

Institut für Immunologie



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

**Die murine T-Zell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2:
Nachweis ihrer Lokalisation in Lipid Rafts
und Identifizierung ihrer Zielproteine**



Dissertation

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

Peter Bannas

aus Prag

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

Hamburg 2007

In bunten Bildern wenig Klarheit, viel Irrtum und ein Fünkchen Wahrheit.

Johann Wolfgang von Goethe,

Faust I

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	6
Abstract	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Anglizismen	10
1 Einleitung	11
1.1 Das Immunsystem	11
1.1.1 Die unspezifische Immunität	11
1.1.2 Die spezifische Immunität	12
1.1.3 T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen	12
1.2 ADP-Ribosyltransferasen	15
1.2.1 Enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung	15
1.2.2 Familie der ADP-Ribosyltransferasen	17
1.2.3 Rolle der ART2 im Immunsystem	19
1.2.4 Nachweis der ADP-Ribosylierung	21
1.3 Purinorezeptoren	22
1.3.1 P2X-Familie	22
1.3.2 P2X7	23
1.4 Transgene- und Knockout-Mausmodelle	25
1.4.1 Generierung von Knockout-Mäusen	25
1.4.2 Generierung transgener Mäuse	26
1.5 Lipid Rafts	27
2 Zielsetzung und Fragestellung	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.1.1 Laborgeräte:	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	30
3.1.3 Mäusestämme	30
3.1.4 Zelllinien	31
3.1.5 Antikörper	31
3.1.6 Chemikalien	32
3.1.7 Enzyme	33
3.1.8 Primer	33
3.1.8.1 PCR-Screening-Primer & Primer zur Generation transgener Mäuse	33
3.1.8.2 P2X7-Mutageneseprimer	34
3.1.9 Medien und Lösungen	35
3.1.9.1 Zellkulturmedien:	35

3.1.9.2	Gey's Puffer für Erythrozytenlyse	35
3.1.9.3	Puffer für Zelllyse	35
3.1.9.4	Puffer für Gradientenzentrifugation	35
3.1.9.5	SDS-PAGE und Western blot	35
3.1.9.6	Puffer für Dünnschichtchromatographie	35
3.1.9.7	Isolierung von genomischer DNA	36
3.1.9.8	Isolierung von Plasmid-DNA	36
3.1.9.9	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
3.1.9.10	Southernblot	36
3.1.9.11	Bindepuffer für AnnexinV-Bindung	36
3.1.10	ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7	37
3.2	Methoden	38
3.2.1	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1.1	Kultivierung und Gewinnung von Lymphomzellen	38
3.2.1.2	Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus	38
3.2.1.3	Präparation von murinen Milzzellen	39
3.2.1.4	Depletion der B Zellen	39
3.2.1.5	Transiente Transfektion von HEK-T Zellen	40
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	40
3.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.2.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41
3.2.2.4	Zielgerichtete Mutagenese	42
3.2.2.5	E.coli Transformation	42
3.2.2.6	DNA-Sequenzierung	43
3.2.2.7	Herstellung einer DNA-Sonde	43
3.2.2.8	Markierung der DNA-Sonden	43
3.2.2.9	Southernblot	44
3.2.3	Immunologische Methoden	44
3.2.3.1	„Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ (FACS)	44
3.2.3.2	Messung der ART2.2 Aktivität mit dem 1G4 Assay	46
3.2.3.3	Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen	46
3.2.3.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	46
3.2.3.5	Apoptose-Assay	47
3.2.3.6	Western blot Analysen	47
3.2.3.7	Radioisotopen-basierte enzymatische Assays	50
3.2.3.8	Isolierung von Membran-Mikrodomänen	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Nachweis und Charakterisierung von Zielproteinen der ARTs	53
4.1.1	Nachweis von ARTs und ART-Aktivität auf der Zelloberfläche	53
4.1.1.1	ARTs werden als GPI-verankerte Proteine exprimiert	53
4.1.1.2	Nachweis von ART Zielproteinen mit dem 1G4-Antikörper	54
4.1.1.3	Nachweis spezifischer ART2 Zielproteine mit ³² P-NAD	56
4.1.2	Aufreinigung und Identifizierung neuer ART2.2-Zielproteine	58
4.1.2.1	Aufreinigung etheno-ADP-ribosylierter Proteine	58
4.1.2.2	Massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Proteine	59
4.1.2.3	Bestätigung massenspektrometrisch identifizierter ART2.2-Targets	63

4.1.3	Identifizierung & Charakterisierung des Target-Arginins im P2X7	65
4.1.3.1	Mutation der konservierten Arginine des P2X7-Rezeptors	65
4.1.3.2	Identifizierung von R125 & R133 als Target-Arginine im P2X7	66
4.1.3.3	ADP-Ribosylierung von R125 aktiviert den P2X7-Rezeptor	68
4.1.3.4	Aktivierung des P2X7 führt zum Shedding der ART2.2	71
4.1.3.5	P2X7 wird durch endogenes NAD aktiviert	72
4.2	Generierung und Charakterisierung ART2.2 transgener Mäuse	74
4.2.1	Generierung ART2.2-transgener Mäuse	74
4.2.2	Identifizierung transgener Foundertiere	75
4.2.3	Nachweis der Transmission des ART2.2 Transgens	76
4.2.4	Normale Lymphozyten-Entwicklung in transgenen Mäusen	78
4.2.5	Erhöhte Expression der transgenen ART2.2 auf T-Zellen	79
4.2.6	Erhöhte Aktivität der transgenen ART2.2	80
4.2.7	Erhöhte Sensibilität von ART2.2-transgenen T-Zellen für NICD	81
4.2.8	Verstärktes Shedding von CD62L und ART2.2 durch transgene T-Zellen	83
4.2.9	ART2.2 wird als aktives Enzym gesheddet	87
4.3	Assoziation von ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen	89
4.3.1	Konstruktion & Expression von ART2.2-GPI und ART2.2-Tm	89
4.3.2	Unterschiedliche PI-PLC- und TX-100-Sensitivität	90
4.3.3	Unterschiedliche Segregation der ART2.2 nach 2-Schritt-Lyse	93
4.3.4	ART2.2-GPI aber nicht ART2.2-Tm ist mit Lipid Rafts assoziiert	94
4.3.5	ART2.2-GPI besitzt eine höhere Enzymaktivität als ART2.2-Tm	95
4.3.6	Lipid Rafts beeinflussen die ART2.2-Aktivität und Spezifität	97
4.3.7	Membran-Assoziation beeinflusst die Spezifität der ART2.2	100
5	Diskussion	102
5.1	Nachweis und Charakterisierung von ART2.2-Zielproteinen	102
5.2	Charakterisierung ART2.2 transgener Mäuse	110
5.3	Assoziation der ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen	113
	Perspektiven für weiterführende Untersuchungen	117
	Literaturverzeichnis	118
	Danksagung	125
	Lebenslauf	126
	Publikationen	128
	Eidesstattliche Erklärung	130

Zusammenfassung

Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf Zielproteine übertragen. Die pathogene Wirkung von Cholera-, Pertussis- und anderen bakteriellen Toxinen beruht auf der ADP-Ribosylierung von Zielproteinen in humanen Wirtszellen. Unsere Arbeitsgruppe hat Toxin-verwandte Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART1-ART5) bei Säugetieren kloniert, die als GPI-verankerte oder sezernierte Ekto-Enzyme exprimiert werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der murinen T-Zell ADP-Ribosyltransferase ART2.2 und der näheren Charakterisierung ihrer Zielproteine.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden (etheno)-ADP-ribosylierte Membranproteine aus Lymphomzellen affinitätschromatographisch isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Unter den identifizierten Targets befinden sich interessante Zell-Zellinteraktionsmoleküle (CD11/CD18, CD31, CD44, CD205, CD229). Mittels zielgerichteter Mutagenese konnten für den bereits als ART2.2 Target bekannten, Ligandengesteuerten P2X7 Ionen-Kanal zwei Aminosäurereste (Arg 125 und Arg 133) als Ziele der ADP-Ribosylierung eruiert werden. Die Ergebnisse deuten an, dass die an R125 gebundenen ADP-Ribose-Gruppe einen Liganden für die Adenin-Ribonukleotid Bindungstasche des P2X7 präsentiert und dadurch die Öffnung des Ionen-Kanals induziert.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden ART2.2 überexprimierende transgene Mäuse generiert, und diese in vergleichenden Experimenten mit Wildtyp- und bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierten ART2-KO-Mäusen untersucht. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die durch ART2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung des P2X7 die Apoptose von T-Zellen auslösen kann. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass die Aktivierung von P2X7 zum "Shedding" von enzymatisch aktiver ART2.2 führt.

Im dritten Teil wurde die mögliche Assoziation der ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen ("Lipid-Rafts") auf der T Zell-Oberfläche untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die ART2.2 dank ihres GPI-Ankers mit Rafts assoziiert ist und durch diese Assoziation in ihrer Aktivität und Spezifität reguliert und auf bestimmte Zielproteine fokussiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten somit einen Beitrag sowohl zur Aufklärung der Regulation der ART2.2-Aktivität auf der T Zell-Oberfläche als auch zur Klärung des molekularen Mechanismus der P2X7-Aktivierung durch die ADP-Ribosylierung.

Abstract

ADP-ribosylation is an enzyme-catalyzed posttranslational modification, in which the ADP-ribose moiety is transferred from NAD onto target proteins. The mechanism of action of Cholera-, Pertussis- and other toxins involves the ADP-ribosylation of target proteins in host cells. Mammalian cells express toxin-related mono-ADP-ribosyltransferases (ART1-ART5) as GPI-anchored or secreted ecto-enzymes. The present study focuses on the murine T cell ADP-ribosyltransferase ART2.2 and the characterization of its target proteins.

In the first part of the study, (etheno)-ADP-ribosylated membrane proteins were isolated from lymphoma cells and were identified by mass spectrometry. The identified target proteins include several cell-cell-interaction molecules (CD11a/CD18, CD31, CD44, CD205, CD229). The target amino acids for ART2.2 were identified in one of the known target proteins, the ligand-gated P2X7 ion-channel, by site directed mutagenesis (R125 and R133). The results indicate that the ADP-ribose-group bound to R125 presents a ligand for the adenine-ribonucleotide-binding site of the P2X7-channel and thereby gates the ion-channel.

In the second part of the study, ART2.2-overexpressing transgenic mice were generated and used for comparative analysis with wildtype and ART2-KO mice. The results confirmed that ART2.2 catalyzed ADP-ribosylation of P2X7 induces apoptosis of T cells. Furthermore the results revealed that activation of P2X7 leads to shedding of enzymatically active ART2.2.

In the third part of the study, the association of ART2.2 with so called membrane-microdomains or lipid rafts was investigated. The results show that ART2.2 is associated with lipid rafts due to its GPI-anchor and that this raft-association regulates the activity and specificity of ART2.2.

Taken together, the results of this study shed light on the regulation of ART2.2 activity on the T cell surface and clarify the molecular mechanism of P2X7 activation by ADP-ribosylation.

Keywords: ADP-ribosylation, apoptosis, immunoregulation, lipid rafts, mass spectrometry, membrane-microdomains, NAD, P2X7, site-directed mutagenesis, T cells, transgenic mice

Abkürzungsverzeichnis

ADP-Ribose	Adenosin-Di-Phospho-Ribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)Benzen-Sulfonyl-Fluorid
APC	Allophyocyanin
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine-serum-albumin
CT	Choleratoxin
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminiscent
EDTA	disodium ethylenediaminetetraacetate
EtBr	Ethidium Bromid
etheno-NAD	Nicotinamid-1,N6-Etheno-Adenin-Dinucleotide
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fetal calv serum
FITC	Fluorescein
Flashen	Nach außen Kehren (von Phosphatidylserin)
FSC	Forward scatter
G418	Geneticin-Disulfat
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
Igepal	(Oktylphenoxy)-Polyethoxyethanol
KN62	1-(N,O-bis[5-isoquinolinesulphonyl]-N-methyl-L-tyrosyl)-4-phenylpiperazine
Kb	Kilobase
KO	Knock-out
LDS	lithium-dodecyl-sulfate
Lk	Lymphknoten
MES	2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
MTT	Dimethylthiazol-Dephenyltetrazolium-Bromid
NAD	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NC	Nitrozellulose
NICD	NAD induced cell death

NK Zelle	„Natürliche Killer“ Zelle
PARP	Poly ADP-Ribosyltransferasen
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PES	Penazin-Ethosulfat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen
PO	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylendifluorid
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
slg	Zelloberflächenimmunglobuline (surface Ig)
SSC	Side scatter
TBS	Tris-Buffered Saline
TACE	Tumor-necrosis-faktor-alpha converting enzyme
TE	Tris-EDTA
TG	Transgen
TX-100	Triton X 100
WT	Wildtyp

Anglizismen

Alignment	Paarweise Anordnung mehrerer DNA- oder Proteinsequenzen
Beads	Kügelchen
Blebbing	Blasenwerfen der Zytoplasmamembran
buffy coat	Schicht von Leukozyten auf den Erythrozyten nach der Zentrifugation von Blut
Bystander T Zelle	Antigen-unspezifische T Zellen, die sich in der Nähe einer Immunreaktion von Antigen-spezifischen T Zellen aufhalten
Dot Plot	Punktwolken-Darstellung von zwei Parametern bei FACSAnalysen
FLAG-Tag	Rekombinant eingefügtes Epitop, das die Erkennung eines Proteins durch einen gegen das Epitop gerichteten Antikörper ermöglicht
Forwardscatter	Vorwärtsstreuung; lässt in der FACS-Analyse auf die Größe der Zellen schließen
Gaten, Gate setzen	Eingrenzung einer Zellpopulation bei der FACS-Analyse
Histogram Plot	Histogramm-Darstellung eines Parameters bei FACS-Analysen
homing, trafficking	Wanderungsverhalten von Leukozyten im Organismus
Knock-out	Ausschaltung eines Gens in der Keimbahn
Messenger	Botenstoff
Panel	Feld
Panning	Zellen eines bestimmten Phänotyps in einer Petri-Schale auffangen, aus dem Englischen von Goldschürfen (engl. pan, Panne)
PS-Flashing	Das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin
Pulse-Chase-Experiment	Impuls-Verfolgungs-Experiment: Nach einer kurzen Exposition von Zellen mit einem Agonisten, werden die Folgen der Exposition zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt
Screenen, Screening	Durchmusterung
Shedding	Abschneiden von Zelloberflächenproteinen und deren Freisetzung in den Zellüberstand
Sidescatter	Seitwärtsstreuung; lässt in einer FACS-Analyse auf die Granularität von Zellen schließen
Splice	Verbinden (Spleißen) der Exone auf RNA-Ebene

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem eines Lebewesens dient diesem als Schutz gegen Mikroorganismen wie Bakterien und Viren und gegen andere nicht körpereigene Moleküle, die körperfremden Strukturen werden eliminiert. Dabei hat es die Aufgabe, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden, damit nicht körpereigene Strukturen Ziel der Immunreaktion werden. Neben der Abtötung pathogener Fremdorganismen werden auch untergegangene körpereigene Zellen sowie entartete Zellen beseitigt. Das Immunsystem höherer Lebewesen setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, es wird dabei eine unspezifische und spezifische Form unterschieden. Beide Wege sind eng miteinander verknüpft und ergänzen sich bei der Bekämpfung von als Antigen bezeichneten Eindringlingen.

1.1.1 Die unspezifische Immunität

Die unspezifische Immunität ist angeboren, sie wird in humorale und zelluläre Immunität unterteilt. Erstere wird durch lösliche Moleküle in Körperflüssigkeiten vermittelt, die Zelluläre durch Granulozyten und Monozyten, beide Systeme sind eng miteinander verwoben. Zur unspezifischen humoralen Immunität zählt das Komplementsystem, es besteht aus über 20 Plasmaproteinen und Zelloberflächenrezeptoren. Bei der Anregung des Komplementsystems durch Immunkomplexe oder alternativ durch bakterielle Faktoren kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung der primär inaktiv vorliegenden Faktoren C1 bis C9. Es kommt zur Bildung eines Membran-Angriffkomplexes, dieser tötet Zielzellen durch Perforation der Zellmembran. Weiterhin sind an der humoralen Immunität das Bakterienzellwände spaltende Lysozym, das C-reaktive Protein und Interferone beteiligt. Bei der Aktivierung des Komplementsystems entstehen ferner Faktoren, die Chemotaxis von Granulozyten und Phagozytoseprozesse stimulieren (Delves and Roitt, 2000a; Delves and Roitt, 2000b; Janeway et al., 2005). Die zur zellulären Immunität gehörenden Granulozyten und Monozyten phagozytieren Antigene. Diese werden durch Enzyme wie Peroxidasen, Esterasen, Proteasen und Lipasen, die in Granula im Zytosol der Phagozyten enthalten sind, zerstört. Monozyten entwickeln sich zu Antigen-Präsentierenden Zellen (APC), diese können Lymphozyten stimulieren.

1.1.2 Die spezifische Immunität

Auch die spezifische Immunität besteht aus einer humoralen und zellulären Komponente. Im Gegensatz zur unspezifischen Immunität ist sie erworben. Sie besteht aus den B- und T-Lymphozyten sowie von den B-Lymphozyten sezernierten Antikörpern. Die Zellen der spezifischen Immunität stammen von pluripotenten Vorläuferzellen des Knochenmarkes ab. Diese Stammzellen entwickeln sich im Knochenmark zu reifen B-Lymphozyten und im Thymus zu reifen T-Lymphozyten. Interessant ist bei der spezifischen Abwehr, dass sie bei wiederholtem Antigenkontakt selektiv und verstärkt aktiviert wird, um eine effektive und gezielte Abwehr zu gewährleisten. B-Zellen verwenden für Erkennungs- und Effektorfunktionen membranständige als auch sezernierte Immunglobuline, welche die Wiedererkennung eines Antigens auch nach Jahren ermöglichen. Bei den T-Lymphozyten erfolgt die Antigenerkennung über membranständige Rezeptoren (TCR), allerdings müssen die Antigene zuvor von Antigen-Präsentierenden-Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und als Peptidfragmente mit Hilfe der MHC-Moleküle präsentiert werden. Die T-Zell-APC-Kontaktstelle wird als Immunologische Synapse bezeichnet. Durch sie wird die T-Zelle aktiviert, es kommt zur Expression signalübertragender löslicher Zytokine als auch membrangebundener Proteine wie TNF α , FAS-Ligand oder CD40-Ligand.

1.1.3 T-Zellen und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen

Im Idealfall herrscht ein Gleichgewicht zwischen den äußeren Einflüssen die den Organismus affektieren und der körpereigenen Abwehr. Durch eine überschießende Reaktion des Immunsystems werden allergische Reaktionen hervorgerufen, die Unfähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden führt zu Autoimmunerkrankungen.

Bei vielen Autoimmunerkrankungen, auch bei solchen bei denen Immunglobuline vordergründig das pathogenetische Prinzip darstellen, scheint es so zu sein, dass eine Dysregulation der CD4⁺ Subpopulation der T-Zellen vorliegt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Antikörper-vermittelte Immunreaktion der B-Lymphozyten, von den - in einer vorangegangenen Phase gebildeten - CD4⁺ T-Helfer-Zellen abhängig ist. Hiermit kommt den T-Zellen bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz eine wesentliche Bedeutung zu.

Bestimmte Funktionen der Toleranzerhaltung erwerben die T-Lymphozyten erst im Laufe ihrer Entwicklung. Im Thymus kommt es während der Reifungsphase zu einer Veränderung des Expressionsmusters der Zelloberflächenproteine. Der Ursprungsort der T-Zellen sind pluripotente Stammzellen des Knochenmarkes. Von dort migrieren die Vorläufer der T-Lymphozyten über die Blutbahn in den Thymus und proliferieren und differenzieren dort. Es kommt zur Rekombination der für die einzelnen Ketten des T-Zell-Rezeptors kodierenden Genabschnitte. Die Rekombinations-Möglichkeiten der TCR-Genabschnitte sind sehr vielfältig, daher kommt es überwiegend zur Entstehung von Zellen die einen T-Zell-Rezeptor tragen, der physiologisch unerwünscht ist. Deshalb gibt es zwei Formen der Selektion: Zunächst reifen in der Thymusrinde nur diejenigen T-Zellen heran, deren TCR eine Bindung mit MHC-Molekülen der Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) eingehen kann, man spricht von positiver Selektion. Anschließend erfolgt die negative Selektion, dabei wird bei denjenigen T-Zellen die eine feste Bindung mit körpereigenem Antigen auf den Antigen-Präsentierenden Zellen eingehen, der programmierte Zelltod, die Apoptose induziert. Die Zellen die den Thymus verlassen besitzen eine Toleranz gegenüber allen ihn dort präsentierten Antigenen, bei diesen handelt es sich um Strukturproteine, die allen Zellen des Körpers gemeinsam sind, organspezifische Antigene dagegen werden nicht präsentiert.

Wenn die im Blut und lymphatischen Gewebe zirkulierenden T- Zellen eine Bindung mit einer APC eingehen, erfolgt durch die Antigenpräsentierung und Ko-Stimulation die Ausdifferenzierung zu Effektorzellen. CD8+Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen, bei den CD4+Zellen kommt es in Abhängigkeit des sie umgebenden Milieus zur Ausbildung von Entzündungsmediatoren freisetzenden Th1-Zellen oder zu B-Zellen stimulierenden Th2-Zellen.

Trifft die T-Zelle auf ihr Antigen in Abwesenheit einer APC, tritt die Zelle, anstatt sich zu differenzieren und zu proliferieren, in einen Zustand der Anergie. Es kommt zur Toleranz-Entwicklung gegenüber den organspezifischen Antigenen, die im Thymus nicht präsentiert wurden. Wird dieses Antigen jedoch durch eine APC präsentiert, erfolgt eine Reaktivierung der T-Zelle durch den ko-stimulierenden Effekt der APC, welche zu einer Autoimmunreaktion mit Zerstörung körpereigener Strukturen führt.

Es scheinen jedoch regulative T-Zell-Subpopulationen zu existieren, die das Auftreten von Autoimmunerkrankungen verhindern können, indem sie autoreaktive T-Zell-Klone kon-

trollieren und deren Proliferation hemmen (Kayagaki et al., 1995). Diesen regulativen Zellen konnte in mehreren Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen der T-Zell-Differenzierungsmarker RT6 zugeordnet werden (Lund et al., 1998). RT6 wurde als Familienmitglied der ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) erkannt, diese Enzyme spalten NAD^+ in die Bestandteile Nikotinamid und ADP-Ribose und übertragen die ADP-Ribose kovalent auf eine bestimmte Aminosäureseitenkette ihres Zielproteins.

1.2 ADP-Ribosyltransferasen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird hauptsächlich die Funktion der auf murinen T Zellen exprimierten ADP-Ribosyltransferase ART2.2 untersucht. Im Folgenden wird der Mechanismus der ADP-Ribosylierung sowie die Familie der ADP-Ribosyltransferasen und deren Funktion bei Pro- und Eukaryonten vorgestellt. Des Weiteren werden die verschiedenen Nachweismethoden der ADP-Ribosylierungs-Reaktion vorgestellt.

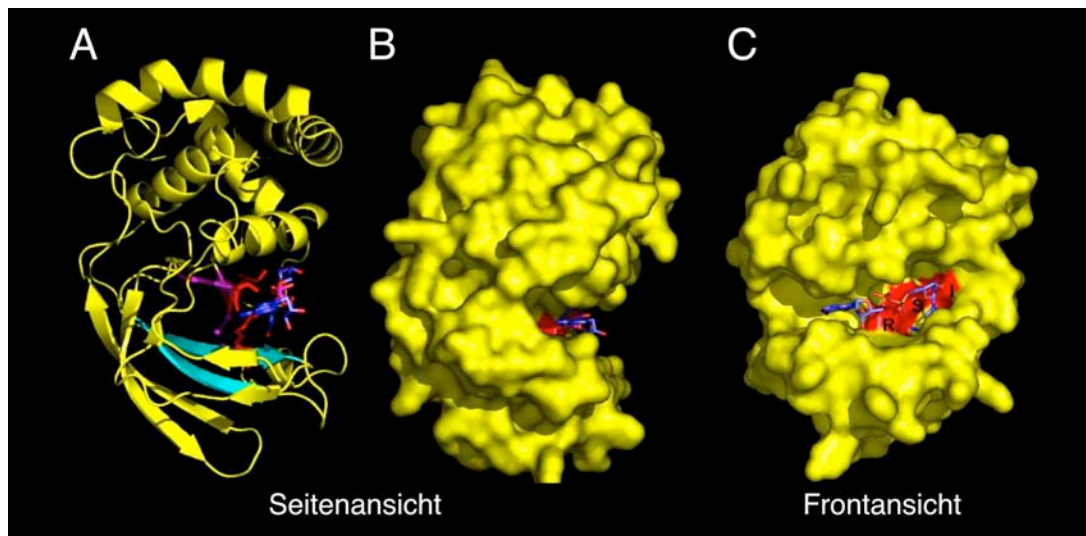


Abb. 1: Tertiärstruktur von RT6 (Ratten ART2). Dargestellt ist die kristallographisch aufgeklärte Tertiärstruktur der Ratten ADP-Ribosyltransferase-2 (ART2). N-terminale und C-terminale Domänen bilden eine Art „Oberkiefer“ und „Unterkiefer“ (A, B), daher werden in schematischen Schaubildern ARTs als „Pacman“ dargestellt. Hier wurde die ART2 mit ihrem Substrat NAD ko-kristallisiert, es befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms, dem „Mund“ des Pacmans. Um die Ko-Kristallisation zu ermöglichen, wurde das katalytische Glutamat E189 vor der Kristallisation zu I (Ile) mutiert (C), zwei weitere konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum sind ebenfalls rot dargestellt: Arginine R126 und Serin S147. (Müller-Dieckmann et al. (2002) *Journal of Molecular Biology*)

Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der ADP-Ribosyltransferasen, die durch kristallographische Röntgenstrukturanalysen der ART2 der Ratte (RT6) (Mueller-Dieckmann et al., 2002) und bakterieller ADP-Ribosyltransferasen aufgeklärt wurde (Choe et al., 1992; Mueller-Dieckmann et al., 2002; Sixma et al., 1991; Stein et al., 1994) (Abb. 1), wird die ART2 in schematischen Zeichnungen als „Pacman“ dargestellt.

