L Mutation im P2X7-Rezeptor

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der P2X7-Rezeptor von BALB/c und C57/BL6 Mäusen unterscheidet sich in einer Aminosäure: <ul style="list-style-type: none"> <li>- BALB/c: Prolin an Position 451</li> <li>- C57/BL6: Leucin an Position 451</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die P451L Mutation beeinträchtigt die Funktion des P2X7-Rezeptors: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kalziumfluss verringert</li> <li>- Porenöffnung vermindert</li> <li>- Geringere Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Mutation liegt im C-Terminus innerhalb einer Domäne, die Homologien zur TNFR 1-Todesdomäne und einer SH3-Bindedomäne zeigt</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der BALB/c-Genotyp (451P) entspricht dem von Mensch und Ratte</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der P2X7-Rezeptor ist wahrscheinlich Effektor der NAD-induzierten Apoptose in T-Lymphozyten und Zielprotein der ADP-Ribosyltransferasen (ARTs)</li> </ul>

#### 4.4. ATP – Herkunft und Verbleib in vivo

Das Wissen um die zentrale Rolle von ATP im Energiestoffwechsel jeder Zelle ist seit langem weit verbreitet. ATP und purinerge Rezeptoren an der Zellaußenseite als Signalvermittler inter- und intrazellulärer Prozesse sind dagegen viel weniger bekannt. In zunehmendem Maße werden sie im Zusammenhang des Nervensystems, der glatten Muskulatur und Zellen hämatopoetischen Ursprungs erforscht.

Bei physiologischem pH liegt ATP überwiegend negativ geladen als  $\text{ATP}^{4-}$  (~60%) oder  $\text{HATP}$  (~30%) vor. Diese negative Ladung ist sowohl für die Bindung an Metallionen wie auch an positiv geladene Seitengruppen von Proteinen wichtig. Ebenso schützt sie vor einem unkontrollierten Durchgang des ATPs durch die Plasmamembran.

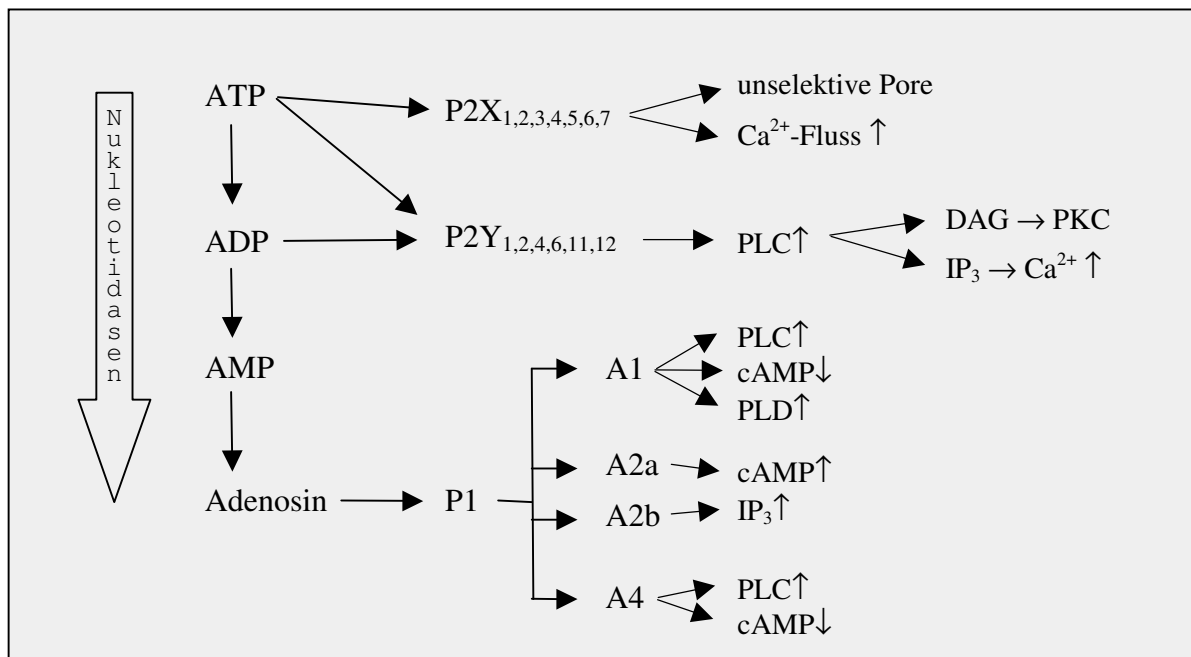
Unter physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen gibt es zahlreiche Quellen für die Freisetzung von ATP [75]. Dies können sein:

1. Sowohl in adrenergen wie cholinergen Nervenendigungen wird ATP während der Neurotransmission in kleinen Vesikeln in den synaptischen Spalt abgegeben [136].
2. Plötzliche Lyse von intakten Zellen, z.B. beim Riss von Blutgefäßen oder anderen Gewebeverletzungen [38].
3. Bei Thrombozytenaktivierung wird ATP gemeinsam mit Serotonin aus Granulationen freigesetzt [74].
4. Erythrozyten geben nach kurzen Perioden von Hypoxie und Hyperkapnie ATP ab [10, 66].
5. In Endothel-, Epithel- [14, 100, 197] und glatten Muskelzellen [137] wird ATP durch einen autokrinen/parakrinen Mechanismus via P2X- oder P2Y-Rezeptoraktivierung freigesetzt. Die Menge an freigesetztem ATP steigt während akuter Entzündungsprozesse an [15].
6. Adrenale chromaffine Zellen sezernieren nach Acetylcholinstimulus über einen Kalzium-abhängigen cholinergen Rezeptor ATP [31].
7. Mastzellen oder basophile Granulozyten verfügen möglicherweise über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus, um P2-Purinorezeptoren zu aktivieren [158].

Die Mechanismen der ATP-Freisetzung sind noch nicht entschlüsselt. Mindestens drei sind Gegenstand der Diskussion: 1) Konduktiver ATP-Transport durch einen ATP-Kanal, der stimuliert wird durch einen Cystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeits-Regulator (CFTR) [21], 2) nicht-konduktive, erleichterte Diffusion durch einen multivalenten Anionentransporter [7] und/oder 3) Exocytose von ATP-gefüllten Vesikeln oder Granulationen [74].

Das in den extrazellulären Raum abgegebene ATP kann unterschiedlich wirken [75]: 1) je nach Umgebung, in der sich die sezernierende Zelle befindet, verteilt sich das ATP durch Diffusion oder es wird durch den Blutfluss weggetragen, 2) das ATP wird innerhalb kurzer Zeit durch ecto-ATPasen oder ecto-Apyrasen und 5'-Nukleotidasen zu ADP, AMP oder Adenosin degradiert und 3) ATP im Verbund mit seinen Abbauprodukten bindet an P1- und P2- Purinorezeptoren und aktiviert diese (siehe **Abbildung 4**).

**Abbildung 4:** Die purinerge Signalkaskade (nach [68])



Extrazelluläres ATP vermittelt diverse biologische Reaktionen, die von der Kontraktion glatter Muskulatur bis zur Signalübermittlung im synaptischen Spalt im autonomen und zentralen Nervensystem reichen. Seine Rolle in den hämatopoetischen Zellen wird zunehmend besser verstanden, wo gezeigt wurde, dass extrazelluläres ATP zytotoxische

Reaktionen in Thymozyten [149, 223], dendritischen Zellen [40, 152], Lymphozyten [160] und Makrophagen [98, 221] induzieren kann. Dieser Zelltod kann sowohl apoptotische wie lytische Züge tragen und wird vornehmlich über den P2X7-Rezeptor vermittelt (siehe Abschnitt 4.3.5.).

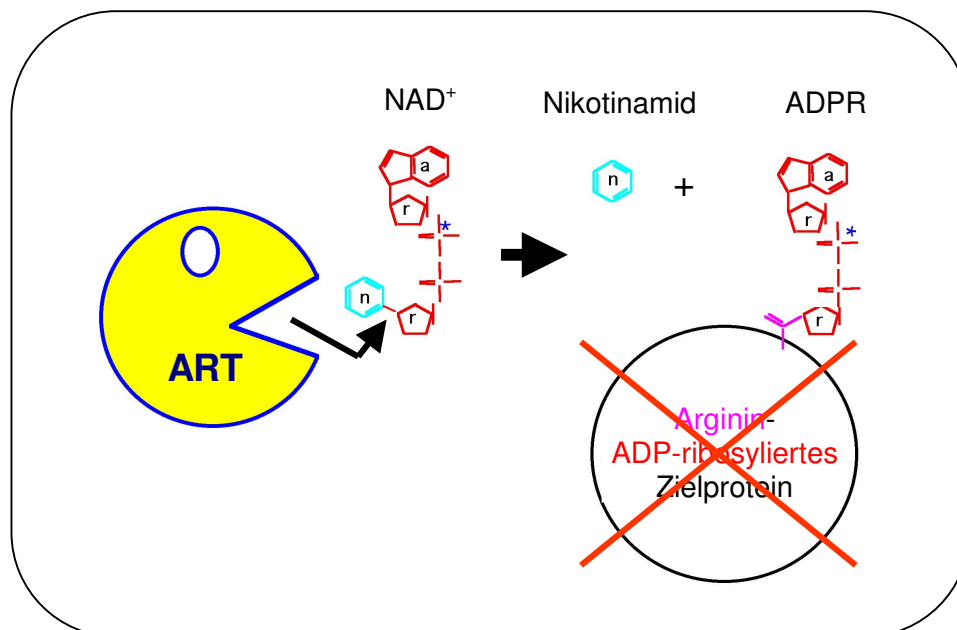
Es muss immer bedacht werden, dass die über Purinorezeptoren vermittelten Reaktionen auf ATP, ADP oder Adenosin Bestandteil eines bestimmten biologischen Umfeldes sind, das u.a. durch die Herkunft der Agonisten und Antagonisten und die Signalwege bestimmt wird. Auf vielen Zellen, unter ihnen auch die hämatopoetischen, ist die Coexistenz von P1- und P2- Rezeptoren nachgewiesen. So sind beispielsweise komplexe und kooperierende Signalwege von P2Y<sub>12</sub>-, P2Y<sub>1</sub>- und P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren im Thrombozytenstoffwechsel dokumentiert, ebenso wie das Zusammenwirken von P2Y<sub>11</sub> und A2a-Rezeptoren in humanen Lymphozyten [37]. Diese Interaktionen können durchaus gegenläufig wirken, so aktivieren *und* hemmen A1- und A2-Rezeptoren die Adenylatzyklase. Die Funktion von einem Rezeptor kann auf diese Weise von einem anderen überspielt oder verstärkt werden; bei genetischen und/oder funktionellen Ausfällen müssen diese, solange sie isoliert auftreten, nicht augenfällig werden, da sie innerhalb des biologischen Netzwerkes kompensiert werden können.

## 4.5. ARTs – ADP-Ribosyltransferasen

### 4.5.1. Die ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation

ADP-Ribosylierung ist wie die Phosphorylierung eine reversible, posttranslationale Modifikation, die in den meisten Fällen zur Inaktivierung des Zielproteins führt. Die ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysieren dabei den Transfer der ADP-Ribose- (ADPR-) Gruppe von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) auf einen spezifischen Aminosäurerest, z.B. Arginin oder Cystein unter Freisetzung von Nikotinamid (**siehe Abbildung 5**). Die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Riboseeinheit ist ein exothermer Prozess, wobei die gewonnene Energie von - 4,3 kJ/mol für den Transfer der ADP-Ribose auf das Zielprotein genutzt wird. Die ARTs werden aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur schematisch häufig als „Pacman“ dargestellt; zwei dreisträngige  $\beta$ -Faltblätter bilden den katalytischen Spalt für die Bindung des NAD und stellen den „Ober- und Unterkiefer“ des „Pacman“ dar. Die dreidimensionale Struktur der prokaryontischen ARTs ist schon länger bekannt [84], die erste Kristallisation der eukaryontischen ART2.2 gelang 2002 [147]. Eine wichtige Funktion bei der NAD-Bindung und Katalyse nehmen die drei konservierten Aminosäuren Arginin (R349), Serin (S386) und Glutamin (E428) ein.

**Abbildung 5:** ADP-Ribosylierung führt meist zur Inaktivierung des Zielproteins



Einige ARTs besitzen neben oder anstelle der Transferase (ARTase)-Aktivität eine NAD-Glykohydrolase (NADase) – Aktivität, mit dem Unterschied, dass nicht eine Aminosäure, sondern Wasser als Akzeptor verwendet wird und sowohl Nikotinamid als auch ADP-Ribose freigesetzt werden. Außerdem gibt es Enzyme, die sich selbst modifizieren, indem eine ADPR-Gruppe kovalent auf eine Seitenkette der eigenen Polypeptidkette übertragen wird (Automodifikation). Die bekannten ARTs unterscheiden sich deutlich in ihren ARTase-, NADase- und Automodifizierungsaktivitäten. Eine weitere Unterklasse der ARTs, die Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARP), katalysieren die Polymerisierung von ADP-Ribose Einheiten zu verzweigten Ketten auf dem Zielprotein. Zusätzlich besitzen sie auch NADase und Automodifikations-Aktivität. Sie kommen intrazellulär vor, „markieren“ DNA und sind damit an der Regulation wichtiger biologischer Vorgänge wie Zellteilung, DNA-Reparatur und Gentranskription beteiligt.

Die ADP-Ribosylierung ist wie die meisten enzymatischen Reaktionen reversibel. Eine De-ADP-Ribosylierung kann durch mono- bzw. poly-ADPR-Hydrolasen katalysiert werden und die Zielproteine reaktivieren [129, 132, 146]. ADP-Ribozyklasen, z.B. die membranständigen Ektoenzyme CD38 oder CD157, verwenden ebenfalls NAD als Substrat, mit dem Unterschied, dass sie nach der Freisetzung von Nikotinamid die Bildung einer intramolekularen Bindung katalysieren, die in einer zyklischen ADP-Ribose (cADPR) resultiert [64, 94, 126, 133, 134]. Eine anschließende Hydrolyse bewirkt eine Spaltung in Nikotinamid und ADP-Ribose.

#### **4.5.2. NAD als Substrat für extrazelluläre Enzyme**

NAD ist neben ATP ein klassischer intrazellulärer Metabolit des Energiestoffwechsels und des Elektronentransfers. Seit einigen Jahren mehren sich die Hinweise, dass diese Moleküle auch in der extrazellulären Umgebung unterschiedliche Funktionen ausüben, sei es im Fall von ATP als Ligand an Purinorezeptoren, wie oben ausführlich geschildert, oder im Fall von NAD als Substrat für Nukleotid-metabolisierende Ektoenzyme. Die meisten dieser Enzyme wurden ursprünglich als membranassoziierte Nukleotid-metabolisierende Enzyme charakterisiert, die entweder NAD- oder ATP-spezifisch sind. Nur die Ekto-Phosphodiesterasen (ENPPs) können sowohl ATP als auch NAD hydrolysieren.

Die Zellmembran von lebenden Zellen ist für NAD ebenso wie für ATP undurchlässig. Die intrazelluläre NAD-Konzentration beträgt etwa 400-500  $\mu\text{M}$  [179], wovon mehr als

70% in den Mitochondrien lokalisiert sind. Extrazelluläres NAD kann zum einen aus untergehenden Zellen infolge mechanischen Zellschadens oder inflammatorischer Reaktionen freigesetzt werden, wobei lokal 50-100fach höhere NAD-Konzentrationen erreicht werden als sie allgemein extrazellulär gemessen werden können (ca. 0,1-0,2  $\mu\text{M}$  im Plasma mit einer Halbwertszeit von etwa 15 Minuten [179]). Zum anderen existieren auch nicht-lytische Mechanismen, die NAD freisetzen. Ein möglicher Sezernierungsmechanismus wurde 2001 beschrieben, wonach Connexin 43, ein gap junction protein, in der Membran Hexamere bildet, die als Poren den NAD Transport ermöglichen [22].

#### **4.5.3. Enzymfamilie der ARTs**

Mono-ADP-Ribosylierung wurde ursprünglich als pathogener Mechanismus bakterieller Toxine (*Diphtherie- Pertussis-* und *Cholera-Toxin*) entdeckt, mit dem diese Zielproteine in humanen Zellen inaktivieren. Das *Diphtherie-Toxin* (DT), dessen pathogener Mechanismus erstmals 1968 beschrieben wurde, mono-ADP-ribosyliert mit Hilfe seiner S1-Untereinheit den Elongationsfaktor 2 (EF2) einer eukaryontischen Zielzelle [92]. Dadurch wird die Proteinsynthese effektiv gehemmt und die Zelle getötet. Ähnliche Wirkungsmechanismen konnten für *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA), *Cholera-Toxin* (CT), *E.coli* heat labile Enterotoxin (LT) und *Pertussis-Toxin* (ADP-ribosyliert die  $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine) gezeigt werden. Die meisten mono-ADP-Ribosyltransferasen, die aus Prokaryonten und Bakteriophagen kloniert wurden, sind sezernierte Enzyme, die Proteine von anderen Organismen modifizieren. Eine zytoplasmatische, endogene ART (DRAT) wurde bislang nur in Stickstoff-fixierenden Bakterien nachgewiesen, wo sie die Dinitrogenase-Reduktase reguliert [132].

Mono-ADP-Ribosylierung beschränkt sich aber nicht nur auf die prokaryontische Welt, sondern konnte auch in verschiedenen Geweben von Vertebraten nachgewiesen werden, wo sie z.B bei Zell-Zell Interaktionen, der Signaltransduktion oder dem Aufbau des Zytoskeletts beteiligt ist [139, 224]. Interessanterweise scheinen weder Hefen, Würmer, Fliegen noch Pflanzen ARTs zu besitzen, so dass eine phylogenetische Lücke zwischen der ADP-Ribosylierung der Prokaryonten und den ARTs der Wirbeltiere klafft.



Im mittlerweile komplett sequenzierten Genom von Maus und Mensch wurden vier humane (ART 1, 3, 4, 5) und sechs murine ARTs (ART 1, 2.1, 2.2, 3, 4, 5) charakterisiert (**vergleiche Tabelle 8**).

Das ART2 Gen ist in der Maus dupliziert, liegt jedoch beim Menschen als Pseudogen vor, da ein vorzeitiges Stopcodon die Translation eines funktionellen Proteins verhindert. Im Genom des Huhns sind außerdem ART6 und 7 beschrieben. Die ART-Gene bestehen aus 4 bis 14 Exonen mit einem großen zentralen Exon, das die katalytische Domäne kodiert. Alle ARTs sind extrazelluläre Proteine, wobei ART1 bis 4 über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden sind, während die anderen ARTs sezerniert werden.

ART1,2,5,6,7 haben ein R-S-EXE Motiv in ihrer katalytischen Domäne, was sie als argininspezifische ARTs kennzeichnet.

Die Expression der ARTs in verschiedenen Geweben, wie sie durch RNA Untersuchungen mittels RT-PCR oder Northern blot ermittelt wurde, ist in Tabelle 8 zusammengefasst. ART3 und 4 sind relativ weit verbreitet, während ART1 v.a. im Muskelgewebe und ART2 in reifen T-Zellen exprimiert wird. ART2 gilt in Ratten und Mäusen als T-Zell-Differenzierungsmarker (in der Ratte als solcher zunächst als RT6 beschrieben) und wird darüber hinaus bei der Aktivierung von T-Lymphozyten von der Zelloberfläche abgestoßen [105].

**Tabelle 8:** Übersicht über die Familie der ARTs (modifiziert aus [179])

	<b>Aminosäuren-Spezifität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Chromosomale Lokalisation</b>	<b>Expressionsprofil</b>	<b>Zielproteine</b>	<b>Effekte</b>
<b>ART1</b>	Arginin	Mensch Maus	11p15 7.49cM	Skelettmuskel, Herz, Lunge, Neutrophile Granulozyten, Lymphome	Integrin $\alpha 7$ , Defensin HNP-1, FGF-2, PDGF-BB	Inhibierung der Funktion der Zielproteine
<b>ART2</b>	Arginin	Mensch Maus: ART2.1 und 2.2 Ratte	11q13 7.48 cM Chr.1	Pseudogen Reife T-Lymphozyten Reife T-Lymphozyten	LFA1, CD8, CD27, CD43, CD44, CD45, P2X7 ART2.2	Inhibierung der TLZ- Funktion und Induktion von Apoptose
<b>ART3</b>	<i>nicht bestimmt</i>	Mensch Maus	4q13.1-q13.3 5.51 cM	Hoden, Herz, Skelettmuskel, Lunge, Monozyten	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>
<b>ART4</b>	<i>nicht bestimmt</i>	Mensch Maus	12p12.2-p13.1 6.70 cM	Erythrozyten, hämatopoetische Zellen, Herz, Lunge, Monozyten	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>
<b>ART5</b>	Arginin	Mensch Maus	11p15 7.49 cM	Hoden, Herz, Skelettmuskel, Lymphome	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>
<b>ART6</b>	Arginin	Huhn			Aktin	Inhibierung der Funktion der Zielproteine
<b>ART7</b>	Arginin	Huhn			<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>

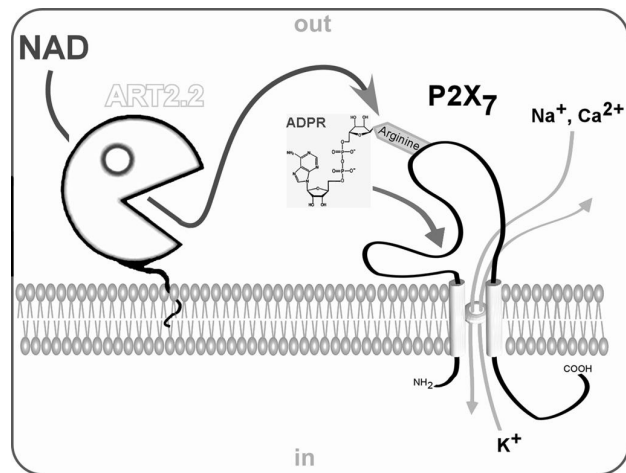
#### 4.5.4. NICD: NAD-induced T cell death

Die physiologische ebenso wie die pathophysiologische Rolle der eukaryontischen ADP-Ribosylierung ist noch weitgehend ungeklärt. Ratten- und Mausmodelle lassen eine Beteiligung an der Regulierung autoimmuner Prozesse vermuten, wobei ART2-doppelt-KO-Mäuse unter sterilen Tierstallbedingungen fertil und phänotypisch unauffällig sind. Eine gute Zusammenfassung des gegenwertigen Kenntnisstands haben Seman et al 2004 veröffentlicht [179].

Für die vorliegende Arbeit ist insbesondere der NICD (NAD-induced T cell death) von Interesse, der 2003 erstmals beschrieben wurde [178]. Die Inkubation von T-Lymphozyten mit NAD führt durch ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen neben der Inhibition der T-Zell-Proliferation auch zur schnellen Auslösung von Zelltod. Dieser ist nachweisbar durch die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran, der Aufnahme von Propidiumiodid, Zellschrumpfung, Zerstörung des Mitochondrien-Membranpotentials und DNA-Fragmentation, was alles Zeichen eines apoptotischen Prozesses sind. Damit gleicht der NICD dem durch den P2X7-Rezeptor vermitteltem Zelltod. Weitergehende Untersuchungen zeigten in der Folge, dass der P2X7-Rezeptor als nachgeordneter Effektor den NICD auslöst und selber ADP-ribosyliert wird [178]. Besonders beachtenswert an dem NICD ist die Tatsache, dass er durch niedrige Konzentrationen von NAD (wenige  $\mu\text{M}$ ), so wie sie in verletztem oder entzündlichem Gewebemillieu erreicht werden, ausgelöst wird. Dies entspricht einem Hundertstel der ATP-Konzentration, die in vitro benötigt wird, um den P2X7-Rezeptor zu aktivieren.

Die Frage, wie der P2X7-Rezeptor durch ADP-Ribosylierung aktiviert wird, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Kovalent an der ATP-Bindungsstelle immobilisierte ADP-Ribose ist ebenso denkbar wie eine allosterische Konformationsänderung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung jenseits der Liganden-Bindungsstelle. Die in vorliegender Arbeit hergestellte P2X7- und ART2.2-doppelt positive Zelllinie soll helfen, den NICD weiter aufzuklären, beispielsweise durch Identifikation des Argininrestes im P2X7-Rezeptor, der durch die ART ADP-ribosyliert wird (**Abbildung 6**).

**Abbildung 6:** Der P2X7-Rezeptor ist Zielprotein der ADP-Ribosylierung (aus [179])



Da die ART2 Expression auf reife T-Lymphozyten begrenzt ist [105, 157], wird der NICD keine Rolle in der Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten im Thymus spielen; vielmehr ist vorstellbar, dass er an der Regulation und Kontrolle der peripheren T-Lymphozyten im Sinne einer Abschaltung potentiell autoreaktiver Zellen beteiligt ist [179].

## **4.6. Gene gun: die DNA-Immunsisierung als interessante Alternative zur Proteinimmunsisierung**

Wissen über Proteine, ihre Verbreitung und Funktion hängt nicht zuletzt von den Methoden ab, die zur Untersuchung dieser Proteine zur Verfügung stehen. Bei den Methoden spielt der Einsatz von Antikörpern eine besondere Rolle, da sie in der Lage sind, aus einem Gemisch von Molekülen das Interessierende spezifisch „herauszufischen“; häufig benutzte Methoden wie der ELISA, FACS-Untersuchungen, Immunfluoreszenzen oder Immunpräzipitationen sind überhaupt nur durch das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern möglich. Dabei hängt das Ergebnis der Untersuchungen im Wesentlichen von der Qualität des Antikörpers ab. Dies wird auch im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit deutlich.

Bei der Produktion von Antikörpern bietet seit einigen Jahren die DNA-Immunsisierung eine Alternative zu der etablierten Protein-/ Peptidimmunsisierung. Im Folgenden wird die Technik der DNA-Immunsisierung vorgestellt und beide Immunsisierungsformen miteinander verglichen.

### **4.6.1. Technik der DNA-Immunsisierung**

#### **4.6.1.1. Prinzip**

Die cDNA des interessierenden Proteins wird in einem eukaryontischen Expressionsvektor in Haut oder Muskulatur des zu immunsisierenden Tieres gebracht, wo sowohl in Zellen im Bereich der Injektionsstelle als auch in mobilen Zellen, die in die drainierenden lymphatischen Organe abwandern, Protein produziert wird. Das Immunsystem reagiert mit der Bildung antigenspezifischer Antikörper, was durch mehrfache Immunsisierung, sog. „Boosterung“, und eine abschließende Proteinimmunsisierung verstärkt wird. Monoklonale Antikörper können aus Milz- und/oder Lymphknotenzellen DNA-immunsisierter Nagetiere gewonnen werden. Der Erfolg der Immunsisierung kann z.B durch Testen der Seren an transfizierten Zellen oder durch einen proteingestützten ELISA untersucht werden.

#### 4.6.1.2. Eigenschaften der für die Immunisierung verwendeten DNA

Die cDNA wird in einen Expressionsvektor für Säugerzellen eingesetzt, in dem die Expression von einem starken viralen Promoter kontrolliert wird. Das Plasmid besteht aus zirkulärer Doppelstrang-DNA mit einer Länge von ca. 4000-5000 Basenpaaren. Bei der Konstruktion des Plasmids besteht die Möglichkeit, die zelluläre Lokalisation des zu produzierendes Proteins durch Anfügen oder Entfernen entsprechender Signalsequenzen zu bestimmen. Eine N-terminale Leadersequenz aus 20-25 hydrophoben Aminosäuren beispielsweise dirigiert den Export des Proteins in das extrazelluläre Kompartiment, während entsprechende intramolekulare oder C-terminale Sequenzen eine Membranverankerung bewirken (als Transmembranprotein bzw. GPI-verankertes Protein). Daneben kann für die Detektion des Proteins ein Marker-Epitop, wie z.B. der FLAG-tag, angefügt werden.

#### 4.6.1.3. Applikation der DNA

Die DNA kann in das Tier entweder durch Beschuss mit DNA-beladenen Teilchen (ballistische Immunisierung), durch Injektion (intradermal, intramuskulär, intravenös, intrasplenisch oder intrahepatisch) oder Applikation über die Schleimhäute (buccal, intranasal oder intravaginal) eingebracht werden [5, 69, 73, 85, 206, 210, 211]. Die ballistische Technik erzielt die konsistentesten Ergebnisse [162, 198]. Dafür werden Goldkügelchen mit einem Durchmesser von 1-3µm mit der DNA beschichtet und an der Innenseite eines Plastikschauches fixiert; dieser wird in 2-3 cm große Patronen zerteilt, die in eine sog. „gen gun“ eingespannt werden. Mit einem raschen Helium-Gas-Stoß von 200-400 psi wird die DNA in die rasierte Haut des Tieres geschossen, was dort als bräunliche Färbung zu erkennen ist. In unserer Arbeitsgruppe wird ausschließlich dieses Verfahren verwendet.

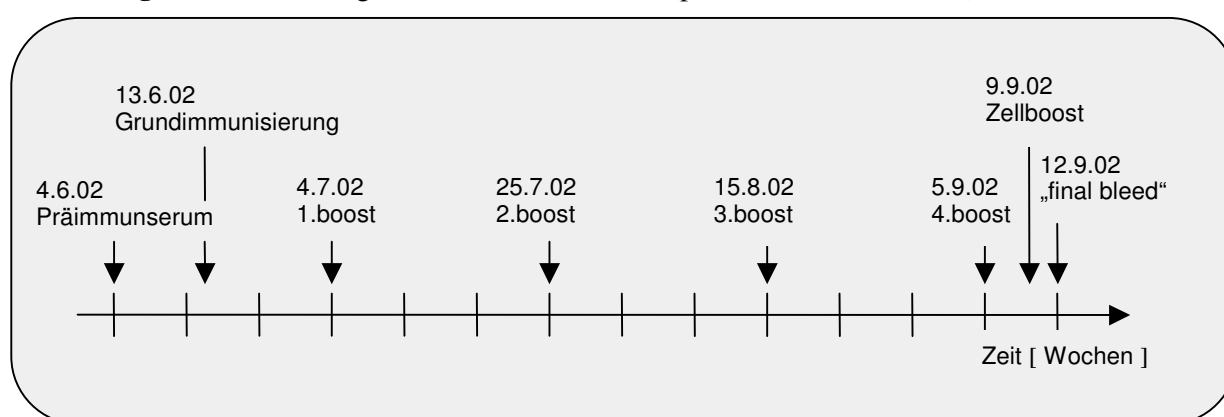
#### 4.6.1.4. Immunisierungsschema

Der zeitliche Verlauf einer DNA-Immunisierung wird am Beispiel der Immunisierung der Ratte RH18 gegen den P2X7-Rezeptor dargestellt. (**Abbildung 7**).

Vor der ersten Immunisierung erfolgt eine Blutabnahme zur Gewinnung des sog. Präimmunserums, das im weiteren Verlauf als Negativkontrolle bei den Untersuchungen

des Immunisierungserfolges dient. Der DNA-Grundimmunisierung folgen drei bis vier „Boosterimmunisierungen“ im Abstand von jeweils drei bis fünf Wochen; wenige Tage vor der letzten Blutentnahme (sog. „final bleed“) und der Fusion der Milz mit Myelomzellen erfolgt die Schlussimmunisierung mit aufgereinigtem Protein oder transfizierten Zellen. Fünf bis acht Tage nach jeder Immunisierung wird den Tieren Blut zur Kontrolle der Antikörperproduktion abgenommen. Die Reaktivität und die Spezifität der erzeugten Seren werden mittels ELISA und anhand von transfizierten Zellen in der Immunfluoreszenz bestimmt.