1.2.1 Enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung

ADP-Ribosylierung ist, wie auch die Phosphorylierung, eine posttranslationale Proteinmodifikation. Ekto-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), Poly-ADP-Ribosyltransferasen

(PARPs) und bakterielle ADP-Ribosyltransferasen binden NAD und katalysieren die Übertragung der ADP-Ribosegruppe auf eine spezifische Zielamino­säure (Aktories, 1991; Jacobson and Jacobson, 1989). Hierbei wird Nikotinamid freigesetzt. Die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und der Ribose-Gruppe des NAD produziert eine freie Energie von $-34,3 \text{ kJ/mol}$, es handelt sich also um eine hoch energetische Bindung. Die Energie der N-glykosidischen Bindung wird verwendet, um den Transfer der ADP-Ribosegruppe zu katalysieren. In **Abb. 2** ist die enzymatische Reaktion der ADP-Ribosylierung schematisch dargestellt.

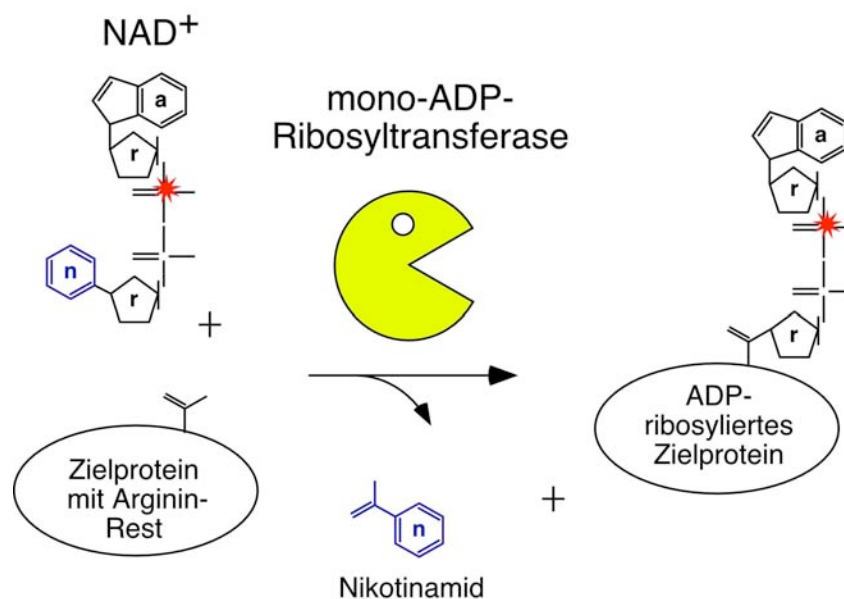


Abb. 2: Mechanismus der ADP-Ribosylierung. Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf das Zielprotein übertragen und Nikotinamid freigesetzt. Die meisten Vertebraten-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) modifizieren Arginin-Reste der Zielproteine. Mit Hilfe von ^{32}P -NAD kann die Reaktion verfolgt werden, das ^{32}P -Phosphat im NAD-Molekül ist hier mit einem roten Stern markiert. (Modifiziert nach Krebs et al. (2003) *Analytical Biochemistry*)

Verschiedene ARTs ADP-ribosylieren die Akzeptoraminosäuren Arginin, Cystein, Asparagin, Diphtamid (modifiziertes Histidin) und Glutamat (Haag and Koch-Nolte, 1997). Wie bei der Phosphorylierung kann dadurch die Funktion des modifizierten Proteins reguliert werden. So wurde die ADP-Ribosylierung erstmalig als Mechanismus der Toxizität des Diphterie-Toxins beschrieben, welches eine modifizierte Aminosäure des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF2) ADP-ribosyliert und dadurch die Proteinsynthese in den betroffenen Zellen blockiert (Honjo et al., 1968a; Honjo et al., 1968b).

Rückblickend kann man sagen, dass die Geschichte der modernen Immunologie mit einer mono-ADP-Ribosyltransferase, dem Diphterietoxin begann. Emil von Behring wusste

allerdings nichts von deren Enzymaktivität, als er seinerzeit Pferde immunisierte und mit dem Serum dieser Tiere die Diphterie erfolgreich behandelte (Janeway et al., 2005).

Ebenfalls ähnlich der Phosphorylierung ist auch die ADP-Ribosylierung ein reversibler Prozess (Ludden, 1994; Zolkiewska and Moss, 1997). Die Entfernung des ADP-Riboserestes kann durch ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) oder Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPPs) katalysiert werden. Durch die ARHs wird die gesamte ADP-Ribosegruppe vom Zielprotein abgetrennt (Moss et al., 1997). Durch die NPPs wird die energiereiche Bindung zwischen den beiden Phosphatgruppen des ADP-Riboserestes gespalten, es bleibt ein Ribosephosphat-Rest am modifizierten Protein zurück, dadurch ist es einer erneuten ADP-Ribosylierung nicht mehr zugänglich (Vollmayer et al., 2003).

1.2.2 Familie der ADP-Ribosyltransferasen

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

Eine Vielzahl weiterer bakterieller Toxine, die von *Vibrio cholera*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Clostridium botulinum* sekretiert werden, entfalten ihre Wirkung in Säugetierzellen ebenfalls als ARTs. Durch mono-ADP-Ribosylierung von heterotrimeren G-Proteinen und anderen GTP-bindenden Proteinen wie Ras und Rho oder ATP-bindenden Proteinen wie Aktin, inhibieren sie die Signaltransduktion oder beeinflussen die Zytoskelett-Organisation (Aktories and Just, 2000; Moss and Vaughan, 1990). Die meisten bakteriellen ARTs sind sekretorische Proteine, die in das Zytoplasma der Zellen des Wirtsorganismus translozieren (**Abb. 3**), um dort die oben beschriebenen Wirkungen zu entfalten.

ADP-Ribosyltransferasen wurden auch bei Eukaryoten gefunden. Die eukaryotischen ARTs lassen sich in die Unterfamilien der mono-ADP-ribosylierenden (ARTs) und Poly-ADP-ribosylierenden Enzyme (PARPs) einordnen (Bazan and Koch, 1997; Domenighini and Rappuoli, 1996; Koch-Nolte et al., 2006; Koch-Nolte et al., 2001).

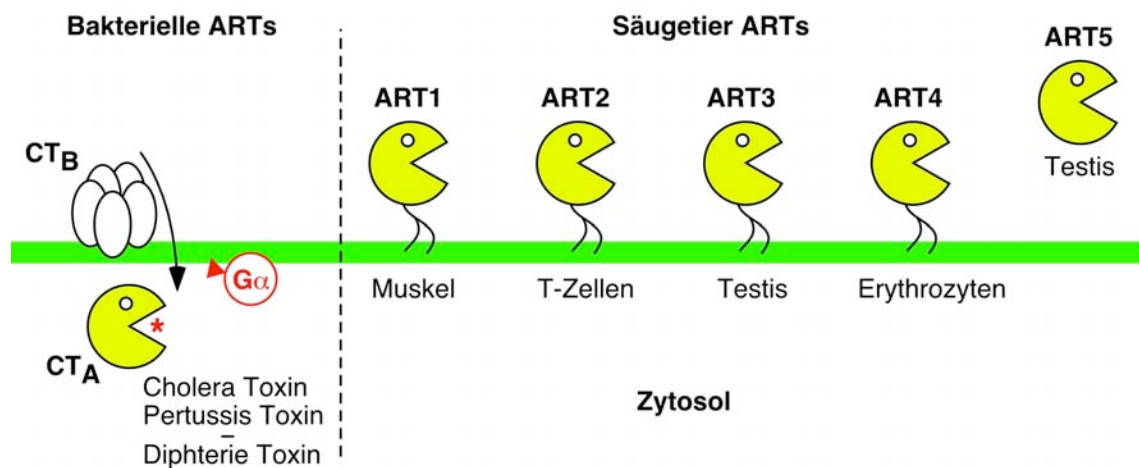


Abb. 3: Familie der ADP-Ribosyltransferasen. Auf der linken Seite sieht man stellvertretend für bakterielle ARTs den Wirkmechanismus des Cholera Toxins: Die B-Untereinheit bindet an die Zelloberfläche, daraufhin transloziert die A-Untereinheit, die ADP-Ribosyltransferase, ins Zellinnere und führt über die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen zu den charakteristischen Krankheitssymptomen. Auf der rechten Seite sind die bisher bei Vertebraten klonierten mono-ADP-Ribosyltransferasen dargestellt. ART1 bis ART4 sind Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankerte Proteine und mit verzweigtem Membrananker dargestellt, ART5 dagegen ist ein sezerniertes Protein. Die Expression der verschiedenen ARTs ist entsprechend der Beschriftung auf bestimmte Gewebe beschränkt. (Modifiziert nach Koch-Nolte et al. 2006, *Annals of Medicine*)

Mono-ADP-Ribosyltransferasen sind bisher bei Vertebraten nachgewiesen worden. Zunächst wurden ART1 aus dem Skelettmuskel des Kaninchens (Zolkiewska et al., 1992) sowie ART2 aus T-Zellen der Ratte (Haag et al., 1990) und der Maus (Koch-Nolte et al., 1996a) und ART6 aus dem Knochenmark des Huhns molekular charakterisiert (Tsuchiya et al., 1994). Seitdem ist eine ganze Familie Arginin-spezifischer ADP-Ribosyltransferasen kloniert worden (**Abb. 3**) (Glowacki et al., 2002). Sie werden in verschiedenen Geweben als membranständige, mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker versehene Ekto-Enzyme oder als sekretierte Enzyme exprimiert und sind in einer einheitlichen Nomenklatur zusammengefasst worden (ART1-ART8). Seit kurzem sind ART1 (CD296) und ART4 (CD297) auch in der CD-Nomenklatur bedacht. ART1-4 sind GPI-verankerte Zellmembranproteine, bei ART5-8 handelt es sich um sezernierte Proteine (**Abb. 3**). Während ART1-5 in verschiedenen Geweben bei Säugetieren gefunden werden, werden ART6-7

von Hühnern exprimiert (Glowacki et al., 2002). Neben ART2 wird von Zellen des Immunsystems auch ART4 exprimiert (Glowacki et al., 2002; Hauschildt et al., 1994; Pellat-Deceunynck et al., 1994).

1.2.3 Rolle der ART2 im Immunsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bedeutung und Funktion der murinen ADP-Ribosyltransferase ART2.2 genauer untersucht. Erstmals wurde ART2 bei der Ratte identifiziert. Die Funktion des ursprünglich als RT6 bezeichneten T-Zelloberflächenproteins war lange Zeit unbekannt (Koch-Nolte et al., 1996b; Thiele et al., 1997). Bei der Ratte ist das *ART2* Gen auf Chromosom 1 lokalisiert und liegt in den zwei allelen Varianten *ART2a* und *ART2b* vor (Butcher et al., 1979). Für ART2a wurde NADase-Aktivität aber keine Transferase-Aktivität festgestellt. ART2b zeigt neben der NADase-Aktivität auch eine Arginin-spezifische Automodifikation nach Inkubation mit NAD (Haag et al., 1995). Im Mausgenom gibt es zwei *ART2* Gene, die durch eine Gen-Duplikation entstanden sind. *ART2.1* und *ART2.2* liegen tandemartig in syntenischer Lage auf Chromosom 7 und weisen eine 80%ige Nukleotidsequenzidentität auf (Hollmann et al., 1996a). Beim Menschen liegt das *ART2* Gen auf Chromosom 11 (11q13) als Einzelkopie vor (Koch-Nolte et al., 1993). Im Leseraster des Gens wurden drei vorzeitige Stop-Codons identifiziert, was *ART2* beim Menschen und beim Schimpansen zu einem so genannten Pseudogen macht, das nicht exprimiert wird (Haag et al., 1994). Die Nachbargene sind konserviert. In diesem Cluster liegen auch die sich überlappenden Gene von *ART1* und *ART5*.

ART2.1 und *ART2.2* werden in der Maus ausschließlich auf naiven T-Zellen exprimiert (Ohlrogge et al., 2002b). T-Zellen haben im Immunsystem zwei prominente Aufgaben: als CD4-positive T-Helferzellen (Th) unterstützen sie die Aktivierung von B-Zellen (Th2) oder Makrophagen (Th1) bei der Abwehr von Pathogenen, als CD8-positive zytotoxische T-Zellen töten sie virusinfizierte oder entartete körpereigene Zellen (Janeway et al., 2005). Wenn die Toleranzentwicklung und die Regulation der Immunabwehr durch T-Zellen fehlerhaft verläuft, können Autoimmunerkrankungen entstehen, bei denen autoreaktive T-Zellen körpereigene Zellen attackieren (Moller et al., 1990). Es wurde eine T-Zellpopulation identifiziert, die das Auftreten von Autoimmunerkrankungen trotz Anwesenheit autoreaktiver T-Zellen unterdrücken kann. T-Zellen dieser CD4 und CD25 posi-

ven T-Zellpopulation werden als regulatorische T-Zellen oder auch Treg bezeichnet (Sakaguchi et al., 2001).

ART2.2 katalysiert die ADP-Ribosylierung vieler Membranproteine, die in der Aktivierung und Migration von T-Zellen eine Rolle spielen (Koch-Nolte et al., 2006; Seman et al., 2004). So konnte durch Inkubation mit ^{32}P -NAD gezeigt werden, dass das Integrin LFA-1 (Nemoto et al., 1996a), der P2X7-Purinorezeptor (Seman et al., 2003a), ein bisher nicht identifiziertes an einem Tyrosinrest phosphoryliertes 80 kDa Protein (Koestner, 2007), der MHC I Ko-Rezeptor CD8, der Milz-Homing-Rezeptor CD43, die T-Zelloberflächenproteine CD27, CD44, CD45 (Okamoto et al., 1998b) und ein unbekanntes, bei der T-Zellaktivierung beteiligtes 40 KDa Protein, das mit seiner intrazellulären Domäne mit der p56Lck-Kinase assoziiert ist (Wang et al., 1997), durch ART2.2 ADP-ribosyliert werden (Abb. 4).

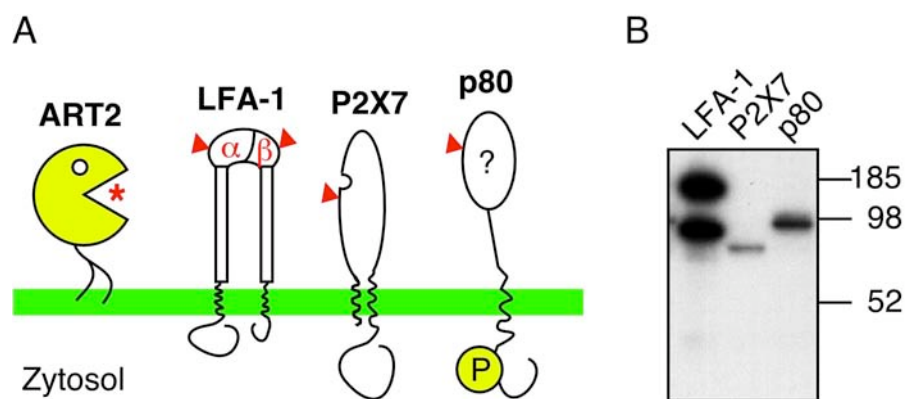


Abb. 4: Zielproteine der ART2.2 auf der Zelloberfläche von T Zellen. (A) Die ADP-Ribosyltransferase-2 (ART2.2) katalysiert die ADP-Ribosylierung von Argininresten in bestimmten Zelloberflächenproteinen auf T Zellen. Zu den Zielproteinen zählen neben CD8, CD27, CD44, CD45 (nicht dargestellt), die beiden Untereinheiten von LFA1, der P2X7-Purinorezeptor und ein bisher nicht identifiziertes 80kD großes phosphoryliertes Protein (P80). (B) Mit ART2.2 transfizierte DC27.10 Zellen wurden mit ^{32}P -NAD inkubiert und anschließend lysiert. Aus den Lysaten wurde mit spezifischen Antikörpern LFA1 und P2X7 immunpräzipitiert, phosphorylierte Proteine wurden mit dem Phospho-spezifischen Antikörper 4G10 isoliert. Die Proben wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet, anschließend folgte eine Autoradiographie. (Modifiziert nach Koch-Nolte et al. (2006) *Annals of Medicine*)

Die ADP-Ribosylierung dieser Zielproteine führt zu einer Reduktion der Zellproliferation, Signaltransduktion, Zielzelladhäsion sowie Zytotoxizität und Zytokinsekretion der T-Zellen. Eine Aktivierung von T-Zellen führt zu einem Abstoßen der ART2.2 durch eine TACE-verwandte Metalloprotease, was mit einer stark reduzierten ART-Aktivität auf aktivierten T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen korreliert (Kahl et al., 2000b).

1.2.4 Nachweis der ADP-Ribosylierung

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen stehen Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren zur Verfügung. Für die Untersuchung der ADP-Ribosylierung stand bis vor kurzem kein vergleichbares Werkzeug zur Verfügung. Santella stellte eine Reihe von Antikörpern her, die an modifizierte DNA binden sollten. Dazu gehörte ein Antikörper (1G4), der an etheno-Adenosinreste in der DNA, die durch Einwirkung von Anilin entstehen, bindet (Young and Santella, 1988a).

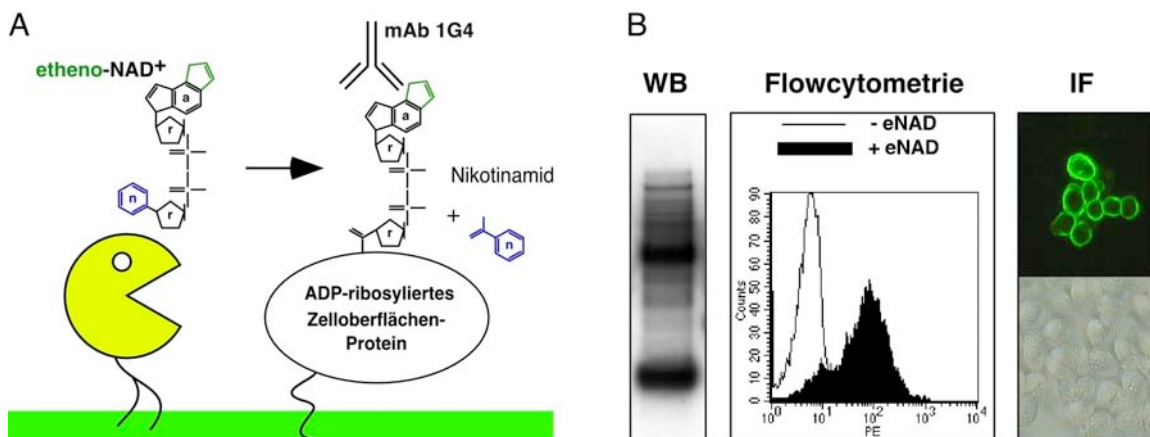


Abb. 5: Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Assay. (A) ARTs können anstelle von NAD auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Der monoklonale Antikörper 1G4 bindet spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe. Der 1G4 Antikörper kann anschließend mit einem Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörper detektiert werden. (B) Damit können ADP-ribosylierte Zielproteine im Westernblot (WB) und auf lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie oder in der Immunfluoreszenz (IF) sichtbar gemacht werden. (Modifiziert nach Krebs et al. (2003) *Analytical Biochemistry*)

Diese etheno-Adenosin Gruppe kommt ebenfalls bei dem NAD-Analogon etheno-NAD vor. Eine andere Arbeitsgruppe bediente sich des 1G4-Antikörpers und etheno-NAD, um die Aktivität der poly-ADP-Ribosyltransferase (PARP) nach Übertragung der etheno-ADP-Ribose auf Zielproteine zu untersuchen (Davis et al., 1998). Von unserer Arbeitsgruppe wurde er eingesetzt um mono-ADP-Ribosyltransferasen zu untersuchen (Krebs et al., 2003). Das experimentelle Vorgehen wird im Methodenteil dieser Dissertation beschrieben. Prinzipiell werden Zelloberflächenproteine, bei der Inkubation von vitalen Zellen mit etheno-NAD, von den ARTs etheno-ADP-ribosyliert. Die etheno-ADP-Ribose-Gruppe lässt sich im Western blot, FACS und in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachweisen (Abb. 5). Der 1G4 Assay wird im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um ART-Aktivität auf Lymphozyten zu untersuchen.

1.3 Purinorezeptoren

Die Existenz von Plasmamembran-Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide, so genannte P2 purinergische Rezeptoren wurde 1978 erstmals von Burnstock beschrieben. Bis heute sind bei Säugetieren 12 Mitglieder der P2-Rezeptorfamilie kloniert und charakterisiert worden. Viele dieser Rezeptoren sind für Zellantworten auf die Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden verantwortlich (Abbraccio and Burnstock, 1994; Ralevic and Burnstock, 1998). Die P2-Rezeptoren teilen sich in die beiden Familien der G-Protein gekoppelten P2Y Rezeptoren und der Liganden gesteuerten Ionenkanal P2X Rezeptoren auf. Es sind bis heute 5 Mitglieder der P2Y-Familie und 7 Mitglieder der P2X-Familie identifiziert (Di Virgilio et al., 2001a). Im Folgenden wird die P2X-Familie und ausführlicher der P2X7-Purinozeptor beschrieben.

1.3.1 P2X-Familie

Die P2X-Rezeptoren stellen ATP-gesteuerte Ionenkanäle dar, die für monovalente (Na^+ , K^+) und divalente Kationen (Ca^{2+}) permeabel sind. Es wurden 7 Mitglieder identifiziert, die als P2X1-P2X7 bezeichnet werden. In fast allen Geweben werden Mitglieder dieser Familie exprimiert (Di Virgilio et al., 1998). Die Kanäle bilden sich als Trimere und können bei heterologer Expression homomere, aber zum Teil auch heteromere Komplexe bilden (Nicke et al., 1998). Die Proteine der P2X-Untereinheiten sind zwischen 379 und 595 Aminosäuren lang. Sie weisen zwei hydrophobe Transmembrandomänen auf, die durch eine große ca. 280 Aminosäuren lange extrazelluläre Schlaufe, die 10 Cysteine und eine Liganden-bindende Domäne enthält, getrennt werden. N-Terminus und C-Terminus aller Rezeptoren sind im Zytoplasma lokalisiert (North, 2002). Die Bindung von ATP an eine nicht genau identifizierte Bindetasche in der extrazellulären Domäne führt zur Konformationsänderung und zur Kanalöffnung. Da noch keine Kristallstruktur von P2X-Rezeptoren existiert und die Rezeptoren auch keine offensichtliche Ähnlichkeit mit andern Ionenkanälen oder ATP-bindenden Proteinen haben, ist über die genauen molekularen Mechanismen der Kanalöffnung noch wenig bekannt (Stojilkovic et al., 2005). Die Kanäle zeigen sowohl unterschiedliche pharmakologische Sensitivität gegenüber ATP als auch Unterschiede in der Desensitivierung, welche je nach Rezeptor langsam, schnell oder gar nicht erfolgt. Das Entfernen von ATP führt bei allen Mitgliedern zu einem Schließen des Kanals.

Die P2X-vermittelte Signaltransduktion geschieht durch einen schnellen Influx von Na^+ und Ca^{2+} und Efflux von K^+ , was zur Depolarisierung der Zellmembran und einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentration führt. Diese drastischen Veränderungen der intrazellulären Ionen-Homöostase durch P2X-Rezeptoröffnung führen zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Botenstoffe und Enzymkaskaden, die bisher partiell identifiziert wurden (Di Virgilio et al., 2001b).

1.3.2 P2X7

P2X7 ist das Mitglied der P2X-Familie, das vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird (Baricordi et al., 1996; Collo et al., 1997; Ferrari et al., 2000). Als Mitglied der P2X-Familie besitzt auch P2X7 zwei Transmembrandomänen, die von einer langen extrazellulären Schleife getrennt sind, sowie einen zytoplasmatischen N-Terminus und einen für P2X7 charakteristischen langen C-Terminus (Surprenant et al., 1996). Im Vergleich zu den andern Mitgliedern der P2X-Familie hat P2X7 eine sehr niedrige Affinität gegenüber ATP mit einer EC_{50} von ca. 500 μM ATP (Surprenant et al., 1996). Lang anhaltende Stimuli agonistischer Konzentrationen extrazellulären ATPs führen interessanterweise zur Bildung von großen Membranporen, durch die Moleküle von bis zu 900 Da passieren können. Experimentell kann dies auch durch die Aufnahme von fluoreszierenden Farbstoffen nachgewiesen werden (Steinberg et al., 1987). Aufgrund dieser sich ausbildenden Membranporen wird P2X7 auch als Zytolytischer Purinozeptor bezeichnet. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass P2X7 nicht selbst diese Pore bildet sondern ein anderes Protein - den Hemichannel Pannexin-1 - rekrutiert wird (Pelegriin and Surprenant, 2006). Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass nicht nur ATP, sondern auch NAD über die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen den P2X7-Purinozeptor aktivieren kann (Seman et al., 2003a) (**Abb. 6**). Allerdings konnte der genaue Mechanismus der Aktivierung des Purinozeptors durch Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung bislang nicht aufgeklärt werden (Kawamura et al., 2005).

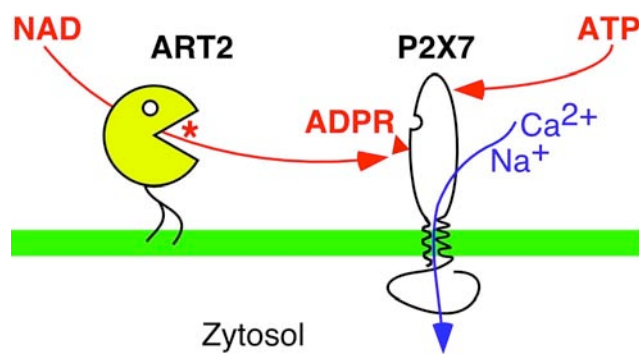


Abb. 6: Aktivierung des P2X7-Purinorezeptors. Der P2X7 Purinozeptor kann auf T Zellen direkt durch ATP aktiviert werden. Exprimieren die T Zellen gleichzeitig ART2, kann die Aktivierung ebenfalls NAD vermittelt erfolgen. Unklar ist bisher, wie P2X7 durch ADP-Ribosylierung aktiviert wird. Die Aktivierung führt zur Kanalöffnung und Kalziumeinstrom.

Die chronische Aktivierung von P2X7 durch ADP-Ribosylierung auf T Zellen führt zum NAD-induzierten Zelltod (NICD) (Scheuplein et al., 2003a; Seman et al., 2003b). Dieser kann durch das Flashen von Annexin V und die Aufnahme von Propidiumjodid nachgewiesen werden (Abb. 7).

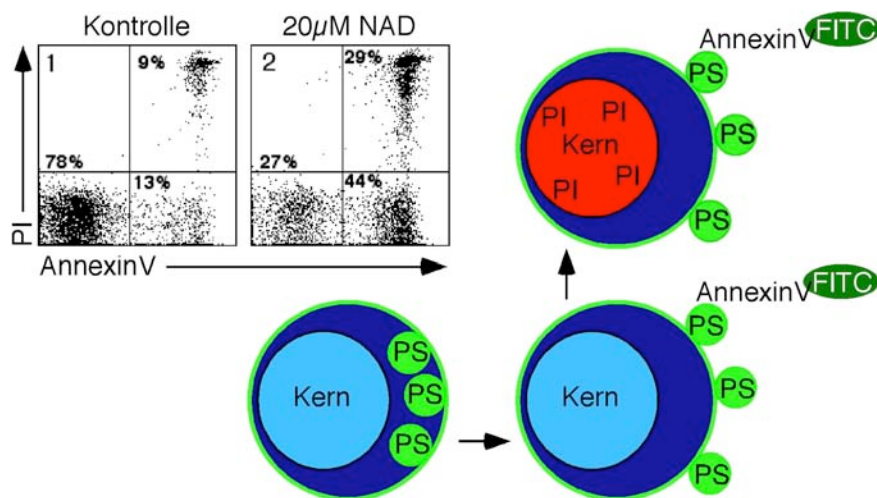


Abb. 7: ART2 vermitteltes Flashen von Phosphatidylserin und Aufnahme von Propidiumjodid. Aufgereinigte T Zellen aus Lymphknoten von BALB/c Mäusen wurden in An- oder Abwesenheit von 20µM NAD für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen und mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid gefärbt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert. Schematisch ist das Flashen von Phosphatidylserin bei früh apoptotischen Zellen und die Aufnahme des DNA-Farbstoffes Propidiumjodid bei toten Zellen dargestellt. (Modifiziert nach Koch-Nolte et al. (2006) *Annals of Medicine*)

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Mechanismen des NAD- und ATP-vermittelten Zelltods und der Effekt von NAD bzw. ADP-Ribosylierung auf den P2X7 Rezeptor genauer untersucht. Dabei gilt es insbesondere zu klären, an welcher Aminosäuren-Seitenkette P2X7 ADP-ribosyliert wird und ob P2X7 direkt dadurch oder durch ADP-ribosylierte Nachbarproteine aktiviert wird.

1.4 Transgene- und Knockout-Mausmodelle

Um die Funktion eines Genproduktes *in vivo* genauer untersuchen zu können, gibt es die Möglichkeit, das Gen in einem Mausstamm zu inaktivieren. Die Untersuchung der für das entsprechende Genprodukt defizienten Mäuse gibt dann Rückschlüsse über die biologische Funktion. Neben dieser als „gene targeting“ bezeichneten Methode zur Generierung so genannter „Knockout“-Mäuse gibt es auch die Möglichkeit, ein Gen in veränderter Form oder mit einem veränderten Expressionsmuster in einer „Transgenen“-Maus zu exprimieren. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Methoden zur Generierung von Knockout-Mäusen und Transgenen-Mäusen gegeben.

1.4.1 Generierung von Knockout-Mäusen

Die Generierung von Knockout-Mäusen geschieht durch die Inaktivierung des Gens in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination (Hogan, 1994; Joyner, 1993). Klonierte Kopien des auszuschaltenden Gens werden durch Ersetzen essentieller Teile des Gens durch ein Antibiotikaresistenz-Gen (z. B. Neomycin) so verändert, dass sie ihre Funktion verlieren. Die so generierten „Targeting-Vektoren“ enthalten weiterhin, an den flankierenden Enden des veränderten Zielgens, die Gensequenz für die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus. Mit diesem Konstrukt werden embryonale Stammzellen, meist vom Mausstamm 129, transfiziert, dabei kommt es in seltenen Fällen zur homologen Rekombination, bei der das intakte Gen der Zielzelle durch die defekte Kopie des Targeting-Vektors ersetzt wird. Zellen bei denen eine Integration des veränderten Gens stattgefunden hat, können nun durch die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Neomycin) selektiert werden, da das Resistenz-Gen ebenfalls integriert wurde. Zusätzlich werden die Zellen mit Ganciclovir behandelt, um nur diejenigen Zellen zu selektieren, bei denen auch tatsächlich eine homologe Integration stattgefunden hat, und nicht an einer zufälligen Stelle im Genom. Zellen, die bei der möglichen Integration ohne Rekombination die Sequenz für das Thymidinkinase-Gen zwangsläufig mit integriert haben, sterben hierdurch ab. So werden nur diejenigen Zellen selektiert, die das defekte Gen an der Stelle des auszuschaltenden Gens integriert haben. Diese ES-Zellen werden in Blastozysten einer Maus, meist C57BL/6, mikroinjiziert. Die Blastozysten werden anschließend in pseudoschwangere Ammen übertragen.

Die Nachkommen sind so genannte Chimären, die mosaikartig aus Zellen mit 129-Genom und C57BL/6-Genom bestehen. Mit Hilfe von Southernblot- oder PCR-Analysen kann die Weitergabe des Knockout-Locus der chimären Tiere auf ihre Nachkommen verfolgt werden. Nach der erfolgreichen Generierung einer Knockout-Maus wird diese auf einen definierten Genetischen Hintergrund eingezüchtet, um kongene Linien zu erhalten.

In unserer Arbeitsgruppe wurden auf diese Weise ART2.1/ART2.2 Doppel-Knockout-Mäuse generiert (Ohlrogge et al., 2002a), die im Folgenden als ART2-defiziente Mäuse oder ART2-KO Mäuse bezeichnet werden. Diese sind auf den BALB/c und C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt worden.

1.4.2 Generierung transgener Mäuse

Die Generierung transgener Mäuse erfolgt durch die zufällige Integration fremder DNA in das Mausgenom (Hogan, 1994). Die hierfür verwendeten Expressionskonstrukte enthalten zusätzlich zu der cDNA des Gens, das als Transgen exprimiert werden soll, auch einen entsprechenden Promoter und regulatorische Sequenzen, die das Expressionsmuster bestimmen. Es kann sowohl ein ubiquitärer Promoter verwendet werden, dadurch wird das Transgen ubiquitär exprimiert, während die Verwendung eines gewebsspezifischer Promoters zu der Expression in einem definierten Gewebe führt. Wird die Sequenz des Transgens verändert, kann die Funktion des Gens als auch die Lokalisation des Genprodukts verändert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ART2.2 transgene Mäuse generiert werden. Hierfür wurde ein auf dem pHSE3'-Vektor basierendes Injektionskonstrukt hergestellt, bei diesem ist das Transgen unter der Kontrolle des IgH-Enhancers und des in allen hämatopoetischen aktiven MHC I Promoters (Pircher et al., 1989). Das Konstrukt wurde N-terminal mit einem FLAG-Tag versehen, um das transgene Transkriptions-Produkt auf der Zelloberfläche mit dem FLAG-Tag spezifischen M2 Antikörper anfärben zu können.

1.5 Lipid Rafts

GPI-verankerte Membranproteine sind häufig mit spezialisierten Membran-Mikrodomänen assoziiert. Diese so genannten „Lipid Rafts“ oder GEMs (glycolipid enriched microdomains) spielen eine zentrale Rolle bei der Transduktion von Signalen aus dem extrazellulären Milieu ins Zellinnere (Millan et al., 2001).

Rafts kennzeichnen sich durch einen hohen Sphingolipid- und Cholesterol-Bestand in ihrer Zusammensetzung aus. Mit ihrem hohen Anteil an gesättigten Kohlenwasserstoffketten flottieren sie als „Inseln“ zwischen den kurzen ungesättigten Phospholipiden der restlichen Zellmembran (**Abb. 8**). Die Zusammensetzung der Rafts bedingt, dass nur bestimmte Proteine mit ihnen assoziiert sind, es handelt sich dabei um bestimmte transmembranäre, acetylierte zytosolische oder GPI-verankerte Proteine (**Abb. 8**), der Großteil der Membranproteine ist Raft-ungebunden (Horejsi et al., 2004; Pike, 2004; Simons and Toomre, 2000).

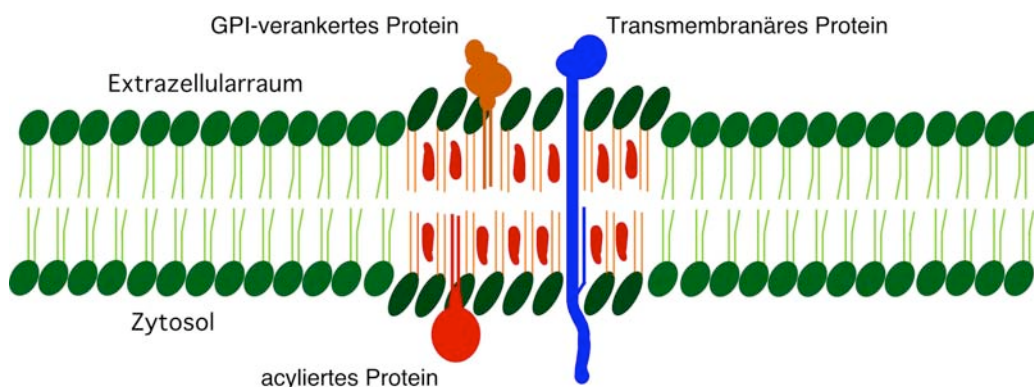


Abb. 8: Schema einer Membran-Mikrodomäne (Lipid Raft). Dargestellt ist die Zusammensetzung einer Membran-Mikrodomäne bzw. eines Lipid Raft, diese sind durch einen erhöhten Cholesterol- (rot) und Gangliosidgehalt (dunkelgrün) charakterisiert. Damit assoziiert sind häufig transmembranäre (blau), acylierte (rot) und GPI-verankerte (orange) Proteine. (Modifiziert nach Dykstra et al. (2003) *Annual Review of Immunology*)

Bei der T-Zell-Aktivierung kommt es zur Zusammenlagerung von mehreren Mikrodomänen zu einer großen Signaltransduktions-Plattform, dem sog. „supramolecular activation cluster (SMAC)“ (Horejsi, 2003; Millan et al., 2001). Die TCR-Untereinheiten, die MHC-Ko-Rezeptoren CD4 und CD8, die Ick Tyrosinkinase und das Adapterprotein LAT lagern sich bei Aktivierung in einem großen Raft mit weiteren Proteinen zusammen und bilden mit der Antigen-Präsentierenden-Zelle (APC) die „Immunologische Synapse“ aus. Dabei kommt es zur Konzentration Raft-assoziiierter Proteine an der Grenzfläche der Zellen, diese sind von einem Ring von Zell-Zell-Interaktionsmolekülen wie dem Integrin LFA-1 umge-

ben. Es ist experimentell gut belegt, dass die Mikrodomänen eine zentrale Rolle bei der Formation der Immunologischen Synapse spielen (Janeway et al., 2005).

Rafts sind ferner an der Reorganisation der Zellmembran nach Induktion der Apoptose beteiligt (Kunzelmann-Marche et al., 2002). Dabei wird das normalerweise an der Innenseite der Zellmembran liegende Phospholipid Phosphatidylserin nach außen gestülpt, eine essentielle Voraussetzung für die Ausprägung der „Phagozytischen Synapse“ zwischen apoptotischer T-Zelle und Phagozyt (Fadok et al., 2001; Savill et al., 2002).

Rafts sind aufgrund ihrer besonderen Lipid-Zusammensetzung resistent gegenüber Non-Ionischen Detergenzien, dadurch lassen sie sich mittels Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Membranbestandteilen trennen, je nach Detergenz erhält man Rafts in der Größenordnung von 25 bis 300 nm Durchmesser. In Situ lassen sich die DIMs (Detergent Insoluble Membrane) mittels Fluoreszenz-markierter Choleratoxin B-Untereinheit detektieren, diese bindet spezifisch an das in Rafts vorkommende Gangliosid GM1. Raft assoziierte Proteine können in Situ mittels so genannter Choleratoxin Co-Capping Experimente nachgewiesen werden, sowie im Immunoblot nach SDS-PAGE Analyse der mittels Dichtegradienten fraktionierten Membranproteine.

GPI-verankerte Membranproteine sind häufig mit diesen spezialisierten Membran-Mikrodomänen assoziiert (Bromley et al., 2001; Cherukuri et al., 2001; Horejsi, 2003; Janeway et al., 2005). Da ART2.2 als GPI-verankertes Molekül in der Zellmembran verankert ist (Hollmann et al., 1996b), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Assoziation der ART2.2 mit den Membran-Mikrodomänen untersucht werden.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die GPI-verankerte ART2.2 überträgt die ADP-Ribose Gruppe von NAD auf Arginin-Seitenketten in anderen Membranproteinen. Die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen kann durch Verwendung von ^{32}P -NAD oder etheno-NAD verfolgt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die ADP-Ribosylierung von bekannten Zielproteinen auf primären T-Zellen und ART-exprimierenden Lymphomzellen vergleichend untersucht werden. Mit Hilfe des etheno-Adenosin-spezifischen 1G4 Antikörpers sollten etheno-ADP-ribosylierte Proteine aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Der ionotrope, zytolytische P2X7 Purinozeptor kann durch den löslichen Liganden ATP, sowie durch ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen aktiviert werden. P2X7 ist selbst Target der ADP-Ribosylierung. Allerdings ist unklar, ob P2X7 direkt durch seine ADP-Ribosylierung oder aber indirekt durch ADP-ribosylierte Nachbarproteine aktiviert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Target-Arginin des P2X7 bestimmt werden, welches durch die ADP-Ribosylierung modifiziert wird und die Rolle dieses Target-Arginins bei der Aktivierung des Purinozeptors geklärt werden.

Im Mausmodell können die Folgen der Defizienz bzw. der Überexpression eines Proteins *in vivo* mit Hilfe von KO- und Transgenen-Mäusen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein ART2.2-transgenes Mausmodell etabliert und die Folgen erhöhter ART-Aktivität auf Lymphozyten untersucht werden.

GPI-verankerte Proteine lokalisieren häufig in spezialisierten Membranmikrodomänen, so genannte Lipid Rafts. Lipid Rafts spielen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und Antigen-Präsentierender Zelle sowie bei der Transduktion von Signalen aus dem extrazellulären Milieu in das Zellinnere. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die GPI-verankerte ART2.2 mit Lipid Rafts assoziiert ist, und inwiefern dadurch ihre Aktivität und Spezifität beeinflusst wird.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte:

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Axiovert S100 Mikroskop	Zeiss, Jena
Digitalkamera DP500	Olympus, Hamburg
Biometra T3 PCR-Maschine	Whatman Biometra, Göttingen
Fujix BAS2000 Phosphoimager	Fuji Film, Tokyo (Japan)
Ultrazentrifuge, SW40-Rotor	Beckman-Coulter, Krefeld

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Kodak Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Company, Connecticut (USA)
Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Kulturplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Nitrozellulose-Hybond-C	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Polyvinylidendifluorid-ImmobilonP (PVDF)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
NuPAGE precast Gele	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Nitex Membran (80µM Maschenweite)	Cadish Precision Meshes Ltd., London (GB)

3.1.3 Mäusestämme

C57BL/6J	Charles Rivers, Sulzfeld
BALB/c/ByJ	Jackson Laboratory (USA)
ART2.2-TG	Die transgenen Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit der „Transgenic Mouse Facility“ im ZMNH (Dr. Hermanns-Borgmeyer) hergestellt und werden zur Zeit auf den BALB/c.ART2-KO Hintergrund eingezüchtet

Die Mäusestämme wurden von der jeweiligen Firma erworben und in der Tierhaltung des UKE's weitergezüchtet. Alle Mäuse standen als CD38 Knock-out oder als ART2 Knock-out zur Verfügung.

3.1.4 Zelllinien

DC 27.10 Hybridom	B. Fleischer, BNI, Hamburg
YAC-1 ATCC A/Sn Lymphom	ATCC, Manassas (USA)
MD 27 BALB/c Hybridom	M. Neumaier, UKE, Hamburg
HEK-T	Humane Embryonale Nierenzelllinie

3.1.5 Antikörper

Ratte α Maus ART2. IgG2 α FITC, A102	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Hamster α Maus CD3 ϵ IgG FITC, 145, 2c11	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α Maus CD4 IgG2 α FITC, RM45	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α Maus CD8 IgG2 β FITC, 536.7	Pharmingen, Heidelberg
Esel α Maus IgG(H+L) FITC	Dianova, Hamburg
Esel α Kaninchen IgG (H+L) F(ab)2 FITC	Dianova, Hamburg
Esel α Schaf IgG (H+L) F(ab)2 FITC	Dianova, Hamburg
Maus α etheno Adenosin IgG2 α Alexa488	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Maus α etheno Adenosin IgG2 α	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Ratte α Maus ART2.1	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Ratte α Maus ART2.2	The Jackson Laboratory
Ratte α Maus ART2.1/2.2 Alexa488	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Kaninchen α Maus P2X7 / K1G (polyklonal)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Kaninchen α Ratte P2X7 / 3428 (polyklonal)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Kaninchen α Human P2X7 / L4 (monoklonal)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Kaninchen α Hamster IgG (H+L) F(ab)2 FITC	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen IgG (H+L) F(ab)2 FITC	Dianova, Hamburg
Ziege α Hamster IgG (H+L) F(ab)2 PE	Dianova, Hamburg
Hamster α Maus CD3 ϵ IgG2 β PE, 1452C11	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α Maus CD4 IgG2 α PE, RM45	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α Maus CD11 α IgG2 α PE, 2D7	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α Maus CD25 IgG2 β PE, 3C7	Pharmingen, Heidelberg
Maus α Ratte IgG (H+L) F(ab)2 PE	Dianova, Hamburg
Esel α Maus IgG (H+L) F(ab)2 PE	Dianova, Hamburg
Maus α FLAG M2 IgG1 Sigma	Aldrich, Deisenhofen
Ratte α Maus CD11a IgG2 α , M17/4	Pharmingen, Heidelberg
AnnexinV APC	Becton Dickinson, Heidelberg
AnnexinV FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Antikörper wurden von Pharmingen, Heidelberg bezogen.

3.1.6 Chemikalien

BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Carbenicillin	Serva, Heidelberg
DNA Typing Grade Agarose	GibcoBRL, Karlsruhe
DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DNA Ladepuffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1	Dynal, Hamburg
ECL Western blotting detection reagent	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
G418	Gibco BRL, Eggenstein
KN62	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Precision Plus Protein, All Blue Standards	BioRad, München
³² P-NAD	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Propidiumjodid	Pharmingen, Hamburg
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standards	Novex, San Diego, CA (USA)
MultiMark	Invitrogen-Novex, Leek (Niederlande)
StrataClean™ Resin	Stratagene, Heidelberg
NuPAGE SDS PAGE MOPS running buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE SDS PAGE MES running buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE SDS PAGE transfer buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE sample reducing agent	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE LDS sample buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Aceton, reinst	Merck, Darmstadt
Ultramount, permanent Mounting Medium	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

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

3.1.7 Enzyme

PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Platinum Blue DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Bam</i> H1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Sal</i> 1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bcl</i> 1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Pst</i> 1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Xho</i> 1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Eco</i> R1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt

3.1.8 Primer

3.1.8.1 PCR-Screening-Primer & Primer zur Generation transgener Mäuse

Name	Produkt	Nukleotidsequenz
F13	ART2.1 Exon F vorwärts	CATCCACAGAAGCCTTAATGAG
F43	ART2.1 Exon F rückwärts	CTAAGCTGCTAACGTTGTCTGC
F44	ART2.2 Exon F rückwärts	CTCTCTTTGTTAAAGATGAAGAACT
NF1	Neomycinresistenz vorwärts	GATGGATTGCACGCAGGTTCT
NR1	Neomycinresistenz rückwärts	AGGTAGCCGGATCAAGCGTAT
TgF	Transgene ART2 vorwärts	TAAAAGTCGACGAATTCATGGCCTTACCAG
TgGPIr	Transgene ART2 rückwärts	GCACTTGATCAGATCTACGGCTCAGCAAGAGT

3.1.8.2 P2X7-Mutageneseprimer

Name / Mutation	Nukleotidsequenz
Ms_R124K_forward	GTGTCCTGAGTATCCCAAGCGCGGTGCACAGTGC
Ms_R124K_reverse	GCACTGTGCACCGCGCTTGGGATACTCAGGACAC
Ms_R125K_forward	CTGAGTATCCCGCGAAGGGTGCACAGTGCTCTTTC
Ms_R125K_reverse	GAAAGAGCACTGTGCACCCTTCGCGGGATACTCAG
Ms_R133K_forward	CAGTGCTCTTCTGACAAGCGTTGTAAAAAGGG
Ms_R133K_reverse	CCCTTTTTTACAACGCTTGTGTCAGAAGAGCACTG
Ms_R134K_forward	CTCTTCTGACCGGAAGTGTA AAAAGGGGTGG
Ms_R134K_reverse	CCACCCCTTTTTTACACTTCCGGTCAGAAGAG
Ms_RR124KK_for	CTGTGTCCTGAGTATCCCAAGAAGGGTGCACAGTGCTCTTTC
Ms_RR124KK_rev	GAAAGAGCACTGTGCACCCTTCTTGGGATACTCAGGACACAG
Ms_RR133KK_for	CAGTGCTCTTCTGACAAGAAGTGTA AAAAGGGGTG
Ms_RR133KK_rev	CACCCCTTTTTTACACTTCTTGTGTCAGAAGAGCACTG
Ms_R276K_forward	CCCAGGTACAGCTTCAAGCGCCTGGATGACAAG
Ms_R276K_reverse	CTTGTGTCATCCAGGCGCTTGAAGCTGTACCTGGG
Ms_R294K_forward	CCCCGGCTACAACCTTCAAGTATGCCAAGTACTATAAG
Ms_R294K_reverse	CTTATAGTACTTGGCATACTTGAAGTTGTAGCCGGGG
hu_R125K_forward	CCGAGTATCCCACCAAAGGAAGATCTGTTCC
hu_R125K_reverse	GGAACAGAGCGTCCTTTTGGTGGGATACTCGG
hu_R126K_forward	GAGTATCCCAACCCGCAAGACGTCTGTTCTCTG
hu_R126K_reverse	CAGAGGAACAGAGCGTCTTGCGGGTGGGATACTC
hu_R133K_forward	CTCTGTTCTCTGACAAAGGTTGTAAAAAGGG
hu_R133K_reverse	CCCTTTTTTACAACCTTTGTGTCAGAGGAACAGAG
hu_RR125KK_for	CCCGAGTATCCCACCAAGAAGACGCTCTGTTCTCTG
hu_RR125KK_rev	CAGAGGAACAGAGCGTCTTCTTGGTGGGATACTCGGG
rt_R125K_forward	GTCCTGAGTATCCCAGCAAAGGTAAACAGTGCCATTC
rt_R125K_reverse	GAATGGCACTGTTTACCTTTGCTGGGATACTCAGGAC

3.1.9 Medien und Lösungen

3.1.9.1 Zellkulturmedien:

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

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

3.1.9.2 Gey's Puffer für Erythrozytenlyse

Puffer A: 35g NH₄Cl, 1.85g KCl, 1.5g Na₂HPO₄*12H₂O, 0.119g KH₂PO₄, 5.0g Glukose, 0.05g Phenol Rot in 1 Liter H₂O

Puffer B: 4.2g MgCL₂*6H₂O, 1.4g MgSO₄*7H₂O, 3.4g CaCl₂*2H₂O in 1 Liter H₂O

Puffer C: 22.5g NaHCO₃ in 1 Liter H₂O

1x Gey's Puffer wurde kurz von Gebrauch angesetzt: 20 % A + 5 % B + 5 % C + 70 % H₂O

3.1.9.3 Puffer für Zelllyse

Lysispuffer: 1 % TritonX100, 1mM AEBSF, 1mM ADP-Ribose, 1mM NAD, 2mM EDTA in PBS

3.1.9.4 Puffer für Gradientenzentrifugation

Lysispuffer: 25 mM MES, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM AEBSF, 1% TritonX100 oder Brij98

Ansätze für die Stufen des Gradienten: 80%, 30% und 5% Sucrose in Lysispuffer

3.1.9.5 SDS-PAGE und Western blot

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

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

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

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

Blocklösung: 1xTBS, 10 % Ziegenserum oder 1% Milchpulver

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

Waschlösung: 1xTBS, 0.5 % Tween 20

Silberlösung: 1xTBS, 20 % AgNO₃, 40 % Na Citrat, 20 % FeSO₄

3.1.9.6 Puffer für Dünnschichtchromatographie

Puffer 1: 1 M Essigsäure)

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

3.1.9.7 Isolierung von genomischer DNA

Lysis Puffer: 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.2M NaCl, 100 µg Proteinase K (direkt vor Gebrauch dazugeben)
Elutionspuffer TE: 10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA

3.1.9.8 Isolierung von Plasmid-DNA

„QIAprep Spin Miniprep Kit“

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

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3 M K-Acetat pH 5.5

Waschpuffer PB

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10 mM Tris-Hcl

3.1.9.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Puffer QG

Waschpuffer PE

Elutionspuffer EB: 10 mM Tris-Hcl

3.1.9.10 Southernblot

Denaturierungslösung: 0.4 M NaOH

Depurinierungslösung: 0.25 M HCl

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

Transferlösung: 2xSSC

Waschpuffer: 0.5xSSC, 1% SDS

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

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

3.1.9.11 Bindepuffer für AnnexinV-Bindung

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

3.1.10 ART2 Substrate, Agonist und Inhibitor von P2X7

Als Substrate für die ART2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung wurden NAD und das NAD-Analogon 6'-etheno-NAD in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. Als direkter Agonist des P2X7-Rezeptors wurde ATP in den angegebenen Konzentrationen benutzt. Der P2X7-spezifische Inhibitor KN62 wurde in Blockadeexperimenten in den angegebenen Konzentrationen verwendet. In **Abb. 9** sind die Strukturformeln dieser Moleküle dargestellt.