**Abbildung 7:** Immunisierungsschema der Ratte RH18 (pcDNA6.P2X7.BALB/c)



#### 4.6.2. Vergleich von DNA- und Proteinimmunisierung

Im Vergleich der Methoden wird deutlich, worin die Vorteile der DNA-Immunisierung liegen [113]. Da bei der DNA-Applikation keine Adjuvantien erforderlich sind, die häufig Entzündungsreaktionen hervorrufen, und die Applikation mittels Gen-gun nach Selbstversuchen einiger Autoren [113] weniger schmerzhaft als ein Nadelstich ist, ist die DNA-Immunisierung für die Tiere verträglicher. Sie bringt gegenüber der Proteinimmunisierung erhebliche Ersparnisse an Personal- und Materialeinsatz, da Herstellung und Aufreinigung von Plasmid-DNA in der Regel einfacher sind als die Produktion und Isolierung eines rekombinanten Proteins. Plasmide sind im Gegensatz zu Proteinen stabil und können problemlos langfristig auch bei Raumtemperatur gelagert werden. Darüber hinaus werden für einen vergleichbaren Immunisierungseffekt wesentlich geringere Mengen an DNA als an Protein benötigt [17].

Eine weit verbreitete Immunisierungsstrategie zur Erzeugung von Antikörpern gegen neu entschlüsselte Gene ist die Verwendung von an Trägerproteine gekoppelten synthetischen Peptiden. Diese induzieren meist Antiseren, die lineare Epitope im denaturierten Protein erkennen und damit vor allem für Immunoblot-Verfahren (Western-Blot) tauglich sind. Häufig sind diese Antiseren jedoch nicht in der Lage, das nativ gefaltete Protein zu erkennen, wie es für Immunpräzipitation oder Vitalzellimmunofluoreszenz erforderlich ist. Das in dieser Arbeit verwendete Immuserum gegen den P2X7-Rezeptor der Firma Alomone Labs ist ein Beispiel für ein solches Antiserum. Die mittels DNA-Immunisierung erzeugten Antiseren erkennen jedoch meist das native Protein und sind in dieser Hinsicht den durch Peptidimmunisierung erzeugten Antiseren überlegen.

Nachteil der ballistischen DNA-Immunisierung sind die hohen Kosten zur Anschaffung und Unterhaltung des Instrumentariums, denen aber Einsparungen bei Antigenaufbereitung und -lagerung gegenüber stehen.



## 5. MATERIALIEN UND METHODEN

Als PBS wurde in allen Fällen Dulbecco's PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Gibco BRL) verwendet.

### 5.1. Zelllinien

HEK-T	-	Humane embryonale Nierenzellen
HEK-T-C.2	-	HEK-T stabil transfiziert mit P2X7 aus BALB/c Maus [3]
HEK-T-6.3	-	HEK-T stabil transfiziert mit P2X7 aus C57/BL6 Maus [3]
DC27.10	-	Hybridom (von B.Fleischer, BNI)
MD27	-	Hybridom
RAW	-	BALB/c Makrophagenzelllinie
EL4	-	C57BL/6 Lymphomzelllinie

Die stabil mit dem P2X7-Rezeptor transfizierten HEK-T-Zellen wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von M.Seman aus Paris zur Verfügung gestellt.

### 5.2. Zellkultur

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus B5060) bei  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  kultiviert.

#### 5.2.1. Adhäsionszellen

Die HEK-T-Zellen wuchsen in Kulturflaschen (Nunc, Flasks T75 oder T25) und wurden zwei- bis dreimal pro Woche mit Trypsin-EDTA (Gibco BRL) passagiert.

Medium: Dulbecco's modified eagle medium/ DMEM ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Gibco BRL)  
10% FCS (Biochrom)  
1% L-Glutamin (Gibco BRL)  
1% MEM – non essential amino acids (Gibco BRL)  
1% 1M HEPES buffer (Gibco BRL)  
1% Natriumpyruvat (Gibco BRL)

Die P2X7 Transfektanten HEK-T-C.2 (P451) und HEK-T-6.3 (451L) wurden in Blasticidin-HCL (Invitrogen)-Selektionsmedium ( $6\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gehalten, die ART2.2 Transfektanten HEK-T-NOD, HEK-T-C.2-NOD und HEK-T-6.3-NOD zusätzlich durch G418 (Gibco BRL) ( $20\mu\text{l}/\text{ml}$ ) selektioniert.

### **5.2.2. Suspensionszellen**

DC27.10, MD27 und EL4-Zellen wurden in Petrischalen (Greiner Labortechnik) kultiviert und 3x pro Woche passagiert.

Medium: RPMI 1640 (Gibco BRL)  
10% FCS (Biochrom)  
1% Natriumpyruvat (Gibco BRL)

DC27.10 ART2.2-Transfektanten (DC27.10-NOD) wurden in G418 (Gibco BRL) (20µl/ml)-Selektionsmedium gehalten.

### **5.2.3. RAW Zellen**

Sie wuchsen in Petrischalen für Zellkultur (NUNC) und wurden in VLE RPMI Medium (Biochrom) + 10% FCS (Biochrom) kultiviert. 3x pro Woche wurden sie durch scharfes Pipettieren passagiert.

## **5.3. Transfektion**

Um ein Zellmodell für P2X7- und ART2.2-doppelt positive Zellen zu erhalten, wurden zwei Strategien angewandt: die P2X7 stabil transfizierten HEK-T-Zellen wurden mit ART2.2 supertransfiziert, und die ART2.2 stabil exprimierenden DC27.10-NOD-Zellen wurden mit P2X7 supertransfiziert. Da jedoch zum Zeitpunkt der Transfektion kein Antikörper vorlag, der P2X7 in der Immunfluoreszenz erkennen konnte und die DC27.10 Zellen einen natürlichen P2X7-Rezeptor exprimieren, wurde dieser Weg nicht weiterverfolgt.

### **5.3.1. Lipofektamin-Transfektion von HEK-T-Zellen**

HEK-T-Zellen und HEK-T-P2X7 Transfektanten wurden mit murinem ART2.2, das im eukaryontischen Expressionsvektor pME-NOD(neo) unter der Kontrolle des SR $\alpha$  Promoters steht, wie folgt transfiziert und mittels G418 (=Geneticin, eine dem Neomycin verwandte Substanz) (Gibco BRL) (20µl /ml) selektioniert.

10µg DNA je T75 Flasche wurde mit ScaI (New England Biolabs) linearisiert, das Enzym mittels Strata Clean™ Resin (Stratagen) entfernt, die DNA mit 3M Natrium-Acetat und 100% Ethanol gefällt und zur Transfektion eingesetzt.

Zur Lipofektamintransfektion wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in eine T75 Flasche neu ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 50% konfluent.

Zwei Lösungen wurden angesetzt:

- Lösung A: 10µg DNA + 750 µl OPTI-MEM<sup>®</sup> Medium (Gibco BRL)
- Lösung B: 100µl Lifofektamin (Life Technologies<sup>™</sup>, Gibco BRL)+ 750 µl OPTI-MEM<sup>®</sup>

Beide Lösungen wurden sanft gemischt, 30 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit OPTI-MEM<sup>®</sup> auf 7,5 ml aufgefüllt und auf die mit OPTI-MEM<sup>®</sup> gewaschenen Zellen pipettiert. Nach vier- bis sechsständiger Inkubation im Brutschrank wurde 7,5 ml DMEM + 20% FCS zugegeben und das Medium am nächsten Tag gegen Kulturmedium (s.o.) ausgetauscht.

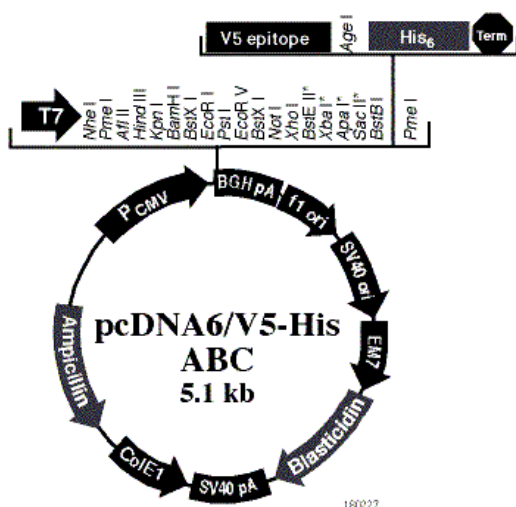
Ab dem zweiten Tag nach Transfektion wurde zur Selektion stabil transfizierter Zellen dem Medium einmal pro Woche G418 in einer Konzentration von 20µl/ml zugesetzt.

### 5.3.2. Elektroporation von DC27.10 Zellen

Zur Transfektion der Zellen wurde das gleiche Konstrukt eingesetzt, mit dem die HEK-T-Zellen transfiziert worden waren: P2X7 cDNA im pcDNA6/V5-His Vektor unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (vergleiche **Abbildung 8** und [3]).

#### Abbildung 8:

Darstellung des pcDNA6/V5-His Vektor



Die Zellen wurden in RPMI 1640 (Gibco BRL) + 1%FCS aufgenommen ( $1 \times 10^7$  Zellen/ ml), mit 10µg mit SSPI linearisierter DNA vermischt und je 0,4ml im Bio-Rad Gene Pulser<sup>™</sup> mit 0,25V bei 960µF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium kultiviert, die Blastizidinselektion (6µg/ml) begann zwei Tage nach Transfektion.

## 5.4. Präparation muriner Lymphozyten

6 bis 8 Wochen alte Mäuse wurden mit einem 70% CO<sub>2</sub> / 30% O<sub>2</sub>-Gemisch narkotisiert und anschließend durch 100% CO<sub>2</sub> getötet. Die cervikalen, axillären, inguinalen, mesenterialen und paraaortalen **Lymphknoten** wurden präpariert und in RPMI 1640+ 10% FCS aufgenommen. Um die Lymphozyten aus dem Zellverband zu lösen, wurden die Lymphknoten mit dem Stempel einer Spritze durch ein engmaschiges Metallsieb gedrückt und die Zellsuspension anschließend durch ein Falcon® cell strainer 70µm Nylon Sieb (Becton Dickinson) filtriert, um den Detritus zu entfernen. Die Zellen wurden mehrfach resuspendiert, mit RPMI 1640 + 10%FCS gewaschen, 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert (Beckmann GS-6KR Zentrifuge) und die Zellzahl bestimmt.

Die **Milz** wurde entnommen, wie die Lymphknoten in eine Zellsuspension überführt, 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert (Beckmann GS-6KR Zentrifuge) und in PBS aufgenommen. Zur Aufreinigung der Lymphozyten wurde Ficoll (Pharmacia Biotech) mit der Zellsuspension überschichtet und 30 Minuten mit 1800 rpm (Beckmann GS-6KR Zentrifuge) bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei die Lymphozyten in die Interphase, den sog. „buffy coat“ wandern. Der „buffy coat“ wurde vorsichtig entnommen, die Zellen dreimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und gezählt.

### 5.4.1. Depletion der B-Zellen

Dynabeads M-280 sheep anti-mouse IgG1 (Dyna) bilden eine magnetische Matrix, die Maus B-Zellen bindet und sie auf diese Weise von den Gesamt-Lymphozyten trennen. Die Depletion erfolgte nach Herstellerangaben. Die Matrix wurde zuerst zweimal mit RPMI 1640 + 10% FCS gewaschen. Anschließend wurden die Lymphozyten (aus Lymphknoten und Milz) in einem Volumen von 1 ml zugegeben. Die Menge an „beads“ richtet sich nach der Zahl der zu depletierenden Zellen, es wurden 4-6 „beads“ pro B-Zelle eingesetzt. Die Zellen wurden 10 Minuten mit den „beads“ rotiert, die „beads“ auf einem Magnetständer entfernt und der Überstand in ein neues Gefäß mit der gleichen Menge gewaschener „beads“ überführt und für weitere 5 Minuten rotiert. Anschließend wurden die restlichen B-Zellen über den Magneten getrennt und die Zellzahl des Überstandes bestimmt. Bei FACS Analysen erfolgte stets eine Überprüfung der Depletion mittels einer Anfärbung eines Aliquots des Überstandes mit dem Pan-T-Zell-Marker anti-Maus-CD3-FITC (Pharmingen).

## 5.4.2. Präparation muriner Thymozyten

Der Thymus wurde präpariert und wie die Lymphknoten in eine Zellsuspension überführt. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640+ 10% FCS gewaschen, 10 Minuten bei 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Beckmann GS-6KR Zentrifuge) und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden lysiert und im Western blot eingesetzt (s.u.).

## 5.5. Western Blot Analysen

Es wurde das NuPAGE™ Elektrophoresesystem der Firma Novex eingesetzt.

### 5.5.1. Material

#### 5.5.1.1. Zellyse

Lysepuffer

- PBS
- 1% Igepal NP40 (Sigma) oder 1% TritonX 100 (Serva)
- 1 mM EDTA
- 1 mM complete (Proteinaseinhibitor) (Boehringer)

Aceton

#### 5.5.1.2. SDS –PAGE

Elektrophoresekammer „EI9001-X Cell II Mini Cell“ (Novex)

4x NuPAGE™ LDS Sample buffer (Invitrogen-Novex)

DTT: NuPAGE™ Sample Reducing Agent (Invitrogen-Novex)

NuPAGE™ 10% Bis-Tris-Gel (Invitrogen-Novex)

MOPS Laufpuffer (NuPage™ 20x Stock, Invitrogen-Novex)

NuPAGE™ Antioxidans (Invitrogen-Novex)

SeeBlue® Pre-Stained Standard (Invitrogen-Novex)

MultiMark® Multi-Colored Standard (Invitrogen-Novex)

#### 5.5.1.3. Western blot, Silberfärbung, Immunodetektion

Elektrophoresekammer „EI9001-X Cell II Mini Cell“ (Novex)

“X Cell II Blot Module” (Novex)

PVDF-Membran „Immobilon™-P“ (Millipore)

Nitrocellulose Membran "ProtanBA 85" (Schleicher & Schuell)

Blot-Puffer:

- 50 ml 20x NuPAGE™ Transfer Buffer (Invitrogen-Novex)
- 849 ml deionisiertes Wasser
- 1 ml NuPAGE™ Antioxidans (Invitrogen-Novex)
- 100 ml Methanol reinst (Walter GmbH & CoKG)

Silberfärbung:

- 9 ml deionisiertes Wasser
- 0,5 ml 40%iges Natriumcitrat (Merck)
- 0,4 ml 20%iges Eisensulfat (Merck)
- 0,1 ml 20%iges Silbernitrat (Merck)

1x TBS: (Chemikalien von Merck oder Sigma)

- 8g NaCl – 0,2g KCl – 3g TrisBase – pH 7,4

Blocklösung: 1xTBS - 10% Ziegenserum (Sigma)

P2X7 Kontrollpeptid (alomone labs, Produkt Nr.APR-004)

P2X7 Antikörper alomone labs

- (Produkt Nr.APR-004, Lot-Nr. AN-03 Epitop: KIRK EFPKT QGQYS GFKYP Y, korrespondierend zum Teil 576-595 des Ratten P2X7-Rezeptors (accession Q64663))

Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked (Amersham Pharmacia Biotech )

Antikörperverdünnungslösung:

- 1xTBS - 10% Ziegenserum (Sigma) - 0,5% Tween20 (ICI Americas Inc.)

Waschpuffer: 1xTBS – 0,5% Tween20

ECL Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited)

Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited)

Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A

## 5.5.2. Methoden

### 5.5.2.1. Zellyse und Aceton-Proteinfällung

Zellen wurden im Verhältnis  $2 \times 10^7$  Zellen pro 0,1 ml Lysepuffer 30 Minuten auf Eis lysiert, anschließend zweimal kurz mit Ultraschall behandelt und die nicht lysierten Zellbestandteile 15 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Die Überstände wurden mittels Acetonfällung konzentriert, die Pellets verworfen.

Für die Acetonfällung wurde die gewünschte Menge Zellysat mit der vierfachen Acetonmenge versetzt, mindestens 1 Stunde, oft über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert, das Aceton durch 20 minütige Zentrifugation mit 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) entfernt und das Pellet gut trocknen gelassen (45 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug).

### 5.5.2.2. SDS-PAGE

Die gefällten Proteine wurden je in 20  $\mu\text{l}$  2xLDS-sample buffer, inklusive 10% DTT, aufgenommen, 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt, 3 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und die Überstände neben einem Proteingrößenstandard in das Polyacrylamid-Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit MOPS Laufpuffer bei 200V für etwa 45 Minuten. Der inneren Gelkammer wurden 0,5 ml NuPAGE™ Antioxidans zugesetzt.

### 5.5.2.3. Western blot

Es folgte ein „Wet blot“; die PVDF Membran wurde 30 Sekunden mit Methanol aktiviert und zusammen mit Filterpapieren und der Nitrocellulose-(NC) Membran mit Blot-Puffer befeuchtet. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen NC- und PVDF-Membran gelegt und die Proteine für 2 Minuten auf die NC-Membran und 90 Minuten auf die PVDF-Membran bei 30V transferiert.

### 5.5.2.4. Silberfärbung

Der Proteingehalt pro Spur und die Effizienz des Blotvorgangs konnte mittels der Silberfärbung kontrolliert werden, da  $\text{Ag}^+$  Ionen an negativ geladene Aminosäurereste binden und somit alle Proteine sichtbar gemacht werden. Die NC-Membran wurde in der frisch angesetzten Silberlösung geschwenkt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden, mit deionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

#### 5.5.2.5. Immunodetektion

Die Detektion des P2X7-Rezeptors erfolgte auf der PVDF-Membran, die zuvor mindestens 30 Minuten in einer Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde sie mit dem 1:1000 verdünnten Primärantikörper (Anti-P2X7) für eine Stunde rotierend bei 4°C und für eine weitere Stunde mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen-Ig-Myerrettich-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation folgten vier gründliche Waschstschritte. In einigen Fällen wurde dem Erstantikörper die äquivalente Menge Kontrollpeptid zugesetzt. Die Chemilumineszenzreaktion mit dem „ECL Western Blotting detection reagent“ wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt, die Membran in Plastikfolie geschlagen und ein Hyperfilm ECL für Sekunden bis Minuten aufgelegt und entwickelt.

### **5.6. Immunpräzipitation**

#### **5.6.1. Material**

PBS -1% BSA (New England Biolabs)

PBS 1% TritonX 100 (Serva)

Protein G Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited)

Antikörperverdünnungslösung: PBS – 1% TritonX 100 (Serva)– complete (Boehringer)

P2X7 Antikörper (alomone labs, Produkt Nr.APR-004, Lot-Nr. AN-03)

Strata Clean™ Resin (Stratagene)

#### **5.6.2. Methode**

Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS – 1% BSA inkubiert; in ihnen wurden je 24µl ProteinG Sepharose zweimal mit PBS – 1% TritonX 100 gewaschen und mit Zelllysaten (Lyse siehe Kapitel „Western blot“) für eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert, um unspezifische Bindungen an die Matrix während der Präzipitation zu minimieren („preclearing“). Zur Kopplung des Antikörpers an die Matrix wurde das P2X7-Antiserum in den angegebenen Verdünnungen mit der gewaschenen Protein G Sepharose in den beschichteten Reaktionsgefäßen ebenfalls eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Die Lysate des „preclearings“ wurden durch milde Zentrifugation (3 Minuten 2000 rpm eppendorf Tischzentrifuge) von der Matrix getrennt



und reagierten über Nacht bei 4°C mit dem immobilisierten Antikörper. Anschließend wurde die Matrix durch mildes Zentrifugieren pelletiert, mit Lysepuffer gewaschen, die Überstände mittels Strata Clean™ Resin (Stratagene) nach Herstellerangaben konzentriert und ebenso wie das Pellet wie oben beschrieben in SDS-PAGE Analyse und Western Blot eingesetzt.

## **5.7. PCR zur P2X7 Genotypisierung**

### **5.7.1. Material**

PCR Maschine T-Gradient (Whatman Biometra®)

genomische DNA (ca. 100 - 200ng/µl)

Primer 451P-F: CTATCTCTCCACGACTCACCCCC

Primer 451L-F: CTATCTCTCCACGACTCACCCCT

P2X7 –R: TATAATCCCGGGAGGGATACTTGAAGCCACTGTAC

AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Roche)

„mix 65“:

- 90 µl PCR-Puffer (Applied Biosystems, Roche)
- 15 µl 10mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)
- 550 µl aqua ad iniectabile (Braun)

DNA Molekulargewichtsmarker (MBI Fermentas)

DNA loading dye solution (MBI Fermentas)

Ethidiumbromid (Sigma)

1% Agarosegel (DNA Typing Grade 50x TAE buffer, DNA Typing Grade Agarose, Gibco BRL)

Die genomische DNA wurde käuflich erworben (Maustämme) oder mittels QIAGEN Blood & Cell Culture DNA-Kit selber präpariert (Zellkulturzellen).

### **5.7.2. PCR-Ansatz**

13µl mix 65

je 1µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer

1µl AmpliTaq Gold  
1µl DNA  
3µl Wasser

### 5.7.3. PCR-Programm

initiale Denaturierung: 3 Minuten 94°C

28 Zyklen

- Denaturierung: 1 Minute 94°C
- Anlagerung : 30 Sekunden 63,5°C (451P-F) / 65°C (451L-F)
- Elongation : 1 Minute 72°C

abschließende Elongation 10 Minuten 72°C

Bis zur Sichtbarmachung der Amplifikate in dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel wurden die Proben bei 4°C gelagert. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 90V für 30 bis 45 Minuten.

## 5.8. Immunfluoreszenzuntersuchungen

### 5.8.1. Antikörper

Präimmunserum der Ratte RH18 (IfI, UKE, Hamburg)

Immunsereen der Ratte RH18 nach der zweiten Immunisierung („second boost“) oder bei der letzten Blutentnahme („final bleed“) (IfI, UKE, Hamburg)

Ratte-anti-Maus ART2.2 (Nika 102) Hybridomüberstand (IfI, UKE, Hamburg)

Anti-Ratte-IgG-PE (Dianova)

Anti-Maus-CD62-PE (Pharmingen)

Anti-Maus-CD4-FITC (Pharmingen)

Anti-Maus-CD3-FITC (Pharmingen)

1G4-FITC (IfI, UKE, Hamburg)

### 5.8.2. Methode

Zellen wurden in PBS oder Medium im Verhältnis  $5 \times 10^6$ /ml aufgenommen. 0,1 ml Zellsuspension wurden mit 1µl Erstantikörper oder PBS versetzt (vom

Hybridomüberstand wurden 0,1ml eingesetzt), 15 – 30 Minuten bei 4°C oder bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS oder Medium gewaschen. Im Fall von unkonjugierten Erstantikörpern erfolgten weitere 15-30 minütige Inkubationen bei 4°C mit einem Fluorochrom markierten Zweitantikörper. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen im FACS untersucht.

Die Inkubation ohne Erstantikörper erfolgte, um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers aufzuzeigen, die Inkubation mit dem Präimmunserum diente als Kontrolle für einen spezifischen Effekt der Immunisierung. Die Färbungen erfolgten direkt in FACS Röhrchen (Becton Dickinson) oder in 96-Loch-Platten; in diesem Fall wurde der Waschlösung mindestens 1%FCS zugesetzt, um weniger Zellen bei der Zentrifugation zu verlieren.

## **5.9. Produktion des RH18 Anti-P2X7-Serums**

Das Prinzip der DNA-Immunisierung ist in der Einleitung ausführlich dargestellt (Kapitel 4.6.1); als DNA wurde das gleiche Konstrukt eingesetzt wie zur P2X7-Transfektion der HEK-T-Zellen (cDNA aus BALB/c P2X7-Rezeptor im pcDNA6/V5-His Vektor) [3], als Proteinboost dienten die P2X7-stabil transfizierten HEK-T-Zellen.

Das Immunisierungsschema ist in der Einleitung angegeben (Kapitel 4.6.1.4.).

## **5.10. L-selectin (CD62L) Abstoßung**

### **5.10.1. Material**

Murine B-Zell depletierte Lymphknotenzellen in PBS + 2% FCS

ATP/ NAD (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Anti-Maus-CD62-PE (Pharmingen)

Anti-Maus-CD4-FITC (Pharmingen)

Propidiumiodid (Pharmingen)

### **5.10.2. Methode**

Murine B-Zell depletierte Lymphknotenzellen wurden im Verhältnis  $5 \times 10^6$ / ml in PBS 2% FCS aufgenommen und je 0,1 ml in einem Napf einer 96-Loch-Platte mit ATP oder NAD für die angegebene Zeit bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die

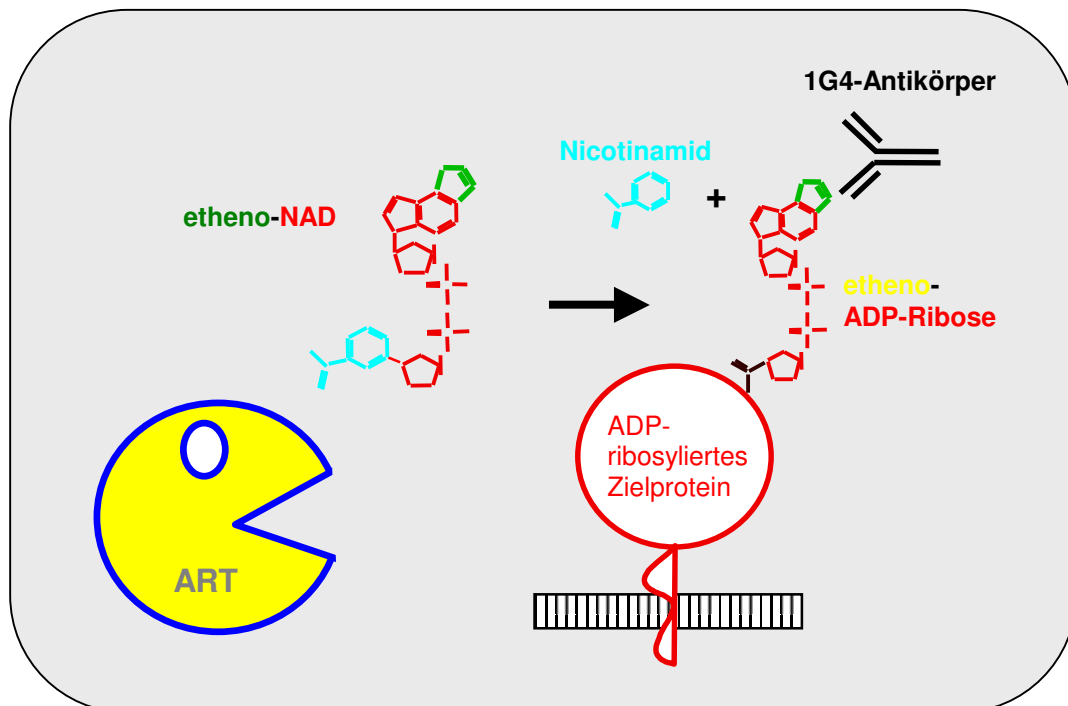
Zellen zweimal mit PBS 2%FCS gewaschen und mit Antikörpern gegen L-selectin (CD62L) und CD4 30 Minuten auf Eis gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit Propidiumiodid haltigem PBS (10µg/ml) versetzt und im FACS gemessen.

In einigen Fällen wurde die Zellen vor der ATP / NAD Behandlung 20 Minuten mit gegen P2X7 gerichtetem Serum der Ratte RH18 oder dem Präimmunserum vorinkubiert, um zu testen, ob die Seren die L-selectin (CD62L) Abstoßung zu verhindern vermögen.

### 5.11. Bestimmung der ART-Aktivität

Diese Methode wurde von Krebs et al. beschrieben [115] und beruht auf dem Prinzip, dass ethenoNAD (eNAD) den ARTs ebenso wie NAD als Substrat dient; Zielproteine werden somit eADP-ribosyliert und können mit dem gegen die Ethenogruppe gerichteten Antikörper 1G4 sichtbar gemacht werden (**Abbildung 9**).

**Abbildung 9:** Darstellung der ART-Aktivität mittels eNAD und 1G4-Antikörper (aus [115])



### **5.11.1. Material**

Zellsuspension in Medium ( $5 \times 10^6$ /ml)

eNAD (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

1G4-FITC (IfI, UKE, Hamburg)

Propidiumiodid (Pharmingen)

PBS (Gibco BRL)

### **5.11.2. Methode**

0,1 ml Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> mit eNAD inkubiert, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend 20 Minuten bei 4°C mit 1G4-FITC gefärbt, erneut zweimal gewaschen, in Propidiumiodid (PI) haltigem PBS (10µg/ml) aufgenommen und im FACS untersucht.

## **5.12. YO-PRO 1 Assay**

### **5.12.1. Material**

YO-PRO 1 (Molecular Probes)

ATP (Sigma)

NAD (Sigma)

PBS (Gibco BRL)

Propidiumiodid (Pharmingen)

### **5.12.2. Methode**

Je 100µl Zellsuspension ( $4-5 \times 10^5$  Zellen) (in PBS oder Zellkulturmedium) wurde in FACS-Röhrchen mit ATP oder NAD bei 37°C inkubiert, YO-PRO 1 wurde in der letzten Minute zugegeben; wenn YO-PRO 1 – wie in einigen Experimenten - während der gesamten 37°C Inkubation anwesend war, ist das in den Bildunterschriften vermerkt. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, entweder zweimal mit kaltem PBS gewaschen und im FACS untersucht oder mit der vierfachen Menge eiskaltem PBS verdünnt und im FACS gemessen. Tote Zellen wurden entweder durch den veränderten forward-side-scatter in der FACS-Analyse ausgeschlossen oder mittels Propidiumiodid

(PI)-Färbung. Propidiumiodid kann von toten Zellen nicht mehr aus der Zelle geschleust werden; in diesem Fall wurde dem PBS 10µg/ml PI zugesetzt. Vorteil der PI-Zugabe ist die exakte Definition von toten Zellen, andererseits strahlt PI während der FACS-Analyse in den Kanal, in dem YO-PRO 1 gemessen wird, so dass es zu Artefakten in der Darstellung kommt.

In weiteren Versuchsansätzen wurden die Zellen vor der ATP-Inkubation mit P2X7-Immunsereum oder Präimmunsereum der Ratte RH18 20 Minuten bei 4°C oder 37°C vorinkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und wie beschrieben weiter behandelt.

## **5.13. ATP-induzierte IL1β-Prozessierung**

### **5.13.1. Material**

Heparinisiertes Vollblut

Verdünnungslösung:

- RPMI 1640 + 1% FCS
- 25 mM HEPES
- PenStrep100 U/ml (Gibco)

LPS (Sigma)

ATP (Sigma)

(m)IL-1β ELISA (Amersham pharmacia biotech)

### **5.13.2. Methode**

6-8 Wochen alten, tief mittels 70% CO<sub>2</sub> - 30%O<sub>2</sub> Gemisch anästhesierten Mäusen wurde aus den retroorbitalen Venenplexus Blut entnommen und mit Heparin vermischt. Dieses Blut wurde 1 zu 1 mit der Verdünnungslösung verdünnt und je 0,2 ml mit 1µg/ml LPS für 3 Stunden stimuliert, um die Synthese von prä-IL1β zu erreichen. Die Prozessierung zu reifem IL1β wurde durch eine weitere zweistündige ATP-Inkubation bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> erreicht. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 700xg zentrifugiert, die Überstände bei -80°C eingefroren und am folgenden Tag im ELISA nach Herstellerangaben eingesetzt.