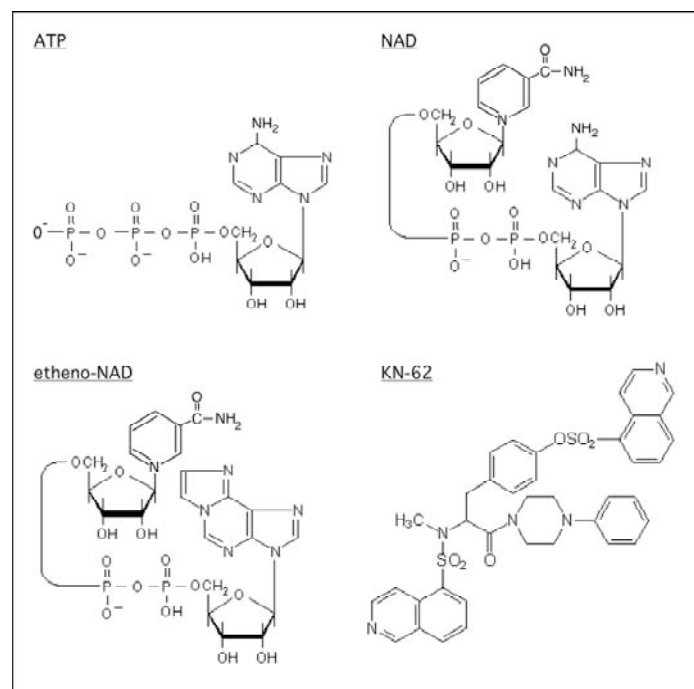


Abb. 9: Strukturformeln von NAD, etheno-NAD, ATP und KN62. NAD und 6'-etheno-NAD (eNAD) dienen beide als Substrat für ADP-Ribosyltransferasen. ATP ist ein Agonist für den P2X7 Purinozeptor. KN62 ist ein Inhibitor des P2X7 Purinozeptors.

3.2 Methoden

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

Current Protocols In Immunology (Coico 2001)

Current Protocols In Molecular Biology (Asubel 1999)

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

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Gewinnung von Lymphomzellen

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

3.2.1.2 Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus

6-8 Wochen alte Mäuse wurden mit einem 30% O₂/70% CO₂ Gasgemisch betäubt und anschließend mit 100% CO₂ getötet. Lymphknoten und Thymus wurden präpariert und in 35 mm Petrischalen in eiskaltem RPMI aufgenommen. Es wurden hierbei die zervikalen, axillären, inguinalen, mesenterialen und lumbalen Lymphknoten entnommen. Die Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus wurden mit Hilfe einer NITEX-Membran (70 µm Maschengröße) aus dem Zellverband gelöst. Hierbei wurden die Lymphknoten oder der Thymus zwischen zwei Membranen gelegt und mit einer Pinzette zerdrückt. So wurden die

Zellen durch das feinmaschige Gewebe in das Medium freigesetzt, während die Membran Hülle und Bindegewebe zurückhielt. Die Zellen wurden mehrfach bei 4°C gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Lymphozyten für Versuche eingesetzt.

3.2.1.3 Präparation von murinen Milzzellen

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

3.2.1.4 Depletion der B Zellen

Die Depletion der B-Zellen erfolgte mit Hilfe magnetischer „Beads“, an denen Schafantikörper gegen Maus IgG1 immobilisiert sind. Die „Beads“ wurden vor der Verwendung zweimal mit RPMI gewaschen. Die Menge verwendeter „Beads“ richtet sich dabei nach der Zahl der zu depletierenden B-Zellen. Es wurden ca. 5 „Beads“ pro B-Zelle eingesetzt (ca. 30% B-Zellen bei Lymphknotenzellen). Die Zellen wurden 10 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsinkubator mit den immobilisierten Antikörpern inkubiert. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die magnetischen „Beads“ und damit auch die gebundenen B-Zellen aus der Suspension entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß mit der gleichen Menge an „Beads“ überführt und für weitere 10 Minuten rotiert. Nach der zweiten Inkubation wurden restlichen B-Zellen mit Hilfe des Magnetständers entfernt. Die Zahl der aufgereinigten T-Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.1.5 Transiente Transfektion von HEK-T Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen sollten zum Transfektionszeitpunkt zu 50% konfluent sein. Für die Transfektion einer T25-Flasche mit ca. 2×10^6 Zellen wurden 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl JetPEI-Reagenz eingesetzt. Dabei wurden zunächst die DNA und die JetPEI-Reagenz einzeln in jeweils 250 µl NaCl durch wiederholtes Vortexen aufgelöst. Anschließend wurde die JetPEI-Lösung zu der DNA-Lösung zugegeben, erneut gevortext und für 30 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium in den Zellkulturflaschen gewechselt und anschließend die JetPEI-DNA-Lösung zu den Zellen zugegeben.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Für das Screening der ART2-KO Mäuse und die Analyse der ART2.2-transgenen Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen. Hierfür wurden die Schwanzbiopsien zunächst für 3 Stunden bei 55°C auf einem Schüttler in 600 µl Lysispuffer und 100 µg Proteinase-K lysiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, in dem bereits 600 µl Isopropanol für die Fällung der DNA vorgelegt worden war. Die ausgefallene DNA wurde durch 1-minütige Zentrifugation mit 9000 rpm pelletiert und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

3.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein etabliertes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA-Segmenten. Hierbei wurde beim Screening der ART2-defizienten und ART2.2-transgenen Mäusen als Template 100-500 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsien verwendet. Bei der Amplifikation der ART2.2 Sequenzen für die Generierung der Injektionskonstrukte wurde 0.1-1 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Polymerasen wurden nach erwarteter Fragmentlänge und Fehlerrate der Polymerase ausgewählt. So wurde für die Amplifikation der Sequenzen für die Injektionskonstrukte die Pfu-Turbo Polymerase mit niedriger Fehlerrate ausgewählt. Je nach Länge der Primer und GC-Gehalt der Sequenz wurden unterschiedliche Schmelztemperaturen gewählt. Um die Spezifität der Primer zu erhöhen, wurde zum Teil eine „touch-down“-PCR mit fallenden Annealing-Temperaturen in den ersten Zyklen und einer konstant niedrigen Annealing-Temperatur während der folgenden Zyklen durchgeführt.

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

F13xF43 (Exon F)

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

TgFxTgGPIr (Sequenz für transgene Maus)

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

NF1xNR1 (Neomycinresistenz)

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

TgFxTgF44 (Transgen)

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

3.2.2.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die Arginine des P2X7-Purinozeptors wurden an den einzelnen Positionen durch „side-directed mutagenesis“ zu Lysinen mutiert. Es wurden Mutationsprimer in beide Richtungen synthetisiert, komplementär zu der Region, welche die Position des jeweiligen Arginins umfassten. Bei den Primern wurde das Basentriplett welches für die Arginine kodierte (AGG, AGA, CGA, CGG, CGC oder CGT) zu einem für Lysin kodierenden Triplett umgewandelt (AAG oder AAA). Mit diesen Primerpaaren und dem pcDNA6.1-P2X7 Vektor als Matrize wurde die PCR durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *Dpn* I verdaut, dieses Enzym schneidet nur methylierte DNA, dadurch wurden die Matrizen-Vektoren entfernt. Mit der DNA wurden kompetente *E. Coli* transformiert und diese ausplattiert. Am nächsten Tag wurden vier Kolonien gepickt und eine DNA-Mini-Prep laut Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die DNA wurde sequenziert und ein Aliquot kryokonserviert. Nach der Überprüfung der erfolgreichen Mutation wurden DNA-Maxi-Preps laut Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) aus den Kryo-Stocks angefertigt und für die Transfektion von HEK-T Zellen für die Versuche eingesetzt.

3.2.2.5 E.coli Transformation

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

3.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die ART2.2-Sequenz des pHSE3'-Konstrukts für die transgenen Mäuse wurden vor der Injektion sequenziert, um sicher zu gehen, dass bei der PCR-Amplifikation keine Mutationen entstanden sind. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1980). Es wurde das BigDye Terminator Sequenzierungskit verwendet. Es wurden ca. 500 ng DNA und die entsprechenden Primer verwendet.

Sequenzierungsprogramm:

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

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

3.2.2.7 Herstellung einer DNA-Sonde

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

3.2.2.8 Markierung der DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit dem „Rediprime DNA Labeling Kit“. Hierbei wird eine Polymerase verwendet, die an die freien 3'-Enden von degenerier-

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

3.2.2.9 Southernblot

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

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 „Fluoreszenz Activated Cell Sorting“ (FACS)

Die so genannte Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einer großen Zahl an Zellen. Hierbei kann die Expression von Zelloberflächenmolekülen durch Fluorochromgekoppelte monoklonale Antikörper nachgewiesen werden. Es kann hierbei sowohl die relative Expression auf der einzelnen Zelle als auch der Anteil exprimierender Zellen in

einer Population bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Expression zahlreicher Antigene auf Lymphomzellen, Thymus-, Milz- und Lymphknotenlymphozyten untersucht. Eine weitere Anwendung wurde durch fluoreszierende Substanzen ermöglicht, mit denen die Zellen angefärbt werden. So konnten Calciumflux und das nach außen Kehren des Membranlipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden.

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen oder Farbstoffen angefärbt wurden, durch eine Kapillare gedrückt, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht. Die einzelnen Zellen werden durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge erfasst. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Informationen werden durch einen Computer mit entsprechender Software analysiert. Die Lichtstreuung wird als Vorwärtsstreuung (Forwardscatter) und seitliche Streuung (Sidescatter) registriert. Der Forwardscatter entspricht dem Schatten, den eine angestrahlte Zelle wirft und damit einem Maß für ihre Größe. Das zur Seite gestreute Licht (Sidescatter) gibt Auskunft über die Granularität der angestrahlten Zelle. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz in den jeweiligen Kanälen entspricht der Expressionsstärke des durch Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle bzw. Stärke der Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen. Die Anfärbungen mit Antikörpern zum Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen wurden auf 96-well Platten durchgeführt. Hierbei wurden 4×10^5 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden mit eisgekühltem Kulturmedium durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 1600 rpm wurden die Zellen in 100 µl Kulturmedium für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit ca. 0.5µg der jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubiert. Hierbei wurden bis zu 3 verschiedene Antikörper, die jeweils mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt waren, verwendet. Bei der Verwendung unkonjugierter Antikörper wurde im Anschluss, nach einem Waschschrte, eine 30-minütige Inkubation mit einem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper durchgeführt. Nach der Anfärbung wurden die Zellen gewaschen und in FACS-Röhrchen mit Kulturmedium und 10µg/ml Propidiumjodid überführt. Die Zellen wurden dann im FACS mit Hilfe der entsprechenden Software (Cellquest, Becton Dickinson) gemessen und die Daten ausgewertet.

3.2.3.2 Messung der ART2.2 Aktivität mit dem 1G4 Assay

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen stehen Antikörper zur Verfügung, die spezifisch für phosphorylierte Aminosäuren sind und die Arbeit auf diesem Gebiet wesentlich erleichtern (Glenney et al., 1988). Für die Untersuchung von ADP-ribosylierten Aminosäuren standen bisher keine vergleichbaren Antikörper zur Verfügung. Für die Untersuchung der ADP-Ribosylierung wurde etheno-NAD, ein NAD-Analogon eingesetzt (siehe **Abb. 9**), das zur etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen führt. An die etheno-Adenosingruppe bindet der 1G4 Antikörper. Dieser Antikörper wurde ursprünglich entwickelt, um DNA-Modifikationen durch Anilin zu erforschen (Young and Santella, 1988b). Eine andere Arbeitsgruppe verwendete diesen Antikörper, um die Aktivität von Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) im Zellkern zu untersuchen (Davis et al., 1998). Dieser Ansatz funktioniert auch auf der Zelloberfläche von Lymphozyten. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit der jeweils angegebenen etheno-NAD-Konzentration bei 37°C (10^6 Zellen/100 µl) inkubiert, anschließend wurden sie zweimal gewaschen und mit 1G4 (1 µg /100 µl) angefärbt. Dazu wurde FITC oder Alexa488 konjugierter 1G4 Antikörper verwendet. In einigen Versuchen wurde die 1G4 Markierung mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper detektiert. Die Antikörper Inkubationen wurden 20 Minuten bei 4°C durchgeführt.

3.2.3.3 Nachweis von Marker- und Aktivierungsantigenen

Die Zellen wurden auf ihre Expression der Markerantigene CD3, CD4, CD8, CD38, ART2.2, LFA-1, B220 und IgG untersucht. Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers oder in einer Konzentration von 1 µg/100 µl verwendet. Es wurden sowohl Zweifach- als auch Dreifach- Färbungen mit FITC-, Alexa-488, APC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

3.2.3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

5×10^5 stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden wie für die FACS-Analysen mit Markern für die Zelloberflächen Expression von ART2.2 (AliA53) und GM1 (CT_B) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 10

Minuten bei 4°C mit 1% TX-100 behandelt und direkt mit 2% PFA fixiert. Die Zellen wurden mit einer Cytospin-Zentrifuge auf Objektträger überführt und mit „fluorescence mounting medium“ (DAKO, Hamburg) eingedeckelt. Die so präparierten Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (DM LFSA Leica, Wetzlar) mit einem 40x Öl-Immersion Objektiv (Numerische Apertur 1,25) und Leica Software analysiert.

3.2.3.5 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay basiert auf dem Nachweis von Phosphatidylserin (PS), das zu Beginn der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran gekehrt wird, wo es bei vitalen Zellen nicht vorkommt. Die PS-Exposition kann mit FITC-konjugiertem Annexin V in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Bereits abgestorbene Zellen färben sich mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid an, welcher normalerweise von lebenden Zellen aktiv aus der Zelle entfernt wird. Für den Assay wurden aufgereinigte T Zellen mit den angegebenen NAD- und ATP-Konzentrationen für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen, das zusätzlich 2 mM CaCl₂ enthielt und auch für die folgenden Schritte verwendet wurde. Dies ist notwendig, da die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin Ca²⁺ abhängig ist. Jeder Ansatz enthielt 5 µl FITC-konjugiertes Annexin V und 3 µl Propidiumiodid in 100 µl Medium. Während Annexin V frühe apoptotische Zellen anfärbt, werden durch den DNA-Farbstoff Propidiumiodid alle toten Zellen sichtbar gemacht. Die folgende 20-minütige Inkubation erfolgte lichtgeschützt auf Eis. Die Zellen wurden in einem Volumen von 300 µl im FACS untersucht. In weiteren Versuchsansätzen wurden die Zellen vor der NAD-Behandlung noch mit 20 µM etheNAD bei 37 °C oder KN62 (5 µM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und wie oben beschrieben weiter behandelt.

3.2.3.6 Western blot Analysen

Beim Western blot (Burnette, 1981) werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels Gelelektrophorese größenfraktioniert, auf eine Membran überführt und dort einer für bestimmte Proteine spezifischen Nachweismethode unterzogen. In dieser Arbeit sollten auf diese Weise die ADP-ribosylierten Zielproteine von ART2.2 untersucht werden.

3.2.3.6.1 Inkubation mit etheno-NAD und Zelllyse

Lymphozyten oder Lymphomzellen wurden in einem Volumen von 100 μ l pro 10^6 Zellen mit etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal gewaschen und in 100 μ l Lysispuffer aufgenommen. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht lysierten Zellbestandteile erst 5 Minuten bei 5000 U/min und dann 15 Minuten bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Die so gewonnenen Lysate wurden direkt für eine SDS-PAGE Analyse oder für eine Immunpräzipitation verwendet.

3.2.3.6.2 Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD und Zelllyse

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

3.2.3.6.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde 1 μg Antikörper an 15 μ l Protein G Sepharose Matrix in 200 μ l PBS 1 % TX-100 60 min bei 4 °C gekoppelt. Dabei wurden monoklonale oder polyclonale Antikörper gegen die jeweiligen Antigene verwendet. Anschließend wurde die Matrix mit PBS 1 % TX-100 dreimal gewaschen. Die Zelllysate wurden für 60 Minuten mit 15 μ l unbehandelter Protein G Sepharose inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine

aufzufangen. Anschließend wurde die Protein G Matrix 3 min bei 5000 U/Min abzentrifugiert, der Überstand auf die Antikörper-Protein G Sepharose Matrix gegeben und wiederum 60 min bei 4 °C inkubiert. Die Matrices wurden fünfmal gewaschen und in SDS Lade-puffer aufgenommen.

3.2.3.6.4 SDS-PAGE

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

3.2.3.6.5 Silberfärbung

Das Muster der größenfraktionierten Proteine konnte mit Hilfe einer Silberfärbung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran überprüft werden. Die Membran wurde dazu 1-2 Minuten in einer 10 ml Silberlösung schwenkend gefärbt, mit H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.2.3.6.6 Immundetektion

Die Immundetektion der untersuchten Proteine erfolgte auf einer PVDF-Membran, die zuerst 30 Minuten in einer Blocklösung (TBS mit 5% Ziegenserum) bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper in der angegebenen Verdünnung für eine Stunde bei 4 °C (rotierend) und für eine weitere Stunde mit dem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase (HRP) (1:5000) inku-

biert. Nach jeder Antikörperinkubation folgten drei einminütige und zwei zehnminütige Waschschrte. Dann wurde die Chemilumineszenz-Reaktion mit dem "ECL Western blotting detection reagent" durchgeführt. Die Membran wurde mit einer Plastikfolie bedeckt, ein Hyperfilm ECL (Roche) für wenige Sekunden bis mehrere Minuten aufgelegt und entwickelt.

3.2.3.6.7 Autoradiographie

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

3.2.3.7 Radioisotopen-basierte enzymatische Assays

Es sollte die Enzymaktivität von gesheddeter ART2.2 untersucht werden. Aufgereinigte T Zellen aus den Lymphknoten einer ART2.2-TG Maus wurden für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, die Überstände abgenommen und die Pellets lysiert. Mit an Protein-G-Sepharose immobilisierten anti-ART2 mAb Ali53 wurde ART2.2 aus den Überständen und Lysaten präzipitiert. Danach wurde die aufgereinigte ART2.2 für 30 Minuten mit $2\text{ }\mu\text{M}$ NAD ($2\text{ }\mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD) in Gegenwart von 4 mM Agmatin weiterinkubiert. Als Kontrollen wurden Wasser (H_2O) und rekombinante ART2.2 eingesetzt. Je $1\text{ }\mu\text{l}$ der Inkubationsüberstände wurde für eine Dünnschichtchromatographie verwendet.

3.2.3.7.1 Nachweis der Enzymreaktion: Dünnschicht-Chromatographie und Autoradiographie

Die Proben wurden nach der Inkubation mit ^{32}P -NAD abzentrifugiert und je $1\text{ }\mu\text{l}$ des Überstandes auf eine PEI-Cellulose Folie aufgetragen. Die Folie wurde 5 Minuten in Lösung 1 (1 M Essigsäure) in einer Glaskammer gestellt, um die Nukleotide entsprechend ihrer Löslichkeit aufzutrennen. Die Auftrennung mit der Lösung 2 ($0,3\text{ M}$ LiCl, $0,9\text{ M}$ Essigsäure)

wurde für 50 Minuten durchgeführt. Die Folie wurde luftgetrocknet, eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm bei -80°C zwischen 3 und 20 Stunden exponiert.

3.2.3.8 Isolierung von Membran-Mikrodomänen

2×10^7 stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10-Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, danach wurden die Zellen 6x für jeweils 5 Sekunden Ultraschall behandelt. Das Zelllysate wurde in Ultrazentrifugations-Röhrchen überführt und mit 1 ml 80%-iger Sucrose-Lösung vermischt, und ein Stufengradient durch Übersichtung mit 6 ml 30%-iger und 4 ml 5%-iger Sucrose-Lösung hergestellt. Anschließend wurde eine Gradientenzentrifugation bei 200.000 g für 14 Stunden bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden von oben nacheinander 12 Fraktionen á 1 ml abgenommen und jeweils Aliquots von 400 μl Aceton gefällt und im Immunoblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Das Pellet der Sucrose-Gradienten wurde in 100 μl 2% SDS aufgelöst und davon 5 μl für die Western-Blot Analyse eingesetzt.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte.

Im ersten Teil werden Untersuchungen zur Expression und Aktivität verschiedener Mitglieder der ADP-Ribosyltransferase-Familie vorgestellt. Besonders wird dabei auf die von murinen T Zellen exprimierte ADP-Ribosyltransferase-2.2 (ART2.2) eingegangen und deren Aktivität auf Lymphom- und primären T-Zellen vergleichend untersucht. Um bisher nicht bekannte Zielproteine der ART2.2 zu identifizieren, wurden aus Lymphomzellen etheno-ADP-ribosylierte Membranproteine aufgereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Darüber hinaus wurde das bekannte ART2.2-Targetprotein, der P2X7-Purinozeptor, näher charakterisiert und die von der ART2.2 modifizierten Arginin-Reste identifiziert.

Der zweite Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschreibt die Generation einer ART2.2-transgenen Maus sowie funktionelle Untersuchung der lymphatischen Zellen dieser Tiere im Vergleich mit Zellen aus Wildtyp und ART2-KO Mäusen.

Im dritten Teil wird untersucht, inwieweit die Funktion der GPI-verankerten ART2.2 von ihrer Assoziation mit Lipid Rafts, beeinflusst wird. Für diese Untersuchungen wurde der native GPI-Anker der ART2.2 durch einen klassischen Transmembran-Anker ersetzt, um im Zellkulturmodell die Aktivitäten der GPI-verankerten ART2.2 und der transmembran-verankerten ART2.2 vergleichend zu analysieren.

4.1 Nachweis und Charakterisierung von Zielproteinen der ARTs

4.1.1 Nachweis von ARTs und ART-Aktivität auf der Zelloberfläche

In diesem Kapitel wird zunächst die Expression und Aktivität der vier bekannten GPI-verankerten ADP-Ribosyltransferasen (ART1-ART4) auf transfizierten Lymphomzellen untersucht. Die weiteren Versuche befassen sich mit der auf murinen T Zellen exprimierten ART2.2. Dabei wird die ADP-Ribosylierung von drei bekannten Zielproteinen - dem P2X7 Purinozeptor, dem Integrin LFA-1, und dem Phosphoprotein p80 - auf Lymphom- und primären T-Zellen vergleichend analysiert. Im Rahmen dieser Versuche werden die für den Nachweis ADP-ribosylierter Zielproteine etablierten radioaktiven und Antikörper-basierten Nachweismethoden vorgestellt.

4.1.1.1 ARTs werden als GPI-verankerte Proteine exprimiert

Die in unserem Labor bereits etablierten, stabil mit den verschiedenen ARTs transfizierten DC27.10-Lymphomzellen sollten auf ART-Expression und auf die vorhergesagte GPI-Membranverankerung hin überprüft werden. Um die Expression der mit einem FLAG-Tag versehenen ARTs zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse mit dem FLAG-Tag spezifischen M2-Antikörper durchgeführt (**Abb. 10**). Die vorhergesagte GPI-Verankerung der Proteine wurde durch Inkubation der Zellen mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC), welche GPI-verankerte Proteine von der Zellmembran schneidet, überprüft (**Abb. 10**). Tote Zellen wurden mit Propidiumjodid angefärbt und in der FACS-Analyse ausgegrenzt. Die Ergebnisse zeigen, dass der M2-Antikörper alle Transfektanten anfärbt, aber nicht mit untransfizierten DC27.10-Zellen reagiert. Allerdings unterscheidet sich das Niveau der Zelloberflächenexpression bei den verschiedenen ARTs zum Teil deutlich. Die ART3 der Maus zeigt dabei das höchste, die humane ART3 hingegen das niedrigste Expressionsniveau. Ferner ist zu erkennen, dass die Inkubation der Zellen mit PI-PLC bei allen Transfektanten zu einem deutlichen Rückgang der mittleren Fluoreszenzintensität führte, ein Hinweis darauf, dass die ARTs dadurch von der Zelloberfläche freigesetzt wurden. Um dies zu überprüfen, wurden die Proteine die durch PI-PLC-Behandlung von der Zelloberfläche gelöst wurden, im Immunoblot analysiert.

Dazu wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit PO-konjugiertem M2-Antikörper beprobt (**Abb. 11A**). Die auf den PI-PLC behandelten Zellen verbliebenen Zelloberflächen-Proteine wurden durch Detergenz-lyse solubilisiert und ebenfalls im Immunoblot mit dem M2-Antikörper beprobt (**Abb. 11B**). In allen Fällen detektierte der M2-Antikörper in den Überständen der PI-PLC behandelten Zellen eine Bande in der vorhergesagten Größe der jeweiligen ART (**Abb. 11A**). In den Zelllysaten der PI-PLC behandelten Zellen sind auf gleicher Höhe keine oder nur sehr schwache Banden zu erkennen (**Abb. 11B**). Die Ergebnisse der FACS und Immunoblot-Analysen zeigen, dass nach einstündiger PI-PLC-Behandlung die ARTs fast vollständig von der Zelloberfläche gelöst wurden und im Überstand zu finden sind.

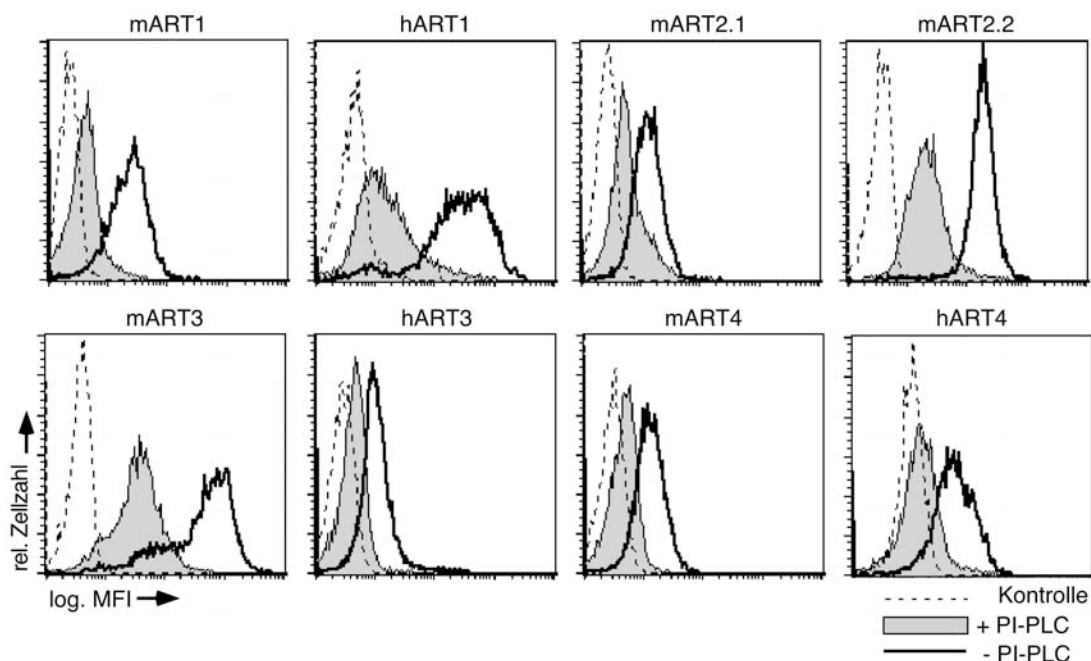


Abb. 10: FACS-Analyse FLAG-getaggter ARTs auf der Zelloberfläche von stabil transfizierten DC27.10 Lymphomzellen. Stabil mit den angegebenen ARTs transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 60 Minuten mit oder ohne PI-PLC inkubiert, welches GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abschneidet. Die Zellen wurden anschließend mit FITC-konjugiertem anti-FLAG mAb M2 gefärbt und im FACS analysiert. Kontrollanfärbungen wurden mit untransfizierten Zellen durchgeführt. Die Histogramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität der vitalen Zellen, tote Zellen wurden auf Basis von Propidiumjodid Anfärbbarkeit ausgegrenzt.

4.1.1.2 Nachweis von ART Zielproteinen mit dem 1G4-Antikörper

In diesem Abschnitt wird der Frage nachgegangen, ob die auf den DC27.10-Zellen exprimierten ARTs eine enzymatische Aktivität besitzen und inwiefern sie sich in ihrer Target-Spezifität unterscheiden. Hierzu kommt ein bei uns im Labor etablierter, nicht-radioaktiver

Nachweis der ADP-Ribosylierung zum Einsatz (Krebs et al., 2003). Dieser basiert auf einem monoklonalen Antikörper (1G4), der an die etheno-Adenosin Gruppe des NAD-Analogon etheno-NAD (eNAD) bzw. der übertragenden ADP-Ribose-Gruppe bindet (Giovane et al., 1985; Young and Santella, 1988b). Dieser Antikörper erlaubt es, ADP-Ribosylierung in FACS-, Immunfluoreszenz- und Westernblot-Analysen nachzuweisen, (siehe **Abb. 5**, Einleitung).

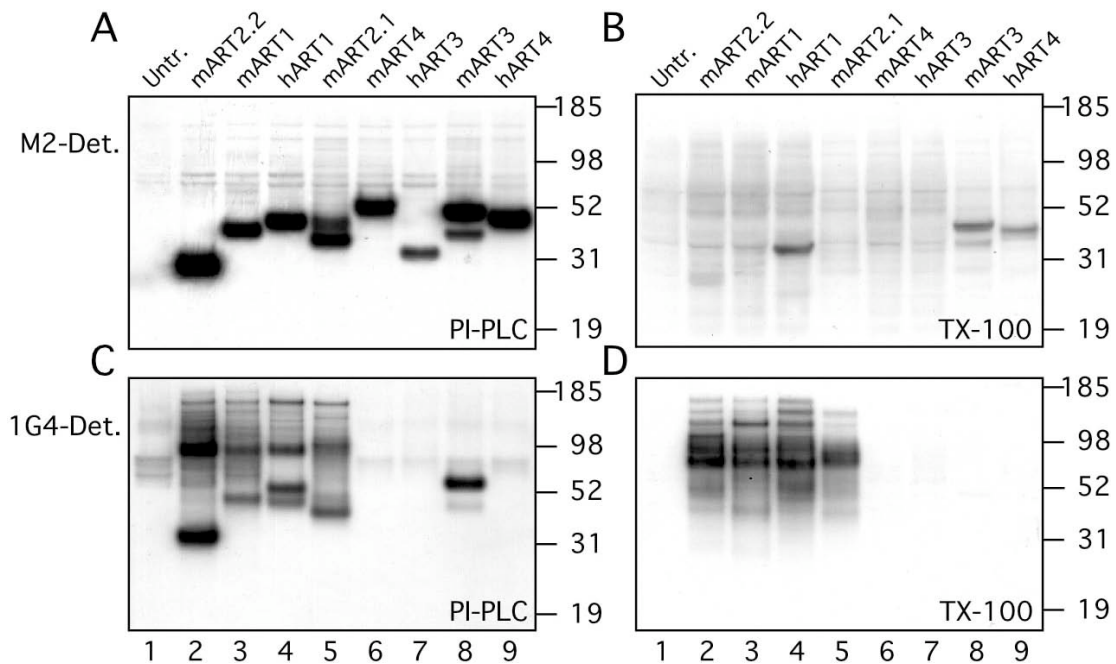


Abb. 11: Immunoblot Analyse FLAG-getaggtter ARTs und ihrer Zielproteine. Stabil mit den angegebenen ARTs transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 45 min mit oder ohne 50µM eNAD inkubiert, anschließend wurden die Zellen für 60 min mit PI-PLC behandelt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert, der Überstand isoliert und die Zellpellets mit TX-100 lysiert. Der Überstand (**A, C**) und das Lysat der PI-PLC behandelten Zellen (**B, D**) wurden separat in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. FLAG-getaggtte ARTs wurden mit PO-konjugiertem anti-FLAG mAb M2 detektiert (**A, B**), ADP-ribosylierte Zielproteine mit dem mAb 1G4 und einem PO-konjugierten Sekundär-Antikörper (**C, D**). Zur Detektion wurde das „Enhanced Chemiluminescent Detection“ System“ (ECL) benutzt.

Um zu untersuchen, welche Mitglieder der ART-Familie eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität besitzen, wurden ART-transfizierte DC27.10-Zellen mit eNAD inkubiert, gewaschen und mit PI-PLC behandelt, um GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche zu lösen. Die verbleibenden Proteine wurden durch Detergenzlyse solubilisiert. Die solubilisierten Proteine wurden im Immunoblot mit dem etheno-Adenosin-spezifischen 1G4-Antikörper beprobt (**Abb. 11C, D**). Die Ergebnisse zeigen keine oder nur eine schwache Anfärbung von Banden bei untransfizierten Zellen (Spur 1), sowie bei Zellen, die mit hART3 (Spur 7) oder mit ART4 transfiziert waren (Spuren 6, 9). In den mit mART3 trans-

fizierten Zellen ist eine einzige prominente Bande im Überstand der PI-PLC behandelten Zellen zu sehen (Spur 8). Hingegen zeigen Zellen, die mit ART1 (Spuren 3, 4) oder mit ART2.2 (Spuren 2, 5) transfiziert waren, jeweils ein heterogenes Muster deutlich angefarbter Banden, und zwar sowohl im Überstand PI-PLC behandelter Zellen (**Abb. 11C**), als auch im Zelllysat (**Abb. 11D**). Das Muster der von ART1 und ART2 modifizierten Zielproteine ist ähnlich, abgesehen von prominenten Banden zwischen 31 und 52 kD, die jeweils auf der gleichen Höhe liegen wie die mit dem M2-Antikörper detektierten ART Banden (vergleiche Spuren 2-5, **Abb. 11A, C**). ART1 und ART2 modifizieren offensichtlich sich selbst, sowie andere GPI-verankerte und nicht durch PI-PLC solubilisierbare Proteine, mART3 scheint nur eine Automodifikation zu katalysieren. Für hART3, mART4 und hART4 lässt sich in diesem System keine ART-Aktivität nachweisen.

4.1.1.3 Nachweis spezifischer ART2 Zielproteine mit ^{32}P -NAD

Im folgenden Abschnitt wird die ADP-Ribosylierung von bekannten Zielproteinen der ART2 - dem Integrin LFA1, dem P2X7-Purinoceptor und dem Phosphoprotein p80 - vergleichend auf verschiedenen Lymphomzelllinien und primären Maus Lymphozyten analysiert.

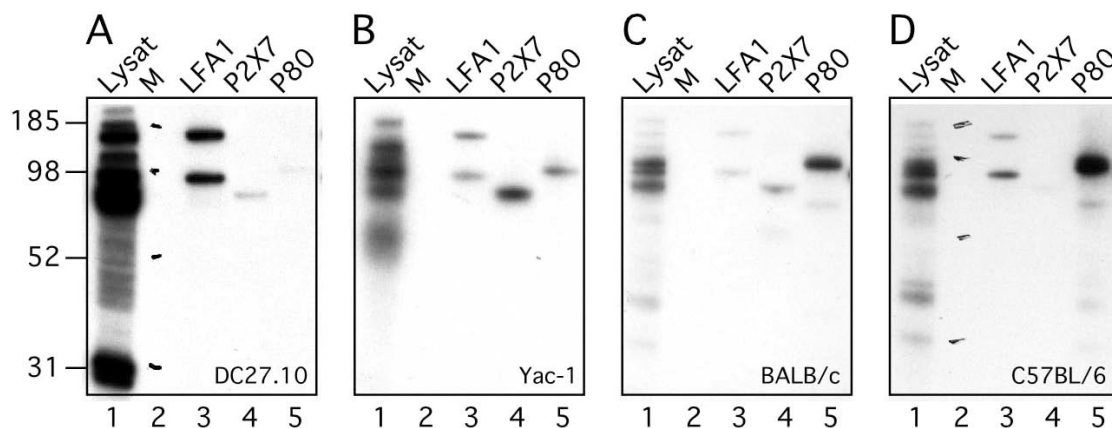


Abb. 12: Analyse der bekannten Zielproteine auf verschiedenen Lymphomzelllinien und primären T Zellen mit ^{32}P -NAD. (A) Stabil mit ART2.2 transfizierte DC27.10 Zellen, endogen ART2.2 exprimierende Yac-1 Zellen (B), und aufgereinigte T Zellen aus einer BALB/c Maus (C) und einer C57BL/6-Maus (D) wurden für 20 min mit ^{32}P -NAD bei 4°C inkubiert. Nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C mit TX-100 lysiert. Aus den Lysaten wurde dann mit Protein-G-Sepharose gekoppelten spezifischen Antikörpern LFA1, P2X7 und phosphorylierte Proteine mit dem 4G10 Antikörper immunpräzipitiert. Die Proteine aus den Lysaten und den Präzipitaten wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet, anschließend folgte eine Autoradiographie.

Neben den bereits vorgestellten stabil mit ART2.2-transfizierten DC27.10 Lymphomzellen wurden Yac-1 Lymphomzellen, die endogen ART2.2 exprimieren (Scheuplein, 2006), sowie primäre T-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen, deren ART2-Expressionsniveau relativ niedrig bzw. relativ hoch ist (Koch-Nolte et al., 1996a) untersucht. Hierzu wurden diese Zellen mit ^{32}P -NAD inkubiert, lysiert und die genannten Proteine mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE Autoradiographie auf kovalente Inkorporation von Radioaktivität untersucht (**Abb. 13**).

Die Ergebnisse zeigen in den Gesamtzelllysaten jeweils mehrere radioaktiv markierte Protein-Banden (Spur 1). Erwartungsgemäß zeigen die stabil mit ART2.2 transfizierten DC27.10 Zellen die stärkste Markierung von Protein-Banden (**Abb. 14A**). Während sich das Banden-Muster von T-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen ähnelt, zeigen die beiden Lymphomzelllinien ein jeweils individuelles Bandenmuster. Die drei untersuchten Zielproteine wurden in allen Zellen markiert, allerdings in unterschiedlich starkem Ausmaß. Bei DC27.10 Zellen wurden beide Untereinheiten von LFA-1 (CD11a und CD18) besonders stark markiert, bei Yac-1 Zellen der P2X7 Purinozeptor und bei den primären T-Zellen beider Mausstämme vor allem das Phosphoprotein p80.

4.1.2 Aufreinigung und Identifizierung neuer ART2.2-Zielproteine

In diesem Kapitel wird die Identifizierung bisher unbekannter ART2.2-Zielproteine vorgestellt, die im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes bei Prof. Václav Horejsí am Institut für Molekulare Genetik in Prag, erfolgte. Hierzu wurden etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächen-Proteine mit Hilfe immobilisierten 1G4 Antikörpers aus DC27.10 Zellen aufgereinigt und anschließend am Institut für Mikrobiologie in Prag von Petr Novak und Petr Man massenspektroskopisch analysiert.

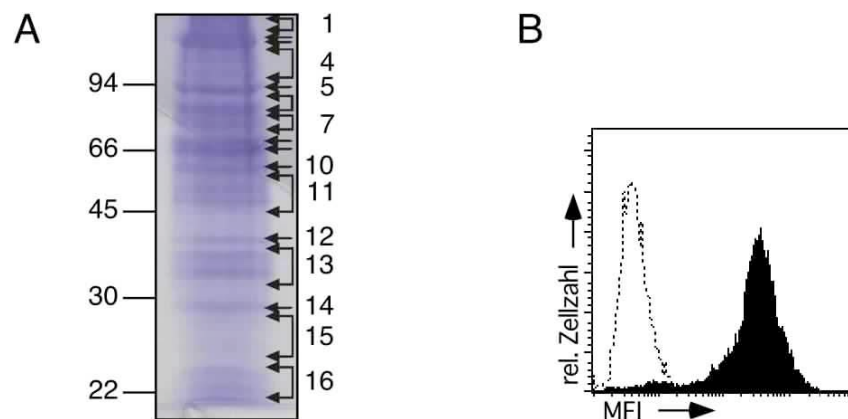


Abb. 15: Massenspektrometrische Untersuchung von 1G4-Immunpräzipitaten. 1×10^9 stabil mit ART2.2 transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 30 Minuten mit $50 \mu\text{M}$ eNAD inkubiert, das nicht inkorporierte eNAD gewegewaschen. Die Zellen wurden mit 1% Dodecyl- β -maltoside auf Eis lysiert und das Lysat wurde über eine Säule mit an Aminolink immobilisierten 1G4-Antikörper gegeben. **(A)** Coomassie-Färbung der aufgereinigten und in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine. Es wurden 16 Banden ausgeschnitten (1-16), anschließend wurde ein Trypsin-Verdau und eine Nano-Elektrospray Massenspektrometrie durchgeführt. **(B)** Ein Aliquot der Zellen wurde vor und nach der eNAD-Behandlung abgenommen und die ADP-Ribosylierung der Zelloberflächenproteine im FACS mit Hilfe des 1G4 Antikörpers überprüft. Die gepunktete Linie entspricht der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der unbehandelten Zellen, das ausgefüllte Histogramm stellt Zellen die mit eNAD behandelt wurden, dar.

4.1.2.1 Aufreinigung etheno-ADP-ribosylierter Proteine

Für die Gewinnung ausreichender Mengen an etheno-ADP-ribosylierten Proteinen wurden 1×10^9 stabil mit ART2.2 transfizierte DC27.10 Zellen für 30 Minuten mit $50 \mu\text{M}$ eNAD inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gründlich gewaschen um nicht-inkorporiertes eNAD zu entfernen und eine Markierung anderer Proteine nach der Zelllyse zu vermeiden. Die mit 1% Dodecyl- β -maltoside solubilisierten Proteine wurden über eine Säule mit immobilisierten 1G4-Antikörper gegeben. An die Säule gebundene Proteine wurden mit einem Überschuss von etheno-Adenosin eluiert, mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und

im Gel Coomassie gefärbt (**Abb. 15A**). Aus dem Gel wurden 16 Banden ausgeschnitten (**Abb. 15A**, siehe Pfeile) und nach im Gel-Trypsinverdau massenspektrometrisch mit zwei unterschiedlichen Verfahren (MALDI-TOF und LC-MS/MS) analysiert. Die etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen wurde im FACS mit Hilfe des 1G4 Antikörpers überprüft (**Abb. 15B**).

4.1.2.2 Massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Proteine

Anhand der durch MALDI-TOF ermittelten molekularen Größe konnten die untersuchten Oligopeptide in Protein-Datenbank-Recherchen spezifischen Proteinen zugeordnet werden (**Abb. 16**). Pro Bande wurden 40-80 Peptide gemessen, die jeweils einigen wenigen Proteinen zugeordnet werden konnten. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Banden mehrere Proteine enthielten und dass einige Proteine (z.B. CD45, CD11a) in verschiedenen Banden vorhanden waren. Je Protein wurden 5-50 unterschiedliche Peptide identifiziert, bei einer Sequenzabdeckung von 10-50%. Bei etwa der Hälfte der identifizierten Proteine handelt es sich um Membranproteine. Unter den 8 identifizierten Membranproteinen befinden sich 5 bereits bekannte Zielproteine der ADP-Ribosylierung: CD11a, CD18 (den beiden Untereinheiten von LFA-1), CD44, CD45 und ART2.2.

Beispielhaft für das Ergebnis der Datenbank-Recherche ist das durch MALDI-TOF identifizierte und bereits als ART2.2 Target bekannte Protein CD18 (β -Kette des Integrins LFA1) dargestellt (**Abb. 17**).

Bande	Gemessene Peptide	Identifiziertes Protein	Übereinstimmende Peptide	Sequenz-abdeckung	bAT J / N	Antigen-Beschreibung
1	68	CD45 CD11a <i>Myosin</i>	29 15 12	22% 16% 8%	J J -	Leukozyten gemeinsames Antigen, Tyrosinphosphatase α -Untereinheit des Intergrins LFA1 <i>Zytoskeletales Protein</i>
2	78	CD45 CD11a	51 11	34% 12%	J J	Leukozyten gemeinsames Antigen, Tyrosinphosphatase α -Untereinheit des Intergrins LFA1
3	68	CD11a CD45	36 15	33% 14%	J J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1 Leukozyten gemeinsames Antigen, Tyrosinphosphatase
4						
5	78	CD18 CD71 CD61	32 14 10	52% 15% 13%	J N N	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a, b und c Transferrin Rezeptor Integrin β 3-Untereinheit, assoziiert mit CD41 oder CD51
6	51	CD98 <i>EWSRI</i>	11 10	24% -	N -	Heterodimer, T Zell Aktivierungs-Antigen <i>Intrazelluläres Protein</i>
7						
8	70	<i>DEAD</i> <i>fusLP</i> <i>LACTB</i>	17 11 10	26% 21% 22%	- - -	<i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i>
9	72	<i>LACTB</i> <i>fusLP</i>	19 14	29% 23%	- -	<i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i>
10	70	<i>Keratin</i> <i>Trkfp</i> <i>hnRNP</i>	18 13 10	38% 36% 27%	- - -	<i>Verunreinigung</i> <i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i>
11	41	<i>Aktin</i> ART2.2	12 5	31% 20%	- J	<i>Zytoskeletales Protein</i> ADP-Ribosyltransferase 2
12	43	<i>hnRNP</i>	18	43%	-	<i>Intrazelluläres Protein</i>
13	70	<i>hnRNP</i> <i>Galectin 9</i> <i>hnRNP</i> CD45-AP	15 12 8 5	52% 42% 30% 24%	- - - J	<i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i> <i>Intrazelluläres Protein</i> CD45 assoziiertes Protein, Funktion unbekannt
14	70	CD90	46	41%	N	Thy-1, Funktion unbekannt, markiert Thymozyten
15	39	<i>RS9</i>	5	-	-	<i>Intrazelluläres Protein</i>

Abb. 16: Auswertung der nach Proteindatenbankrecherche identifizierten Proteine durch MALDI-TOF. Tabellarische Darstellung der in den einzelnen Banden detektierten Proteine. Angegeben sind die Anzahl der insgesamt pro Bande gemessenen Peptide, die Anzahl mit dem identifizierten Protein übereinstimmender Peptide und die minimale Sequenzabdeckung. Potentielle extrazelluläre ART2.2-Zielproteine sind mit ihrer CD-Nummer angegeben, intrazelluläre Proteine und offensichtliche Verunreinigungen (*Keratin*) sind *kursiv* gedruckt. Zusätzlich ist angegeben ob es sich bei den identifizierten Proteinen um bereits bekannte ART2.2 Targetproteine (bAT) handelt. In der letzten Spalte ist die Funktion der potentiellen ART2.2 Targets angegeben.

Es wurden insgesamt 78 Peptide in Bande 5 gemessen, wovon 32 dem CD18 zugeordnet werden konnten, die Sequenz-Abdeckung betrug 52%. Die Coverage und Error Maps zeigen graphisch welche Massen (500-2900Da) gemessen wurden (Data) und welche davon dem Protein zugeordnet werden konnten (Match) (**Abb. 17B**), weiterhin wird dargestellt welche Abschnitte des Proteins (Residue 0-771) durch Peptide nachgewiesen werden konnten (**Abb. 17C**), und die Größe des Messfehlers in Abhängigkeit von der gesamten Peptidgröße (hier maximal +/- 0,5 Da) (**Abb. 17D**). Weiterhin sind die gemessenen Massen (**Abb. 17E, Spalte 1**), die vorhergesagten Massen (**Spalte 2**), der Massen-Fehler (**Spalte 3**), Start- und End-Position in der Proteinsequenz (**Spalte 4**), Anzahl der ungeschnittenen Schnittstellen (**Spalte 5**) und die Sequenzen der einzelnen Peptide (**Spalte 6**) aufgeführt. Die Massen der Peptide, die nicht dem CD18 zugeordnet werden konnten, sind ebenfalls angegeben (**Abb. 17F**).