## **6. ERGEBNISSE**

Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung einer natürlich vorkommenden Mutation im murinen P2X7-Rezeptor (P451L). Dafür standen mir zu Beginn dieser Arbeit stabil transfizierte HEK-T-Zellen zur Verfügung, welche die Wildtyp- oder die mutierte Variante des P2X7-Rezeptors exprimieren; diese Zellen wurden mir von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Michel Seman aus Paris freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

**Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Abschnitte:**

1. Charakterisierung der Mutation anhand transfizierter HEK-T-Zellen und muriner Primärzellen
2. Untersuchung der Inzidenz der Mutation in verschiedenen Mausstämmen
3. Charakterisierung verschiedener Zelllinien auf P2X7 Expression, Genotyp und Funktion
4. Untersuchung eines neuen, mittels DNA-Vakkzinierung erzeugten P2X7-Antiserums
5. Etablierung einer P2X7 und ART2.2 doppelt-positiven Zelllinie als experimentelles Werkzeug für die Untersuchung der NAD induzierten P2X7 Aktivierung.

## **6.1. Charakterisierung der P451L Mutation anhand der transfizierten HEK-T-Zellen und muriner Primärzellen**

### **6.1.1. Nachweis der P2X7 Expression im Western Blot**

Zu Beginn meiner Arbeit standen mir HEK-T -Zellen zur Verfügung, die stabil mit dem P2X7-Rezeptor aus einer BALB/c Maus (HEK-T-C.2) und dem P2X7-Rezeptor aus einer C57/BL6 Maus (HEK-T -6.3) transfiziert worden waren und unter permanenter Blastocidin-Selektion kultiviert wurden. Daneben stand ein kommerzielles polyklonales Kaninchen Antiserum zur Verfügung, das ein C-terminales (intrazelluläres) Epitop des P2X7-Rezeptors erkennt.

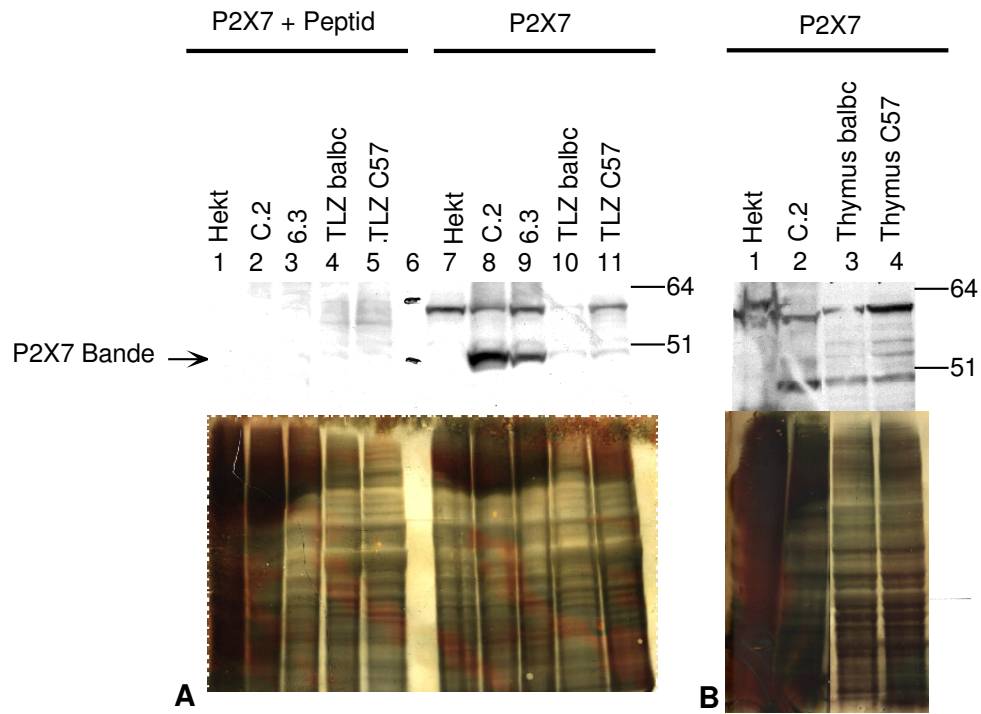
**Abbildung 10** zeigt den P2X7-Rezeptor aus transfizierten HEK-T -Zellen sowie aus peripheren T-Zellen (B-Zell depletierte Lymphknotenzellen) und Thymozyten von BALB/c und C57/BL6 Mäusen im Western blot. Die parentalen HEK-T -Zellen dienen als Negativkontrolle und zeigen die entsprechende Bande nicht. Bei vergleichbarer Proteinmenge pro Lysat (siehe Silberfärbung) exprimieren die transfizierten HEK-T -Zellen deutlich mehr Rezeptor als die B-Zell depletierten Lymphknotenzellen. Zwischen der 451P (BALB/c Zellen und HEK-T -C.2) und der 451L Variante (C57/BL6 und HEK-T -6.3) besteht kein augenfälliger Unterschied; lediglich die HEK-T -C.2 P2X7-Bande erscheint etwas stärker als die HEK-T -6.3 P2X7 Bande (vgl. Spur A8 und 9). Neben dem P2X7-Rezeptor erkennt der Antikörper ein etwa 60 kD großes Protein, das auch auf den untransfizierten HEK-T -Zellen vorkommt.

Setzt man bei der Antikörperinkubation die äquivalente Menge P2X7-Immunisierungs-Peptid zu, verschwinden beide Banden, was zeigt, dass beide Proteine sequenzspezifisch erkannt werden (vgl. Spur A1-5).

Um herauszufinden, bei welcher Konzentration des P2X7-Antiserums die beste Darstellung des P2X7-Rezeptors gelingt, wurden Zelllysate von HEK-T -Zellen und HEK-T -C.2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des 1. Antikörpers oder nur mit dem Peroxidase- (PO) -konjugierten Zweitantikörper inkubiert (**Abbildung 11**). Gezeigt werden zwei Konzentrationen und die alleinige Inkubation mit dem Zweitantikörper, wobei deutlich wird, dass eine unspezifische Bande bei etwa 40 kD auf den Zweitantikörper zurückzuführen ist, während die Bande bei etwa 60 kD eine unspezifische Reaktion des P2X7 Antiserums darstellt.

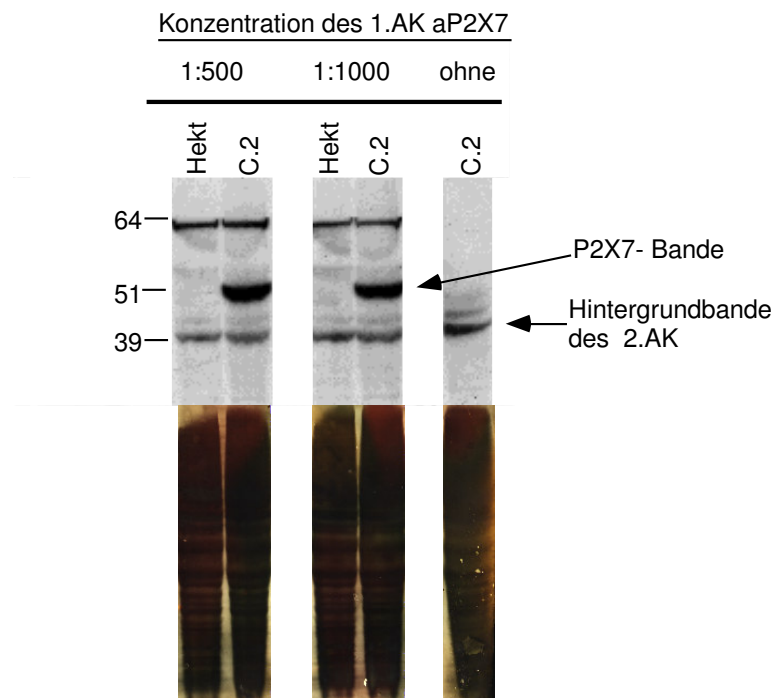


**Abb.10 Nachweis der P2X7 Expression im Western Blot**



Zelllysate (aus A 1-3, 7-9:  $3 \times 10^6$  Zellen; A 4,5,10,11:  $5 \times 10^6$  Zellen; B 1,2:  $4 \times 10^6$  Zellen; B 3,4:  $1 \times 10^7$  Zellen) wurden mittels SDS-PAGE Analyse aufgetrennt, auf NC- und PVDF-Membranen übertragen und alle Proteine in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor durch einen spezifischen Antikörper (alomone labs) und einen PO-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. In A 1-5 wurde dem P2X7-Antikörper die äquivalente Menge P2X7-Immunsierungspeptid zugesetzt. Spur 6: Proteingrößenmarker (kD). Die dem P2X7-Rezeptor entsprechende Bande ist mit einem Pfeil markiert.

## Abb.11 Titrierung des P2X7-Antikörpers zum Einsatz im Western blot



Zelllysate von  $4 \times 10^6$  Zellen wurden mittels SDS-PAGE -Analyse aufgetrennt, auf NC- und PVDF-Membranen übertragen und alle Proteine in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor durch einen spezifischen Antikörper (alomone labs) und einen PO-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht.

Die Spuren 1-4 zeigen neben der P2X7-Bande bei etwa 50 kD eine unspezifische höhermolekulare Bande und eine niedermolekulare Bande, die Spur 5 als unspezifische Bindung des Zweitantikörpers ausweist.

Die 40 kD Bande war am Ende meiner experimentellen Arbeit nicht mehr nachweisbar, als ich eine neue Charge des Zweitantikörpers eingesetzt habe.

### **6.1.2. YO-PRO 1 Aufnahme in den transfizierten HEK-T-Zellen**

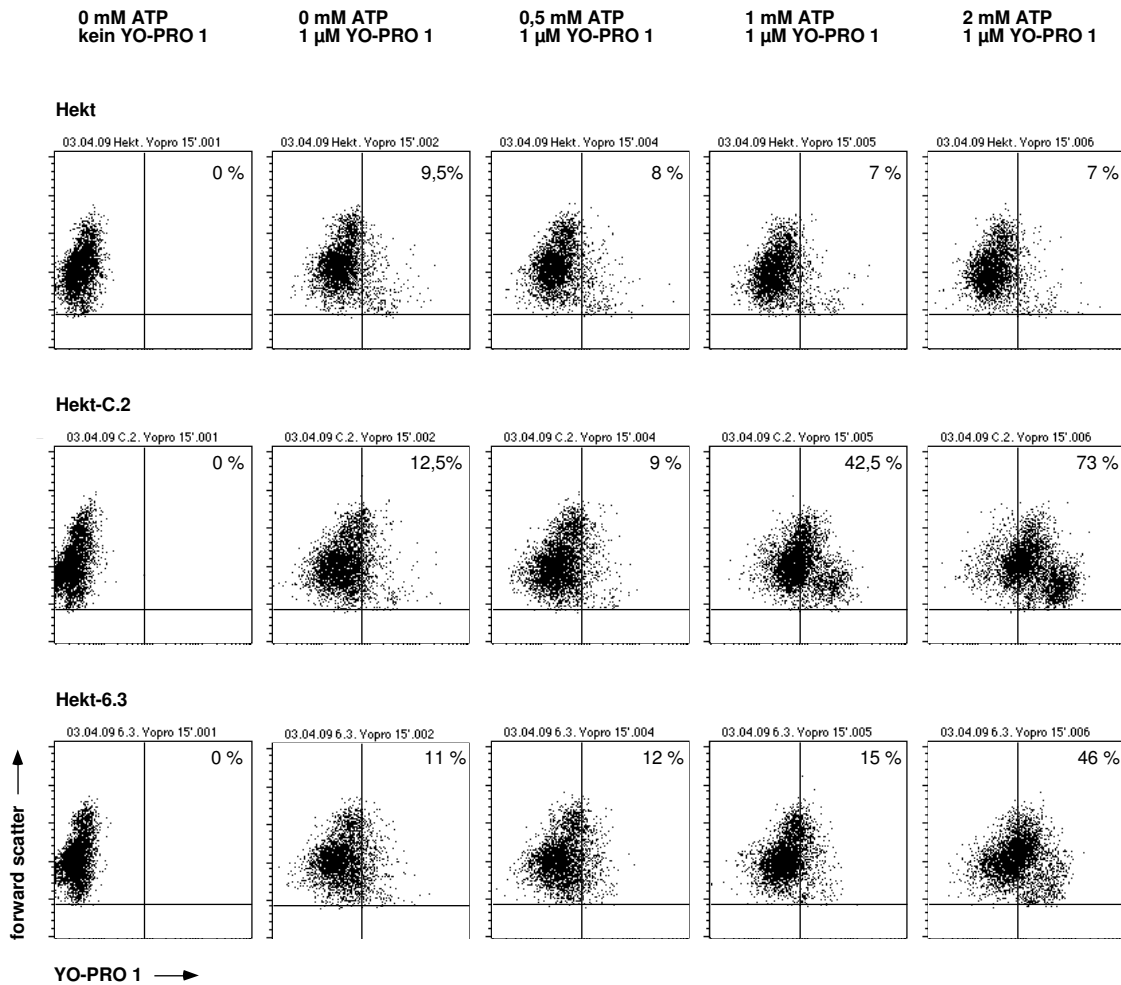
Als nächstes untersuchte ich die Frage, ob der an den T-Lymphozyten von BALB/c und C57/BL6 Mäusen beobachtete Unterschied in der Funktion des P2X7 Rezeptors sich auch in den transfizierten HEK-T -Zellen nachweisen lässt.

Eine typische Reaktion des P2X7-Rezeptors auf seine Aktivierung besteht in der Öffnung einer großen unselektiven Pore, die Moleküle bis zu 800 Da (wie z.B. den Farbstoff YO-PRO 1) passieren lässt. Daher wurden untransfizierte und mit den P2X7-Varianten transfizierte HEK-T -Zellen mit unterschiedlichen ATP Konzentrationen aktiviert und die YO-PRO 1-Aufnahme im FACS gemessen (**Abbildung 12**).

Alle drei Zelllinien zeigen nach alleiniger YO-PRO 1-Zugabe eine Zunahme der Fluoreszenzintensität (vgl. Spalte 1 und 2), was der Aufnahme des Farbstoffs durch die Zellen unter Basalbedingungen entspricht. Die untransfizierten HEK-T -Zellen lassen sich im Gegensatz zu den transfizierten Zellen durch ATP nicht zu einer weiteren YO-PRO 1-Aufnahme bringen; die HEK-T -6.3-Zellen, die die 451L Variante des P2X7-Rezeptors tragen, nehmen deutlich weniger Farbstoff auf als HEK-T -C.2, Zellen mit der BALB/c Variante (451P) des P2X7-Rezeptors. Konzentrationen oberhalb von 0,5 mM ATP sind notwendig, um eine Farbstoffaufnahme zu bewirken. Sowohl bei den HEK-T -C.2-Zellen als auch bei den HEK-T -6.3-Zellen scheinen zwei Subpopulationen vorzuliegen, von denen die eine besonders gut YO-PRO 1 aufnimmt.

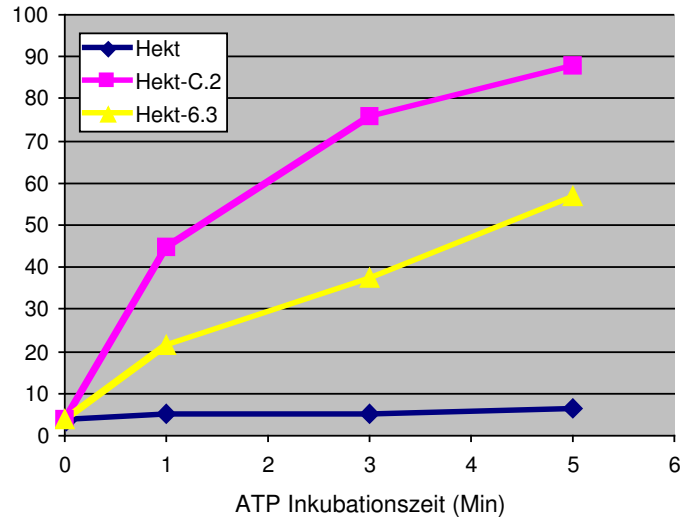
Die Kinetik der YO-PRO 1 Aufnahme ist in **Abbildung 13** dargestellt. Der Unterschied zwischen beiden P2X7-Rezeptoren wird auch hier deutlich: die Zunahme YO-PRO 1 positiver Zellen erfolgt bei den HEK-T -6.3-Zellen (451L) weniger schnell als bei den HEK-T -C.2-Zellen (451P).

## Abb.12 YO-PRO 1 Aufnahme in HEK-T-Zellen



Um die ATP-abhängige unselektive Pore des P2X7-Rezeptors zu aktivieren, wurden die Zellen 15 Minuten in Anwesenheit unterschiedlicher ATP-Konzentrationen und 1  $\mu$ M YO-PRO 1 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, dreimal mit PBS gewaschen und im FACS untersucht. Tote Zellen wurden durch die Eigenschaften ihrer Lichtstreuung ausgeschlossen (forward scatter-side scatter; nicht gezeigt).

**Abb.13 Kinetik der YO-PRO 1 Aufnahme in HEK-T-Zellen**



Zellen wurden in Anwesenheit von  $1\mu\text{M}$  YO-PRO 1 null bis fünf Minuten mit  $2\text{ mM}$  ATP inkubiert, anschließend auf Eis gestellt, dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend im FACS untersucht. Tote Zellen wurden anhand ihrer Streueigenschaften (forward scatter-side scatter) ausgeschlossen.

### **6.1.3. Vergleich der ATP- und NAD-induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung auf T-Lymphozyten von BALB/c und C57/BL6 Mäusen**

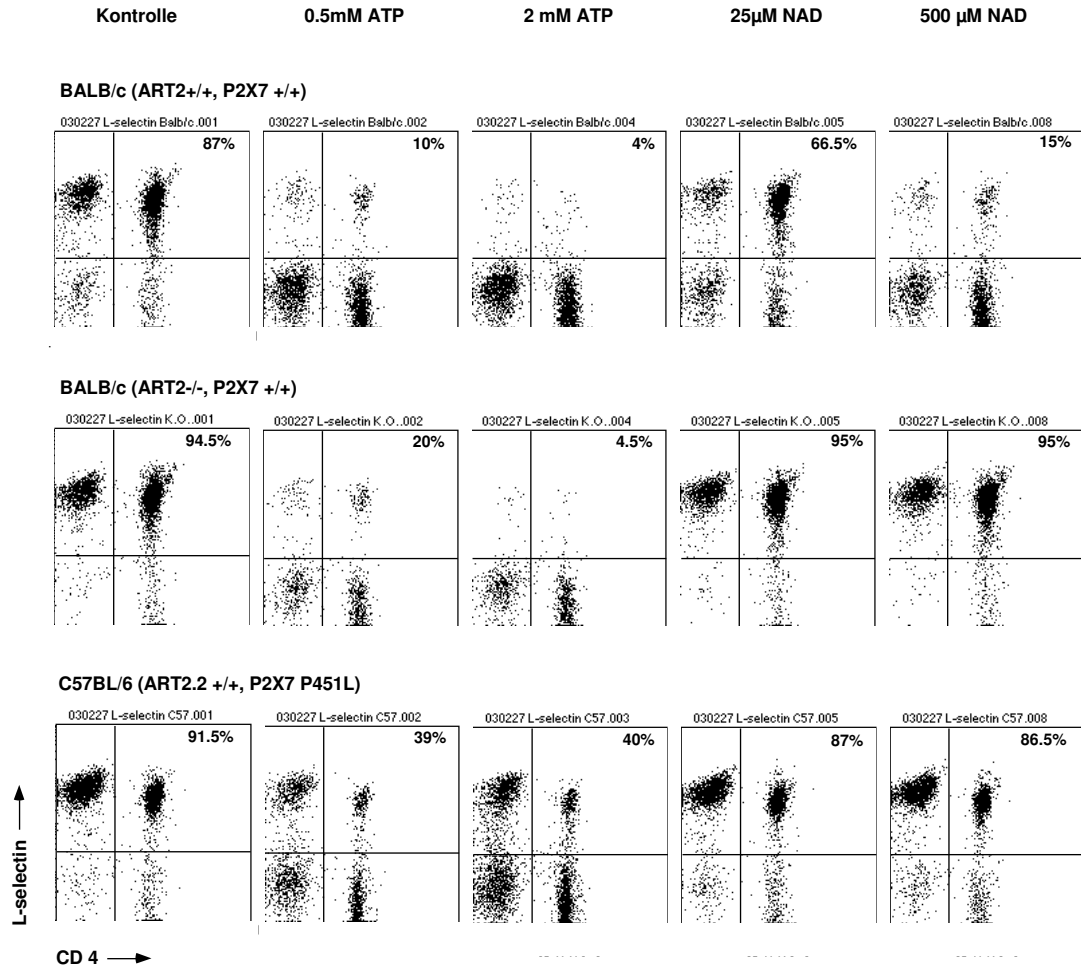
Eine weitere Antwort von T-Lymphozyten auf eine P2X7-Rezeptor Aktivierung ist der partielle Verlust („shedding“) von L-selectin (CD62L) von der Zelloberfläche [121]. Es stellte sich zum einen die Frage, ob diese Abstoßung ebenfalls durch die P451L Mutation im P2X7-Rezeptor beeinträchtigt wird, zum anderen, ob auch NAD durch ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors den Verlust von L-selectin (CD62L) von der Zelloberfläche auszulösen vermag.

Lymphknotenzellen wurden aus BALB/c Wildtypmäusen, BALB/c ART2-KO-Mäusen und C57/BL6 Mäusen präpariert, anschließend wurden die B-Zellen depletiert und die Depletion wurde mittels einer CD3 Anfärbung überprüft. Die Entfernung der B-Zellen erfolgte, da B-Lymphozyten in hohem Maße die NADase CD38 exprimieren, und daher die Antwort der T-Zellen auf extrazelluläres NAD beeinträchtigen können. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von ATP und NAD für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und mit PE-konjugiertem CD62L-Antikörper und FITC-konjugiertem CD4-Antikörper gefärbt. Im FACS wurden tote Zellen mittels PI-Aufnahme, Nicht-Lymphozyten durch den differierenden forward scatter ausgeschlossen.

Man erkennt bei allen drei Mausstämmen vier Zellpopulationen (**Abbildung 14**): CD4-positive Zellen, die den Helfer-T-Zellen entsprechen, CD4-negative Zellen, entsprechend den zytotoxischen T-Zellen (CTLs), und jeweils L-selectin (CD62L)-positive und -negative Zellen, wobei unter Basalbedingungen etwa 90% aller Zellen L-selectin (CD62L) auf der Oberfläche exprimieren.

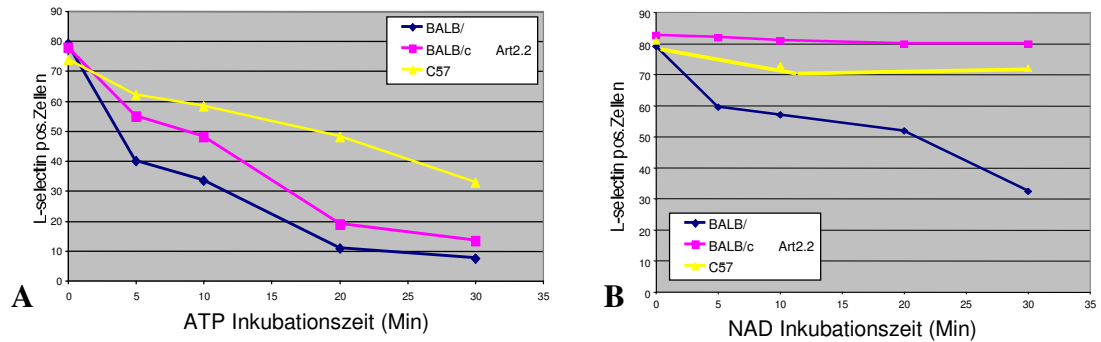
Die T-Lymphozyten der BALB/c Maus und der C57/BL6 Maus unterscheiden sich deutlich in ihrer Reaktivität gegenüber ATP und NAD. Beide Substanzen vermögen bei den Wildtypmäusen die L-selectin (CD62L)-Oberflächenexpression zu vermindern, wobei dieses bei der BALB/c Maus durch ATP fast vollständig gelingt, während bei der C57/BL6 Maus nur etwas mehr als die Hälfte der T-Zellen L-selectin (CD62L) verliert. NAD führt in geringeren Konzentrationen als ATP zu einem L-selectin (CD62L) Verlust, erreicht aber die Stärke des ATP-Effekts nicht. Die C57/BL6 Maus mit der Mutation im P2X7-Rezeptor, die schon auf ATP soviel schwächer reagiert, ist durch NAD nur marginal zur L-selectin (CD62L) Abstoßung zu bewegen.

## Abb.14 ATP- und NAD-induzierte L-selectin (CD62L) Abstoßung von T-Lymphozyten



Je  $5 \times 10^5$  B-Zell-depletierte Lymphozyten einer BALB/c Wildtyp, einer BALB/c ART2-KO- und einer C57/BL6 Wildtyp Maus wurden 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  mit ATP oder NAD inkubiert, anschließend gewaschen und für weitere 30 Minuten mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD62L inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen im FACS untersucht. Tote Zellen wurden durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen, die Depletion der B-Zellen mit Hilfe einer gegen CD3 gerichteten Kontrollanfärbung überprüft (nicht gezeigt). Die Prozentzahlen geben den Gesamtanteil der CD62L-positiven Zellen an.

**Abb.15 Kinetik der ATP / NAD induzierten L-selectin Abstoßung**



B-Zell depletierte Lymphozyten einer BALB/c Wildtyp-, einer BALB/c ART2 KO- und einer C57/BL6 Wildtyp Maus wurden für 0- 30 Minuten mit 2 mM ATP (A) oder 200µM NAD (B) inkubiert, mit PBS gewaschen und wie in Abbildung 14 analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der L-selectin-positiven Zellen an allen Zellen, nicht differenziert nach CD4-positiven und CD4-negativen Zellen.



Zwischen CD4-positiven Helfer-T-Lymphozyten und CD4-negativen CTLs besteht kein Unterschied in der Reaktion auf ATP und NAD.

Wie erwartet reagiert die ART2-KO-Maus nicht auf NAD; gegenüber dem ATP-Stimulus verhält sie sich wie ihre BALB/c Wildtyp-Artgenossen und verliert konzentrationsabhängig nahezu alles L-selectin (CD62L).

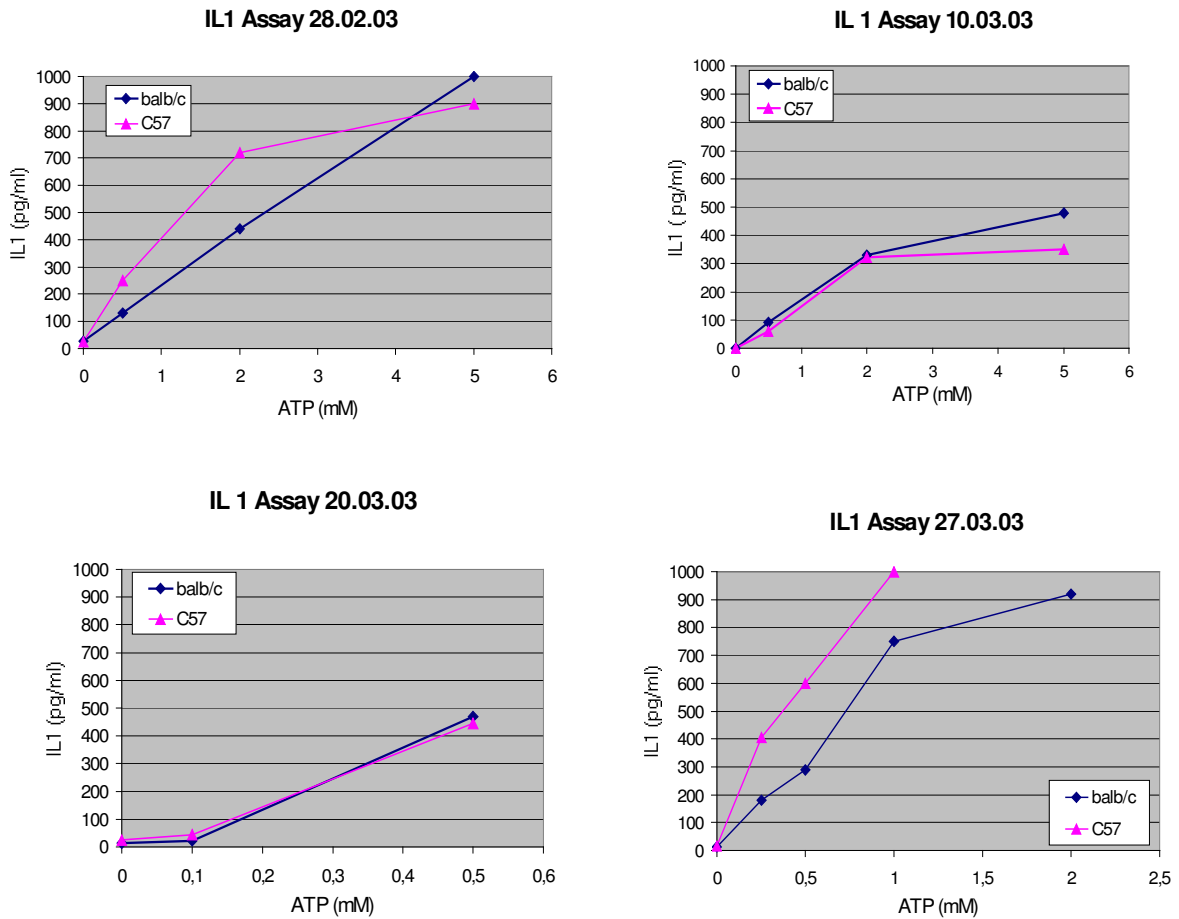
Die Kinetik der ATP- und NAD-induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung ist in **Abbildung 15** gezeigt. Die Zellen wurden wie oben präpariert, mit 2 mM ATP oder 0,2 mM NAD für 0 bis 30 Minuten inkubiert, wie oben beschrieben gefärbt und im FACS untersucht. Dargestellt ist der Anteil der L-selectin (CD62L) positiven Zellen, nicht unterschieden nach CD4-positiven und -negativen Zellen, da sich diese, wie in **Abbildung 14** gezeigt, in ihrer ATP/NAD induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung nicht unterscheiden.

In der Kinetik bestätigen sich die Ergebnisse aus der vorangegangenen Untersuchung: die T-Lymphozyten aus der C57/BL6 Maus reagieren deutlich schwächer sowohl auf ATP als auch auf NAD als die T-Lymphozyten aus der BALB/c Maus; die Zellen der BALB/c ART2 KO-Maus sind gegenüber NAD resistent, während sie sich durch ATP genauso zur L-selectin (CD62L) Abstoßung bewegen lassen wie ihre Wildtyp-Artgenossen. Die in **Abbildung 15 A** sichtbare geringe Differenz zwischen BALB/c Wildtyp und KO-Maus ließ sich in weiteren Experimenten nicht verlässlich reproduzieren.

#### **6.1.4. ATP induzierte IL-1 $\beta$ Prozessierung – ein Vergleich von BALB/c und C57/BL6 Vollblut**

IL-1 $\beta$  wird im Kontext einer Entzündungsreaktion u.a. von Monozyten, Makrophagen und Mikroglia produziert. Dabei benötigt die Synthese von reifem IL-1 $\beta$  im murinen System zwei Stimuli: LPS bewirkt die Synthese von prä-IL-1 $\beta$ , ATP aktiviert die Caspase 1 und erreicht so die Prozessierung von reifem IL-1 $\beta$ . Labasi et al zeigten 2002, dass eine P2X7 KO-Maus nicht mehr in der Lage ist, ATP-abhängig reifes IL-1 $\beta$  zu produzieren [121].

**Abb.16 ATP induzierte IL-1 $\beta$  Prozessierung – ein Vergleich von BALB/c und C57/BL6 Mausblut**



Je 100 $\mu$ l heparinisiertes Vollblut je einer BALB/c und einer C57/BL6 Maus wurde mit 1% FCS-haltigem RPMI-Medium verdünnt, drei Stunden bei 37°C mit 1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert und anschließend für weitere zwei Stunden mit ATP in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Durch Zentrifugieren wurden die Zellen vom Überstand getrennt, und die Menge des in den Überstand abgegebenen IL-1 $\beta$  wurde mit Hilfe eines IL-1 $\beta$  ELISA bestimmt.

Dargestellt sind die gemessenen IL-1 $\beta$  Konzentrationen in pg/ml in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration für vier unabhängige Experimente. Zur besseren Lesbarkeit sind die X-Achsen unterschiedlich skaliert.

Daher lag es nahe zu untersuchen, ob die P451L Mutation des P2X7-Rezeptors, die wie gezeigt einige Funktion des P2X7-Rezeptors beeinträchtigen kann, auch zu einer Verminderung der Produktion von reifem IL-1 $\beta$  führt.

In enger Anlehnung an das von Labasi et al beschriebene Protokoll wurde heparinisiertes Vollblut 1 zu 1 mit FCS-haltigem RPMI Medium verdünnt, drei Stunden mit 1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert und weitere zwei Stunden mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen inkubiert. Die in den Überstand abgegebene Menge an IL-1 $\beta$  wurde anschließend mittels eines kommerziellen IL-1 $\beta$ -ELISA bestimmt.

**Abbildung 16** zeigt die gemessene IL-1 $\beta$ -Konzentration in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration für vier unabhängige Experimente. Leider schwanken die gemessenen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen stark, so dass die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt ist. Ein Grund für die mangelnde Reproduzierbarkeit könnte sein, dass ich die Versuche an jeweils zwei Tagen durchgeführt habe und dass IL-1 $\beta$  während der Lagerung (bei -80°C) oder während des Einfrierens oder Auftauens degradiert wurde.

In allen vier Experimenten sind beide Mausstämme in der Lage, ATP-abhängig reifes IL-1 $\beta$  zu produzieren; es scheint so zu sein, dass sich die Produktionsstärke nicht wesentlich unterscheidet. Das würde bedeuten, dass die P451L Punktmutation im P2X7-Rezeptor zwar die Öffnung der unselektiven Pore, die Abstoßung des L-selectins (CD62L) und die Ausstülpung von Phosphatidylserin [3] beeinträchtigt, nicht jedoch die ATP-abhängige Produktion von reifem IL-1 $\beta$ .

### **6.1.5. Untersuchung der Inzidenz der Mutation in verschiedenen Mausstämmen**

Der folgende Abschnitt untersucht einige häufig benutzte Labor-Mausstämme im Hinblick auf ihren P2X7-Genotyp um herauszufinden, wie weit die P451L Mutation verbreitet ist. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass frühere Transfektionsstudien mit murinem P2X7-Rezeptor diesen als weniger ATP-sensitiv beschrieben als den Rezeptor aus Mensch oder Ratte [86, 87]. Deren P2X7-Rezeptor trägt - wie die BALB/c Maus - die 451P Variante.

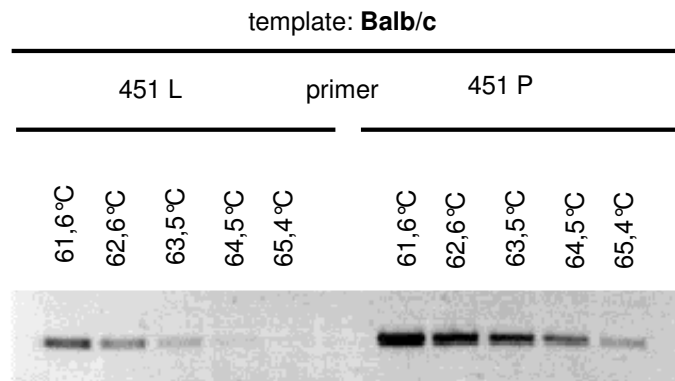
### **6.1.6. Ermittlung geeigneter PCR-Bedingungen, um die Punktmutation im P2X7-Rezeptor mittels PCR nachzuweisen**

Die PCR kann als hochspezifische Methode immer dann in der Lage sein, den Austausch einer einzigen Base zu erkennen, wenn die entsprechend gestalteten Primer nur an dem exakt übereinstimmenden DNA-Strang binden (ARMS: *amplification refractory mutation system*). Für diese Genauigkeit ist vor allem eine ausreichend hohe Annealing-Temperatur entscheidend [148].

Mir standen zwei Vorwärtsprimer zur Verfügung, die den beiden Allelen entsprachen und sich nur in der am 3'-Ende gelegenen Base unterschieden. Die optimale Annealing-Temperatur sollte mittels Gradienten PCR ermittelt werden.

Unter Konstanthaltung aller übriger Parameter wurden mit Hilfe einer Gradienten-PCR-Maschine Annealing-Temperaturen zwischen 55°C und 72°C getestet. **Abbildung 17** zeigt den Gradienten zwischen 61,6°C und 65,4°C. Da als Matritze genomische DNA einer BALB/c Maus eingesetzt wurde, sind die Amplifikationen mit dem 451L primer unspezifisch. Bei höheren Temperaturen binden beide primer erwartungsgemäß schwächer, ab etwa 64°C wird die Bindung spezifisch.

## Abb.17 Gradienten PCR zur Ermittlung geeigneter PCR Bedingungen



Zur Amplifikation eines Fragmentes aus dem P2X7-Gen der Maus wurden die allel-spezifischen Vorwärtsprimer P2X7-451P-F und P2X7-451L-F, die sich nur in der 3'-Endposition unterscheiden, mit dem gemeinsamen Rückwärtsprimer P2X7-R kombiniert. In einer Gradienten-PCR wurde der Einfluss der Annealing-Temperatur auf die Spezifität der Reaktion für die beiden Allele untersucht.

### 6.1.7. P2X7 Genotypisierung verschiedener Mausstämme

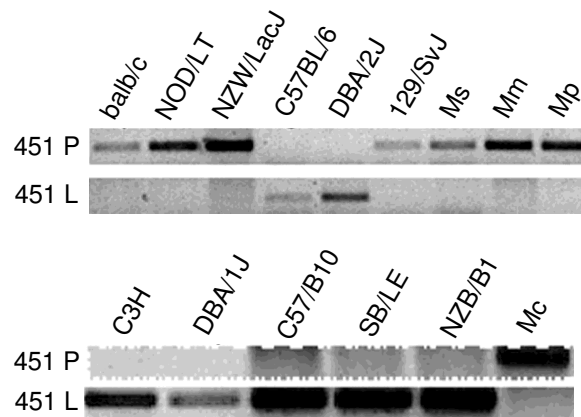
Genomische DNA verschiedener Mausstämme wurde bei Annealing-Temperaturen von 63,5°C (451P-F) bzw. 65°C (451L-F) unter Verwendung der AmpliTaq Gold Polymerase amplifiziert (**Abbildung 18**). Alle vier untersuchten Repräsentanten nicht eingekreuzter Maus-Spezies (*Mus spretus*, *Mus musculus*, *Mus poschiavinus* und *Mus caroli*) tragen das 451P Allel, weshalb dieses als Wildtypallel anzusehen ist. Daneben tragen auch NOD/LT, NZW/LacJ und 129/SvJ dieses Allel, während DBA/1J, DBA/2J, C3H, SB/LE und NZB/B1 wie C57BL/6 die P451L Punktmutation zeigen. Alle Stämme sind für das untersuchte Allel homozygot.

**Tabelle 9** fasst diese Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 9** Inzidenz der P451L Mutation

<b>451P</b>	<b>451L</b>
Mus spretus	C57/BL6
Mus musculus	C57/B10
Mus poschiavinus	DBA/1J
Mus caroli	DBA/2J
BALB/c	NZB/B1
NOD/LT	SB/LE
NZW/LacJ	
129/SvJ	

**Abb.18 P2X7 Genotypisierung verschiedener Mausstämme**



Genomische DNA verschiedener Mausstämme wurde mit den allel-spezifischen Primern 451P und 451L amplifiziert. Alle Repräsentanten nicht eingekreuzter Maus-Spezies (*Mus spretus* (Ms), *Mus musculus* (Mm), *Mus poschiavinus* (Mp) und *Mus caroli* (Mc)) sowie die *Mus musculus* Laborstämme BALB/c, NOD/LT, NZW/LacJ und 129/SvJ trugen das Allel 451P, während die Stämme DBA/2J, DBA/1J, C3H, SB/LE, NZB/B1 und C57BL/6 das 451L Allel aufwiesen. Alle Mäuse waren für das untersuchte Allel homozygot.

## 6.2. Charakterisierung verschiedener Zelllinien auf P2X7 Expression, Genotyp und Funktion

Neben der Inzidenz der P451L Mutation in unterschiedlichen Mausstämmen interessierte mich die Verbreitung des P2X7-Rezeptors in Zelllinien. Dies insbesondere, da die Arbeit mit Zellkulturzellen zum ständigen Repertoire in unserer Arbeitsgruppe gehört und dabei u.a. auch Apoptose und Proliferation der Zellen untersucht werden. Daher habe ich einige bei uns häufig benutzte Zelllinien auf die Expression, den Genotyp und die Funktion des P2X7-Rezeptors untersucht.

Daneben zeige ich am Ende dieses Abschnittes eine Immunpräzipitation von P2X7 mit dem kommerziell erhältlichen P2X7-Antiserum der Firma alomone labs.

### 6.2.1. Nachweis des P2X7-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien im Western Blot

**Tabelle 10** zeigt die in dieser Untersuchung eingesetzten Zelllinien:

HEK-T	Humane embryonale Nierenzelllinie
EL4	C57/BL6 Lymphomzelllinie
RAW	BALB/c Makrophagenzelllinie
DC27.10	Hybridomzelllinie
MD27	Hybridomzelllinie

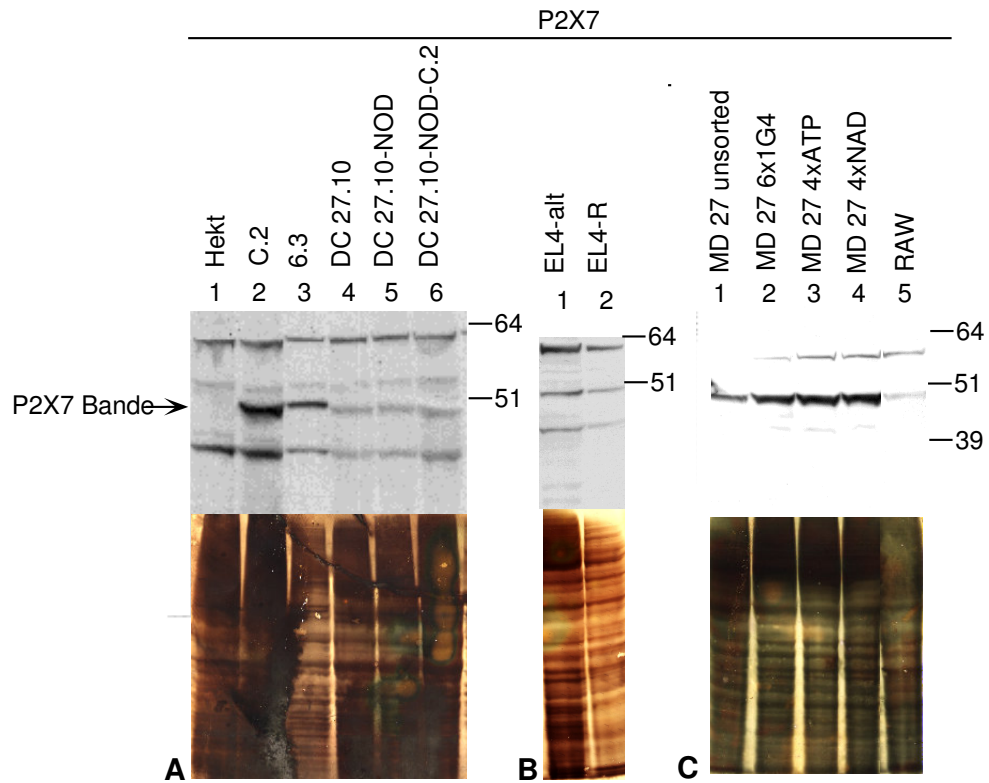
Neben den parentalen HEK-T-Zellen wurden die mit den beiden allelen Varianten von P2X7 stabil transfizierten HEK-T-C.2 und HEK-T-6.3 Zelllinien als Kontrollen mitgeführt. Von den EL4-Zellen existieren in unserer Arbeitsgruppe zwei Varianten, EL4-alt und EL4-R, die beide getestet wurden.

Von den DC27.10 Zellen wurden die parentalen Zellen, eine stabile murine ART2.2 Transfektante (DC27.10-NOD), und eine einmalig mit P2X7 (451P) supertransfizierte Variante (DC27.10-NOD-C.2) untersucht.

Die MD27-Zellen besitzen eine endogene ART; daher lassen sich nach Inkubation der Zellen mit eNAD etheno-ADP-ribosylierte Proteine auf der Zelloberfläche mit dem gegen die Ethenogruppe gerichteten Antikörper 1G4 nachweisen [115] (vergleiche Abbildung 9). Zellen mit einer starken ART-Aktivität wurden mittels sechsfacher FACS Sortierung angereichert (MD27 6x1G4) und mit den unsortierten Zellen verglichen.



**Abb.19 Nachweis des P2X7-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien im Western Blot**



Triton X-100 Zelllysate der angegebenen Zelllinien ( $4 \times 10^6$  Zelläquivalente pro Spur) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC- und PVDF-Membranen übertragen. Die Gesamtheit der Proteine wurde in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor durch einen spezifischen Antikörper (alomone labs) und einen PO-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Mit Ausnahme der untransfizierten HEK-T-Zellen exprimieren alle Zelllinien einen P2X7-Rezeptor.

Einige MD27-Zellen haben die Eigenschaft, nach ATP- oder NAD- Stimulation Phosphatidylserin (PS) nach außen zu stülpen, was durch Fluorochrom-markiertes Annexin V im FACS nachgewiesen werden kann. Zellen mit diesen Eigenschaften wurden ebenfalls durch mehrfache FACS-Sortierung angereichert (MD27 4xATP und MD27 4xNAD) und untersucht.

**Abbildung 19** zeigt den P2X7-Rezeptor in allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme der untransfizierten HEK-T-Zellen etwas unterhalb von 51kD. Das Muster der beiden unspezifischen Banden bei etwa 64kD und etwa 39kD gleicht dem in Abbildung 11 gezeigten, wobei die niedermolekulare Bande dem Zweitantikörper zuzuschreiben ist (vergleiche Abbildung 11).

Die P2X7-Expression erscheint in allen DC27.10-Zellen, in beiden EL4-Zelllinien, in den unsortierten MD27- und den RAW-Zellen deutlich schwächer als in den transfizierten HEK-T-Zellen. Im Vergleich der drei DC27.10 Zelllinien kann man keinen Unterschied feststellen, obwohl die DC27.10-NOD-C.2 Zelllinie als P2X7-Transfektante mehr Rezeptor exprimieren sollte. Die Zellen waren bei dieser Untersuchung etwa vier Wochen nach Transfektion unter Blastocidinselektion, wobei mangels eines geeigneten Antikörpers zu keinem Zeitpunkt nach der Transfektion die Transfektionseffizienz kontrolliert werden konnte.

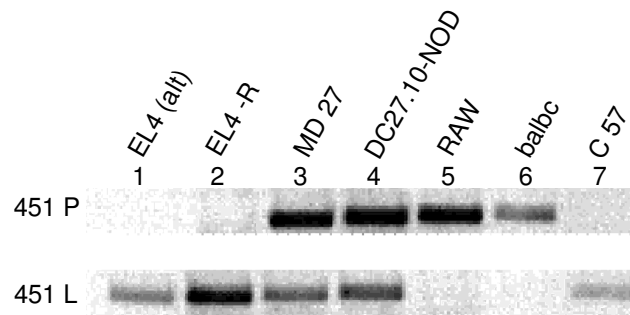
Bei den MD27-Zellen sind durch alle Sortierungsarten Zellen mit einer verstärkten P2X7-Expression angereichert worden. Am stärksten war dies bei den Zellen der Fall, die nach ATP- oder NAD-induzierter PS-Ausstülpung sortiert wurden.

### **6.2.2. P2X7 Genotypisierung der im Western Blot getesteten Zellen**

Unter den gleichen PCR-Bedingungen, unter denen die Mausstämme genotypisiert wurden, wurde genomische DNA der vorher im Western Blot getesteten Zellen untersucht. Genomische DNA je einer BALB/c Maus und einer C57/BL6 Maus wurden als Kontrolle mitgeführt. **Abbildung 20** zeigt, dass die EL4 Zelllinien erwartungsgemäß – als Lymphomzelllinie einer C57/BL6 Maus- an Position 451 ein Leucin tragen, während genauso erwartet die BALB/c Makrophagenzelllinie RAW den Wildtyprezeptor zeigt.

Die Hybridome MD27 und DC27.10 sind für den P2X7-Rezeptor heterozygot und haben beide Allele.

## Abb.20 P2X7 Genotypisierung verschiedener Zelllinien



Genomische DNA von verschiedenen in der Arbeitsgruppe häufig benutzten Zelllinien wurde präpariert und auf das Vorliegen der 451L Mutation mittels PCR mit den spezifischen Primern 451P/451L untersucht. Genomische DNA von BALB/c und C57/BL6 Mäusen wurde als Kontrolle mitgeführt.

### 6.2.3. ATP-induzierte YO-PRO 1 Aufnahme in den untersuchten Zelllinien

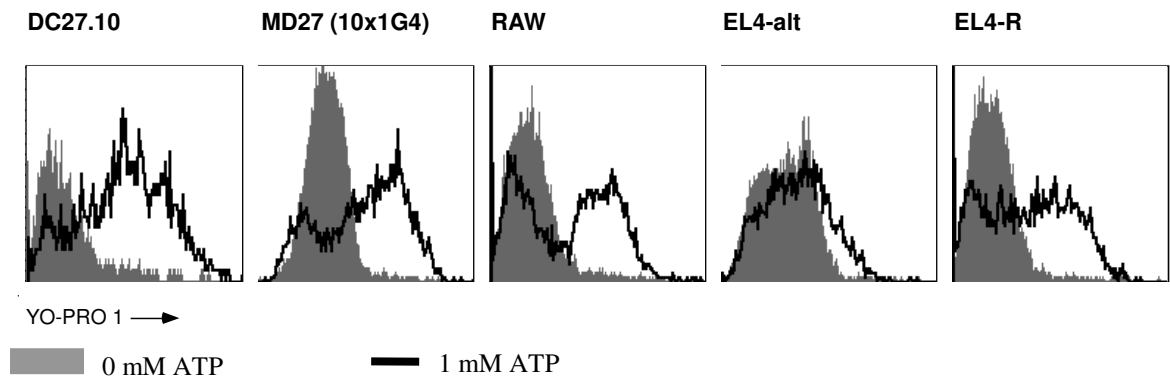
Außer Phäno- und Genotyp interessierte mich die Funktion des P2X7-Rezeptors in den verschiedenen Zelllinien. Dafür habe ich wie an den HEK-T-Zellen die ATP-abhängige YO-PRO-1 Aufnahme in die Zellen untersucht. Als MD27-Zellen wurden Zellen eingesetzt, die zehnmals nach ART-Aktivität sortiert wurden.

Die Zellen wurden bei 37°C in Anwesenheit von 1µM YO-PRO-1 fünf Minuten ohne oder mit 1mM ATP inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und im FACS untersucht. Bei allen YO-PRO-1 Assays wurden Zellen und Reagenzien konsequent auf Eis gestellt, um die Aktivierung des Rezeptors außerhalb der gewünschten Zeit so gering wie möglich zu halten. Tote Zellen wurden mittels des veränderten Forward-Side-Scatters (FSC/SSC) am FACS ausgeschlossen, um den Hintergrund zu minimieren.

In **Abbildung 21** ist dargestellt, dass alle Zelllinien auf ATP mit YO-PRO-1 Aufnahme reagieren, wenn auch in sehr unterschiedlicher Ausprägung. Daneben lassen sich mit Ausnahme der EL4-alt-Zellen bei allen Linien zwei Zellpopulationen unterscheiden, von denen die eine resistent gegenüber ATP zu sein scheint; am deutlichsten wird dieses Phänomen bei den RAW-Zellen.

Eindeutige YO-PRO-1 Aufnahme sieht man bei den RAW-Zellen und den beiden Hybridomen MD27 und DC27.10. Erstaunlich ist das sehr unterschiedliche Verhalten der beiden EL4 Zelllinien, da sich die EL4-alt Zellen nahezu unbeeinflusst durch das ATP präsentieren, während bei den EL4-R Zellen zumindest eine Subpopulation mit YO-PRO1 Aufnahme auf den ATP-Stimulus reagiert.

**Abb.21 YO-PRO-1 Aufnahme in verschiedenen Zelllinien**



Die im Western Blot und in der PCR untersuchten Zelllinien wurden auf ihre ATP-abhängige YO-PRO-1 Aufnahme untersucht.

Die Zellen wurden bei 37°C für 5 Minuten in Anwesenheit von 1  $\mu$ M YO-PRO-1 ohne oder mit 1 mM ATP inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und im FACS untersucht. Tote Zellen wurden mittels forward scatter – side scatter Analyse ausgeschlossen.

#### **6.2.4. Immunpräzipitation von P2X7 mit einem anti-Peptid-Antiserum (alomone labs)**

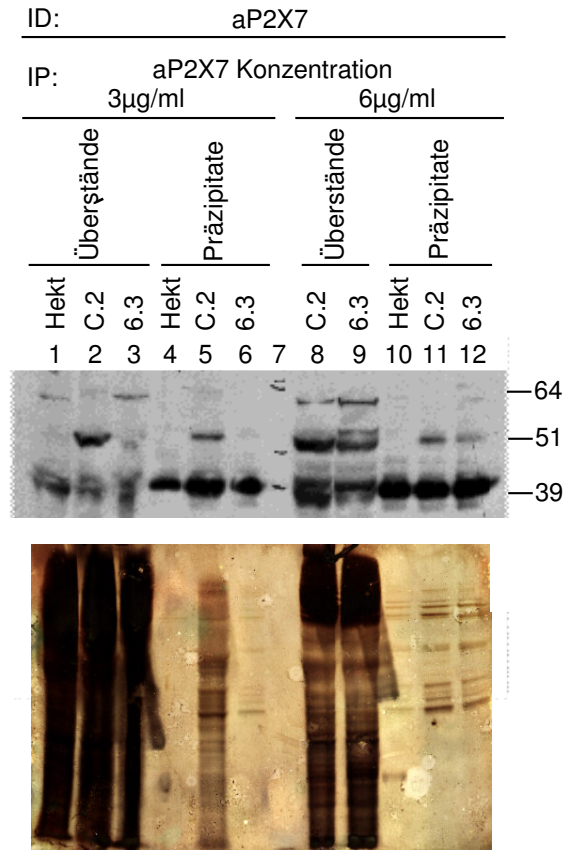
Der P2X7-Rezeptor liegt als Komplex mit anderen Proteinen in der Zellmembran vor [109]. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Funktion des mutierten Rezeptors könnte in einer veränderten Zusammensetzung dieses Komplexes liegen, insbesondere, da die Mutation im Bereich einer putativen SH3-Bindedomäne liegt [3]. Um die Zusammensetzung dieses Komplexes zu untersuchen, ist die Immunpräzipitation des P2X7-Rezeptors notwendig. Zu dem Zeitpunkt, als diese Versuche durchgeführt wurden, war nur ein einziges P2X7-spezifisches Antiserum kommerziell erhältlich. Dabei handelte es sich um ein polyklonales Antiserum der Firma alomone labs, das gegen eine Peptidsequenz am C-terminus gerichtet war.

Das Antiserum wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Protein G-Sepharose immobilisiert und mit Triton X 100-Lysaten von HEK-T-Zellen und ihren P2X7-Transfektanten inkubiert. Um unspezifische Bindungen der Lysate an die Matrix auszuschließen, wurden sie mit „nackter“ Protein G-Sepharose vorinkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate und die konzentrierten Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC- und PVDF-Membranen übertragen. Die Gesamtheit der Proteine wurde in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor in der Immundetektion mit dem alomone labs-Antiserum sichtbar gemacht.

Die Silberfärbung in **Abbildung 22** zeigt, dass die Proteinmenge pro Spur in den Präzipitaten deutlich reduziert ist; alleine Spur 5 stellt eine Ausnahme dar, was als Verunreinigung anzusehen ist. Der P2X7-Rezeptor erscheint in den transfizierten Zellen (C.2 und 6.3) bei etwa 50 kD sowohl in den Präzipitaten als auch in den Überständen, wobei der weitaus größte Anteil in den Überständen verbleibt und nicht präzipitiert wird. Insgesamt ist damit die Präzipitationsleistung des Antiserums als unbefriedigend zu bewerten.

Als Nebenbetrachtung fällt in diesem Experiment ein sichtbarer Unterschied in der P2X7-Rezeptor-Menge von HEK-T-C.2 und HEK-T-6.3-Zellen auf, der in anderen Experimenten nicht so deutlich zu sehen war (vgl. z.B. Abbildung 10). Die Frage, inwieweit die Funktionseinbuße des mutierten P2X7-Rezeptors durch eine verminderte Oberflächenexpression zu erklären ist, kann auf diesem Wege nicht befriedigend beantwortet werden.

**Abb.22 Immunpräzipitation von P2X7 mit einem anti-Peptid-Antiserum (alomone labs)**



Triton X 100 Ganzzelllysate der angegebenen Zelllinien (Spur 1-6:  $2 \times 10^7$  Zelläquivalente, Spur 8-12:  $1,5 \times 10^7$  Zelläquivalente) wurden mit an Protein G-Sepharose immobilisiertem P2X7-Antiserum (alomone labs) inkubiert, wobei zwei unterschiedliche Antikörper-Konzentrationen eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Präzipitate und konzentrierte Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC- und PVDF-Membranen übertragen. Die Gesamtheit der Proteine wurde in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor durch einen spezifischen Antikörper (alomone labs) und einen PO-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht.

Dazu wäre ein Antikörper nützlich, der den nativen Rezeptor erkennt und die Messung der Oberflächenexpression im FACS erlaubt.

### **6.3. Untersuchung eines neuen, mittels DNA-Vakkzinierung erzeugten P2X7-Antiserums**

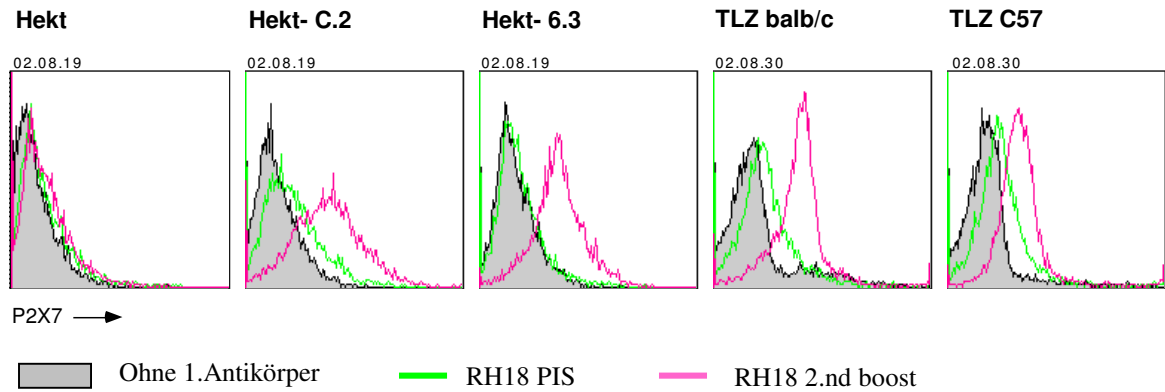
Da das P2X7-Antiserum der Firma Alomone Labs als Anti-Peptid-Antiserum nur das denaturierte P2X7-Protein erkannte, wurden von unserer Arbeitsgruppe eine Ratte und ein Kaninchen mit Hilfe der Gene-Gun mit einem P2X7-Konstrukt immunisiert. Ziel war es, durch DNA-Immunsierung ein Antiserum zu erhalten, das den nativen Rezeptor erkennt, und somit im FACS, in der Immunfluoreszenz und im ELISA einsetzbar ist, präzipitiert, und die Funktion des P2X7-Rezeptors spezifisch blockieren kann. Die Tiere erhielten eine Grund- und mehrere Booster-Immunsierungen in mehrwöchigen Abständen. Mir standen Immunsereen der immunisierten Ratte (RH18) für erste Tests zur Verfügung.

#### **6.3.1. Immunsereum der Ratte RH18 – erstmals Nachweis des nativen P2X7-Rezeptors im FACS**

Transfizierte und untransfizierte HEK-T-Zellen wurden ebenso wie B-Zell depletierte Lymphknotenzellen einer Zweischnittanfärbung unterzogen. Die Zellen wurden für 20 Minuten in einer 1 zu 100 Verdünnung mit dem Prä-Immunsereum, dem Serum nach der zweiten Booster-Immunsierung („second boost“), oder als Negativkontrolle mit PBS inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, weitere 20 Minuten mit einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG gefärbt, erneut gewaschen und im FACS untersucht. **Abbildung 23** zeigt, dass die untransfizierten HEK-T-Zellen weder mit dem Zweitantikörper noch mit dem Präimmunsereum reagieren; das Serum des immunisierten Tieres reagiert nur mit den P2X7-Transfektanten. Bei den Mauslymphozyten liegen geringe Kreuzreaktionen sowohl mit dem Zweitantikörper als auch mit dem Präimmunsereum vor, dennoch ist auch hier eine spezifische Bindung des „second boost“ Serums zu erkennen.



**Abb.23 Ein neues P2X7-Antiserum – erstmals Nachweis des nativen P2X7-Rezeptors der Maus im FACS**



Untransfizierte sowie mit P2X7 transfizierte HEK-T-Zellen (C.2: 451P, 6.3.: 451L) und B-Zell depletierte Lymphknotenzellen je einer BALB/c und einer C57BL/6 Maus wurden mit Serum aus einer mit P2X7 immunisierten Ratte bei 4°C (A) oder bei 37°C (B) und einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG Zweitantikörper sichtbar gemacht (jeweils in einer Verdünnung von 1:100). Um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers auszuschließen, wurde jeweils ein Ansatz nur mit dem Zweitantikörper gefärbt (grau); als Negativkontrolle wurde das Präimmunserum (PIS) der Ratte eingesetzt (grün).