ProFound - Search Result Details

Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

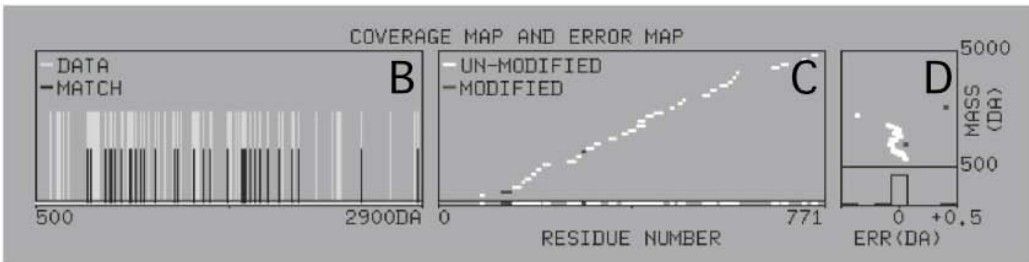
< TR>

Details for rank 1 candidate in search B5F02C81-073C-64DCCB3B

gil3183523/sp118351TB2 MOUSE Integrin beta-2 precursor (Cell surface adhesion glycoproteins
LFA-1/CR3/P150.95 beta-subunit) (CD18) (Complement receptor C3 beta-subunit)

A

Sample ID : [Pass:0]
Measured peptides : 78
Matched peptides : 32
Min. sequence coverage: 52%



E

Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Error (Da)	Residues Start	To	Missed Cut	Peptide sequence
819.455	M	819.390	0.065	588	594	0	LVECSGR
847.458	M	847.403	0.055	490	496	0	SSQELER
930.412	M	930.354	0.058	595	601	0	GHCQCNR
968.500	M	968.496	0.004	167	175	0	IGFGSPVDK
978.497	M	978.455	0.043	579	587	0	STTGCLNAR
997.542	M	997.512	0.030	188	195	1	LRNPCCPNK
1038.566	M	1038.582	-0.016	727	735	0	ALTHLTDLR
1080.469	M	1080.451	0.018	464	472	0	GVMECGICR
1092.494	M	1092.517	-0.023	198	206	0	ACQPPFAFR
1125.563	M	1125.614	-0.050	276	286	0	LGAILTPNDGR
1151.418	M	1151.444	-0.026	481	489	0	NCECQTQGR
1175.501	M	1175.557	-0.055	84	93	0	SIANPEFDOR
1241.454	M	1241.509	-0.055	545	555	0	YNSQVCGGSDR
1361.565	M	1361.636	-0.071	747	757	0	SQWNMDNLFK
1380.660	M	1380.740	-0.079	176	187	0	TVLFFVNTHPEK
1380.660	M	1380.591	0.069	287	296	1	CHLEDNMYKR
(1)+0@M;							
1484.732	M	1484.787	-0.055	368	380	0	VFLDHSTLPDTLK
1545.773	M	1545.839	-0.066	312	325	0	LSSENIQPIFAVTK
1579.723	M	1579.747	-0.024	211	224	0	LTDNSNQFQTEVGK
1690.791	M	1690.794	-0.003	297	311	0	SNEFDYPSVGLAHK
1691.773	M	1691.745	0.028	381	396	0	VTYDSFCSNGASSIGK
1784.937	M	1784.926	0.011	150	166	0	LGGDLLQALNEITESGR
1795.869	M	1795.859	0.010	416	430	0	VMASECIQEQSFVIR
1808.877	M	1808.873	0.005	259	275	0	LLVFATDDGFFHAGDGK
1831.873	M	1831.877	-0.004	685	699	0	NIYNIHVEDSLECVK
1859.911	M	1859.947	-0.036	341	358	0	SAVGELSDSSNVVQLIK
1889.870	M	1889.893	-0.023	399	415	0	GDGCVQINNPTFQVK
1946.756	M	1946.748	0.008	563	578	0	CSCKPGYEGSACQCOR
2012.900	M	2012.925	-0.025	666	681	1	ERDSKGCWITYTLQOK
2091.745	M	2091.807	-0.062	529	544	0	EIFGQYCECDNVNCR
2132.934	M	2133.026	-0.093	397	415	1	SRGDCDGVQINNPTFQVK
2523.770	M	2524.161	-0.391	431	451	0	ALGFTDTVTQVVRPQCECQCR
2870.792	M	2870.338	0.454	125	148	0	GYPIDLYILMDLSYSMLDDLNNVK
(1)+0@M;							

F

Unmatched Monoisotopic Masses:

593.346 635.538 649.547 652.535 657.491 659.556 670.490 709.420 834.469 842.560 856.555 862.552 865.434
870.573 882.516 891.535 1045.558 1074.497 1084.554 1107.521 1207.541 1265.506 1268.612 1303.523 1308.586
1357.627 1363.629 1403.642 1475.719 1493.711 1502.736 1510.536 1593.797 1707.773 1716.855 1745.869
1765.755 2032.873 2106.783 2249.888 2342.794 2374.882 2383.712 2398.872 2704.719 2859.714

Abb. 17: Ergebnis der Datenbanksuche für das durch MALDI-TOF identifizierte CD18 aus Bande 5. (A) Angegeben sind die Gesamtzahl der gemessenen Peptide (78), die Anzahl der Peptide die mit CD18 übereinstimmen (32) und die minimale Sequenzabdeckung (52%). (B) Graphische Darstellung der gemessenen Massen, (C) der Sequenzabdeckung und (D) die Größe des Messfehlers. (E) Weiterhin sind die gemessenen Massen, die vorhergesagten Massen, der Massenfehler, Start- und End-Position in der Proteinsequenz, Anzahl der ungeschnittenen Schnittstellen (0 oder 1) und die Sequenzen der einzelnen Peptide nach Größe sortiert aufgeführt. Partiiell Methionin-oxidierte Peptide sind mit ((1)+0@M) markiert. (F) Massen der Peptide (Unmatched Monoisotopic Masses) die nicht dem CD18 zugeordnet werden konnten.

Bande	Gemessene Peptide	Identifiziertes Protein	Übereinstimmende Peptide	MALDI J / N	Antigen-Beschreibung
1	300	CD11a	43	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD71	30	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD45	60	J	Leukozyten gemeinsames Ag, Tyrosinphosphatase
		CD100	7	N	Semaphorin 4D, Adhäsionsmolekül
		CD205	2	N	DEC-205, Endozytose Rezeptor
		CD44	3	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
2	165	CD11a	42	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD45	60	J	Leukozyten gemeinsames Ag, Tyrosinphosphatase
		CD71	10	J	Transferrin Rezeptor
		CD100	4	N	Semaphorin 4D, Adhäsionsmolekül
		CD44	3	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
		CD18	1	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
3	155	CD11a	75	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD45	3	J	Leukozyten gemeinsames ig, Tyrosinphosphatase
		CD71	3	J	Transferrin Rezeptor
		CD44	3	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
		CD18	1	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
		CD100	1	N	Semaphorin 4D, Adhäsionsmolekül
4	250	CD11a	17	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD51	11	N	Vitronectin Rezeptor, Thrombozyten
		CD49f	3	N	VLA-6, α 5 Integrin, CD29 assoziiert, bindet Laminin
		CD18	7	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
		CD44	4	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
		CD31	2	N	PECAM-1, Adhäsionsmolekül
		CD98	3	J	T Zell Aktivierungs-Antigen
		CD229	4	N	Ly-9, Adhäsionsmolekül
5	170	CD43	1	N	Sialophorin, bindet CD54 (ICAM-1)
		CD18	38	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
		CD11a	3	J	α -Untereinheit des Intergrins LFA1
		CD71	30	J	Transferrin Rezeptor
		CD43	4	N	Sialophorin, bindet CD54 (ICAM-1)
		CD30	2	N	Ki-1, Funktion unbekannt
6	150	CD98	20	J	T Zell Aktivierungs-Antigen
		CD44	9	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
		CD18	5	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
7	180	CD98	8	J	T Zell Aktivierungs-Antigen
		CD18	4	J	Integrin β 2-Untereinheit, assoziiert mit CD11a
		CD44	3	N	Hermes Antigen, Leukozyten Adhäsionsmolekül
11		ART2	8	J	ADP-Ribosyltransferase 2
13		CD90	1	J	Thy-1, Funktion unbekannt, markiert Thymozyten
14		CD90	6	J	Thy-1, Funktion unbekannt, markiert Thymozyten

Abb. 18: Auswertung der nach Proteindatenbankrecherche identifizierten Proteine durch LC-MS/MS. Tabellarische Darstellung der in den einzelnen Banden detektierten Proteine, bei den aufgeführten Proteinen handelt sich um die auf der Zelloberfläche exprimierten identifizierten Antigene. Rot hervorgehoben sind Proteine, die in früheren bzw. in folgenden radioaktiven Labeling-Versuchen als ART Targets bestätigt werden konnten. Angegeben sind die Anzahl der insgesamt gemessenen Peptide und die Anzahl mit dem identifizierten Protein übereinstimmender Peptide. In der nächsten Spalte ist angegeben ob es sich um ein ebenfalls durch MALDI-TOF identifiziertes Protein handelt (Ja/Nein). In der letzten Spalte ist die Funktion der potentiellen ART2.2 Targets angegeben.

Zusätzlich zu den im MALDI-TOF identifizierten Peptiden wurden noch durch LC-MS/MS Untersuchungen weitere Peptid-Sequenzen identifiziert (**Abb. 18**). In der Tabelle sind die Anzahl der gemessenen Peptide, das identifizierte Antigen und die Anzahl der mit dem jeweiligen Antigen übereinstimmenden Peptide angegeben. Weiterhin ist aufgeführt ob das Antigen ebenfalls durch die MALDI-TOF Analyse identifiziert werden konnte (MALDI J/N) und ob es sich um ein bereits bekanntes ART2.2 Targetprotein (bAT) handelt.

4.1.2.3 Bestätigung massenspektrometrisch identifizierter ART2.2-Targets

Die Proteine, die in den massenspektrometrischen Untersuchungen identifiziert worden waren, sollten durch Inkubation von Lymphomzellen mit ^{32}P -NAD und Immunpräzipitation der jeweiligen Antigene mit anschließender Autoradiographie nachgewiesen werden.

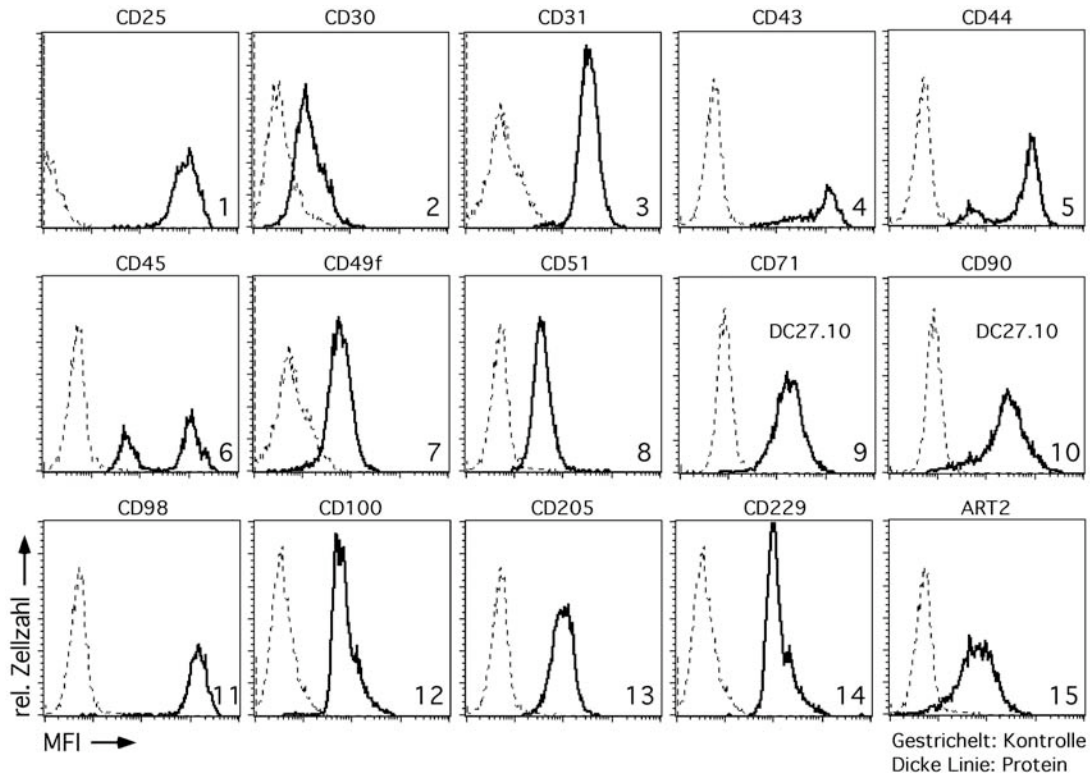


Abb. 19: Nachweis von Zelloberflächenproteinen auf Lymphomzellen mittels Fluorochromgekoppelter Antikörper. Lymphomzellen wurden auf ihre Expression hinsichtlich massenspektrometrisch identifizierter ART2.2 Targetproteine untersucht. Abgebildet ist das Expressionsprofil auf endogen ART2.2 exprimierenden Yac-1 Lymphomzellen. CD71 und CD90 werden auf diesen Zellen nicht exprimiert und daher wurden für die Analyse dieser beiden Moleküle in diesem und den weiteren Versuchen stabil mit ART2.2 transfizierte DC27.10 Zellen genommen (Panel 9, 10). Die Zellen wurden indirekt oder direkt mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Kontrollanfärbungen wurden entweder nur mit Fluorochrom gekoppelten Sekundär-Antikörper oder mit ungefärbten Zellen durchgeführt.

Zunächst wurde die Zelloberflächen-Expression der zu untersuchenden Antigene auf verschiedenen Lymphomzellen überprüft. Folgende ausgewählte Antigene, die entweder durch MALDI-TOF und/oder LC-MS/MS identifiziert worden waren, wurden im FACS auf ihre Expression mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern untersucht: CD30, CD31, CD43, CD44, CD45, CD49f, CD51, CD71, CD90, CD98, CD100, CD205 und CD229. Alle Antigene konnten auf endogen ART2.2 exprimierenden YAC Lymphomzellen nachgewiesen werden (**Abb. 19**), bis auf CD71 und CD90 (**Abb. 19**, Panel 9, 10), daher wurden für die weitere Analyse dieser beiden Proteine stabil mit ART2.2 transfizierte DC27.10-

Zellen genommen. Die Zelloberflächen-Expression der ART2.2 auf den Yac-1 Zellen (Abb. 19, Panel 15) wurde ebenfalls überprüft.

Für den Nachweis der ADP-Ribosylierung durch die ART2.2 wurden die Zellen mit ^{32}P -NAD inkubiert, sorgfältig gewaschen und anschließend mit TX-100 lysiert. Aus den Lysaten wurden mit entsprechenden Antikörpern die oben aufgeführten Antigene präzipitiert. Die Proteine aus den Lysaten und Immunpräzipitaten wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt (Abb. 20A). Neben den Spuren mit den Proteinen aus den Ganzzelllysaten (Spuren 1-2) sind die präzipitierten Antigene (Spuren 4-17) aufgetragen. Folgende Antigene konnten als mit ^{32}P -NAD markierte Bande in der Autoradiographie nachgewiesen werden: CD31, CD44, CD45, CD98, CD100, CD205 und CD229 (Abb. 20A, B).

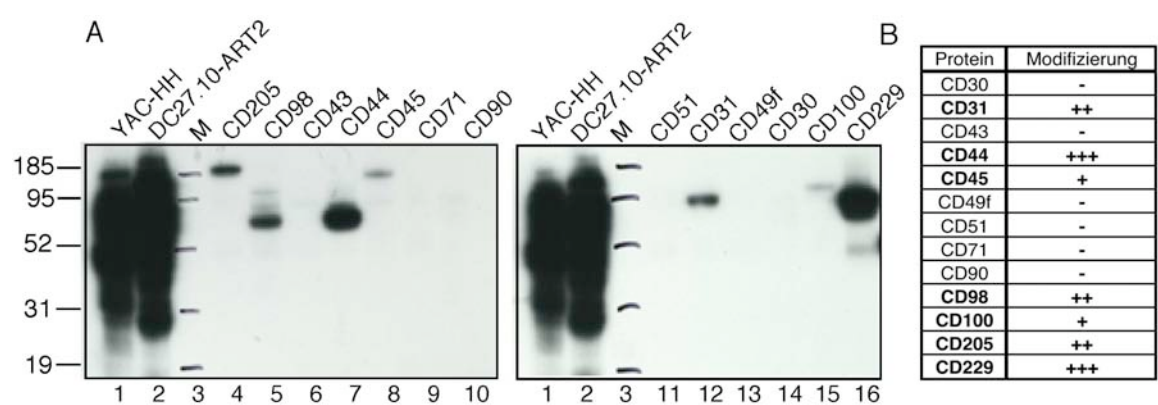


Abb. 20: Nachweis der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mit ^{32}P -NAD. Analyse der massenspektroskopisch identifizierten potentiellen ART2.2 Targetproteine auf Lymphomzellen. YAC- bzw. DC27.10-Zellen (CD71, CD90) wurden für 20 Minuten mit ^{32}P -NAD inkubiert. Nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C mit TX-100 lysiert. Aus den Lysaten wurden dann mit Protein-G-Sepharose gekoppelten Antikörpern die angegebenen Antigene präzipitiert. (A) Die Proteine aus den Lysaten und den Präzipitaten wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet, anschließend folgte eine Autoradiographie. (B) Tabellarische Auflistung der untersuchten Antigene: Links sind die massenspektrometrisch identifizierten Proteine aufgeführt, rechts der Grad der ADP-Ribosylierung.

4.1.3 Identifizierung & Charakterisierung des Target-Arginins im P2X7

Dieses Kapitel widmet sich dem Mechanismus der Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung (vergleiche **Abb. 7**). Für diesen Vorgang werden mehrere Hypothesen postuliert: 1. Die ADP-Ribosylierung könnte P2X7 durch eine konformationale Änderung aktivieren, unabhängig von der ATP-Liganden-Bindungsstelle. 2. Die kovalent am P2X7 geknüpfte ADP-Ribose könnte in die ATP-Bindungsstelle passen und so zu einer dauerhaften Stimulation des Rezeptors führen. 3. Alternativ könnten die an Nachbarproteine auf der Zelloberfläche geknüpften ADP-Ribose-Gruppen als Liganden für die ATP-Bindungsstelle im P2X7 fungieren (Kawamura et al., 2005).

Um die oben erwähnten Fragen zu beantworten sollte die Target-Aminosäure im P2X7 identifiziert werden, und ihre Bedeutung für die Aktivierung des Rezeptors geklärt werden. Da die ART2.2 spezifisch Arginin-Reste in Zielproteinen modifiziert, sollten durch zielgerichtete Mutagenese die Arginine im extrazellulären Teil des P2X7 ersetzt werden, um das für die Aktivierung verantwortliche Arginin zu identifizieren. Im Folgenden wird zuerst die Identifizierung der Target-Arginine im P2X7 beschrieben und sodann die funktionellen Konsequenzen der Mutationen dieser Arginin-Reste für die Funktion des P2X7 analysiert.

4.1.3.1 Mutation der konservierten Arginine des P2X7-Rezeptors

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden in unserem Labor von Dr. Sahil Adriouch alle elf bei Mensch, Ratte und Maus konservierten Arginine (R) im Maus-P2X7 an den einzelnen Positionen durch Lysine (K) ersetzt (vergleiche **Abb. 21A**). Für die Untersuchungen standen daher folgende Konstrukte zur Verfügung: R53K, R125K, R151K, R178K, R206K, R230K, R276K, R277K, R294K, R307 und R316K.

Für vergleichende Versuche wurden HEK-T Zellen mit P2X7-Wildtyp oder einem der Arginin-Mutanten und ART2.2 co-transfiziert, zusätzlich wurde ein EGFP-Konstrukt als Negativ-Kontrolle (mock) statt eines P2X7-Konstruktes mit der ART2.2 co-transfiziert. Nach zwei Tagen Wachstum wurden die Zellen geerntet und die Zelloberflächen-Expression der P2X7-Konstrukte sowie der ART2.2 wurde im FACS überprüft (nicht gezeigt). Die Zellen wurden mit ^{32}P -NAD inkubiert, gewaschen und anschließend lysiert. Die Proteine der

Zelllysate wurden in der SDS-PAGE größenfraktioniert und ein Immunoblot mit einem P2X7-spezifischen Antikörper angeschlossen (**Abb. 21B**). Danach wurde eine Autoradiographie derselben Membran durchgeführt (**Abb. 21C**).

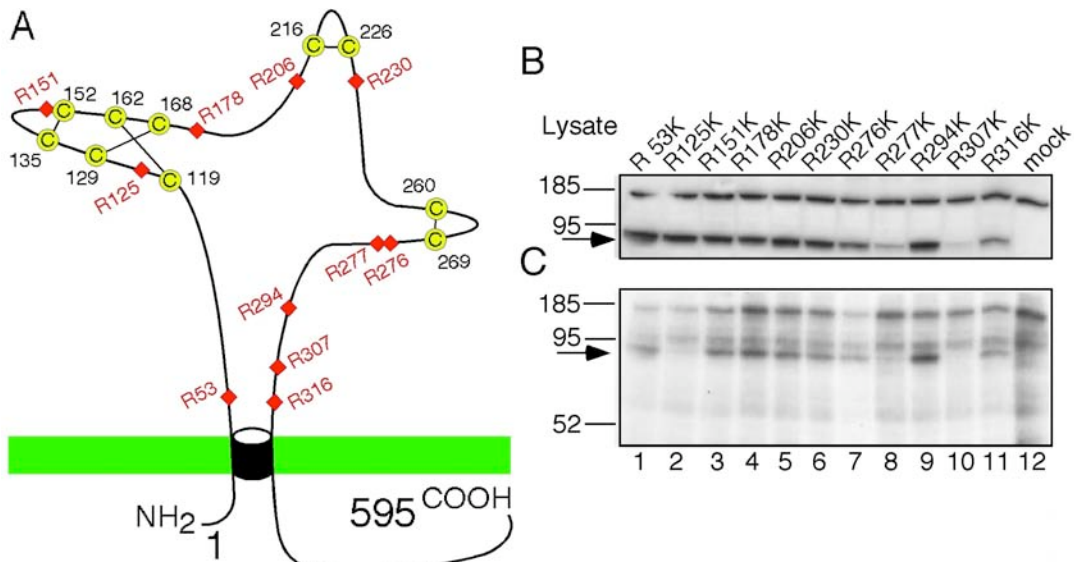


Abb. 21: Schematische Darstellung aller elf konservierten Arginine des P2X7-Rezeptors und Analyse der einzelnen Mutanten. (A) Schema des P2X7-Rezeptors, die Positionen der konservierten Arginine sind rot markiert. Cysteine, die Disulfidbrücken ausbilden sind gelb markiert. (B-C) HEK-T Zellen wurden mit je 2,5 µg ART2.2- und P2X7-Konstrukt ko-transfiziert, nach 2 Tagen Wachstum geerntet und anschließend für 20 Minuten mit 1µM NAD (5 µCi ³²P-NAD) inkubiert. Nicht inkorporiertes ³²P-NAD wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C mit 1% TX-100 lysiert. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine aus den Lysaten auf eine PVDF-Membran geblottet. Die PVDF-Membran wurde mit einem P2X7-spezifischen Antikörper beprobt und die P2X7-Expression zu überprüfen (B), anschließend wurde von derselben Membran eine Autoradiographie durchgeführt (C).

Die Ergebnisse zeigen für alle exprimierten Konstrukte (vergleiche **Abb. 21B**) eine Bande auf der Höhe des P2X7 in der Autoradiographie (**Abb. 21C**), allerdings ist diese bei der Mutante R125K in Relation zur Expression sehr schwach: das Konstrukt wurde zwar gut exprimiert (**Abb. 21B**, Spur 2) aber offenbar nicht oder nur schwach mit ³²P-NAD markiert (**Abb. 21C**, Spur 2).

4.1.3.2 Identifizierung von R125 & R133 als Target-Arginine im P2X7

Die Versuche mit den Arginin-Mutanten im Maus-P2X7 hatten den Verdacht auf das in Maus, Ratte und Mensch konservierte Arginin an der Position 125 gelenkt. Die Versuche hatten gezeigt, dass die Mutation des Arginins an der Position R125 zu Lysin die ADP-Ribosylierung des P2X7 durch ART2.2 zwar deutlich reduziert aber nicht ganz verhindert.

Bei der Analyse der P2X7 Aminosäuresequenz stellte sich heraus, dass direkt neben dem R125 ein zweites, nicht konserviertes Arginin an der Position 124 lokalisiert ist. Zusätzlich finden sich in der Sequenz zwei weitere benachbarte, nicht konservierte Arginine an den Positionen R133 und R134 (**Abb. 22C**). Es stellte sich die Frage, ob die benachbarten Arginine bei der Mutation des Arginins R125 alternativ ADP-ribosyliert werden und es daher zwar zu einer schwächeren Bande in der Autoradiographie kommt, aber nicht zum vollständigen Verschwinden der Markierung durch ^{32}P -NAD.

Um die durch ART2.2 modifizierten Arginine im Maus-P2X7 genau bestimmen zu können, wurden durch zielgerichtete Mutagenese weitere Konstrukte hergestellt: R124K, R125K, R133K, R134K, R125K+R133K, R125K+R134K. Als Kontrollen wurden der P2X7-Wildtyp und eine Mutante, bei der alle vier in der Region vorkommenden Arginine (**Abb. 22C**) mutiert sind (RR124KK+RR133KK), eingesetzt. Zusätzlich wurde ein EGFP-Konstrukt als Negativ-Kontrolle (mock) statt eines P2X7-Konstruktes mit der ART2.2 co-transfiziert.