### 6.3.2. Das RH18 Immuneserum bindet bei 37°C stärker als bei 4°C

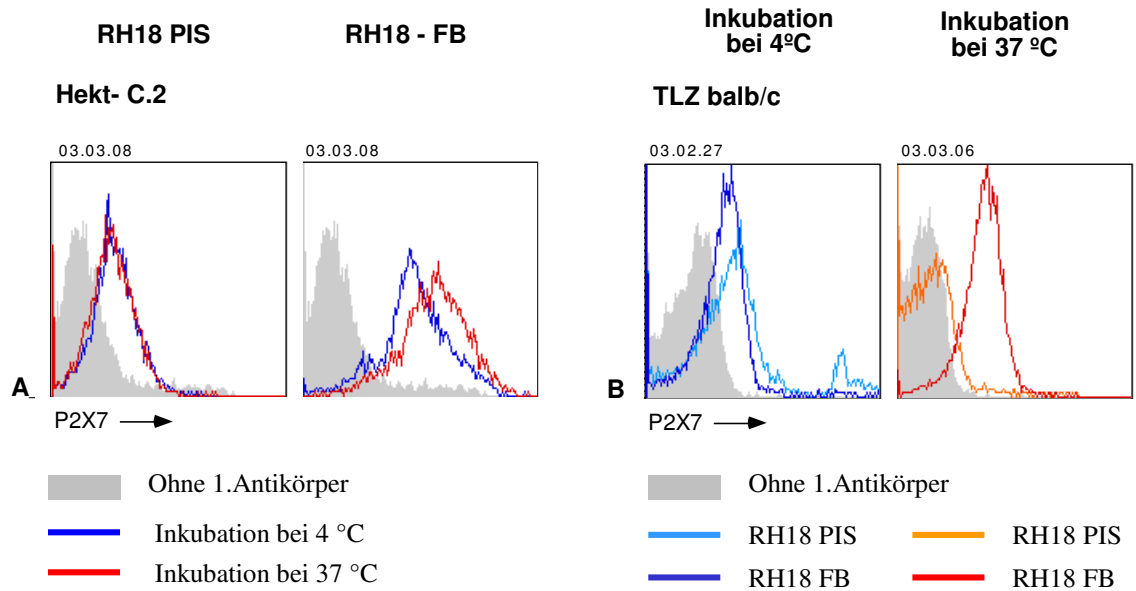
Antigen-Antikörper-Reaktionen werden für gewöhnlich bei 4°C angesetzt, um unspezifische Bindungen zu vermindern; auf den B-Zell depletierten Lymphknotenzellen gelang damit keine spezifische Anfärbung (vgl. **Abbildung 24 B**). Erst als zufällig ein Ansatz Lymphozyten mit Immuneserum bei 37°C inkubiert wurde, gelang eine reproduzierbare Anfärbung des P2X7-Rezeptors auf diesen Zellen. Daraufhin wurde an den transfizierten HEK-T-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt schon mehrfach bei 4°C gefärbt worden waren, das Bindungsverhalten der RH18-Immuneseren bei 4°C und bei 37°C verglichen. **Abbildung 24 A** zeigt, dass das Präimmuneserum mit den HEK-T-C.2-Zellen eine unspezifische Bindung eingeht, die temperaturunabhängig ist, während das "Final bleed"-Serum bei 37°C besser bindet als bei 4°C. Im Gegensatz zu den Lymphozyten, bei denen bei 4°C überhaupt keine spezifische Anfärbung gelingt, ist dieses bei den transfizierten HEK-T-Zellen möglich (vergleiche auch **Abbildung 23**: die HEK-T Zellen wurden bei 4°C, die Lymphozyten bei 37°C gefärbt).

### 6.3.3. Vergleich der beiden P2X7-Antiseren RH18 „second boost“ und RH18 „final bleed“

Am Ende der Immunisierungsreihe der Ratte RH18 standen mir neben dem Präimmuneserum das Serum nach der zweiten Immunisierung („second boost“) und das der letzten Blutentnahme bei Entblutung des Tieres („final bleed“) zur Verfügung. Es galt herauszufinden, ob das „final bleed“ Serum dem „second boost“ Serum vergleichbare Ergebnisse bei einer FACS Anfärbung liefert. Dafür wurden die transfizierten HEK-T-Zellen und B-Zell-depletierten Lymphknotenzellen wie oben beschrieben gefärbt, im FACS gemessen und die Seren direkt miteinander verglichen.

**Abbildung 25** zeigt, dass beide Immuneseren den P2X7-Rezeptor spezifisch und gleichwertig erkennen; beide reagieren nicht mit den untransfizierten HEK-T-Zellen, und unterscheiden sich an den Lymphozyten deutlich von dem Präimmuneserum. Geringe Unterschiede, wie sie in den gezeigten Untersuchungen bei den HEK-T-6.3-Zellen und den BALB/c Lymphozyten zu erkennen sind, ließen sich nicht reproduzieren.

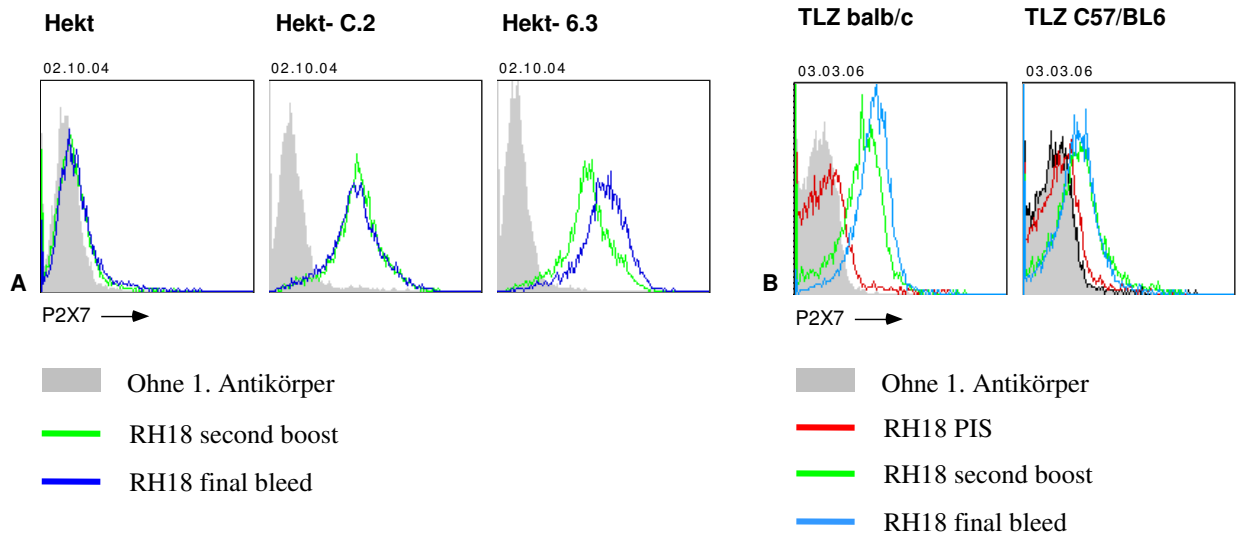
**Abb.24 Das RH18 Immuneserum bindet den P2X7-Rezeptor auf Lymphozyten nur bei 37°C**



Das Bindungsverhalten des RH18-Immuneserums wurde an HEK-T-Zellen (A) und an B-Zell depletierten Lymphknotenzellen einer BALB/c Maus (B) bezüglich verschiedener Inkubationstemperaturen in FACS-Analysen untersucht.

Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden mit RH18-Präimmuneserum, RH18 „final bleed“-Serum oder ohne Erstantikörper 20 Minuten bei 4°C oder bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen, mit einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG weitere 20 Minuten bei 4°C inkubiert und im FACS untersucht.

**Abb.25 Vergleich der beiden P2X7 Antiseren RH18 „second boost“ und RH18 „final bleed“**



Die Seren RH18 „second boost“ und RH18 „final bleed“ wurden an transfizierten und untransfizierten HEK-T-Zellen (A) und an B-Zell-depletierten Lymphknotenzellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen (B) getestet. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden ohne oder mit RH18-Seren 20 Minuten bei 4°C (A) oder 37°C (B) inkubiert, gewaschen, weitere 20 Minuten mit einem PE-konjugiertem anti-Ratten-IgG gefärbt und im FACS untersucht.

#### **6.3.4. Vergleich der P2X7 Oberflächenexpression im FACS**

Nach wie vor unbeantwortet ist die Frage, wie die verminderte Funktion des mutierten P2X7-Rezeptors zu erklären ist und ob eine Veränderung in der Oberflächenexpression dafür eine Rolle spielt. Mit der Möglichkeit der FACS-Untersuchung stand jetzt eine genauere Technik zur Verfügung als bisher mit dem Western blot.

Transfizierte HEK-T-Zellen und B-Zell-depletierte Lymphknotenzellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden wie beschrieben gefärbt, im FACS gemessen, und es wurde jeweils die 451P mit der 451L Variante verglichen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 26** dargestellt: auf den transfizierten HEK-T-Zellen lässt sich kein Unterschied erkennen, während die B-Zell depletierten Lymphknotenzellen der BALB/c Maus etwas mehr P2X7-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zeigen als die Zellen der C57BL/6 Maus.

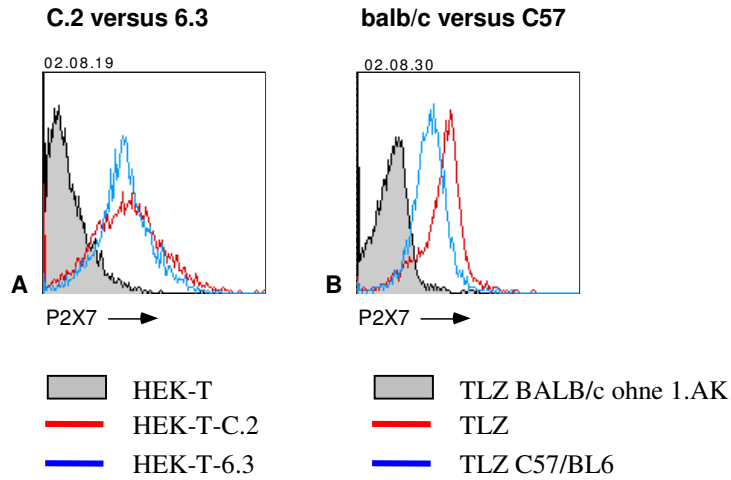
Da jedoch die Mutation im P2X7-Rezeptor in den transfizierten HEK-T-Zellen bei gleicher Oberflächenexpression ausreicht, um seine Funktion zu verringern, ist es wahrscheinlich, dass auch in den Lymphozyten andere Ursachen als die Zahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche entscheidend für die Funktionsminderung sind.

#### **6.3.5. Test der RH18 Antiseren an den bisher untersuchten Zelllinien**

In Abschnitt 3 des Ergebnisteils wurden einige Zelllinien bezüglich ihrer P2X7-Expression im Western blot, ihres Genotyps und ihrer P2X7-Funktion untersucht. An diesen Zellen wurde nun getestet, ob sie ebenfalls spezifisch mit den RH18-Seren reagieren. Wie oben für die HEK-T-Zellen und die Mauslymphozyten beschrieben, wurden die Zellen gefärbt und im FACS untersucht. Sowohl die RH18-Seren als auch der PE-konjugierte Zweitantikörper wurden bei 4°C in einer Verdünnung von 1 zu 100 eingesetzt.

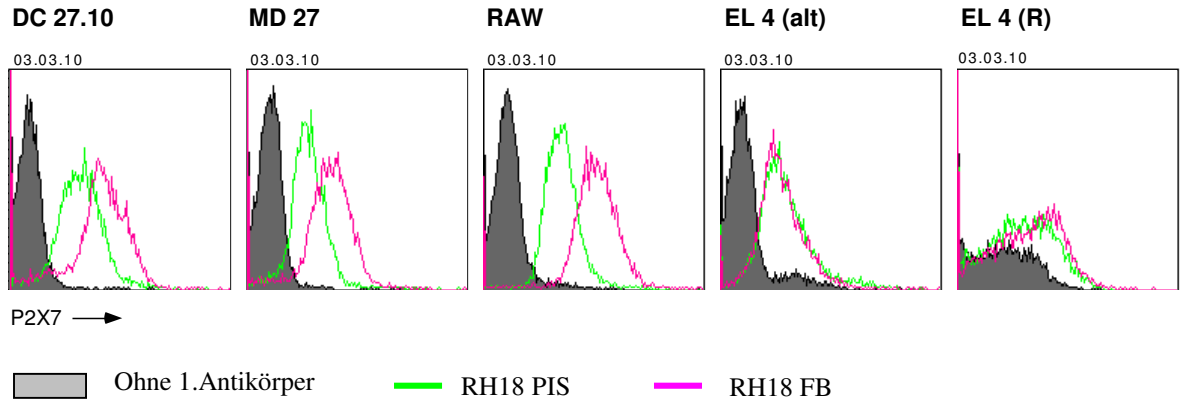
Wie **Abbildung 27** zeigt, vermag das RH18 Serum den P2X7-Rezeptor auf den DC27.10-Zellen, den MD27-Zellen und den RAW-Zellen spezifisch darzustellen, auch wenn das Präimmunserum mit allen drei Zelllinien reagiert; besonders die RAW-Zellen zeigen eine starke Reaktion.

**Abb.26 T-Lymphozyten der BALB/c Maus exprimieren mehr P2X7 als T-Lymphozyten der C57/BL6 Maus**



Die Oberflächenexpression der zwei allelen Varianten des P2X7-Rezeptors wurde auf den transfizierten HEK-T-Zellen (A) und B-Zell-depletierten Lymphknotenzellen je einer BALB/c und einer C57BL/6 Maus (B) mit Hilfe einer FACS Analyse verglichen. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden 20 Minuten mit dem P2X7-spezifischen Serum RH18 „2nd boost“ bei 4°C (A) bzw. 37°C (B) inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und weitere 20 Minuten mit einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG gefärbt. Tote Zellen wurden bei der Analyse mittels Propidiumiodid-Aufnahme ausgeschlossen.

**Abb.27 Analyse der Oberflächenexpression von P2X7 auf Zelllinien mit Hilfe des RH18-Immunsersums**



Die angegebenen, bereits im Western Blot und in der PCR untersuchten Zelllinien wurden mit dem RH18-Immunsersum in FACS-Analysen auf ihre P2X7 Oberflächenexpression getestet. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden 20 Minuten ohne Serum, mit Präimmunsersum oder dem P2X7-spezifischen Serum RH18 FB („final bleed“) bei 4°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und weitere 20 Minuten mit einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG gefärbt. Tote Zellen wurden bei der Analyse mittels Propidiumiodid-Aufnahme ausgeschlossen.

Auf den beiden EL4-Zelllinien gelingt dies nicht: bei den EL4-alt-Zellen, die zwar im Western blot einen P2X7-Rezeptor gezeigt, aber auf ATP nahezu nicht reagiert haben (vgl. Abbildung 19 und 21), ist kein Unterschied zwischen Präimmunserum und „final bleed“ Serum zu erkennen. Die EL-R-Zellen reagieren ebenfalls nicht spezifisch mit den RH18-Seren, außerdem zeigen sie eine starke Reaktion mit dem Zweitantikörper; bei weiteren Untersuchungen sollte daher ein anderer Zweitantikörper eingesetzt oder ein Zusatz von Mausserum versucht werden.

### **6.3.6. Untersuchung, ob das RH18-Serum die ATP-induzierte YO-PRO 1 Aufnahme blockieren kann**

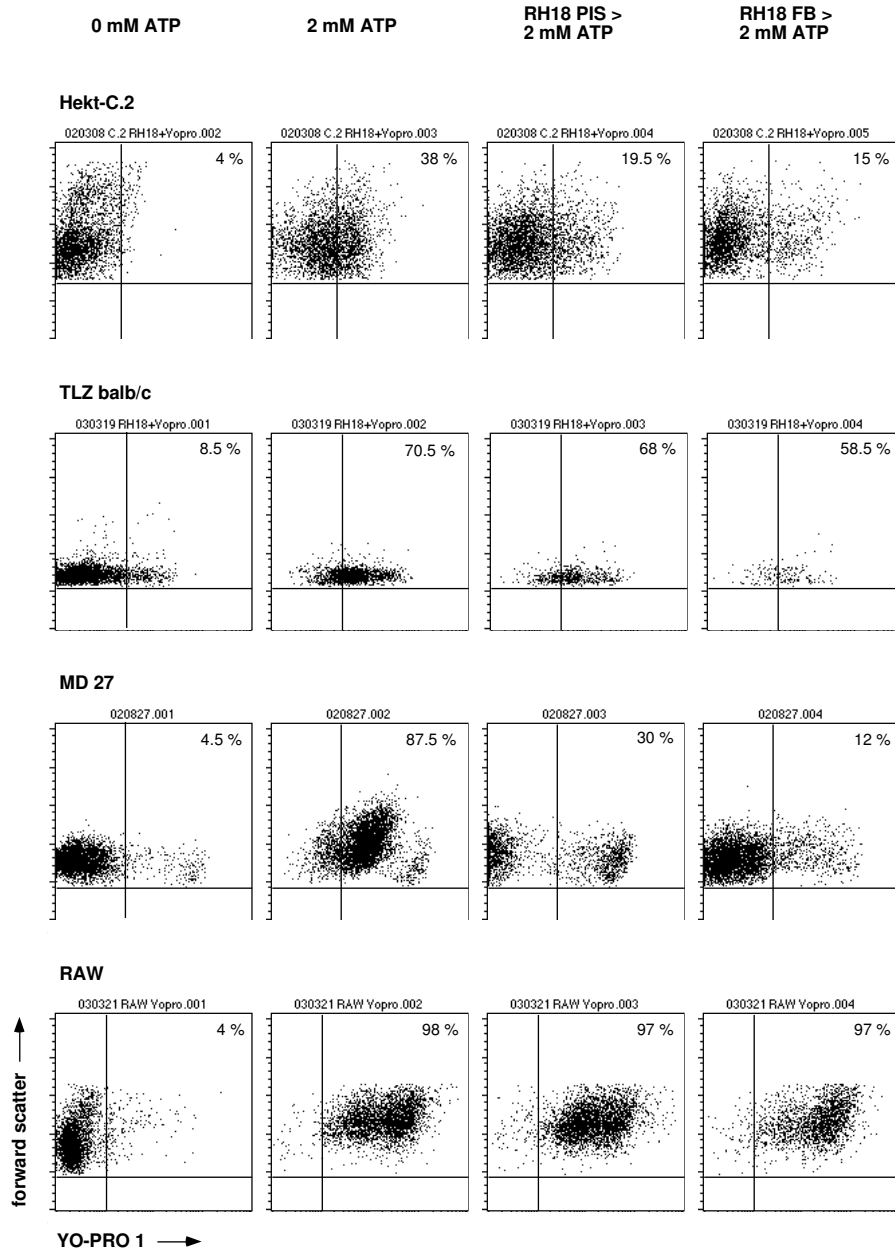
Ein klassisches Experiment für den Nachweis einer Funktion eines Proteins ist die Blockade durch einen spezifischen Antikörper; für diesen Zweck muss der Antikörper so am Protein binden, dass z.B. eine funktionell wichtige Bindungsstelle oder das aktive Zentrum eines Enzyms blockiert wird.

Um zu testen, ob das RH18-Serum einen solchen blockierenden Antikörper darstellt, wurde an HEK-T-C.2-Zellen, an B-Zell depletierten Lymphknotenzellen einer BALB/c Maus, an MD27-Zellen und an RAW-Zellen die ATP-abhängige YO-PRO 1-Aufnahme untersucht. Dafür wurden die Zellen für 20 Minuten mit RH18 „final bleed“-Serum oder Präimmunserum inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und fünf Minuten bei 37°C mit 2 mM ATP stimuliert. Für die letzte Minute erfolgte die Zugabe von 1 µM YO-PRO 1. Danach wurden die Ansätze mit eiskaltem, Propidiumiodid-haltigem PBS verdünnt und sofort im FACS untersucht. Die toten Zellen wurden bei der Analyse anhand der Aufnahme ausgeschlossen. Zwei Ansätze wurden ohne RH18-Vorinkubation als Kontrolle mitgeführt.

Wie in **Abbildung 28** dargestellt ist, nehmen alle Zelllinien durch die ATP-Behandlung YO-PRO 1 auf. Betrachtet man bei den MD27-Zellen alleine die Kontrollansätze und den, der mit dem RH18 „final bleed“ Serum vorinkubiert wurde, so scheint das Serum die Rezeptorfunktion zu blockieren. Allerdings zeigt die Vorbehandlung mit dem Präimmunserum, dass es sich dabei im Wesentlichen um einen unspezifischen Effekt handelt. Eine derart „gute“ Blockade konnte zudem nicht sicher reproduziert werden, auch nicht bei einer Antiseruminkubation bei 37°C (nicht gezeigt).



## Abb.28 Das RH18-Serum vermag die ATP-vermittelte YO-PRO 1 Aufnahme nicht zu blockieren



Um zu testen, ob das RH18 Serum P2X7 vermittelte Funktionen zu blockieren vermag, wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen für 5 Minuten ohne oder mit 2 mM ATP bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In der letzten Minute wurde  $1 \mu\text{M}$  YO-PRO 1 zugegeben; im Anschluss wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, mit eiskaltem PBS verdünnt und im FACS untersucht. Tote Zellen wurden mittels Propidiumiodid-Aufnahme ausgeschlossen. Die Ansätze in Spur 3+4 wurden vor der ATP-Behandlung 20 Minuten mit dem RH18-Präimmunsereum oder dem RH18 „final bleed“-Serum bei  $4^\circ\text{C}$  (HEK-T-C.2, MD27, RAW) oder  $37^\circ\text{C}$  (B-Zell depletierte Lymphknotenzellen BALB/c) inkubiert und schließlich zweimal mit PBS gewaschen.

Auch bei den HEK-T-C.2-Zellen und den Mauslymphozyten erkennt man einen unspezifischen Effekt des Präimmunserums und keine eindeutige Blockade; alleine die RAW-Zellen, die sich gut mit dem Serum anfärben ließen, zeigen gar keine Reaktion bezüglich einer Veränderung der YO-PRO 1 Aufnahme.

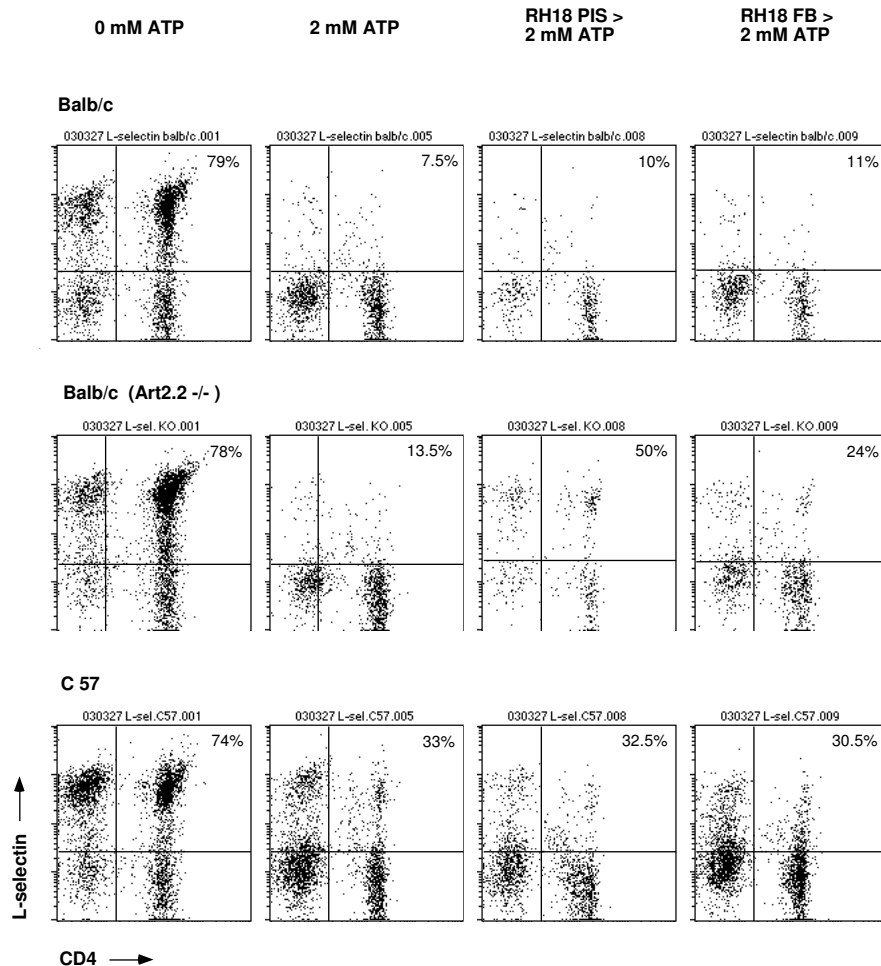
Interessant ist die Tatsache, dass die Vorinkubation mit den Antiseren für die Mauslymphozyten toxisch war, da in diesen beiden Ansätzen deutlich mehr Zellen tot waren (und damit in der abgebildeten FACS-Auswertung nicht dargestellt wurden) als in dem vergleichbaren Ansatz ohne Serum (nicht dargestellt). Dieser Effekt trat nur bei den Lymphozyten auf und könnte auf die zusätzliche 20 minütige Inkubation bei 37°C zurückzuführen sein. Dieser toxische Effekt trat in allen Blockadeversuchen bei Lymphozyten auf, jedoch nicht bei Anfärbungen, so dass es möglicherweise die Kombination aus Antiserum und nachfolgender ATP-Inkubation ist, die für diese Zellen so schlecht verträglich ist.

Nicht gezeigt sind erste Tests, in denen untersucht wurde, ob das Antiserum eine agonistische Wirkung auf P2X7 ausübt, d.h. ob Zellen nach Inkubation mit dem Antiserum aber ohne nachfolgende ATP-Inkubation YO-PRO-1 aufnehmen; dieses gelang weder an murinen Lymphozyten, noch an MD27- oder transfizierten HEK-T-Zellen.

### **6.3.7. Versuch der Blockade der ATP induzierten L-selectin (CD62L) Abstoßung mit dem RH18 Antiserum**

Neben der YO-PRO 1 Aufnahme wurde versucht, die ATP induzierte L-selectin (CD62L) Abstoßung mittels der RH18-Seren zu blockieren. Dazu wurden B-Zell-depletierte Lymphknotenzellen je einer BALB/c, einer BALB/c ART2.2 KO- und einer C57BL/6 Maus mit Präimmunserum oder „final bleed“-Serum 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert, anschließend ohne Waschschrift 2mM ATP zugegeben, für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD62L gefärbt. Die Depletion der B-Zellen wurde mit Hilfe einer gegen CD3 gerichteten Kontrollanfärbung überprüft (nicht gezeigt). Tote Zellen wurden mittels Propidiumiodid Aufnahme ausgeschlossen.

## Abb.29 Die ATP-vermittelte L-selectin (CD62) Abstoßung wird durch RH18-Serum nicht verhindert



Es wurde untersucht, ob das RH18 „final bleed“ Serum die ATP-vermittelte L-selectin- (CD62L-) Abstoßung verhindern kann. Dazu wurden je  $5 \times 10^5$  B-Zell depletierte Lymphknotenzellen je einer BALB/c Wildtyp-, einer BALB/c ART.2.2 KO- und einer C57BL/6 Maus ohne, mit RH18-Präimmun- oder „final bleed“-Serum 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde kein oder 2 mM ATP für 30 Minuten bei 37°C zugesetzt, dann mit PBS gewaschen und für weitere 30 Minuten mit FITC bzw. PE-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD62L inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen im FACS untersucht. Tote Zellen wurden durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid von der Analyse ausgeschlossen, die Depletion der B-Zellen wurde mit Hilfe einer gegen CD3 gerichteten Kontrollanfärbung überprüft (nicht gezeigt).

**Abbildung 29** zeigt, dass auch die L-selectin (CD62L) Abstoßung durch das RH18-Antiserum nicht verhindert wird.

Auch wenn der ungebundene Antikörper vor der ATP-Inkubation nicht gewaschen wurde (wie es bei dem YO-PRO 1 Assay gemacht wurde) und somit weiter mit dem ATP um freie Bindungsstellen am P2X7-Rezeptor konkurrieren konnte, kam es zu keiner Blockade, was den Schluss nahe legt, dass der Antikörper weder an der ATP-Bindungsstelle noch an Zentren bindet, die für die L-selectin (CD62L) Abstoßung von Bedeutung sind.

Auch in diesem Versuch führte die Vorinkubation mit den RH18-Seren zu einer Abnahme der Propidiumiodid-negativen Zellen, wie aus der verminderten Punktdichte der Diagramme in Spalten 3 und 4 der Abbildung 29 gesehen werden kann. Dies traf insbesondere bei den Zellen aus BALB/c Mäusen zu.

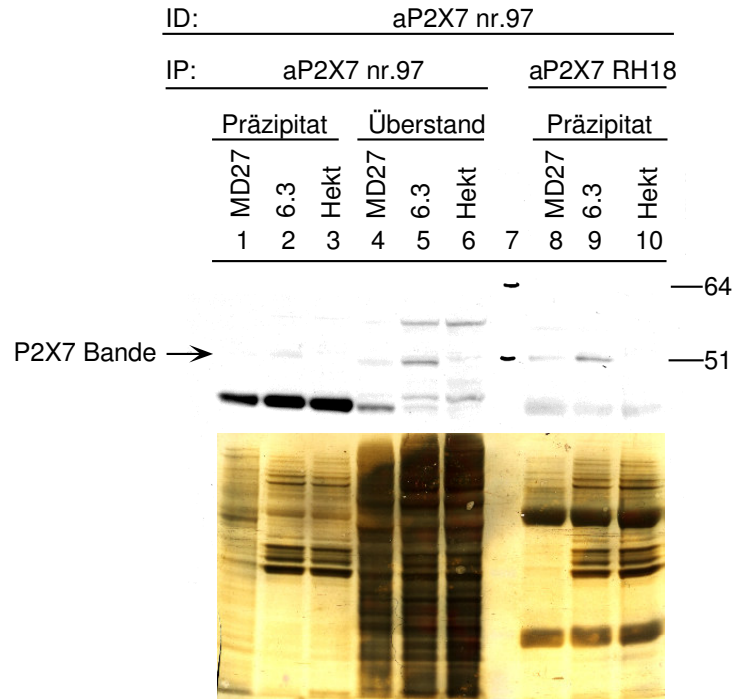
Auch die Inkubation mit NAD bewirkt eine Abstoßung des L-selectins (CD62L) durch T-Zellen (vgl. Abb.14 und 15), wenn auch in geringerem Umfang als ATP. In Versuchen, bei denen der gleiche Blockadeversuch wie in Abbildung 29 mit 0,2 mM NAD anstelle von ATP durchgeführt wurde, wurde keine wesentliche Veränderung der Propidiumiodid-Aufnahme festgestellt (nicht gezeigt). Die im vorhergehenden Abschnitt geäußerte Vermutung, dass es die Kombination aus RH18 Serum-Inkubation und nachfolgender ATP-Behandlung ist, die toxisch wirkt, wird durch diese Beobachtung unterstützt. Da bereits das Präimmenserum die Zellen zu vermehrter Propidiumiodid Aufnahme bringt, ist es kein spezifischer Effekt der P2X7-erkennenden Antikörper. Eine vergleichbare Beobachtung konnte ich bei keiner der untersuchten Zellkultur-Zelllinien feststellen.

### **6.3.8. Versuch der Immunpräzipitation von P2X7 mit RH18 „second boost“ Serum im Vergleich zum Serum von alomone labs**

Als letzte Untersuchung mit den RH18-Seren habe ich getestet, ob das Serum in der Lage ist, den P2X7-Rezeptor zu präzipitieren. Dabei bin ich genauso vorgegangen wie in Abschnitt 6.3.4. beschrieben. Das Antiserum von alomone labs habe ich als Vergleich mitgeführt.

Wie **Abbildung 30** zeigt, vermag das RH18-Serum den Rezeptor zwar etwas besser zu präzipitieren als das Serum von Alomone Labs, jedoch wird auch hier nur ein kleiner Teil des vorhandenen Proteins isoliert. Für weitergehende Untersuchungen an dem P2X7-Membrankomplex erscheint auch diese Präzipitationsleistung zu gering.

**Abb.30 Anti-P2X7 aus RH18 und von alomone labs- ein Vergleich der Fähigkeit zur Immunpräzipitation**



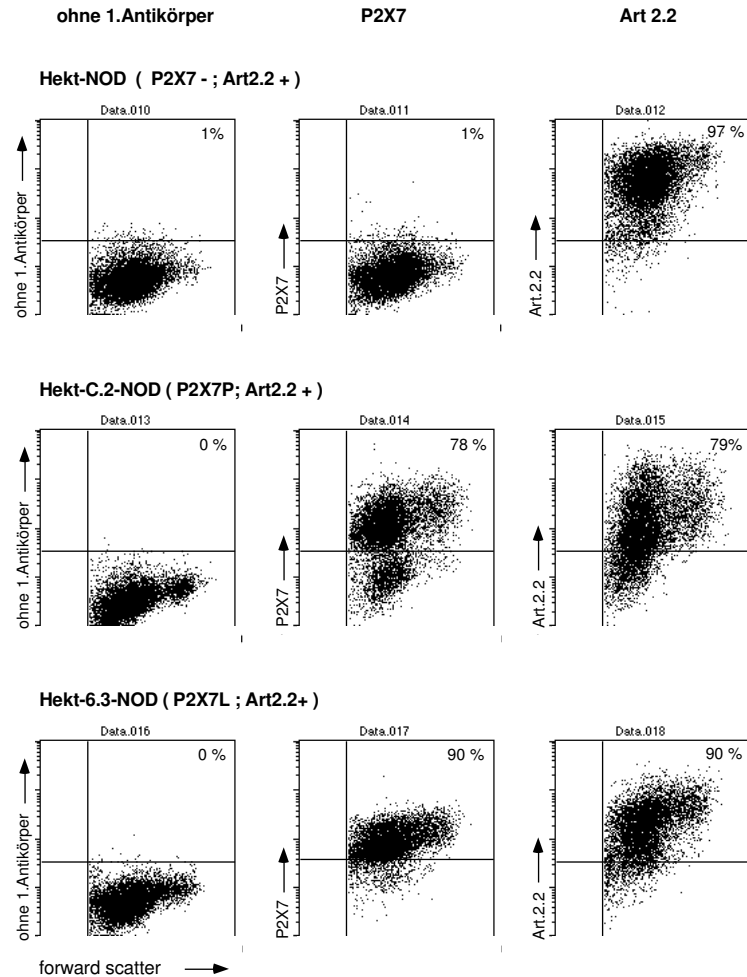
Triton X-100-Lysate (aus je  $1 \times 10^7$  Zellen) der angegebenen Zelllinien wurden mit an Protein G Sepharose immobilisierten P2X7-Antikörpern der Firma alomone labs (Spur 1-6) oder RH18 „second boost“ (Spur 8-10) über Nacht inkubiert. Die Überstände wurden konzentriert, und Überstände und Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und auf NC- und PVDF-Membranen übertragen. Die Gesamtheit der Proteine wurde in der Silberfärbung, der P2X7-Rezeptor durch den spezifischen Antikörper von alomone labs und einen PO-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht.

#### **6.4. Etablierung von P2X7 und ART2.2 doppelt-positiven Zelllinien als experimentelle Werkzeuge für die Untersuchung der NAD-induzierten P2X7-Aktivierung**

Die Arbeit von Seman et al. [178] hat gezeigt, dass typische Phänomene der P2X7-Rezeptoraktivierung in B-Zell-depletierten Lymphknotenzellen der Maus auch durch NAD anstelle von ATP ausgelöst werden können. Für die NAD-abhängige P2X7-Aktivierung ist das Ektoenzym ART2.2 essentiell, und es sind wesentlich geringere NAD- als ATP-Konzentrationen erforderlich. Ich habe das in der vorliegenden Arbeit für die NAD-induzierte L-selectin (CD62L) Abstoßung (s. Abbildung 14 und 15) dargestellt. Um die Untersuchung der NAD-induzierten P2X7-Aktivierung zu erleichtern und zu testen, ob die Transfektion von P2X7 und ART2.2 ausreicht, um die typischen P2X7-Effekte durch NAD auszulösen, habe ich Zelllinien etabliert, die für die beiden Varianten des P2X7-Rezeptors und für ART2.2 doppelt positiv sind. Dafür wurden die vorhandenen HEK-T-P2X7-Transfektanten mit murinem ART2.2. supertransfiziert und durch eine kombinierte Blastocidin- und G418-Behandlung selektioniert. Dieses an sich etablierte Verfahren erwies sich im vorliegenden Fall als problematisch, da trotz zahlreicher Varianz in den Transfektionsbedingungen die Transfektionseffizienz gering blieb, nur wenige Zellklone die Selektion überlebten und diese Wochen benötigten, um eine für die HEK-T-Zellen normale Wachstumsgeschwindigkeit zu entwickeln. Lichtmikroskopisch waren sie dann von den untransfizierten HEK-T-Zellen und den P2X7-Transfektanten nicht zu unterscheiden.

**Abbildung 31** zeigt eine FACS-Doppelanfärbung dieser Zelllinien 5 Monate nach Transfektion. Alle drei transfizierten HEK-T-Zelllinien – ohne P2X7-Rezeptor, mit P2X7-451P (HEK-T-C.2) und mit P2X7-451L (HEK-T-6.3) – exprimieren das mART2.2, was durch Anfärbung mit dem spezifischen Hybridomüberstand Nika102 und einem Fluorochrom markierten anti-Ratten-IgG deutlich wird (Spalte 3); die HEK-T-Zellen ohne P2X7-Rezeptor zeigen die stärkste mART2.2 Expression. Die P2X7-Expressionsstärke der beiden Rezeptorvarianten ist etwa vergleichbar, wobei bei den HEK-T-C.2-Zellen eine Subpopulation den Rezeptor nicht mehr auf der Oberfläche trägt.

**Abb.31 Zusammenwirken von P2X7 und ART2.2 – Herstellung P2X7- und ART2.2-doppelt positiver Zelllinien durch stabile Transfektion**



Um experimentelle Werkzeuge für die Untersuchung des Zusammenspiels von P2X7-Rezeptor und ART2.2 herzustellen, wurden die vorhandenen, mit beiden P2X7-Varianten transfizierten HEK-T- Zellen mit murinem ART2.2 supertransfiziert, und auf die Expression von ART2 und P2X7 untersucht. Diese Abbildung entstand 5 Monate nach Transfektion. Die Zellen wurden jeweils 30 Minuten ohne Antikörper, mit P2X7-spezifischem RH18-Serum „second boost“ oder mit ART2.2. spezifischem Hybridomüberstand Nika102 auf Eis inkubiert, gewaschen, und mit einem PE-konjugierten anti-Ratten-IgG für weitere 30 Minuten gefärbt. In der FACS-Analyse wurden tote Zellen mittels forward scatter - side scatter Analyse ausgeschlossen.



#### **6.4.1. Untersuchung der ART2.2 Aktivität auf den P2X7 und ART2.2 doppelt positiven HEK-T-Zellen**

Neben dem Nachweis der Oberflächenexpression interessierte die Aktivität der transfizierten ADP-Ribosyltransferase (ART2.2). Ein etabliertes System für die Bestimmung der Enzymaktivität ist der Einsatz von etheno-NAD (eNAD) als Substrat und die Darstellung der etheno-ADP-ribosylierten Zielproteine mit dem etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper 1G4 [115]. Die Zellen wurden 30 Minuten bei 37°C mit 0,25 mM eNAD inkubiert, gewaschen, mit FITC-konjugiertem 1G4 Antikörper gefärbt und im FACS untersucht; tote Zellen wurden mittels Propidiumiodidaufnahme ausgeschlossen.

Fünf Monate nach Transfektion zeigen alle Zellen eine nicht sehr starke, aber deutlich messbare ART-Aktivität, die sich durch FACS-Sortierung oder durch magnetgestützte Sortierung anreichern ließe (**Abbildung 32**).

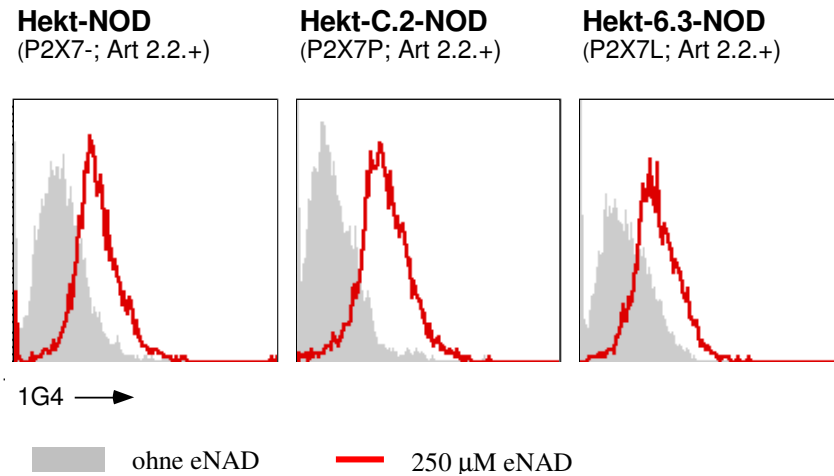
#### **6.4.2. Versuch der Induktion der YO-PRO-1-Aufnahme in P2X7/ART2.2 doppelt-positive HEK-T-Zellen durch NAD**

Nachdem gezeigt wurde, dass die Zellen neben dem P2X7-Rezeptor eine aktive ART exprimieren, wurde untersucht, ob sich der P2X7-Rezeptor in diesen Zellen – so wie in murinen T-Lymphozyten [178] – auch durch NAD aktivieren lässt; diese Aktivierung wurde anhand der Aufnahme von YO-PRO-1 untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit NAD oder ATP bei 37°C inkubiert, wobei in der letzten Minute YO-PRO 1 zugegeben wurde. Die Zellen wurden anschließend sofort auf Eis gestellt und im FACS untersucht. **Abbildung 33** zeigt, dass die P2X7-tragenden Zellen nach Stimulation mit ATP abhängig von ihrem P2X7-Haplotyp YO-PRO 1 aufnehmen, während sie sich gegenüber NAD resistent verhalten. Die nicht mit P2X7 transfizierten HEK-T-Zellen reagieren wie erwartet nicht.

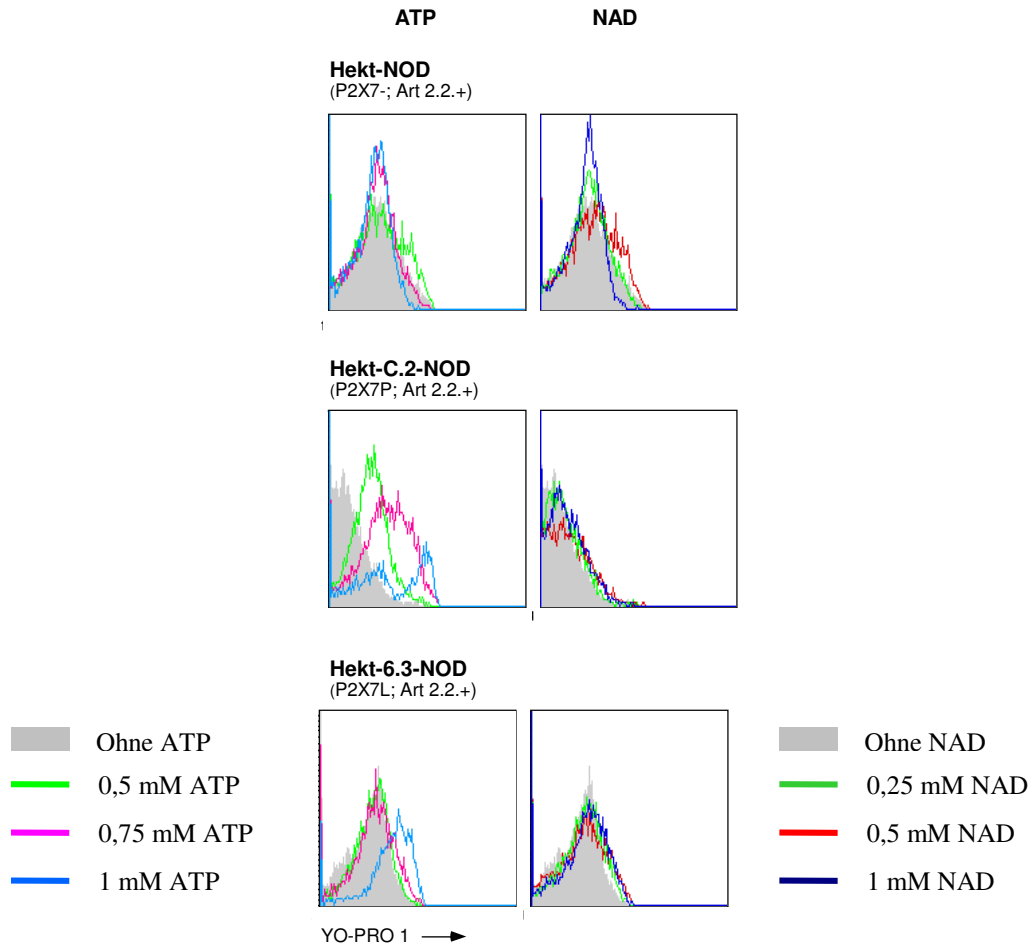
Die Untersuchungen dieser ersten Versuchsreihe, für deren Ergebnisse **Abbildung 33** repräsentativ ist, habe ich jeweils nur mit kurzen ATP/NAD-Inkubationszeiten (bis 15 Minuten) durchgeführt.

**Abb.32 Untersuchung der ART2.2-Aktivität auf den P2X7 und ART2.2 doppelt positiven HEK-T-Zellen**



Um die ART2.2-Aktivität der transfizierten Zellen zu testen, wurden die Zellen 30 Minuten bei 37°C ohne oder mit 250 μM eNAD inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die eADP-ribosylierten Proteine mit dem FITC-konjugierten, eAdenosinspezifischen Antikörper 1G4 für eine FACS-Analyse sichtbar gemacht.

**Abb.33 Die P2X7 und ART2.2 positiven HEK-T-Zellen nehmen YO-PRO-1 nur nach Stimulation mit ATP, nicht aber mit NAD auf**



Die P2X7/ART2.2 doppelt-positiven HEK-T-Zellen wurden auf NAD- und ATP-vermittelte YO-PRO-1 Aufnahme untersucht. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden 3 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  mit unterschiedlichen Konzentrationen von ATP-oder NAD- inkubiert, die YO-PRO 1 Zugabe erfolgte in der letzten Minute. Unmittelbar danach wurden die Zellen auf Eis gestellt, mit eiskaltem PBS verdünnt und im FACS untersucht. Tote Zellen wurden von der Analyse mittels Propidiumiodid-Aufnahme ausgeschlossen.

Die geplante Weiterführung der Versuche mit Verlängerung der NAD-Inkubationszeiten auf eine Stunde oder länger konnte ich nicht durchführen, da ich zu diesem Zweck Zellen auftauen musste, die ich zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der ART-Transfektion im flüssigen Stickstoff eingefroren hatte. Im Gegensatz zu den HEK-T-P2X7-Einzeltransfektanten vertrugen die P2X7/ART-Doppeltransfektanten diesen Vorgang so schlecht, dass in drei unabhängigen Versuchen jeweils eine Woche nach dem Auftauen mehr als 95% der Zellen apoptotisch waren und die verbliebenen, wenigen Zellklone 4 bis 6 Wochen benötigten, um ein normales Wachstumsverhalten zu entwickeln. Dann waren sie lichtmikroskopisch unauffällig, zeigten jedoch nur noch schwache P2X7-Expression und keine ATP-vermittelte YO-PRO1-Aufnahme mehr. Offensichtlich hat der Vorgang des Einfrierens und/oder Auftauens Zellen ohne oder mit inaktivem P2X7-Rezeptor selektioniert. Die enormen Schwierigkeiten, die ich bei der Transfektion dieser P2X7 und ART doppelt positiven Zelllinie hatte, haben sich bei dem weiteren Routinevorgang der Kryokonservierung wiederholt und könnten einen Hinweis darstellen, dass eine ADP-Ribosylierung u.a. des P2X7-Rezeptors, die bei mikromolaren NAD-Konzentrationen im Medium stattfindet, für die Zellen ein Wachstumshindernis oder gar ein Todessignal darstellt.

## 7. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung einer natürlich vorkommenden Mutation im murinen P2X7-Rezeptor (P451L). Dazu wurde u.a. ein neues, mittels DNA-Immunsierung erzeugtes Antiserum gegen murinen P2X7-Rezeptor auf seine experimentellen Möglichkeiten untersucht, und eine P2X7- und ART2.2-doppelt positive Zelllinie erzeugt, die als Werkzeug für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen P2X7-Rezeptor und ADP-Ribosylierung dienen soll.

Es folgen die Diskussion der Ergebnisse, die Vorstellung einer Hypothese, welche Rolle die ADP-Ribosylierung und der P2X7-Rezeptor im Immunsystem spielen könnten und abschließend ein Ausblick auf mögliche weiterführende Untersuchungen

### 7.1. Die P451L-Punktmutation im murinen P2X7-Rezeptor schränkt dessen Funktion ein

Zu Beginn meiner Arbeit war durch Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit derjenigen von Michel Seman und Sahil Adriouch in Paris bekannt, dass der P2X7-Rezeptor in T-Lymphozyten der C57BL/6 Maus nur eingeschränkt funktioniert, indem nach Stimulation mit ATP die YO-PRO-1 Aufnahme, die PS-Ausstülpung und der  $Ca^{2+}$ -Einstrom vermindert waren. Die P2X7-Rezeptoren aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen waren kloniert und stabil in HEK-T-Zellen transfiziert, und unterschieden sich in einer einzigen Aminosäure (P451L).

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde anhand der YO-PRO 1-Aufnahme gezeigt, dass sich der an den Primärzellen beobachtete Unterschied in der Funktion des P2X7-Rezeptors auch in den transfizierten HEK-T-Zellen nachweisen lässt; dass also alleine die Punktmutation im P2X7-Rezeptor (P451L) ausreicht, um seine Funktion einzuschränken (**Abbildung 12 und 13**). Sahil Adriouch hat dieses für die PS-Ausstülpung und den  $Ca^{2+}$ -Fluss untersucht [3]. Diese Funktionseinschränkung schließt einen weiteren Aspekt der P2X7-Rezeptoraktivierung mit ein: auch die ATP-induzierte Abstoßung von L-selectin (CD62L) ist in den C57BL/6 Mäusen vermindert (**Abbildung 14 und 15**). Die über den P2X7-Rezeptor vermittelte Prozessierung von prä-IL1 $\beta$  zu reifem IL1 $\beta$  scheint dagegen von dieser Mutation unbeeinflusst, was einer weitergehenden Untersuchung bedarf (**Abbildung 1**).

Die Lage der Punktmutation im zytoplasmatischen Anteil im Bereich einer putativen SH3-Bindedomäne lässt vermuten, dass durch die Mutation intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst werden. Je proximaler in der Signalkaskade eine Läsion liegt, desto mehr nachgeordnete Ereignisse können davon betroffen sein; es ist aber wahrscheinlich, dass nicht alle Kaskaden gleichermaßen eingeschränkt werden. Mittlerweile ist z.B. gezeigt, dass die Aktivierung der PLD nicht durch die P451L-Punktmutation beeinflusst wird.

Die Tatsache, dass durch die Punktmutation das in seiner Struktur außergewöhnliche Prolin – eine zyklische Iminosäure – gegen die aliphatische Aminosäure Leucin ausgetauscht wird, erleichtert die Vorstellung, dass diese Punktmutation so in die Funktionalität des P2X7-Rezeptors eingreift.

## **7.2. P2X7-Funktionsstudien mit transfizierten HEK-T-Zellen sind nicht unproblematisch**

Die Arbeit mit den transfizierten HEK-T-Zellen hat gegenüber der Arbeit mit Primärzellen zahlreiche Vorteile, ist aber nicht ohne Probleme. Die Zellen sind in der Kultur genetisch instabil und variieren so in der Empfindlichkeit und der Ansprache auf ATP. Dies schränkt die Vergleichbarkeit einzelner Untersuchungen ein, wenn es um exakte Bestimmung z.B. einer Schwellendosis geht; dagegen bestätigte sich in allen Untersuchungen der prinzipielle Unterschied zwischen der 451P- und der 451L-Variante genauso wie die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Phänomene. Die Aussage, dass die P451L-Mutation im P2X7-Rezeptor dessen Funktion in weiten Teilen beeinträchtigt, ist somit auch mit den Zellkulturzellen zu zeigen.

Da die HEK-T-Zellen keinen endogenen P2X7-Rezeptor exprimieren, sind sie die in der Literatur gängige Zelllinie für P2X7-Transfektionsstudien. Sie wachsen jedoch verhältnismäßig langsam und sind insgesamt in der Kultur wenig robust, was immer wieder zu Schwierigkeiten führt. Versuchsreihen mit großem Zellbedarf wie z.B. Immunpräzipitationen sind daher zeitaufwendig und mühsam.

### **7.2.1. Bedeutet die gemeinsame Expression von P2X7 und ART2.2 für HEK-T-Zellen einen Selektionsnachteil?**

Am Ende meiner experimentellen Arbeit zeigte sich, dass die Herstellung einer P2X7- und ART2.2-doppelt positive Zelllinie durch Supertransfektion der stabilen P2X7-HEK-T-Zellen mit ART2.2 sich als schwierig gestaltete. Zwar wurden doppelt-positive Zellen erzeugt (**Abbildung 31 und 32**); diese hatten jedoch letztlich – nach Auftauen aus der Kryokonservierung - den P2X7-Rezeptor herunterreguliert und/oder inaktiviert. Bereits bei der Transfektion überlebten - sowohl bei verschiedenen Varianten der Lipofektion wie auch bei Elektroporation - jeweils weniger als 5% der Zellen die Transfektion mit anschließender pharmakologischer Selektion länger als eine Woche. Die überlebenden Zellen zeigten keine NAD-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors, trotz nachweisbarer Expression und Aktivität der ADP-Ribosyltransferase (**Abbildungen 31 bis 33**). Es ist denkbar, dass das gemeinsame Vorkommen von P2X7-Rezeptor und ART2.2 auf der Zelloberfläche einen Selektionsnachteil darstellt, da solche Zellen möglicherweise anfällig gegenüber NAD-induziertem, P2X7-vermitteltem Zelltod sind. Dieser Selektionsdruck könnte bei der pharmakologischen Selektion im Rahmen der stabilen Transfektion verstärkt werden, da durch den (beabsichtigten) Tod vieler Zellen die NAD-Konzentration im Medium derart ansteigt, dass bei Zellen mit aktivem P2X7-Rezeptor und ART2.2 der NICD induziert wird und diese sterben.

Alternativ steht zum einen die Möglichkeit offen, mit transient transfizierten Zellen zu arbeiten, um die Probleme der Selektion zu umgehen. Beim Vorliegen Fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen P2X7 und ART2.2 könnten in FACS-Analysen gezielt die doppelt positiven Zellen untersucht werden. Allerdings stellt die Transfektion alleine für die Zellen Stress dar (z.B. durch die Transfektionsreagenzien und/oder den Serumentzug), so dass auch hier Probleme auftreten können.

Zur Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie könnten Selektionstechniken eingesetzt werden, die zu keiner Erhöhung der Nukleotidkonzentration im Serum führen, wie beispielsweise FACS-Sortierung oder magnetgestützte Sortierung.

Weiterer Nachteil der HEK-T-Zellen ist die Tatsache, dass es sich um humane Nierenzellen handelt; den transfizierten murinen Proteinen P2X7 und ART2.2 also ein fremdes „Umfeld“ geboten wird, was im Hinblick auf funktionelle Untersuchungen und die Zusammenarbeit mit anderen Proteinen ungünstig erscheint. Der P2X7-Rezeptor liegt in der Zellmembran als Komplex mehrerer Proteine vor [109, 110], und da die P451L-

Mutation im Bereich einer potentiellen SH3-Bindedomäne liegt (**Abbildung 3**, [3]), ist es vorstellbar, dass die Funktionseinschränkung des mutierten Rezeptors in einer veränderten Zusammensetzung dieses Komplexes begründet ist.

### **7.2.2. Alternative Zellmodelle für die Untersuchung des Zusammenwirkens von P2X7 und ADP-Ribosylierung**

Als alternative Zellkulturmodelle zur Untersuchung der Interaktion zwischen P2X7 und ART2 bieten sich beispielsweise zwei murine Zelllinien an. Zum einen die MD27-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit auf P2X7-Expression und ATP-induzierte YO-PRO1 Aufnahme untersucht wurden (**Abbildungen 19, 20, 21, 27**). Sie exprimieren endogen sowohl den P2X7-Rezeptor als auch eine ART, und bieten somit von sich aus das System einer doppelt positiven Zelllinie. Ein Nachteil dieses Modells ist es, dass die Zellen bezüglich der P451L-Mutation im P2X7-Rezeptor heterozygot sind, und die Auswirkung dieser Punktmutation an ihnen nicht untersucht werden kann.

Von der aus der BALB/c Maus gewonnenen Lymphomzelllinie YAC1 existieren seit kurzer Zeit in unserer Arbeitsgruppe zwei Varianten, von denen die eine endogene P2X7- und ART-Aktivität zeigt (YAC1.HH), während die andere dieses nicht tut (YAC1.ATCC). Damit bietet sich ein ideales System für Transfektionsstudien, was momentan getestet wird.

### **7.3. Auch andere eingezüchtete Mausstämme tragen die 451L-Mutation im P2X7-Rezeptor**

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die Inzidenz der 451L-Mutation in einigen häufig benutzten Mausstämmen untersucht (**Abbildung 18, Tabelle 9**). Da alle untersuchten nicht eingezüchteten Mäuse, sowohl der Spezies *Mus musculus* als auch der Arten *Mus spretus* und *Mus poschiavinus* das 451P-Allel tragen, und Mensch und Ratte überdies an der Position 451 ein P tragen, ist das 451P'-Allel vermutlich das in der Mausbevölkerung am meisten verbreitete Allel, und wurde von uns daher als Wildtypallel bezeichnet. Frühere Transfektionsstudien hatten den murinen P2X7-Rezeptor als weniger ATP-sensitiv beschrieben als den Rezeptor aus Ratte oder Mensch [86, 87]; dieses Ergebnis wird nun relativiert, da in diesen Untersuchungen die 451L-Variante des murinen



Rezeptors mit Wildtyprezeptoren (451P) aus Mensch und Ratte verglichen wurde. Auch die Untersuchungen, die mit P2X7-KO-Mäusen gemacht wurden, müssen vor dem Hintergrund interpretiert werden, dass beide bisher veröffentlichten KO-Mausmodelle auf Mausstämmen mit 451L-Phänotyp rückgekreuzt wurden; d.h. fehlender Rezeptor wurde mit einem partiell defekten verglichen [57, 72, 107, 121, 123, 125, 180, 191].

#### **7.4. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren P2X7-Rezeptoren, die sich jedoch in ihrer Aktivität unterscheiden**

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurden Expression, Genotyp und Funktion von P2X7 auf verschiedenen Zelllinien charakterisiert. Da in unserer Arbeitsgruppe häufig an Zellkulturmodellen die Effekte von Nukleotiden auf Zellen untersucht werden, erschienen diese Tests aufschlussreich. Alle untersuchten Zellen mit Ausnahme der HEK-T Linie exprimierten den P2X7-Rezeptor, was verdeutlicht, warum die HEK-T-Zellen für Transfektionsstudien mit dem P2X7-Rezeptor so geläufig sind. Als P2X7- und ART-doppelt positive Zelllinie waren die MD27 Zellen für unsere Arbeitsgruppe von besonderem Interesse. Um eine in Bezug auf ART2 und P2X7 funktionell aktive Zellpopulation zu erhalten, wurden sie per FACS nach ihrer ATP- oder NAD-induzierten PS-Ausstülpung oder nach ihrer ART-Aktivität (gemessen mittels 1G4-Anfärbung nach Inkubation mit eNAD und) sortiert. Alle sortierten MD27 Zellen zeigten im Western blot eine verstärkte Expression des P2X7-Rezeptors (**Abbildung 19**). Da die PS-Ausstülpung Folge der Aktivierung des P2X7-Rezeptors ist, entspricht es den Erwartungen, dass die nach ATP-induzierter PS-Ausstülpung sortierten Zellen eine verstärkte P2X7-Expression zeigen; auch die P2X7-Anreicherung in den nach NAD-induzierter PS-Ausstülpung sortierten Zellen ist leicht zu verstehen, wenn man das Modell des NICD zu Grunde legt. Bemerkenswerterweise war die P2X7-Expression jedoch auch gesteigert in Zellpopulationen, die mittels 1G4-Anfärbung auf hohe ART-Aktivität sortiert worden waren. Dass auch in dieser Zellpopulation der P2X7-Rezeptor angereichert wurde, ist ein Hinweis auf bisher unbekannte Verknüpfungen zwischen diesen beiden Oberflächenmolekülen.

Bei den Untersuchungen zur YO-PRO-1-Aufnahme ist interessant, dass alle Zellen mit Ausnahme der EL4-alt Zellen zwei Populationen zeigen, von denen sich eine resistent gegenüber der ATP-induzierten P2X7-Rezeptor-Aktivierung verhält (**Abbildung 21**). Auch hier kann spekuliert werden, dass ein aktiver P2X7-Rezeptor einen Selektionsnachteil darstellt, und sich somit im Laufe der Zellkulturpassagen zunehmend Zellen ohne oder mit inaktivem Rezeptor durchsetzen. Es ist daher denkbar, dass Zellkulturzellen aufgrund ihrer genetischen Plastizität die Expression des P2X7-Rezeptors abschalten. Bemerkenswert ist jedoch, dass die meisten untersuchten Zelllinien mit dem RH18 anti-P2X7 Antiserum als homogene Populationen anfärbbar waren (**Abbildung 27**). Es ist daher eher wahrscheinlich, dass die Zellen einen oder mehrerer stromabwärts gelegene Signalübertragungsmoleküle abschalten, und so den P2X7-Rezeptor von seinen zytotoxischen Effektorfunktionen „entkoppeln“. Ein Nebenprodukt dieser Beobachtungen ist die Erkenntnis, dass regelmäßiges Subklonieren der Zellen unumgänglich ist, um Zellpopulationen zu erhalten, die in Bezug auf P2X7 funktionell aktiv sind.

## **7.5. Ein neues Antiserum ermöglicht die Darstellung des nativen P2X7-Rezeptors**

Im vierten Abschnitt gelang mit dem neuen, mittels DNA-Immunisierung erzeugten Antiserum RH18 erstmals die Darstellung des nativen murinen P2X7-Rezeptors im FACS (**Abbildung 23**). Dadurch wurde sichtbar, dass die C57BL/6 Maus etwas weniger P2X7-Protein auf der Zelloberfläche trägt als ihre BALB/c Artgenossen (**Abbildung 26**). Ob dies ein allgemeiner Speziesunterschied oder Produkt der Mutation selber ist, ist hier nicht abschließend zu beantworten; jedoch liefert die Tatsache, dass in den mit den zwei allelen Varianten transfizierten HEK-T-Zellen jeweils eine vergleichbare Rezeptormenge exprimiert wird, einen Hinweis darauf, dass die Mutation die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche nicht beeinflusst. Auch reicht die an den T-Lymphozyten beobachtete unterschiedliche Expressionsdichte nicht aus, um die funktionellen Unterschiede zu erklären, da in den transfizierten HEK-T-Zellen bei gleicher Expressionsdichte ebenfalls Funktionseinbußen der 451L-Variante nachzuweisen sind.