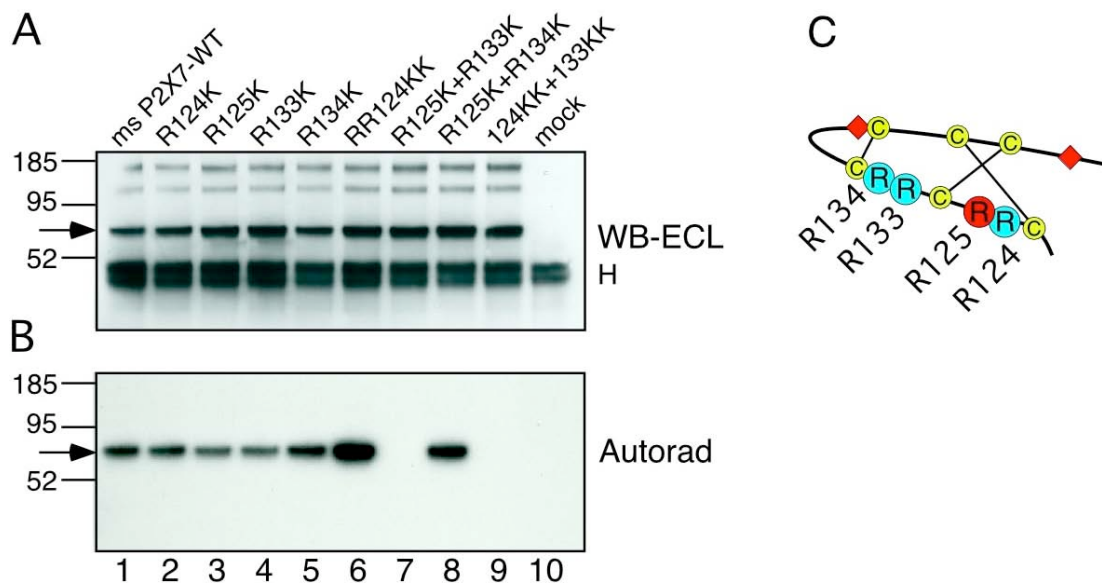


Abb. 22: Immunoblot und Autoradiographie von mit ART2.2 und verschiedenen Maus-P2X7-Konstrukten transfizierten HEK-T Zellen. HEK-T Zellen wurden mit je 2,5 µg ART2.2 und P2X7-Konstrukt co-transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. (A, B) Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 1 µM NAD (5 µCi ^{32}P -NAD) inkubiert und nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit K1G anti-msP2X7 Immunsereum präzipitiert. Nach SDS-PAGE wurden die präzipitierten Proteine eine PVDF-Membran geblottet. (A) Immunodetektion mit dem P2X7-spezifischen Alo-004 Immunsereum, einem PO-konjugierten Sekundär-Antikörper und dem ECL-System. (B) Autoradiographie derselben PVDF-Membran. Markiert sind die Gesamtmenge des P2X7-Rezeptors (A) und der ADP-ribosylierte Anteil (B). (C) Schematische Darstellung der Region um das konservierte Arginin R125 (roter Kreis), markiert sind die nicht konservierten Arginine R124, R133 und R134 (blauer Kreis). Cystein-Reste die Disulfidbrücken ausbilden sind durch gelbe Kreise dargestellt.

Die Zelloberflächen-Expression der Konstrukte wurde im FACS überprüft: alle Konstrukte konnten auf der Zelloberfläche exprimiert werden und zeigten vergleichbare Anfärbungen. Die Zellen wurden wie in den vorhergehenden Versuchen mit ^{32}P -NAD inkubiert und anschließend die P2X7-Präzipitate im Immunoblot (**Abb. 22A**) und in der Autoradiographie analysiert (**Abb. 22B**). Die Ergebnisse zeigen im Immunoblot vergleichbare Bandenstärken aller Konstrukte auf der erwarteten Höhe von 75 kDa (Pfeil), diese Bande war in der Negativ-Kontrolle (Spur 10) nicht sichtbar (**Abb. 22A**). Zusätzlich ist auf der Höhe von 50 kDa die schwere Kette des Präzipitations-Antikörpers zu erkennen (H). Die Autoradiographie der Präzipitate zeigt die verringerte Modifikation der R125K- aber auch der R133K-Mutante (Spuren 3, 4) und keine Modifikation der R125K+R133K- und R124KK+RR133KK-Mutanten (Spuren 7, 9) (**Abb. 22B**). Die Ergebnisse zeigen, dass beim Maus-P2X7 offenbar zwei Arginine durch ART2.2 modifiziert werden können, es handelt sich dabei um das bei Mensch-, Ratte- und Maus konservierte Arginin R125 und das nur bei Mensch und Maus vorkommende Arginin R133.

4.1.3.3 ADP-Ribosylierung von R125 aktiviert den P2X7-Rezeptor

Die Aktivierung von P2X7-Purinozeptors führt auf T Zellen zu Calciumflux, Flashen von Phosphatidylserin und Porenformation in der Zellmembran (siehe **Abb. 6**, Einleitung) (Seman et al., 2003a). Nachdem die beiden Arginine R125 und R133 im Maus-P2X7 als Ziel der ADP-Ribosylierung durch ART2.2 identifiziert worden waren, sollte nun untersucht werden, welche Rolle sie bei der Aktivierung des Purinozeptors durch NAD und ATP spielen.

In funktionellen Analysen wurde an transfizierten Zellen die Aktivierung der P2X7-Konstrukte untersucht. Durch AnnexinV-Färbung sollte das Flashen von Phosphatidylserin und durch YO-PRO-Aufnahme die Poren-Formation der verschiedenen P2X7-Konstrukte auf HEK-T Zellen nach NAD oder ATP Stimulation nachgewiesen werden. Außerdem sollte der Einfluss der P2X7 Aktivierung auf die Zelloberflächen Expression der ART2.2 analysiert werden.

Auf primären T Zellen reichen nanomolare Mengen an NAD und mikromolare Mengen an ATP um den P2X7-Rezeptor zu stimulieren. Auf mit ART2.2 und P2X7 ko-transfizierten HEK-T Zellen ist aber, selbst bei Einsatz von hohen Konzentration ATP oder NAD die

Aktivierung des Rezeptors nicht verlässlich messbar, bzw. nur durch Stimulation mit dem ATP-Analogon Benzoyl-ATP zu erreichen.

Um das Target-Arginin im Maus-P2X7 zu identifizieren, waren alle elf konservierten Arginine des Rezeptors zu Lysinen mutiert worden, siehe vorhergehenden Abschnitt. Mit diesen P2X7-Konstrukten wurden HEK-T Zellen transfiziert und funktionelle Messungen nach Stimulation mit NAD, ATP und Benzoyl-ATP durchgeführt (nicht gezeigt). Dabei wurden von Dr. Sahil Adriouch zwei Konstrukte identifiziert, die besondere Eigenschaften aufwiesen, einmal die R294K-Mutante, welche nicht mehr auf NAD, ATP oder Benzoyl-ATP reagiert („Defekter-P2X7“), und die R276K-Mutante, welche wesentlich sensitiver auf die Substrate reagiert („Super-P2X7“).

Um die funktionelle Relevanz der ADP-Ribosylierung der Arginine R125 und R133 zu überprüfen, wurden Doppel-Mutanten hergestellt, hierzu wurde die R276K-Mutante (super-P2X7) welche sich in den HEK-T Transfektanten auf NAD- und ATP-Response untersuchen lässt, mit den Mutanten R125K bzw. R133K kombiniert. Für die vorgestellten Versuche wurden die folgenden P2X7-Konstrukte vergleichend untersucht: P2X7-WT, R294K (defekt), R276K (super), R276K+R125K, R276K+R133K und R276K+R125K+R133K.

Eine der Konsequenzen der P2X7-Aktivierung ist das nach außen Kehren (Flashen) von Phosphatidylserin und die Formation von Poren in der Zellmembran. Das Flashen von Phosphatidylserin lässt sich durch die Bindung von Fluoreszenz-markierten AnnexinV nachweisen, die Porenformation durch die Aufnahme des DNA-Farbstoffes YO-PRO.

Es sollte die Bedeutung der Arginine R125 und R133, die durch die ART2.2 ADP-ribosyliert werden, für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors untersucht werden. Hierzu wurden Zellen wie in den vorhergehenden Versuchen mit ART2.2 und verschiedenen P2X7-Konstrukten co-transfiziert. Diese wurden für eine Stunde bei 37°C allein, mit NAD oder ATP in Gegenwart von 1µM YO-PRO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit AnnexinV gefärbt und im FACS analysiert (**Abb. 23**). Die Kontroll-Inkubationen zeigen einen gewissen Anteil an AnnexinV-positiven Zellen, dieser ist bei den R276K-Konstrukten mit erhaltenem Arginin R125 erhöht (Panel 3, 5) gegenüber den Konstrukten bei denen sich an dieser Position ein Lysin befindet (Panel 4, 6). Der Hintergrund ist am geringsten bei der R294K-Mutante sowie dem Wildtyp (Panel 1, 2).

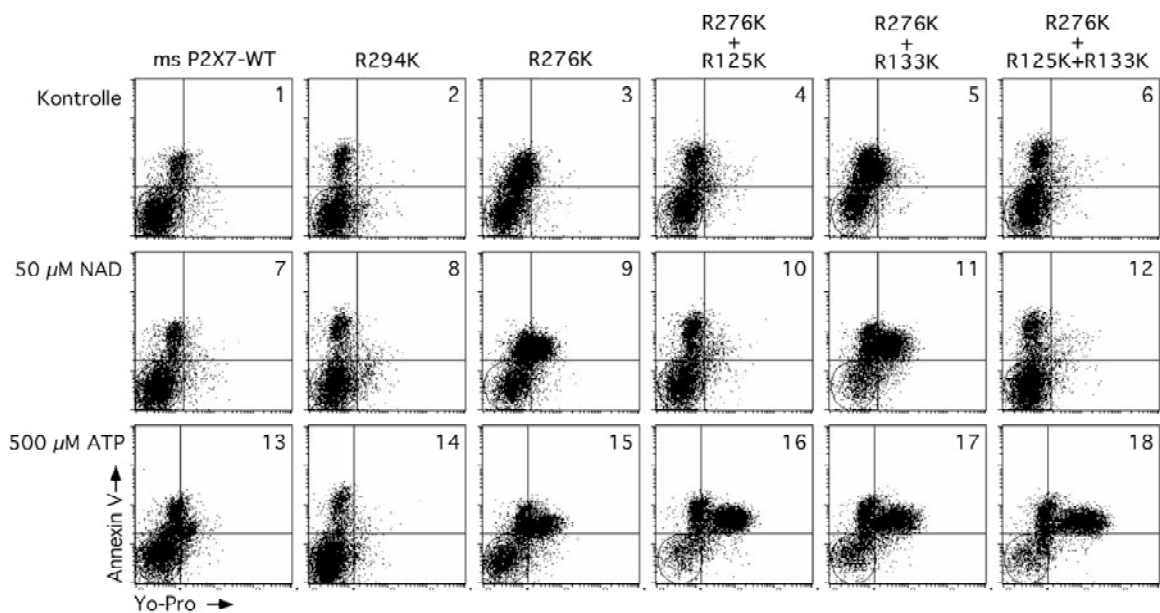


Abb. 23: YO-PRO-AnnexinV Anfärbung der P2X7-ART2.2-Transfektanten nach Behandlung mit NAD oder ATP. HEK-T Zellen wurden mit je 2,5 μ g ART2.2 und msP2X7-Konstrukt kotransfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Die Zellen wurden für 1 Stunde in Gegenwart von 1 μ M YO-PRO bei 37°C allein (Kontrolle) oder bei 37°C mit 50 μ M NAD oder 500 μ M ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 mM CaCl_2 gewaschen, 20 Minuten mit AnnexinV-APC inkubiert und im FACS analysiert.

Die Inkubation mit NAD führt bei den R276K-Mutanten mit erhaltenem R125 zu einer verstärkten AnnexinV-Färbung und zur Aufnahme von YO-PRO (Abb. 23, Panel 9, 11). Beim P2X7-Wildtyp, der R294K-Mutante und den R276K+R125K-Konstrukten (Panel 7, 8, 10, 12) lässt sich dagegen keine verstärkte Anfärbung feststellen.

Die Wirkung von ATP auf den P2X7-Rezeptor ist bei allen R276K-Konstrukten deutlich an der gesteigerten AnnexinV-Färbung und massiver YO-PRO-Aufnahme zu erkennen (Abb. 23, Panel 15-18). Der Effekt scheint sich am deutlichsten auf die R125K-Mutanten (Panel 16, 18) auszuprägen. Der Wildtyp-P2X7 zeigt eine leichte Steigerung beider Anfärbungen (Panel 13) und die R294K-Mutante reagiert nicht auf ATP (Panel 14).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass von den beiden Ziel-Argininen des P2X7, R125 und R133, lediglich die ADP-Ribosylierung des Arginin-Rests an der Position R125 zu einer Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt. Im Gegensatz dazu wird die Aktivierung durch ATP nicht durch die Mutationen R125K oder R133K verhindert.

4.1.3.4 Aktivierung des P2X7 führt zum Shedding der ART2.2

Expressionsanalysen von mit ART2.2 und R276K-P2X7-Mutanten hatten gezeigt, dass die Expression der ART2.2 offenbar durch die Aktivierung des P2X7-Purinozeptors beeinflusst wird. Der Einfluss der P2X7 Aktivierung auf die Zelloberflächen Expression der ART2.2 sollte an ART2.2-P2X7-coexprimierenden Transfektanten untersucht werden. Die Rolle der Arginine R125 und R133 bei der Aktivierung des Purinozeptors durch NAD und ATP sollte dabei weiter aufgeklärt werden.

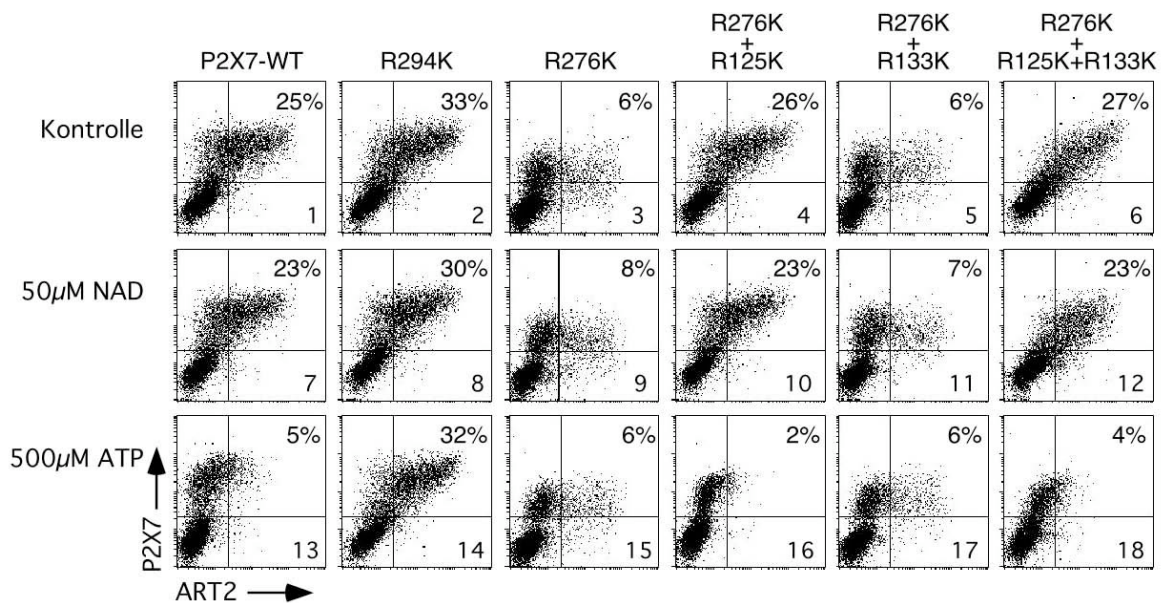


Abb. 24: Regulation der ART2.2 Zelloberflächen Expression. HEK-T Zellen wurden mit je 2,5 μg ART2.2 und msP2X7-Konstrukt co-transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C allein oder bei 37°C in Gegenwart von 50 μM NAD oder 500 μM ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bei 4°C mit Alexa-488-konjugiertem anti-ART2.2 mAb und anti-P2X7 mAb und PE-konjugiertem Sekundär-Antikörper gefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der Prozentsatz ART2.2-P2X7 doppelpositiver Zellen.

HEK-T Zellen wurden mit ART2.2 und verschiedenen P2X7-Konstrukten transfiziert und nach der Ernte wie im vorhergehenden Versuch für eine halbe Stunde bei 37°C allein, mit NAD oder ATP inkubiert, mit ART2.2 und P2X7 spezifischen Antikörpern gefärbt und im FACS gemessen (**Abb. 24**).

Das Ergebnis bestätigt die Beobachtungen, dass die Expression von ART2.2 auf unbehandelten Zellen offenbar von dem P2X7-Konstrukt abhängt, das mit der ART2.2 co-transfiziert wurde (**Abb. 24**, vergleiche Panel 1-6). Bei Ko-Transfektion von ART2.2 mit P2X7-WT oder der defekten R294K-Mutante finden sich am meisten doppel-positive Zellen (**Abb. 24**, Panel 1, 2). Zellen die mit dem „super“-R276K-Konstrukt in Kombination

mit der R125K-Mutante transfiziert sind, zeigen ebenfalls eine relativ hohe Expression (Panel 4, 6). Am niedrigsten exprimieren die Zellen die das R276K-Konstrukt tragen und das Arginin an der Position R125 besitzen (Panel 3, 5). Die Inkubation mit NAD (Panel 7-12) zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine vergleichbare Anfärbung der beiden transfizierten Proteine. ATP dagegen führt bei der Ko-Expression aller R276-Konstrukte (Panel 15-18) sowie dem P2X7-Wildtyp (Panel 13) zu einem fast vollständigen Verlust der Anfärbbarkeit der ART2.2, lediglich bei der Ko-Expression der ART2.2 mit dem defekten R276K-P2X7 (Panel 14) wird die Expression nicht durch ATP beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch NAD oder ATP die Expression der ART2.2 stark herabreguliert. Weiterhin bestätigt sich die Rolle des Arginins R125 als das für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung verantwortliche.

4.1.3.5 P2X7 wird durch endogenes NAD aktiviert

Der vorhergehende Versuch mit den „super“-R276K-Mutanten des P2X7-Rezeptors hat bei der Kontroll-Anfärbung der Zellen (**Abb. 24**, Panel 1-6) eine stark unterschiedliche Expression des ART2.2-Konstrukts in Abhängigkeit des ko-exprimierten R276K-P2X7-Konstrukts gezeigt. Diese Unterschiede der Expression ließen sich zwar durch die Inkubation mit ATP bei allen Konstrukten auf ein etwa gleich niedriges Niveau herabregulieren (Panel 7-12), aber wurden nicht durch die exogene Zugabe von NAD beeinflusst (Panel 13-18). Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Expression der ART2.2 durch endogenes, bei der Ernte der Zellen freiwerdendes, NAD und ADP-Ribosylierung des P2X7 durch ART2.2 verursacht werden, wurden die "normalen"-P2X7 Konstrukte mit den "super"-P2X7 Mutanten vergleichend untersucht.

Alle Konstrukte konnten erfolgreich exprimiert werden, allerdings zeigten das R276K- und R276K+R133K-Konstrukt (**Abb. 25A**, Panel 5, 7) einen wesentlich geringeren Anteil an ART2.2-P2X7-doppel-positiven Zellen (**Abb. 25A**) und auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) war bei diesen Konstrukten deutlich verringert (**Abb. 25B**). Diese Unterschiede der Expression waren bei den Mutanten auf dem Wildtyp-P2X7-Hintergrund (Panel 1-4) nicht zu beobachten (vergleiche **Abb. 25A, B**) und zeigten eine vergleichbare Anfärbung wie die beiden R276K-Mutanten bei denen das Arginin an der Position R125

durch Lysin ersetzt wurde (Vergleiche Panel 1-4 mit Panel 6, 8). Offenbar wird die Expression des P2X7-Rezeptors selbst in ähnlicher Weise beeinflusst (vergleiche **Abb. 25B**, ART2.2 und P2X7). Die Untersuchungen bestätigen, dass die Zelloberflächen-Expression der ART2.2 von der Aktivierung des P2X7-Rezeptors reguliert wird. Zusätzlich wird deutlich, dass offenbar schon während der Kultur oder bei der Ernte der Zellen freiwerdendes NAD zur ADP-Ribosylierung des P2X7 durch die ART2.2 führt. Dadurch kommt es zur Minderung der ART2.2- aber auch der P2X7-Expression.

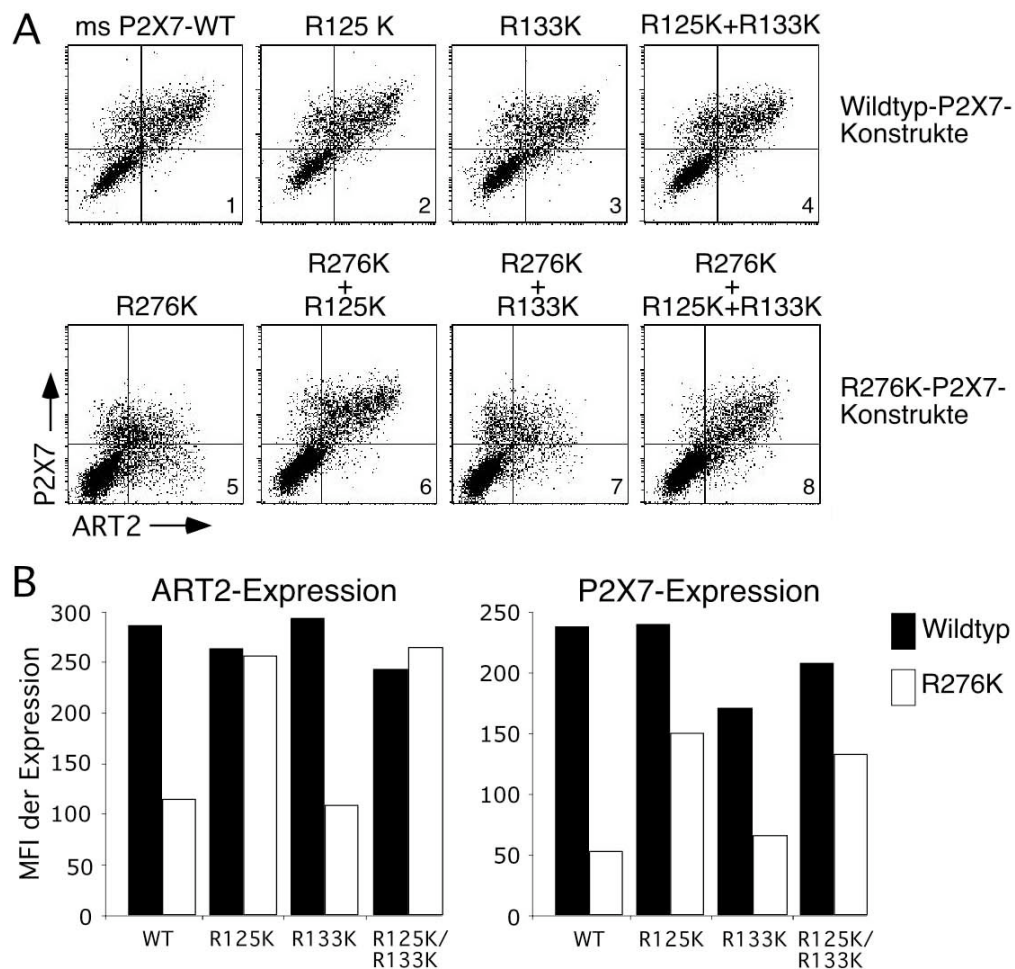


Abb. 25: Expressionsniveau von P2X7-Wildtyp- und R276K-Mutanten und ART2.2 auf der Zelloberfläche. HEK-T Zellen wurden mit je 2,5 µg ART2.2 und msP2X7-Konstrukt co-transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bei 4°C mit Alexa-488-konjugiertem anti-ART2.2 mAb und anti-P2X7 mAb und PE-konjugiertem Sekundär-Antikörper gefärbt. **(A)** FACS-Analyse der Expression der Konstrukte auf dem Wildtyp-P2X7- (Panel 1-4) und auf dem R276K-Hintergrund (Panel 5-6). **(B)** Graphische Auswertung der in den FACS-Dot-Blot-Analysen erhobenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für ART2.2 und P2X7, schwarze Balken geben die MFI bei Ko-Transfektion mit "normalem" P2X7 an, weiße Balken die MFI für Transfektanten mit „super“-R276K-P2X7.

4.2 Generierung und Charakterisierung ART2.2 transgener Mäuse

In diesem Kapitel wird die Generierung und Untersuchung von ART2.2 transgenen Mäusen beschrieben. Da ART2.2 auf unreifen Thymozyten nicht und auf peripheren T Zellen nur niedrig exprimiert wird, sollten ART2.2 transgene Mäuse generiert werden, die ART2.2 unter der Kontrolle des H-2Kb Promotors und des IgH-Enhancers überexprimieren. Die Versuche zur Charakterisierung der transgenen ART2.2-Tiere wurden im Vergleich mit BALB/c Wildtyp und in unserem Labor etablierten (Ohlrogge et al., 2002a) ART2 defizienten Mäusen durchgeführt.