Da sich Zellen in Kultur –wie ausführlich diskutiert- ständig verändern, sollte zukünftig bei funktionellen Untersuchungen des P2X7-Rezeptors jeweils die Expressionsdichte mitbestimmt werden, um beobachtete Phänomene damit korrelieren zu können.

Ungewöhnlich ist die Tatsache, dass das RH18 Serum den P2X7-Rezeptor auf T-Lymphozyten nur bei 37°C, auf den transfizierten HEK-T-Zellen jedoch auch bei 4°C erkennt. Dies könnte zum einen in einer schwachen Affinität des Antiserums zu dem P2X7-Rezeptor begründet sein, die auf den transfizierten Zellen durch die sehr starke Oberflächenexpression kompensiert wird, auf den Lymphozyten jedoch nicht mehr ausreicht, um eine für eine FACS-Anfärbung ausreichend starke Bindung einzugehen (vergleiche dazu den Western blot in **Abbildung 10**, der eine Abschätzung der P2X7-Menge pro Gesamtproteingehalt der Zelle erlaubt). Zum anderen ist denkbar, dass sich die „Umfelder“ des Rezeptors und damit die Zugänglichkeit für den Antikörper auf den sehr unterschiedlichen Zellen temperaturabhängig unterscheiden.

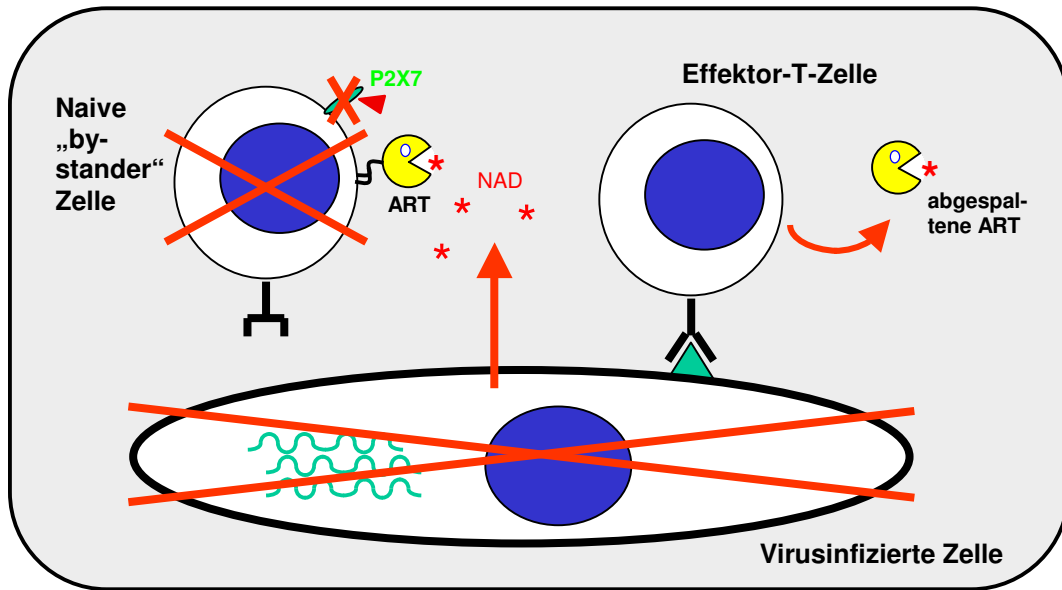
Die abschließende Bewertung des Antiserums RH18 ergibt, dass es im Gegensatz zu dem durch Peptidimmunisierung gewonnenen Antiserum von Alomone Labs den nativen Rezeptor erkennt und somit für Vitalzell-Immunfluoreszenz-Analysen einzusetzen ist. Es vermag die Funktionen des P2X7-Rezeptors, untersucht anhand der YO-PRO1-Aufnahme und der L-selectin (CD62L)-Abstoßung, nicht zu blockieren (**Abbildungen 28 und 29**), und präzipitiert zwar besser als das Alomone Labs-Serum, aber immer noch unzureichend (**Abbildung 30**). Da mittlerweile mit dem Serum K1G (von einem mittels DNA-Immunisierung gegen P2X7 immunisierten Kaninchen) ein viel potenteres Antiserum zur Verfügung steht, wurden weder die experimentellen Bedingungen für das RH18 Serum optimiert noch die Kreuzreaktivität gegenüber dem P2X7-Rezeptor anderer Spezies oder anderen P2X-Rezeptoren ermittelt.

## 7.6. P2X7, ADP-Ribosylierung und NICD als mögliche Kontrollmechanismen von Autoreaktivität

Die Frage nach den physiologischen Rollen sowohl des P2X7-Rezeptors als auch der ADP-Ribosylierung im Immunsystem ist bislang ungeklärt. Da ATP über verschiedene Rezeptoren das Zytokinmuster in seinem Umfeld beeinflussen und sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken kann, ist eine regulatorische Funktion vorstellbar. Den dendritischen Zellen, die eine Immunreaktion initiieren können, und dabei auch die Art der Immunreaktion (z.B. in Richtung einer Th1 oder Th2 gewichteten Immunantwort) mitbestimmen, wird derzeit besonderes Augenmerk gewidmet. La Sala et al haben die Hypothese veröffentlicht, dass die verfügbare Konzentration der Nukleotide die entscheidende Rolle für ihre regulatorischen Wirkungen spielt. Während laut Ansicht der Autoren hohe Nukleotiddosen Entzündungsreaktionen und das Abtöten von Pathogenen fördern, wirken geringe Dosen entzündungshemmend und immunmodulierend. In der Nachbarschaft geschädigter Zellen könnte ATP in niedrigen Dosen die Synthese proinflammatorischer Zytokine durch dendritische Zellen blockieren, und damit die T-Zell-Antwort in Richtung Th2 dirigieren, die weniger gewebsschädigend als eine Th1-Antwort ist. In den Lymphknoten könnte darüberhinaus das Priming der T-Zellen durch die toxischen Effekte von ATP beendet werden, das von aktivierten T-Zellen freigesetzt werden und via den P2X7-Rezeptor auf Antigen-präsentierende-Zellen wirken könnte [120].

Eine Hypothese unserer Arbeitsgruppe sieht ebenfalls eine immunregulierende Funktion in der ADP-Ribosylierung und dem NICD (NAD-induced T-cell death) (**Abbildung 34**): die Elimination nicht-Antigen-spezifischer „Bystander“-Zellen bei der Induktion einer Immunantwort. Dabei führt z.B. eine Virusinfektion zur Aktivierung und Expansion von antigenspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten, die in Folge der Aktivierung ihre ADP-Ribosyltransferase von der Zelloberfläche abspalten [105]. Die zytotoxischen T-Lymphozyten bewirken den Tod der virusinfizierten Zelle, was lokal die NAD- und ATP-Konzentration erhöht. Auf benachbarten naiven T-Zellen, so genannten „Bystander-Zellen“, die potentiell autoreaktiv sind, werden Zelloberflächenproteine – unter ihnen der P2X7-Rezeptor – ADP-ribosyliert und die Zellen damit in der Folge getötet. Die antigenspezifischen T-Lymphozyten sind durch die Abspaltung der eigenen ARTs vor diesem Schicksal geschützt.

Abbildung 34: Hypothese zur Funktion des NICD im Immunsystem



## 7.7. Perspektiven

Das zunehmende Wissen um die Bedeutung der Nukleotide außerhalb des Energiestoffwechsels eröffnet eine Vielzahl offener Fragen. So bietet auch die Thematik der vorliegenden Arbeit einige Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen; sowohl im Hinblick auf die P451L-Mutation im P2X7-Rezeptor als auch für das Zusammenwirken von P2X7-Rezeptor und ADP-Ribosylierung.

Ungeklärt ist die Frage, wie der P2X7-Rezeptor funktioniert und an welcher Stelle die 451L-Punktmutation dessen Funktion beeinträchtigt. Da der Rezeptor in der Zellmembran als Komplex mit vielen anderen Proteinen beschrieben wurde [109, 110], könnte versucht werden, diesen zu präzipitieren und die Komponenten jeweils der 451P und der 451L-Variante zu vergleichen. In diesem Zusammenhang könnte auch die Technik der „blue native PAGE Elektrophorese“ eingesetzt werden, bei denen Multiprotein-Komplexe unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden können [110, 151]. Mit Hilfe eines sogenannten DNA- oder Gen-Chips (Microarray) könnten die Expressionsmuster von Zellen in Abhängigkeit vom P2X7-Genotyp verglichen werden. Offen ist auch, welchen Einfluss die Mutation auf intrazelluläre Ereignisse nach der Rezeptoraktivierung nimmt. Die in der Literatur beschriebenen Signalübertragungswege, z.B. die Aktivierung

von MAP-Kinasen oder des Transkriptionsfaktors NF-kappaB, könnten auf Unterschiede je nach P2X7-Genotyp getestet werden.

In Hinblick auf das Zusammenwirken von P2X7-Rezeptor und ADP-Ribosylierung muss zunächst geklärt werden, welcher Argininrest im P2X7-Rezeptor ADP-ribosyliert wird und auf welche Art und Weise der Rezeptor durch die ADP-Ribosylierung aktiviert wird.

Für die weitergehende Untersuchung der Rolle der ADP-Ribosylierung im Immunsystem ist es sehr hilfreich, dass bereits ART2-KO-Mäuse existieren [157]. Diese sind in steriler Tierhaltung fertil und phänotypisch unauffällig. Erst wenn das Immunsystem dieser ART-defizienten Mäuse durch Immunisierungen oder Infektionen herausgefordert wird, kann beurteilt werden, ob der Verlust von ARTs tatsächlich mit einer erhöhten Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen einhergeht. Für diese Fragestellung ist auch die Rückkreuzung der ART-KO-Mäuse auf den NOD-Mausstamm sinnvoll, der ein Tiermodell für die Entwicklung eines autoimmunen insulinpflichtigen Diabetes mellitus darstellt.

Interessant ist ebenfalls die Frage, ob der P2X7-Rezeptor auf dendritischen Zellen die Antigenpräsentation und/oder deren Zytokinprofil beeinflusst.

Mittelfristig sollte die Herstellung einer P2X7-KO-Maus auf Wildtypgrundlage (451P) angestrebt werden, um die Auswirkungen der P2X7-Defizienz besser beurteilen zu können.

Bei der Beurteilung der anhand von ART2.2 gewonnenen Erkenntnisse über die ADP-Ribosylierung muss bedacht werden, dass ART2 im menschlichen Genom aufgrund eines vorzeitigen Stopcodons als Pseudogen vorliegt und die Erkenntnisse daher nicht ohne weiteres vom murinen auf das humane System übertragen werden können.

Langfristig erscheinen sowohl die ADP-Ribosylierung wie auch die Purinorezeptoren als interessante pharmakologische Targets. Als extrazelluläre Moleküle sind sie verhältnismäßig leicht erreichbare Ziele, um Einfluss auf nukleotidvermittelte physiologische oder pathophysiologische Vorgänge zu nehmen. Beispielsweise schützt *in vitro* die Vorinkubation mit eNAD, einem nur an der Adeningruppe modifizierten NAD, Zellen komplett vor dem NICD [178]; dies illustriert die Möglichkeit, ART-vermittelte Effekte durch die Herstellung von modifiziertem NAD zu beeinflussen, indem statt ADP-Ribose eine X-Ribosegruppe auf Zielproteine der ARTs übertragen wird.

Die Gruppe der Thienopyridine mit ihrem bekanntesten Vertreter *Clopidogrel* (Iscover®, Plavix®) hat sich als Inhibitor der thrombozytären P2Y1-Rezeptoren mittlerweile ihren festen Platz in der Thrombembolieprophylaxe erobert und ist für diese Indikation eine Alternative zu Acetylsalicylsäure. Sie ist ein gutes Beispiel dafür, wie durch Erkenntnisse der Grundlagenforschung eine gezieltere und damit nebenwirkungsärmere Pharmakotherapie möglich wird.

Die Aussicht, mit Hilfe des P2X7-Rezeptors zukünftig so wichtige Prozesse wie den programmierten Zelltod oder die Zytokinproduktion beeinflussen zu können, erscheint gerade vor dem Hintergrund, dass in letzter Zeit vermehrt pathophysiologische Assoziationen mit dem P2X7-Rezeptor entdeckt wurden (vergleiche 4.3.7), verlockend!

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von Nukleotiden im Immunsystem, im speziellen mit dem ATP-Rezeptor P2X7 und dessen Zusammenwirken mit der ADP-Ribosyltransferase ART2. Eine natürlich vorkommende Mutation im murinen P2X7-Rezeptor (P451L) beeinträchtigt zahlreiche seiner Effekte; dazu gehören der ATP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss, die Öffnung einer großen, unselektiven Pore (gemessen anhand der Aufnahme des Farbstoffes YO-PRO 1), die Induktion von Apoptose und die Abstoßung von L-selectin (CD62L); die Prozessierung von prä-IL1 $\beta$  zu reifem IL1 $\beta$  scheint dagegen unbeeinflusst. Die Punktmutation liegt intrazellulär im C-Terminus des P2X7-Rezeptors, in einem Bereich, der Homologien mit einer TNF-Rezeptor-Todesdomäne und einer SH3-Bindedomäne aufweist.

Die Punktmutation ist unter zahlreichen eingezüchteten Mausstämmen verbreitet, dazu zählen C57-, DBA-, NZB und SB/LE-Mäuse. Auch in einigen der untersuchten Zelllinien ist die Mutation nachweisbar.

Durch DNA-Immunisierung gelang die Produktion eines Antiserums gegen P2X7, das den nativ gefalteten Rezeptor erkennt und somit in der Lage ist, die Expressionsdichte des Rezeptors auf der Zelloberfläche zu bestimmen. Zwar zeigte sich an murinen T-Lymphozyten ein geringer Unterschied in der Expression zwischen Mäusen mit Wildtyprezeptor (BALB/c) oder Mutation (C57BL/6); dieser ist jedoch nicht ausreichend, um die funktionellen Differenzen zu erklären.

Der P2X7-Rezeptor ist auf T-Lymphozyten ein Zielprotein der ADP-Ribosyltransferase ART2 und kann auf diesem Weg durch vergleichsweise geringe NAD-Konzentrationen (ca. ein Hundertstel der benötigten ATP-Konzentrationen) aktiviert werden; als ein Vermittler des „NAD-induced T-cell death“ (NICD) ist er möglicherweise an der Regulation des Immunsystems beteiligt.

Die funktionelle Etablierung einer P2X7- und ART2.2-doppelt transfizierten Zelllinie gelang im Rahmen dieser Arbeit leider nicht. Jedoch können die dabei gesammelten Erfahrungen zum einen bei folgenden Transfektionsstudien hilfreich sein, zum anderen stützen sie die These, dass die gemeinsame Expression von P2X7-Rezeptor und ADP-Ribosyltransferasen für Zellen einen Selektionsnachteil darstellt.



## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adinolfi, E., L. Melchiorri, S. Falzoni, P. Chiozzi, A. Morelli, A. Tieghi, A. Cuneo, G. Castoldi, F. Di Virgilio, and O. Baricordi, P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002. **99**(2): p. 706-708.
2. Adriouch, S., W. Ohlrogge, F. Haag, F. Koch-Nolte, and M. Seman, 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.*, 2001. **167**(1): p. 196-203.
3. Adriouch, S., C. Dox, V. Welge, M. Seman, F. Koch-Nolte, and F. Haag, Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor. *J. Immunol.*, 2002. **169**(8): p. 4108-4112.
4. Aga, M., J. Watters, Z. Pfeiffer, G. Wiepz, J. Sommer, and P. Bertics, Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NK-kappaB signaling pathway in murine RAW 264.7 macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **286**: p. C923-930.
5. Agadjanyan, M.G., N.N. Trivedi, S. Kudchodkar, M. Bennet, W. Levine, A. Lin, J. Boyer, D. Levy, K.E. Ugen, J.J. Kim, and D.B. Weiner, An HIV type 2 DNA vaccine induces cross-reactive immune response against HIV type 2 and SIV. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, 1997. **13**: p. 1561-1572.
6. Aktas, O., U. Wendling, R. Zschenderlein, and F. Zipp, Apoptose bei multipler Sklerose. *Nervenarzt*, 2000. **71**: p. 767-773.
7. al-Awqati, Q., Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science*, 1995. **269**: p. 805-806.
8. Armstrong, J., T. Brust, R. Lewis, and B. MacVicar, Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*, 2002. **22**: p. 5938-5945.
9. Baricordi, O., D. Ferrari, L. Melchiorri, P. Chiozzi, S. Hanau, E. Chiari, M. Rubini, and F. Di Virgilio, An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood*, 1996. **87**: p. 682-690.
10. Bergfeld, G. and T. Forrester, Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular research*, 1992. **26**: p. 40-47.
11. Bernikov, L., K. Dzhandzhugazyan, S. Lutsenko, and N. Modyanov, Dialdehyd ATP derivatives as an affinity modifier of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase active site. *European Journal of Biochemistry*, 1990. **194**: p. 413-421.
12. Bissagio, R., O. Nihei, P. Persechini, W. Savino, and L. Alves, Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells. *Cellular & Molecular Biology*, 2001. **47**: p. 19-31.
13. Blanchard, D., S. McMillen, and J. Djeu, INF-gamma enhances sensitivity of human macrophages to extracellular ATP-mediated lysis. *Journal of Immunology*, 1991. **147**: p. 2579-2585.
14. Bodin, P., P. Milner, R. Winter, and G. Burnstock, Chronic hypoxia changes the ratio of endothelin to ATP release from rat aortic endothelial cells exposed to high

- flow. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Science*, 1992. **247**: p. 131-135.
15. Bodin, P. and G. Burnstock, Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflammation Research*, 1998. **47**: p. 351-354.
  16. Bortner, C., F. Hughes, and J. Cidlowski, Primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Efflux in the activation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**: p. 32436-32442.
  17. Boyle, J.S., A. Silva, J.L. Brady, and A.M. Lew, DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(26): p. 14626-31.
  18. Bradford, M. and S. Soltoff, P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochemical Journal*, 2002. **366**: p. 745-755.
  19. Brandle, U., P. Spielmanns, R. Osteroth, J. Sim, A. Surprenant, G. Buell, J. Ruppertsberg, P. Plinkert, H. Zenner, and E. Glowatzki, Desensibilization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Letters*, 1997. **404**: p. 294-298.
  20. Brandle, U., K. Kohler, and T. Wheeler-Schilling, Expression of P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1998. **62**(106-109).
  21. Braunstein, G., R. Roman, J. Clancy, B. Kudlow, A. Taylor, V. Shylonsky, B. Jovov, K. Peter, T. Jilling, I. Ismailov, D. Benos, L. Schwiebert, J. Fitz, and E. Schwiebert, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**: p. 6621-6630.
  22. Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, and A. De Flora, Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *Faseb. J.*, 2001. **15**(1): p. 10-12.
  23. Budagian, V., E. Bulanova, L. Brovko, Z. Orinska, R. Fayad, R. Paus, and S. Bulfone-Paus, Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56<sup>lck</sup>, MAP kinases and transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**: p. 1549-1560.
  24. Buell, G. and F. Rassendren, P2X: The ionotropic receptor for extracellular ATP. *Drug Development Research*, 1998. **45**: p. 125-129.
  25. Burnstock, G., *A basis for distinguishing two types of purinergic receptors*, in *Cell membrane receptors for drugs and hormones*, L. Bolis and R. Straub, Editors. 1978, Raven Press: New York. p. 107-118.
  26. Burnstock, G. and C. Kennedy, Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology*, 1985. **16**: p. 433-440.
  27. Burnstock, G., Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(3): p. 364-373.
  28. Canady, D., R. Beigi, R. Silver, C. Harding, W. Boom, and G. Dubyak, ATP and control of intracellular growth of mycobacteria by T cells. *Infect. Immun.*, 2002. **70**: p. 6456-6459.
  29. Cavaliere, F., G. Sancesario, G. Bernadi, and C. Volonte, Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFRp75 receptors. *Neurochemistry*, 2002. **83**: p. 1129-1138.

30. Cavaliere, F., F. Florenzano, S. Amadio, F. Fusco, M. Viscomi, N. D'Ambrosi, F. Vacca, G. Sancesario, G. Bernadi, M. Molinari, and C. Volonte, Up-regulation of P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> receptor and ischemic cell death: prevention by P<sub>2</sub> antagonists. *Neuroscience*, 2003. **120**: p. 85-98.
31. Cena, V. and E. Rojas, Kinetic characteristics of calcium-dependent, cholinergic receptor controlled ATP secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1990. **1023**: p. 213-222.
32. Chiozzi, P., M. Murgia, S. Falzoni, D. Ferrari, and F. Di Virgilio, Role of purinergic P<sub>2Z</sub> receptor in sponaneous cell death in J774 macrophage cultures. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1996. **218**: p. 176-181.
33. Chiozzi, P., J. Sanz, D. Ferrari, S. Falzoni, A. Aleotti, G. Buell, G. Collo, and F. Di Virgilio, Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P<sub>2Z</sub>/P<sub>2X7</sub> receptor. *Journal of Cell Biology*, 1997. **138**: p. 697-706.
34. Chow, S., G. Kass, and S. Orrenius, Purines and their role in apoptosis. *Neuropharmacology*, 1997. **36**(9): p. 1149-56.
35. Chused, T., S. Apasov, and M. Sitkovsky, Murine T Lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P<sub>2Z</sub>-type purinoreceptor during differentiation. *Journal of Immunology*, 1996. **157**: p. 1371-1380.
36. Chvatchko, Y., S. Valera, J. Aubry, T. Renno, G. Buell, and J. Bonnefoy, The involvement of an ATP-gated ion channel, P<sub>2X1</sub>, in thymocyte apoptosis. *Immunity*, 1996. **5**: p. 275-283.
37. Conigrave, A., K. Fernando, B. Gu, V. Tasevski, W. Zhang, B. Luttrell, and J. Wiley, P<sub>2Y</sub>(11) receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 2001. **426**: p. 157-163.
38. Cook, S. and E. McCleskey, Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*, 2002. **95**: p. 41-47.
39. Coutinho-Silva, R., L. Alves, A. de Carvalho, W. Savino, and P. Persechini, Characterization of P<sub>2Z</sub> purinergic receptors on phagocytic cells in the thymic reticulum in culture. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1996. **1280**: p. 217-222.
40. Coutinho-Silva, R., P. Persechini, R. Bissagio, J. Perfettini, A. Neto, J. Kanellopoulos, M. Motta-Ly, A. Dautry-Vasat, and D. Ojcius, P<sub>2Z</sub>/P<sub>2X7</sub> receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *American Journal of Physiology*, 1999. **276**: p. C1139-1147.
41. Coutinho-Silva, R., M. Parsons, T. Robson, J. Lincoln, and G. Burnstock, P<sub>2X</sub> and P<sub>2Y</sub> purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. **204**(1-2): p. 141-154.
42. Dalziel, H. and D. Westfall, Receptors for adenin nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution and molecular characterization. *Pharmacological reviews*, 1994. **46**: p. 449-466.
43. Denlinger, L., P. Fiset, J. Sommer, J. Watters, U. Prabhu, G. Dubyak, R. Proctor, and P. Bertics, Cutting edge: The Nucleotide Receptor P<sub>2X7</sub> Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, 2001. **167**(4): p. 1871-1876.
44. Dhulipala, P., Y. Wang, and M. Kotlikoff, The human P<sub>2X4</sub> receptor gene is alternatively spliced. *Gene*, 1998. **207**: p. 259-266.
45. Di Virgilio, F., V. Bronte, D. Collavo, and P. Zanovello, Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine-5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with

- cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *Journal of Immunology*, 1989. **143**: p. 1955-1960.
46. Di Virgilio, F., The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunology Today*, 1995. **16**: p. 524-528.
  47. Di Virgilio, F., P. Zanovello, A. Zambon, V. Bronte, P. Pizzo, and M. Murgia, Cell membrane receptors for extracellular ATP: a new family of apoptosis signaling molecules. *Fundam Clin Immunol.*, 1995. **3**: p. 80-81.
  48. Di Virgilio, F., P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J. Sanz, V. Venketaraman, and O. Baricordi, Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ*, 1998. **5**(3): p. 191-199.
  49. Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi, and O. Baricordi, Nucleotid receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, 2001. **97**: p. 587-600.
  50. Donnelly-Roberts, D., M. Namovic, C. Faltynek, and M. Jarvis, Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **308**: p. 1053-1061.
  51. Donze, O., J. Deng, J. Curran, R. Sladek, D. Picard, and N. Sonnenberg, The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. *EMBO Journal*, 2004. **23**(3): p. 564-571.
  52. Dubyak, G. and C. el-Moatassim, Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Journal of Physiology*, 1993. **265**: p. C577-606.
  53. Elliott, J. and C. Higgins, Major Histocompatibility Complex Class I Shedding and Programmed Cell Death Stimulated Through the Proinflammatory P2X7 Receptor: A Candidate Susceptibility Gene for NOD Diabetis. *Diabetis*, 2004. **53**(8): p. 2012-2017.
  54. el-Moatassim, C. and G. Dubyak, A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**: p. 23664-23673.
  55. el-Moatassim, C. and G. Dubyak, Dissociation of pore forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. Product inhibition of phospholipase D enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**: p. 15571-15578.
  56. Ennion, S., S. Hagan, and R. Evans, The role of the positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**: p. 29361.
  57. Fairbairn, I., C. Stober, D. Kumararatne, and D. Lammas, ATP-Mediated Killing of Intracellular Mycobacteria by Makrophages Is a P2X7-Dependent Process Inducing Bacterial Death by Phagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Immunology*, 2001. **167**: p. 3300-3307.
  58. Falzoni, S., M. Munerati, D. Ferrari, S. Spisani, S. Moretti, and F. Di Virgilio, The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *Journal of Clinical Investigation*, 1995. **95**: p. 1207-1216.
  59. Fernando, K., C. Gargett, and J. Wiley, Activation of the P2Z/P2X7 receptor in human lymphocytes produces a delayed permeability lesion: involvement of phospholipase D. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1999. **362**: p. 197-202.

60. Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O. Baricordi, and F. Di Virgilio, Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *Journal of Immunology*, 1997. **159**: p. 1451-1458.
61. Ferrari, D., S. Wesselborg, M. Bauer, and K. Schulze-Osthoff, Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *Journal of Cell Biology*, 1997. **139**: p. 1635-1643.
62. Ferrari, D., M. Los, M. Bauer, P. Vandenameele, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff, P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Letters*, 1999. **447**: p. 71-75.
63. Ferrari, D., M. Idzko, S. Dichmann, D. Purlis, C. Virchow, J. Norgauer, P. Chiozzi, F. Di Virgilio, and W. Luttmann, P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Letters*, 2000. **486**: p. 217-224.
64. Ferrero, E., F. Saccucci, and F. Malavasi, The making of a leukocyte receptor: origin, genes and regulation of human CD38 and related molecules. *Chem. Immunol.*, 2000. **75**: p. 1-19.
65. Formigli, N., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. Orlandini, S. Capaccioli, and S. Orlandini, Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 2000. **182**: p. 41-49.
66. Forrester, T., Release of ATP from heart. Presentation of a release model using human erythrocyte. *Annals of the New York Academy of Science*, 1990. **603**: p. 335-351.
67. Fredholm, B., Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacology & Toxicology*, 1995. **76**: p. 228-239.
68. Fredholm, B., A. Ijzermann, K. Jacobsen, K. Klotz, and J. Linden, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 2001. **53**: p. 527-552.
69. Fynan, E.F., R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro, and H.L. Robinson, DNA vaccines: protektive immunization by parenteral, muscuosal and gen-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**: p. 11478-11482.
70. Gargett, C., J. Cornish, and J. Wiley, Phospholipase D activation by P2Z-purinoceptor agonists in human lymphocytes is dependent on bivalent cation influx. *Biochemical Journal*, 1996. **313**: p. 529-535.
71. Gargett, C., J. Cornish, and J. Wiley, ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *British Journal of Pharmacology*, 1997. **122**: p. 911-917.
72. Gartland, A., K. Buckley, R. Hipskind, M. Perry, J. Tobias, G. Buell, I. Chessell, W. Bowler, and J. Gallagher, Multinucleated osteoclast formation in vivo and in vitro by P2X7 receptor-deficient mice. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2003. **13**: p. 243-253.
73. Gerloni, M., W.R. Baliou, R. Billetta, and M. Zanetti, Immunity to Plasmodium falciparum malaria sporozoites by somatic transgene immunization. *Nat. Biotechnol.*, 1997. **15**: p. 876-881.
74. Goldenberg, S., N. Veriabo, and G. Soslau, A micromethod to measure platelet aggregation and ATP release by impedance. *Thrombosis Research*, 2001. **103**: p. 51-57.

75. Gordon, J., Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal*, 1986. **233**: p. 309-319.
76. Grahames, C., A. Michel, I. Chessell, and P. Humphrey, Pharmacological characterization of ATP- and LPS- induced IL-1 beta release in human monocytes. *British Journal of Pharmacology*, 1999. **127**: p. 1915-1921.
77. Greenberg, S., F. Di Virgilio, T. Steinberg, and S. Silverstein, Extracellular nucleotides mediate Ca<sup>2+</sup> fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**: p. 10337-10343.
78. Gu, B., L. Bendall, and J. Wiley, Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, 1998. **92**: p. 946-951.
79. Gu, B., W. Zhang, L. Bendall, I. Chessell, G. Buell, and J. Wiley, Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **279**(4): p. C1189-1197.
80. Gu, B., W. Zhang, R. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J. Barden, and J. Wiley, A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(14): p. 11135-11142.
81. Gu, B., *The P2X7 receptor of human leukocytes*, in *Departement of Medicine Nepean Hospital*. 2003, University of Sydney: Sydney.
82. Gu, B., R. Sluyter, K. Skarratt, A. Shemon, P. Dao-Ung, S. Fuller, J. Barden, A. Clarke, S. Petrou, and J. Wiley, An Arg-307 to Gln Polymorphism within the ATP-binding site causes loss-of-function of the human P2X7 receptor. 2004.
83. Guerra, A., P. Fiset, Z. Pfeiffer, B. Quinchia-Rios, U. Prabhu, M. Aga, L. Denlinger, A. Guadarrama, J. Sommer, R. Proctor, and P. Bertics, Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. *Journal of Endotoxin Research*, 2003. **9**: p. 256-263.
84. Han, S., J.A. Craig, C.D. Putnam, N.B. Carozzi, and J.A. Tainer, Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(10): p. 932-936.
85. Harlow, E. and D. Lane, *Antibodies, a laboratory manual*. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
86. Hibell, A., E. Kidd, I. Chessell, P. Humphrey, and A. Michel, Apparent species differences in the kinetic properties of P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 2000. **130**: p. 167.
87. Hibell, A., K. Thompson, J. Simon, M. Xing, P. Humphrey, and A. Michel, Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2001. **363**: p. 639.
88. Hibell, A., K. Thompson, M. Xing, P. Humphrey, and A. Michel, Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 2001. **296**: p. 947-957.
89. Hickman, S., J. el Khoury, S. Greenberg, I. Schieren, and S. Silverstein, P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte derived macrophages. *Blood*, 1994. **84**: p. 2452-2456.
90. Hidaka, H. and R. Kobayashi, Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 1992. **32**: p. 377-397.
91. Holton, P., The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *Journal of Physiology*, 1959. **145**: p. 495-504.

92. Honjo, T., Y. Nishizuka, O. Hayaishi, and I. Kato, Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1968. **243**: p. 3553-3555.
93. Hopfner, M., K. Maaser, B. Barthel, B. von Lampe, C. Hanski, E. Riecken, M. Zeitz, and H. Scherubl, Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis*, 2001. **16**: p. 154-166.
94. Howard, M., J.C. Grimaldi, J.F. Bazan, F.E. Lund, A.L. Santos, R.M. Parkhouse, T.F. Walseth, and H.C. Lee, Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, 1993. **262**(5136): p. 1056-1059.
95. Hu, Y., P. Fiset, L. Denlinger, A. Guadarrama, J. Sommer, R. Proctor, and P. Bertics, Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**: p. 27170-27175.
96. Humphreys, B. and G. Dubyak, Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and INF-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *Journal of Immunology*, 1996. **157**: p. 5627-5637.
97. Humphreys, B. and G. Dubyak, Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *Journal of Leucocyte Biology*, 1998. **64**: p. 265-273.
98. Humphreys, B., J. Rice, S. Kertesz, and G. Dubyak, Stress-activated protein kinase/ JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**: p. 26792-26798.
99. Hung, A. and S. Sun, The P2X7 receptor mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signaling*, 2002. **14**: p. 83-92.
100. Imai, M., C. Goepfert, E. Kaczmarek, and S. Robson, CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2000. **270**: p. 272-278.
101. Jacobsen, K., P. van Galen, and M. Williams, Adenosin receptors: pharmacology, structure-activity relationships and therapeutic potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1992. **35**: p. 407-422.
102. Jacobsen, K., M. Jarvis, and M. Williams, Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. *J. Medicinal Chemistry*, 2002. **45**(19): p. 4057-4093.
103. Jamieson, G., M. Snook, P. Thurlow, and J. Wiley, Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *Journal of Cellular Physiology*, 1996. **166**: p. 637-642.
104. Jiang, L., F. Rassendren, A. Surprenant, and R. North, Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**: p. 34190.
105. Kahl, S., M. Nissen, R. Girisch, T. Duffy, E.H. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte, Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J. Immunol.*, 2000. **165**(8): p. 4463-4469.
106. Kahlenberg, J. and G. Dubyak, Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**: p. C1100-1108.

107. Ke, H., H. Qi, A. Weidema, Q. Zhang, N. Panupinthu, D. Crawford, W. Grasser, V. Paralkar, M. Li, L. Audoly, C. Gabel, W. Jee, S. Dixon, S. Sims, and D. Thompson, Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**: p. 1356-1367.
108. Khakh, B., G. Burnstock, C. Kennedy, B. King, R. North, P. Seguela, M. Voigt, and P. Humphrey, Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*, 2001. **53**: p. 107-118.
109. Kim, M., L. Jiang, H. Wilson, R. North, and A. Surprenant, Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO Journal*, 2001. **20**: p. 6347-6358.
110. Kim, M., V. Spelta, J. Sim, R. North, and A. Surprenant, Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**: p. 23262-23267.
111. Klapperstuck, M., C. Buttner, G. Schmalzing, and F. Markwardt, Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X7 receptor. *Journal of Physiology*, 2001. **534**: p. 25-35.
112. Kochetkov, S., T. Bulargina, L. Sashchenko, and E. Severin, Studies on the mechanism of action of histone kinase dependent on adenosin 3',5'-monophosphate. Evidence for involvement of histidine and lysine residues in the phosphotransferase reaction. *European Journal of Biochemistry*, 1977. **81**: p. 111-118.
113. Koch-Nolte, F., F. Haag, F. Iglauer, and J. Dimigen, DNA immunization is an efficient mechanism to raise antibodies against human and murine cell surface antigens. *36. Jahrestagung der Ges. f. Versuchstierkunde, Hamburg*, 1998.
114. Krammer, P.H., CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000. **407**: p. 789-795.
115. Krebs, C., W. Koestner, M. Nissen, V. Welge, I. Parusel, F. Malavasi, E. Leiter, R.M. Santella, F. Haag, and F. Koch-Nolte, Flow cytometric and immunoblot assays for monitoring cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for etheno-adenosine. *Anal. Biochem.*, 2003. **314**: p. 108-115.
116. Kukley, M., J. Barden, C. Steinhauser, and R. Jabs, Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia*, 2001. **36**: p. 11-21.
117. Kuntz, G., S. Eber, W. Kessler, H. Krietsch, and W. Krietsch, Isolation of phosphoglycerate kinases by affinity chromatography. *European Journal of Biochemistry*, 1978. **85**: p. 493-501.
118. Kusner, D. and J. Adams, ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human Makrophages requires phospholipase D. *Journal of Immunology*, 2000. **164**: p. 379.
119. Kusner, D. and J. Barden, ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent Mycobacterium tuberculosis via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *Journal of Immunology*, 2001. **167**: p. 3308-3315.
120. la Sala, A., D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer, and G. Girolomoni, Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *Journal of Leucocyte Biology*, 2003. **73**: p. 339-343.
121. Labasi, J., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. Payette, W. Brissette, J. Wicks, L. Audoly, and C. Gabel, Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J. Immunol.*, 2002. **168**: p. 6436-6445.



122. Lammas, D., C. Stober, C. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam, and D. Kumararatne, ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*, 1997. **7**: p. 433-444.
123. Le Feuvre, R., D. Brough, Y. Iwakura, K. Takeda, and N. Rothwell, Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via caspase-1 dependent mechanism, independently of cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**: p. 3210-3218.
124. Le Feuvre, R., D. Brough, O. Touzani, and N. Rothwell, Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. **23**(3): p. 381-384.
125. Le Stunff, H., R. Auger, J. Kanellopoulos, and M.-N. Raymond, The Pro-451 to Leu Polymorphism within the C-terminal Tail of P2X7 Receptor Impairs Cell Death but not Phospholipase D Activation in Murine Thymocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**: p. 16918-16926.
126. Lee, H.C., R.M. Graeff, and T.F. Walseth, ADP-ribosyl cyclase and CD38. Multifunctional enzymes in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Adv Exp Med Biol*, 1997. **419**(411): p. 411-9.
127. Leist, M. and M. Jäätelä, Four Death and a Funeral: From Caspases To Alternative Mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.*, 2001. **2**: p. 589-598.
128. Li, C., S. Campbell, D. Kumararatne, A. Hill, and D. Lammas, Response heterogeneity of human macrophages to ATP is associated with P2X7 receptor expression but not to polymorphisms in the P2X7 promoter. *FEBS Letters*, 2002. **531**: p. 127-131.
129. Lin, W., J.C. Ame, E.N. Aboul, E.L. Jacobson, and M.K. Jacobson, Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP- ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 11895-901.
130. Londos, C., D. Cooper, and J. Wolff, Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A*, 1980. **77**: p. 2551-1554.
131. Lowe, P. and R. Beechey, Interactions between the mitochondrial adenosinetriphosphatase and periodate-oxidized adenosin 5'-triphosphate, an affinity label for adenosin 5'-triphosphate binding sites. *Biochemistry*, 1982. **21**: p. 4073-4082.
132. Ludden, P.W., Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1994. **138**: p. 123-129.
133. Lund, F., N. Solvason, J.C. Grimaldi, R.M.E. Parkhouse, and M. Howard, Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol Today*, 1995. **16**: p. 469-473.
134. Malavasi, F., A. Funaro, S. Roggero, A. Horenstein, L. Calosso, and K. Mehta, Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today*, 1994. **15**: p. 95-97.
135. Markwardt, F., M. Lohn, T. Bohm, and M. Klapperstuck, Purinoceptor operated cationic channels in human B lymphocytes. *Journal of Physiology*, 1997. **498**: p. 143-151.
136. Matsuka, Y., J. Neubert, N. Maidment, and I. Spigelman, Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. *Brain Research*, 2001. **915**: p. 248-255.
137. Matsuo, K., T. Katsuragi, S. Fujiki, C. Sato, and T. Furukawa, ATP release and contraction mediated by different P2-receptor subtypes in guinea-pig ileal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 1997. **121**: p. 1744-1748.

138. McKenzie, A., H. Wilson, E. Kiss-Toth, S. Dower, R. North, and A. Surprenant, Rapid secretion of interleukin-1 beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 2001. **15**: p. 825-835.
139. McMahon, K.K., K.J. Piron, V.T. Ha, and A.T. Fullerton, Developmental and biochemical characteristics of the cardiac membrane-bound arginine-specific mono-ADP-ribosyltransferase. *Biochem J*, 1993. **293**: p. 789-793.
140. Mehta, V., J. Hart, and M. Wewers, ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1 beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**: p. 3820-3826.
141. Merighi, S., P. Mirandola, D. Milani, K. Varani, S. Gessi, K. Klotz, E. Leung, P. Baraldi, and P. Borea, Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human myeloma cells. *J Invest Dermatol*, 2002. **119**: p. 923-933.
142. Merighi, S., P. Mirandola, K. Varani, S. Gessi, E. Leung, P. Baraldi, M. Tabrizi, and P. Borea, A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther*, 2003. **100**: p. 31-48.
143. Mizuno, K., H. Okamoto, and T. Horio, Heightened ability of monocytes from sarcoidosis patients to form multi-nucleated giant cells in vitro by supernatants of concanavalin A-stimulated mononuclear cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 2001. **126**(1): p. 151-156.
144. Mizuno, K., H. Okamoto, and T. Horio, Inhibitory influences of xanthine oxidase inhibitor and angiotensin I-converting enzyme inhibitor on multinucleated giant cell formation from monocytes by downregulation of adhesion molecules and purinergic receptors. *Br J Dermatol*, 2004. **150**(2): p. 205-210.
145. Morelli, A., P. Chiozzi, A. Chiesa, D. Ferrari, J. Sanz, S. Falzoni, P. Pinton, R. Rizzuto, M. Olson, and F. Di Virgilio, Extracellular ATP causes ROCK I - dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**: p. 2655-2664.
146. Moss, J., A. Zolkiewska, and I. Okazaki, ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997. **419**(25): p. 25-33.
147. Mueller-Dieckmann, C., H. Ritter, F. Haag, F. Koch-Nolte, and G. Schulz, Structure of the Ecto-ADP-ribosyl Transferase ART2.2 from Rat. *J. Mol. Biol.*, 2002. **322**(4): p. 687-696.
148. Mühlhardt, C., Molekularbiologie / Genomics. Der Experimentator. 2002, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
149. Nagy, P., T. Feher, S. Morga, and J. Matko, Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol Lett*, 2000. **72**: p. 23-30.
150. Naumov, A., E. Kaznacheyeva, K. Kiselyov, Y. Kuryshev, A. Mamin, and G. Mozhayeva, ATP-activated inward current and calcium-permeable channels in rat macrophage plasma membranes. *Journal of Physiology*, 1995. **486**: p. 323-337.
151. Nicke, A., H. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing, P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO Journal*, 1998. **17**: p. 3016-3028.
152. Nihei, O., A. de Carvalho, W. Savino, and L. Alves, Pharmacological properties of P2z/P2X7 receptor characterized in murine dendritic cells: role of the induction of apoptosis. *Blood*, 2000. **96**: p. 996-1005.

153. North, R., Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 2002. **82**(4): p. 1013-1067.
154. North, R.A., Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 2002. **82**(4): p. 1013-1067.
155. Nuckel, H., U. Frey, J. Durig, U. Duhrsen, and W. Siffert, 1513A/C polymorphism in the P2X7 receptor gene in chronic lymphocytic leukemia: absence of correlation with clinical outcome. *Eur J Haematol*, 2004. **72**(4): p. 259-263.
156. Nuttle, L. and G. Dubyak, Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**: p. 13988-13996.
157. Ohlrogge, W., *ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) und Immunfunktionen: Folge von ART-Gendefekten für Immunfunktionen*, in *Fachbereich Biologie der Universität Hamburg*. 2001: Hamburg.
158. Osipchuk, Y. and M. Cahalan, Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature*, 1992. **359**(241-244).
159. Parvathenani, L., S. Tertyschnikova, C. Greco, S. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur, P2X7 mediates superoxid production im primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 2003.
160. Peng, L., C. Bradley, and J. Wiley, Study on apoptosis of leukemic lymphocytes mediated by purinergic P2Z receptors. *Chung-Hua Hsueh Yeh Hsueh Tsa Chih: Chinese Journal of Hematology*, 1998. **19**: p. 398-401.
161. Perregaux, D. and C. Gabel, Human monocyte stimulus-coupled IL-1 beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *American Journal of Physiology*, 1998. **275**: p. C1538-1547.
162. Pertmer, T.M., M.D. Eisenbraun, D. McCabe, S.K. Prayaga, D.H. Fuller, and J.R. Haynes, Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine*, 1995. **13**(15): p. 1427-1430.
163. Pfeiffer, Z., M. Aga, U. Prabhu, J. Watters, D. Hall, and P. Bertics, The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol.*, 2004. **75**: p. 1173-1182.
164. Pizzo, P., P. Zanovello, V. Bronte, and F. Di Virgilio, Extracellular ATP causes lysis of mouse thymocytes and activates a plasma membrane ion channel. *Biochemical Journal*, 1991. **274**: p. 139-144.
165. Pizzo, P., M. Murgia, A. Zambon, P. Zanovello, V. Bronte, D. Pietrobon, and F. Di Virgilio, Role of P2z purinergic receptors in ATP-mediated killing of tumor necrosis factor (TNF)-sensitive and TNF-resistant L929 fibroblasts. *Journal of Immunology*, 1992. **149**: p. 3372-3378.
166. Ralevic, V. and G. Burnstock, Roles of P2 purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation*, 1991. **84**: p. 1-14.
167. Ralevic, V. and G. Burnstock, Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 1998. **50**(3): p. 413-492.
168. Rampe, D., L. Wang, and G. Ringheim, P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 2004. **147**(1-2): p. 56-61.

169. Raouf, R., Y. Chakfe, D. Blais, A. Speelman, E. Boue-Grabot, D. Henderson, and P. Seguela, Selective knock-down of P2X7 receptor function by dominant-negative subunits. *Molecular Pharmacology*, 2001. **65**(3): p. 646-654.
170. Rassendren, F., G. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. North, and A. Surprenant, The permeabilizing ATP receptor P2X7. Cloning and expression of human cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**: p. 5482-5486.
171. Ray, F., W. Huang, M. Slater, and J. Barden, Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Arteriosclerosis*, 2002. **162**: p. 55-61.
172. Saribas, A., K. Lustig, X. Zhang, and G. Weisman, Extracellular ATP reversibly increases the plasma membran permeability of transformed mouse fibroblasts to large macromolecules. *Anal. Biochem.*, 1993. **209**: p. 45-52.
173. Schrier, S., B. Florea, G. Mulder, J. Nagelkerke, and A. Ijzermann, Apoptosis induced by ectracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line N1E-115: studies on the involvement of P2 receptors and adenosine. *Biochemical Pharmacology*, 2002. **63**: p. 1119-1126.
174. Schulze-Lohoff, E., C. Hugo, S. Rost, S. Arnold, A. Gruber, B. Brune, and R. Sterzel, Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *American Journal of Physiology*, 1998. **275**: p. F962-971.
175. Seifert, R. and G. Schultz, Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and uracil nucleotides. *Trends in Pharmacological Science*, 1989. **10**: p. 365-369.
176. Sellers, L., J. Simon, T. Lundahl, D. Cousens, P. Humphrey, and E. Barnard, Adenosine nucleotides acting at human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**: p. 16379-16390.
177. Sellick, G., M. Rudd, P. Eve, R. Allinson, E. Matutes, D. Catovsky, and R. Houlston, The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(6): p. 1065-1067.
178. Seman, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, and F. Koch-Nolte, NAD-Induced T cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 571-582.
179. Seman, M., S. Adriouch, F. Haag, and F. Koch-Nolte, Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(7): p. 857-72.
180. Sikora, A., J. Liu, C. Brosnan, G. Buell, I. Chessell, and B. Bloom, Cutting edge: Purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *Journal of Immunology*, 1999. **163**: p. 558-561.
181. Simon, J., E. Kidd, F. Smith, I. Chessell, R. Murrell-Lagnado, P. Humphrey, and E. Barnard, Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Molecular Pharmacology*, 1997. **52**: p. 237-248.
182. Slater, M., J. Barden, and C. Murphey, Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy. *Histochemical Journal*, 2000. **32**: p. 365-372.

183. Slater, M., S. Danieletto, A. Gidley-Baird, L. Teh, and J. Barden, Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptor. *Histopathology*, 2004. **44**(3): p. 206-215.
184. Slater, M., S. Danieletto, M. Pooley, L. Teh, A. Gidley-Baird, and J. Barden, Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **83**(1): p. 1-10.
185. Sluyter, R., A. Shemon, and J. Wiley, Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1beta release from human monocytes. *Journal of Immunology*, 2004. **172**(6): p. 3399-3405.
186. Smart, ML, B. Gu, R. Panchal, J. Wiley, B. Cromer, D. Williams, and S. Petrou, P2X7 Receptor Cell Surface Expression and Cytolytic Pore Formation Are Regulated by a Distal C-Terminal Region. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(10): p. 8853-8860.
187. Smith, R., A. Alvarez, and D. Estes, The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. *Veterinary Immunology & Immunopathologie*, 2001. **78**: p. 249-262.
188. Solini, A., P. Chiozzi, A. Morelli, R. Fellin, and F. Di Virgilio, Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *Journal of Cell Science*, 1999. **112**: p. 297-305.
189. Solini, A., P. Chiozzi, S. Falzoni, A. Morelli, R. Fellin, and F. Di Virgilio, High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts. *Diabetologia*, 2000. **43**(10): p. 1248-1256.
190. Solini, A., P. Chiozzi, A. Morelli, E. Adinolfi, R. Rizzo, O. Baricordi, and F. Di Virgilio, Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenic mechanism for vascular damage in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(7): p. 1240-1245.
191. Solle, M., J. Labasi, D. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. Koller, R. Griffiths, and C. Gabel, Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(1): p. 125-132.
192. Sperlagh, B., G. Hasko, Z. Nemeth, and E. Vizi, ATP released by LPS increases nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptor. *Neurochemistry International*, 1998. **33**: p. 209-215.
193. Starczynski, J., C. Pepper, G. Pratt, L. Hooper, A. Thomas, T. Hoy, D. Milligan, T. Bentley, and C. Fegan, The P2X7 receptor gene polymorphism 1513 A->C has no effect on clinical prognostic markers, in vitro sensitivity to fludarabine, Bcl-2 family protein expression or survival in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2003. **123**(1): p. 66-71.
194. Steinberg, T., A. Newman, J. Swanson, and S. Silverstein, ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**: p. 8884-8888.
195. Sugiyama, T., R. Kobayashi, H. Kawamura, Q. Li, D. Puro, and M. Kobayashi, Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(3): p. 1026-1032.
196. Sun, S., L. Lin, A. Hung, and J. Kuo, ATP-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *Journal of Neurochemistry*, 1999. **73**: p. 334-343.

197. Sun, Y., S. Keay, P. De Deyne, and T. Chai, Augmented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with intestinal cystitis. *Journal of Urology*, 2001. **166**: p. 1951-1956.
198. Sundaram, P., W. Xiao, and J.L. Brandsma, Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen). *Nucleic Acids Res.*, 1996. **24**: p. 1375-1377.
199. Surprenant, A. *Functional properties of native and cloned P2X receptors*. in *Ciba Foundation Symposium*. 1996.
200. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. North, and G. Buell, The cytotoxic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 1996. **272**: p. 735-738.
201. Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata, Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *Journal of Neuroscience*, 2004. **24**(1): p. 1-7.
202. Tatham, P., N. Cursack, and B. Gomperts, Characterisation of the ATP4- receptor that mediates permeabilisation of rat mast cells. *European Journal of Pharmacology*, 1988. **147**: p. 13-21.
203. Tatham, P. and M. Lindau, ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. *Journal of General Physiology*, 1990. **95**: p. 459-476.
204. Thunberg, U., G. Tobin, A. Johnson, O. Soderberg, L. Padyukov, M. Hultdin, L. Klareskog, G. Enblad, C. Sundstrom, G. Roos, and R. Rosenquist, Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphatic leukaemia. *Lancet*, 2002. **360**(9349): p. 1935-1939.
205. Torres, G., T. Egan, and M. Voigt, Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**: p. 6653-6659.
206. Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Felgner, V.J. Dwarki, S.H. Gromkowski, R.R. Deck, C.M. DeWitt, A. Friedman, L.A. Hawe, K.R. Leander, D. Martinez, H.C. Perry, J.W. Shiver, D.L. Montgomery, and M.A. Liu, Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993. **259**(5102): p. 1745-1749.
207. van Calcar, D., M. Muller, and B. Hamprecht, Adenosine regulates via two different types of receptors the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry*, 1979. **33**: p. 999-1005.
208. Virginio, C., D. Church, R. North, and A. Surprenant, Effect of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 1997. **36**: p. 1285-1294.
209. Virginio, C., A. MacKenzie, F. Rassendren, R. North, and A. Surprenant, Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neuroscience*, 1999. **2**: p. 315-321.
210. Wang, B., K.E. Ugen, V. Srikantan, M.G. Agadjanyan, K. Dang, Y. Refaeli, A.I. Sato, J. Boyer, W.V. Williams, and D.B. Weiner, Gene inoculation generates immune response against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**: p. 4156-4160.
211. Wang, J., E. Nemoto, and G. Dennert, Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP- ribosyltransferase. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997. **419**: p. 191-201.

212. Wen, L., C. Caldwell, and A. Knowless, Poly(ADP-ribose) polymerase activation and changes in Bax protein expression associated with extracellular ATP-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293-P2X7 cells. *Molecular Pharmacology*, 2003. **63**: p. 706-713.
213. Wiley, J., R. Chen, M. Wiley, and G. Jamieson, The ATP<sub>4</sub>- receptor-operated ion channel of human lymphocytes: inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1992. **292**: p. 411-418.
214. Wiley, J., R. Chen, and G. Jamieson, The ATP<sub>4</sub>- receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba<sup>2+</sup> and ethidium<sup>+</sup> uptake; inhibition of fluxes by suramin. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1993. **305**: p. 54-60.
215. Wiley, J., C. Gargett, W. Zhang, M. Snook, and G. Jamieson, Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte p2z/p2x(7) channel. *American Journal of Physiology*-, 1998. **44**: p. C1224-C1231.
216. Wiley, J., P. Dao-Ung, B. Gu, R. Sluyter, A. Shemon, C. Li, J. Taper, J. Gallo, and A. Manoharan, A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet*, 2002. **359**(9312): p. 1114-1119.
217. Wiley, J., P. Dao-Ung, C. Li, A. Shemon, B. Gu, M. Smart, S. Fuller, J. Barden, S. Petrou, and R. Sluyter, An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(19): p. 17108-17113.
218. Wilson, H., S. Wilson, A. Surprenant, and R. North, Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C-terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(37): p. 34017-34023.
219. Worthington, R., M. Smart, B. Gu, D. Williams, S. Petrou, J. Wiley, and J. Barden, Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X7 receptor function. *FEBS Letters*, 2002. **512**: p. 43-46.
220. Yeung, D., R. Kharidia, S. Brown, and D. Gorecki, Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis*, 2004. **15**(2): p. 212-220.
221. Zamboni, A., V. Bronte, F. Di Virgilio, S. Hanau, T. Steinberg, D. Collavo, and P. Zanovello, Role of extracellular ATP in cell-mediated cytotoxicity: a study with ATP-sensitive and ATP-resistant macrophages. *Cellular Immunology*, 1994. **156**: p. 458-467.
222. Zhang, L., R. Ibbotson, J. Orchard, A. Gardiner, R. Seear, A. Chase, D. Oscier, and N. Cross, P2X7 polymorphism and chronic lymphatic leukaemia: lack of correlation with incidence, survival and abnormalities of chromosome 12. *Leukemia*, 2003. **17**(11): p. 2097-2100.
223. Zheng, L., A. Zychlinsky, C. Liu, D. Ojcius, and J. Young, Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol.*, 1991. **112**: p. 279-288.
224. Zolkiewska, A. and J. Moss, Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1993. **268**(34): p. 25273-25276.

## 10. DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung zahlreicher hilfsbereiter Menschen wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Im Institut für Immunologie wurde ich von allen Mitarbeitern von Beginn an freundlich aufgenommen; die dort herrschende ebenso kollegiale wie fröhlich-konstruktive Arbeitsatmosphäre wird mir als Vorbild in guter Erinnerung bleiben.

Bei Prof. Dr. F. Haag und Prof. Dr. F. Nolte standen die Türen stets offen, jederzeit stellten sie ihre Zeit und ihr umfangreiches Wissen für Anregungen und Diskussionen zur Verfügung. Von ihrer Bereitschaft, Studenten die Welt der Wissenschaft zu öffnen, habe ich während der gesamten Zeit meiner Dissertation profitiert.

Vivienne Welge gebührt großer Dank für ihre geduldige Einarbeitung in mikro- und zellbiologische Arbeitstechniken. Fenja Braasch beantwortete mir alle Fragen bei der Suche nach dem richtigen Antikörper und war stets bereit, mir zu helfen. Gudrun Dubberke war die Anlaufstelle, wann immer ich technischen Rat und Erfahrung benötigte; zum Ende der Dissertation hat sie mich bei der Kultivierung der Zellen unterstützt.

Ohne die Hilfe meiner Eltern wäre es mir nicht möglich gewesen, die vorliegende Arbeit in der gegebenen Ruhe und ohne finanziellen Druck fertig zu stellen.

Mein Mann war mit seiner Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit das verlässliche Fundament dieser Dissertation; wann immer es nötig war, sorgte er für Motivation oder sanften Druck und ertrug geduldig alle Zeit, die ich im Labor oder vor dem Computer verbracht habe.



# 11. LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Adresse: Claudia Bechstedt, geb. Dox  
Roggenkamp 80a  
22941 Bargteheide  
04532 - 282528  
c.dox @ hamburg.de

Geburtstag, -ort: 15.03.1976, Bad Oldesloe / Schleswig-Holstein

Familienstand: verheiratet mit Martin Bechstedt, Lehrer;  
ein Sohn (geb. 28.12.2005)

## Schulische und berufliche Ausbildung

1982 - 1986: Grundschule Bargteheide-Land

1986 - 1995: Kreisgymnasium Bargteheide

1995 - 1998: Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Berufsfachschule  
für Physiotherapie am UKE / Hamburg

1998 - 2004: Arbeit als Physiotherapeutin in mehreren Physiotherapie-Praxen

## Verlauf des Medizinstudiums

1998: Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg

2000: Physikum

2001: 1. Staatsexamen

2002: Beginn der Dissertation unter Prof. Dr. F. Haag am Institut  
für Immunologie / UKE im Rahmen eines Freisemesters

2000-2004: Famulaturen im Institut für Immunologie und in den Bereichen der Inneren  
Medizin, Neurologie, Dermatologie und Anästhesie

2004: 2. Staatsexamen

Beginn des Praktischen Jahres (Wahlfach Neurologie)

2005: 3. Staatsexamen

## Veröffentlichungen

**Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F. and F.Haag.** Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor. *J Immunol.* 2002. 169(8):4108-12

Abstract: **Dox, C., Adriouch, S., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F. and F.Haag.** A naturally occurring mutation (P451L) in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, Marburg, September 2002. Abstract number P3

## **12. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

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

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

Claudia Bechstedt

Hamburg, September 2006

<b>Abb.1</b>	Anzahl der PubMed Einträge bis 2003 für P2X7 und/oder P2Z.....	15
<b>Abb.2</b>	Aufbau der P2X-Rezeptoren .....	18
<b>Abb.3</b>	Struktur des P2X7-Rezeptors .....	23
<b>Abb.4</b>	Die purinerge Signalkaskade .....	36
<b>Abb.5</b>	ADP-Ribosylierung führt meistens zur Inaktivierung des Zielproteins .....	38
<b>Abb.6</b>	Der P2X7-Rezeptor ist Zielprotein der ADP-Ribosylierung.....	44
<b>Abb.7</b>	Immunisierungsschema der Ratte RH18 (pcDNA6.P2X7.BALB/c).....	47
<b>Abb.8</b>	Darstellung des pcDNA6/V5-His Vektors .....	51
<b>Abb.9</b>	Darstellung der ART-Aktivität mittels eNAD und 1G4-Antikörper.....	60
<b>Abb.10</b>	Nachweis der P2X7 Expression im Western Blot.....	65
<b>Abb.11</b>	Titrierung des P2X7-Antikörpers zum Einsatz im Western Blot.....	66
<b>Abb.12</b>	YO-PRO 1 Aufnahme in HEK-T-Zellen.....	68
<b>Abb.13</b>	Kinetik der YO-PRO 1 Aufnahme in HEK-T-Zellen.....	69
<b>Abb.14</b>	ATP- und NAD-induzierte L-selectin Abstoßung von T-Lymphozyten .....	71
<b>Abb.15</b>	Kinetik der ATP / NAD induzierte L-selectin Abstoßung .....	72
<b>Abb.16</b>	ATP induzierte IL-1 $\beta$ Prozessierung .....	74
<b>Abb.17</b>	Gradienten PCR zur Ermittlung geeigneter PCR Bedingungen.....	77
<b>Abb.18</b>	P2X7 Genotypisierung verschiedener Mausstämme .....	79
<b>Abb.19</b>	Nachweis des P2X7-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien im Western Blot.	81
<b>Abb.20</b>	P2X7 Genotypisierung verschiedener Zelllinien.....	83
<b>Abb.21</b>	YO-PRO 1 Aufnahme in verschiedenen Zelllinien.....	85
<b>Abb.22</b>	Immunpräzipitation von P2X7 mit einem anti-Peptid-Antiserum .....	87
<b>Abb.23</b>	Ein neues P2X7-Antiserum – erstmals Nachweis des nativen P2X7 Rezeptors der Maus im FACS.....	89
<b>Abb.24</b>	Das RH18 Immunsereum bindet den P2X7-Rezeptor auf Lymphozyten nur bei 37°C.....	91
<b>Abb.25</b>	Vergleich der beiden P2X7 Antiseren RH18 „second boost“ und RH18 „final bleed“ .....	92
<b>Abb.26</b>	T-Lymphozyten der BALB/c Maus exprimieren mehr P2X7 als T-Lymphozyten der C57/BL6 Maus.....	94
<b>Abb.27</b>	Analyse der Oberflächenexpression von P2X7 auf Zelllinien .....	95

<b>Abb.28</b>	Das RH18-Serum vermag die ATP-vermittelte YO-PRO 1 Aufnahme nicht zu blockieren .....	97
<b>Abb.29</b>	Die ATP-vermittelte L-selectin (CD62l) Abstoßung wird durch RH18-Serum nicht verhindert .....	99
<b>Abb.30</b>	Anti-P2X7 aus RH18 und von alomone labs- ein Vergleich der Fähigkeit zur Immunpräzipitation .....	102
<b>Abb.31</b>	Zusammenwirken von P2X7 und ART2.2-Herstellung P2X7 und ART2.2-doppelt positiver Zelllinien durch stabile Transfektion .....	104
<b>Abb.32</b>	Untersuchung der ART2.2-Aktivität auf den P2X7 und ART2.2 doppelt positiven HEK-T-Zellen .....	106
<b>Abb.33</b>	Die P2X7 und ART2.2 positiven HEK-T-Zellen nehmen YO-PRO 1 nur nach Stimulation mit ATP, nicht aber mit NAD auf.....	107
<b>Abb.34</b>	Hypothese zur Funktion des NICD im Immunsystem.....	117