4.2.1 Generierung ART2.2-transgener Mäuse

Um weitere Hinweise über die Funktion von ART2.2 im Kontext des Immunsystems zu erhalten, wurden transgene Mäuse hergestellt, die ART2.2 auf Zellen des Immunsystems überexprimieren. Hierfür wurde das ART2.2-GPI-Konstrukt verwendet, welches sich bereits bei der Herstellung von transfizierten Zelllinien bewährt hatte (siehe vorhergehende Kapitel). Die transgene ART2.2 wurde N-terminal mit einem Flag-Tag, der von dem monoklonalen M2-Antikörper erkannt wird, versehen, um sie von endogener ART2 unterscheiden zu können. Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Experimente mit Transfektanten haben gezeigt, dass die Aktivität der ART2.2 durch den Epitop-Marker nicht beeinträchtigt wird. Das ART2.2-GPI-Expressionskonstrukt wurde aus dem bestehenden Vektor in den Vektor pHSE3' umkloniert, dadurch gerät die Expression der transgenen ART2.2 unter die Kontrolle des in allen hämatopoetischen Zellen aktiven MHC I Promotors und IgH-Enhancers. (Pircher et al., 1989; Wolenski et al., 2003). Hierzu wurde die cDNA der ART2.2 mit Hilfe von Sequenz-spezifischen Primern aus dem bestehenden Konstrukt heraus PCR-amplifiziert. Über die Primer wurden Schnittstellen für die Enzyme *Sal* I und *Bcl* I am 5' bzw. 3'-Ende eingeführt. Die amplifizierte cDNA wurde mit *Sal* I und *Bcl* I geschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen pHSE3'-Vektor ligiert (**Abb. 26**).

Die Pronukleus-Injektion in C57BL/6 x DBA Eizellen wurde in der Transgenic Mouse Facility im Zentrum für molekulare Neurobiologie (ZMNH) von Frau Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer durchgeführt. Hierzu wurden die bakteriellen Sequenzen des Vektors durch

Xho I Verdau (**Abb. 26**) mit anschließender präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese entfernt und die aufgereinigte DNA in Pronuklei befruchteter Eizellen injiziert. Die Eizellen wurden auf Ammen übertragen.

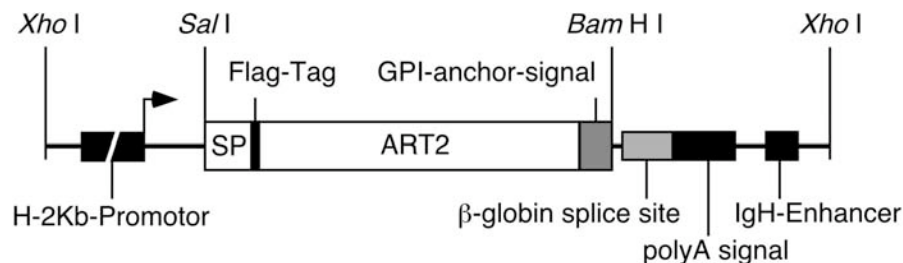


Abb. 26: Konstrukt für die Generierung ART2.2 transgener Mäuse. Schematische Darstellung der Strukturdomänen des Fragments, das für die Pronukleus-Injektion durch Verdau mit *Xho* I aus dem pHSE3' Vektor herausgeschnitten wurde. Für die Insertion in die Multiple Cloning Site wurde das ART2.2-Konstrukt mit *Sal* I und *Bam* H I Schnittstellen versehen und in den auf dem pUC-18 basierenden PHSE3' Vektor eingefügt. Das ART2.2-Expressionskonstrukt wird unter Kontrolle des MHC1 (H-2Kb) Promotors und des IgH Enhancers exprimiert. Das N-terminale Signalpeptid von ART2.2 wurde durch das Signalpeptid von CD8 (SP) ersetzt, gefolgt von einem FLAG-Tag, der ART2.2 cDNA und dem GPI-Ankersignal.

4.2.2 Identifizierung transgener Foundertiere

Um die Nachkommen auf Integration des Transgens zu untersuchen, wurde aus dem Konstrukt durch Restriktionsverdau und präparativer Gel-Elektrophorese eine geeignete 1,15 große Sonde für Southernblot-Analysen hergestellt. Die Sonde wurde mit Hilfe von randomisierten Primern und Klenow-DNA-Polymerase mit ^{32}P markiert. In Southernblot-Analysen von *Eco* RI verdauter Mausschwanz-DNA konnten, nach Hybridisierung mit den Sonden, Mäuse mit transgener Integration durch Autoradiographie identifiziert werden (**Abb. 27**).

Durch die Pronukleusinjektion des ART2.2-Konstrukts entstanden vier weibliche und ein männliches Foundertier, die das Transgen integriert hatten. Nicht alle Tiere, die das Transgen integriert hatten, vererbten dieses an ihre Nachkommen. **Abb. 27** zeigt eine Southernblot-Analyse der Foundertiere #37 und #31 sowie einiger ihrer Nachkommen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Foundertier #31 das Transgen zwar trägt, aber nicht an seine Nachkommen weitergab, während das Foundertier #37 Nachkommen hatte, die positiv mit der Sonde reagierten und somit das Transgen vererbt bekommen hatten.

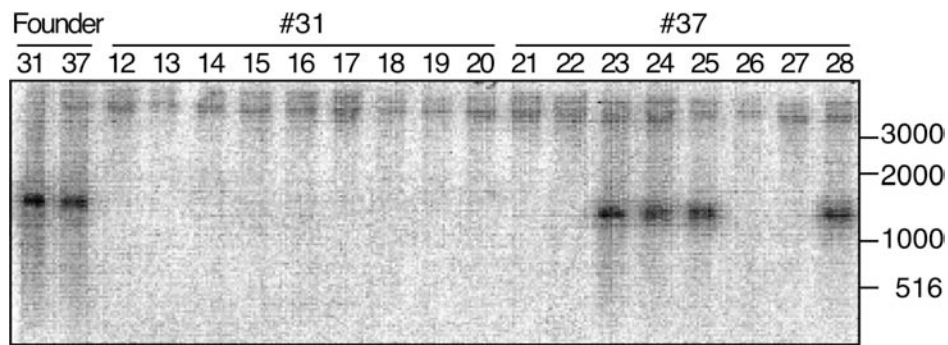


Abb. 27: Detektion transgener Foundertiere und ihrer Nachkommen durch Southernblot Analyse. Genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde mit *Eco* RI Verdaut und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde über Nacht mit radiaktiv markierter Sonde (1,15 kB) hybridisiert und stringent mit 0,5% SSC/ 1% SDS bei 68°C gewaschen. Gebundene Sonde wurde mittels eines Phosphor-Imagers detektiert. Angegeben sind die Nummern der Nachkommen und ihrer jeweiligen Founder-Eltern, als Positivkontrolle wurde die DNA der beiden Foundertiere (37, 31) aufgetragen.

4.2.3 Nachweis der Transmission des ART2.2 Transgens

Die Nachkommen der Foundertiere wurden mit ART2-defizienten (ART2-KO) Mäusen auf dem BALB/c Hintergrund verpaart, um Nachkommen zu erhalten, die nur die transgene ART2.2 besitzen. Dies sollte es ermöglichen vergleichende Versuche mit T Zellen aus ART2-KO (KO), BALB/c Wildtyp (WT) und transgen ART2.2 exprimierenden (TG) Mäusen durchzuführen. Um den genomischen Hintergrund der Tiere in der F1- und F2-Generation zu untersuchen mussten drei verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt werden: Mit entsprechenden Primerpaaren wurde das Transgen, die Neomycin-Resistenz der ART2-KO und das Wildtyp-Allel nachgewiesen (**Abb. 28A**). Gezeigt sind hier die vier möglichen Konstellationen (A, B, C, D) in der F2 Generation (**Abb. 28C**).

Es wurden Tiere ausgewählt, die PCR positiv für das Transgen (TG) und die Neomycin-Resistenz (KO) waren (**Abb. 28C**, Tier B). Diese wurden wieder mit ART2-defizienten Tieren verpaart, die Nachkommen dieser F3-und weiterer Generationen mussten nur noch auf das Vorkommen des Transgens untersucht werden, sie waren in jedem Fall negativ für die endogene ART2. Somit entstanden Tiere, die nur die transgene ART2.2 exprimierten (**Abb. 28B**). Für die vorgestellten Versuche wurden ausschließlich Tiere ab der F5-Rückkreuzungsgeneration eingesetzt.

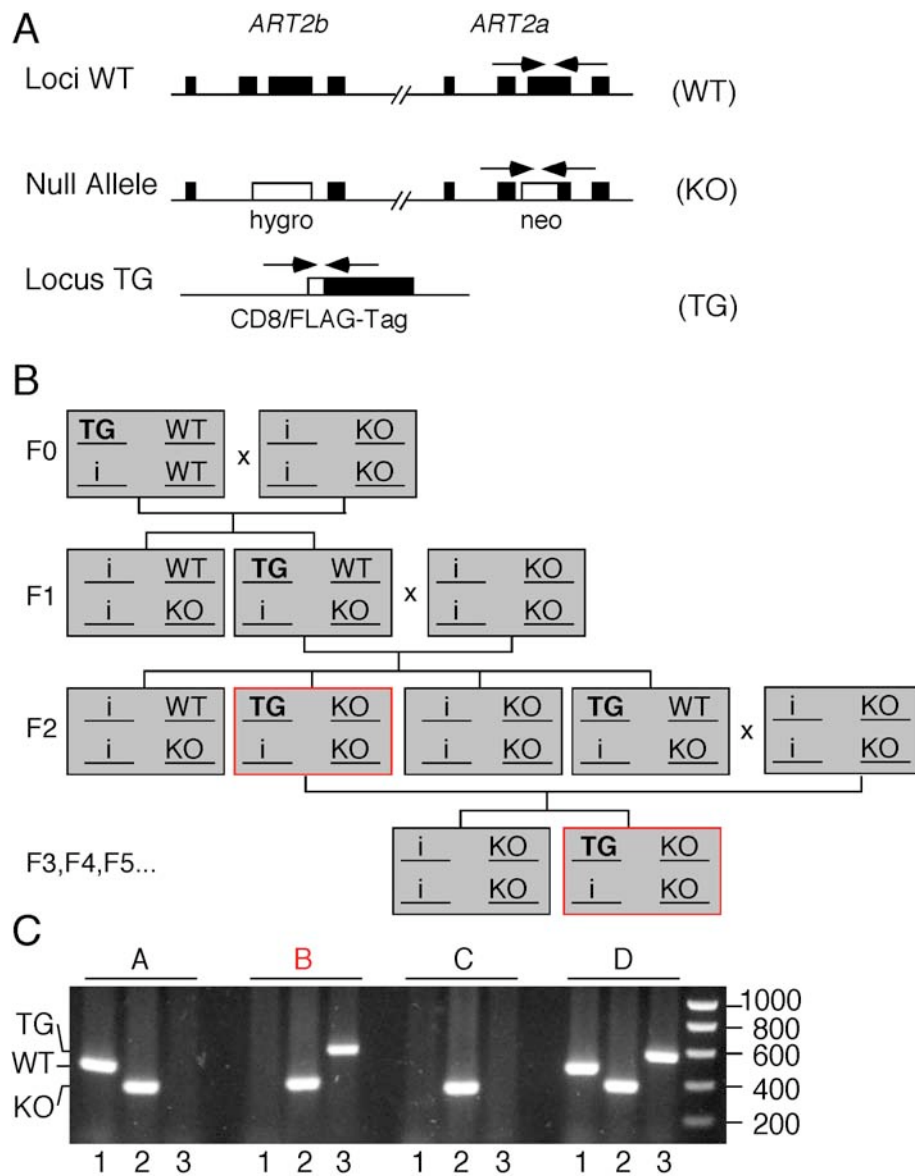


Abb. 28: PCR-Screening transgener Mäuse. (A) Schematische Darstellung des Art2 Locus, der betroffenen Art2 Allele der Knockout-Maus und des transgenen ART2 Konstrukts. Schwarze Kästen repräsentieren die Exone, weiße Kästen die Hygromycin- und Neomycin-Resistenz der KO-Maus bzw. den zusätzlich eingebrachten CD8-Leader und FLAG-Tag des Transgens. Die Pfeile deuten die Lage der für das Screening benutzten Primer an. (B) Schema der Rückkreuzung der Transgenen Tiere auf ART2-KO BALB/c-Mäuse. (C) Genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien von Nachkommen der Rückkreuzung ART2.2-transgener Tiere mit ART2-KO Mäusen wurde mittels verschiedener PCR-Primer auf das Vorkommen des Transgens (TG), der endogenen ART2 (WT), und der Neomycin Resistenz (KO) gescreent. Gezeigt sind die vier möglichen genomischen Konstellationen in der F2-Generation. Das Transgen wurde mit den Primerpaaren F44xTgsF detektiert welches ein PCR-Fragment von 570 bp des Exons F der ART2 bis zum CD8-Leader/FLAG-Tag generiert (Spuren 3), das Vorkommen von Wildtyp-ART2-DNA wurde mit den Primern F13xF43 detektiert, die ein 450 bp großes Stück des Exons F amplifizieren (Spuren 1), die Neomycin Resistenz im ART2-KO-Locus mit den Primern NF1xNR1 ergab ein 380 bp Fragment (Spuren 2).

4.2.4 Normale Lymphozyten-Entwicklung in transgenen Mäusen

Um die Entwicklung einzelner Subpopulationen der Lymphozyten vergleichend zu untersuchen, wurden von ART2-KO, BALB/c-WT, und ART2.2-TG Mäusen Thymus, Lymphknoten und Milz präpariert. Die gewonnenen Zellen wurden für die FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt.

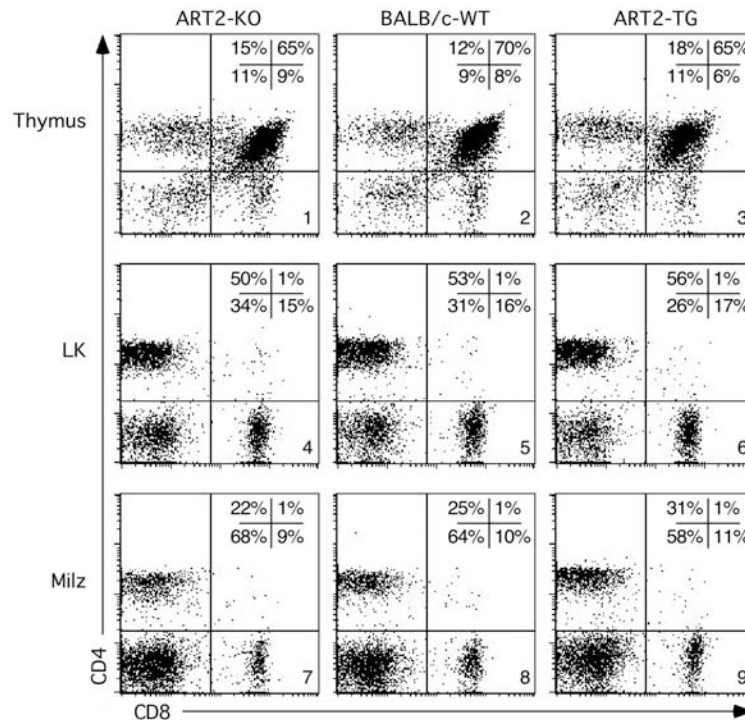


Abb. 29: FACS-Analyse der Zell-Subsets in Thymus, Lymphknoten und Milz. Thymozyten, Lymphknotenzellen und Milzzellen aus je einer ART2-KO, BALB/C-WT und ART2.2-TG Maus wurden präpariert. Die Erythrozyten der Milz wurden mit Gey's Puffer lysiert. Die Zellen wurden mit PE-konjugierten anti-CD8 und APC-konjugierten anti-CD4 Antikörper bei 4°C gefärbt und im FACS analysiert. Angegeben sind die Prozentzahlen der einzelnen Subpopulationen.

Die FACS-Auswertung zeigt sowohl für die ART2-KO als auch für die ART2.2-transgene Maus im Vergleich zum Wildtyp keine auffälligen Verschiebungen in den untersuchten Subpopulationen (**Abb. 29**). Deutlich zu erkennen ist bei allen untersuchten Mäusen das Überwiegen der CD4⁺CD8⁺ Zellen im Thymus (65-70%) (**Abb. 29**, Panel 1-3). In den Lymphknoten (Panel 4-6) bilden den größten Anteil die CD4⁺ Zellen (50-56%), und in der Milz (Panel 7-9) die CD4⁻CD8⁻ Zellen (58-68%). Offenbar werden die CD4/CD8 Subpopulationen durch fehlende oder übermäßige ART2.2 Gen-Expression nicht alteriert.

4.2.5 Erhöhte Expression der transgenen ART2.2 auf T-Zellen

Um die Expression der transgenen ART2.2 zu überprüfen, wurde Tieren, die in der PCR positiv getestet wurden, Lymphknoten, Milz und Thymus entnommen. Um die relative ART2.2-Expression zu quantifizieren, wurden parallel ART2-KO und BALB/c-WT Mäuse untersucht. Die Lymphozyten wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen die ART2 und CD3 angefärbt und im FACS analysiert. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit dem ART2-spezifischen AliA53-Antikörper durchgeführt, da dieser sowohl die transgene als auch die endogene ART2 anfärbt, dies erlaubt einen direkten Vergleich des Expressionsniveaus (**Abb. 30**).

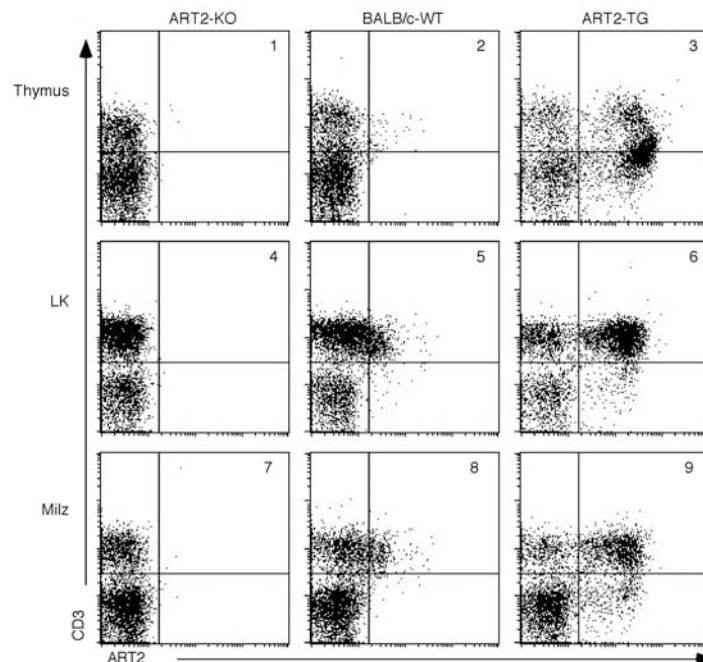


Abb. 30: FACS-Analyse der ART2 Expression in Thymus, Lymphknoten und Milz. Thymozyten, Lymphknotenzellen (LK) und Milzzellen aus je einer ART2-KO, BALB/c-WT und ART2.2-TG Maus wurden präpariert, die Erythrozyten der Milz wurden mit Gey's Puffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit dem Alexa-488-konjugierten ART2-spezifischen mAb Ali53 und einem PE-konjugierten anti-CD3 Antikörper gefärbt und im FACS analysiert.

Durch Anfärbung mit dem Flag-Tag-spezifischen M2 Antikörper konnte zwischen endogener ART2 und transgener ART2.2 unterschieden werden (nicht gezeigt). Das Ergebnis der FACS-Messung zeigt, dass bei den ART2-defizienten Mäusen keinerlei ART2-Oberflächen-Färbung auftritt (Panel 1, 4, 7). Bei BALB/c Wildtyp Mäusen wird die ART2 im Thymus nicht (Panel 2) und in Lymphknoten (Panel 5) sowie Milz (Panel 8) auf den CD3-positiven T Zellen schwach exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die transgene ART2.2 auf den T Zellen aller drei Gewebe stark exprimiert (Panel 3, 6, 9).

4.2.6 Erhöhte Aktivität der transgenen ART2.2

Um zu untersuchen, ob die Überexpression der ART2.2 auf den primären T Zellen zu einer Steigerung der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung führt, wurden Lymphozyten aus den Lymphknoten je einer ART2-KO, BALB/c-WT und ART2.2-TG Maus präpariert. Durch Inkubation mit an magnetischen Beads immobilisierten anti-IgG1 Antikörpern wurden die B Zellen entfernt; die verbleibenden Zellen (zu mehr als 95% T Zellen) wurden für die Titrations-Analyse eingesetzt. Die T Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen eNAD inkubiert, gewaschen, mit dem 1G4-Antikörper gefärbt und anschließend im FACS analysiert. Die Zellen wurden während der gesamten Inkubationen bei 4°C gehalten.

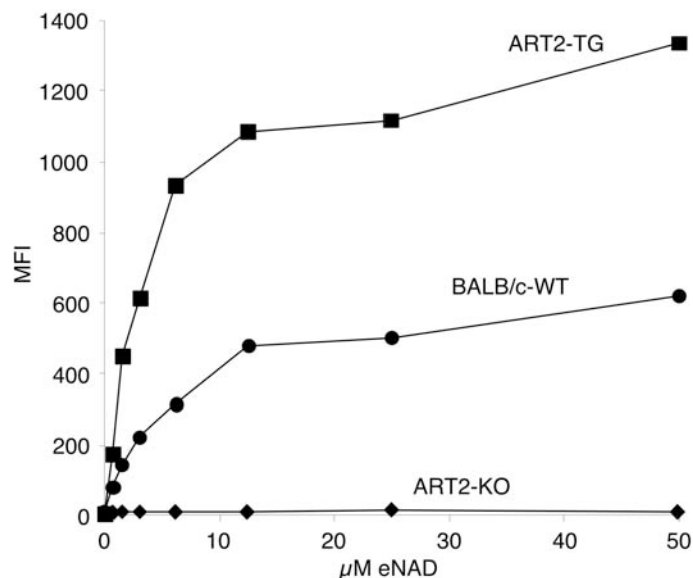


Abb. 31: Titration der eADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf T Zellen der ART2-KO, BALB/c-WT und ART2.2-TG Maus. Lymphozyten aus den Lymphknoten je einer ART2-KO, BALB/c-WT und ART2.2-TG Maus wurden präpariert. B Zellen wurden mit anti-IgG1 an magnetischen Beads immobilisierten Antikörpern depletiert. Die aufgereinigten T Zellen wurden bei 4°C für 3 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen von eNAD inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit Alexa-488-konjugiertem mAb 1G4 gefärbt und im FACS analysiert. Aufgetragen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit eNAD inkubierten Zellen.

Das Ergebnis der Untersuchung (**Abb. 31**) zeigt die effiziente eADP-Ribosylierung der Zelloberflächen-Proteine der ART2-exprimierenden Zellen der BALB/c Wildtyp (**WT**) und der transgenen Maus (**TG**), hierbei zeigt sich dass, die Überexpression der ART2.2 auf den T Zellen zu einer massiven Aktivitätssteigerung führt (Vergleiche **WT** und **TG**). Bei den T Zellen aus den ART2-defizienten Tieren (**KO**) lässt sich keine Zelloberflächen-eADP-Ribosylierung nachweisen.

4.2.7 Erhöhte Sensibilität von ART2.2-transgenen T-Zellen für NICD

Die Inkubation von murinen T Zellen mit NAD führt über ADP-Ribosylierung der Zelloberflächen-Proteine durch ART2 zur Aktivierung des P2X7-Purinozeptors und zum Zelltod, der als NICD „NAD-induced cell death“ bezeichnet (Adriouch et al., 2001; Seman et al., 2003a) (siehe Kapitel 1.3). Der Zelltod kann auch ART2 unabhängig durch direkte Aktivierung des P2X7-Purinozeptors mittels ATP erfolgen (Wilson et al., 2002). Eines der frühen Zeichen des Zelltodes oder der Apoptose ist das nach außen Kehren (Flashen) des Phospholipids Phosphatidylserin, das in vitalen Zellen fast ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist (Bossy-Wetzel and Green, 2000). Es lässt sich durch Binden von Fluorochrom-gekoppelten AnnexinV nachweisen. Als spätes Zeichen des Zelltodes gilt die Anfärbbarkeit zellulärer DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid, welche auf den Verlust der Membranintegrität hinweist (**Abb. 7**).

Da der NICD durch ART2 katalysiert wird, sollte geklärt werden, ob die T Zellen der transgenen, ART2.2 überexprimierenden Maus für die oben beschriebenen Effekte besonders empfindlich sind. Ebenfalls sollte die Empfindlichkeit auf ATP, welches den P2X7-Purinozeptor direkt aktiviert, überprüft werden. Das NAD-Analogon etheno-NAD (eNAD) kann bei ART2 exprimierenden T Zellen den NICD nicht auslösen, obwohl es als effizientes Substrat dient (Seman et al., 2003a). Diese Beobachtung sollte an den stärker ADP-ribosylierenden T Zellen der transgenen Maus überprüft werden. Ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zurückzuführen sind, wurde durch die Inkubation mit dem für P2X7 spezifischen Inhibitor KN62 kontrolliert.

Für vergleichende Analysen wurden aufgereinigte T Zellen von ART2-KO, BALB/c-Wildtyp und ART2.2-transgenen Mäusen für 30 Minuten bei 4°C und bei 37°C in Ab- und Anwesenheit von NAD oder ATP inkubiert. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem AnnexinV und Propidiumjodid (PI) gefärbt. und im FACS untersucht (**Abb. 32**). Zellen im linken unteren Quadranten (AnnexinV-PI negativ) entsprechen vitalen Zellen. Zellen im rechten unteren Quadranten haben PS geflasht und sind AnnexinV positiv, Zellen im rechten oberen Quadranten entsprechen toten Zellen und sind AnnexinV-PI doppelpositiv.

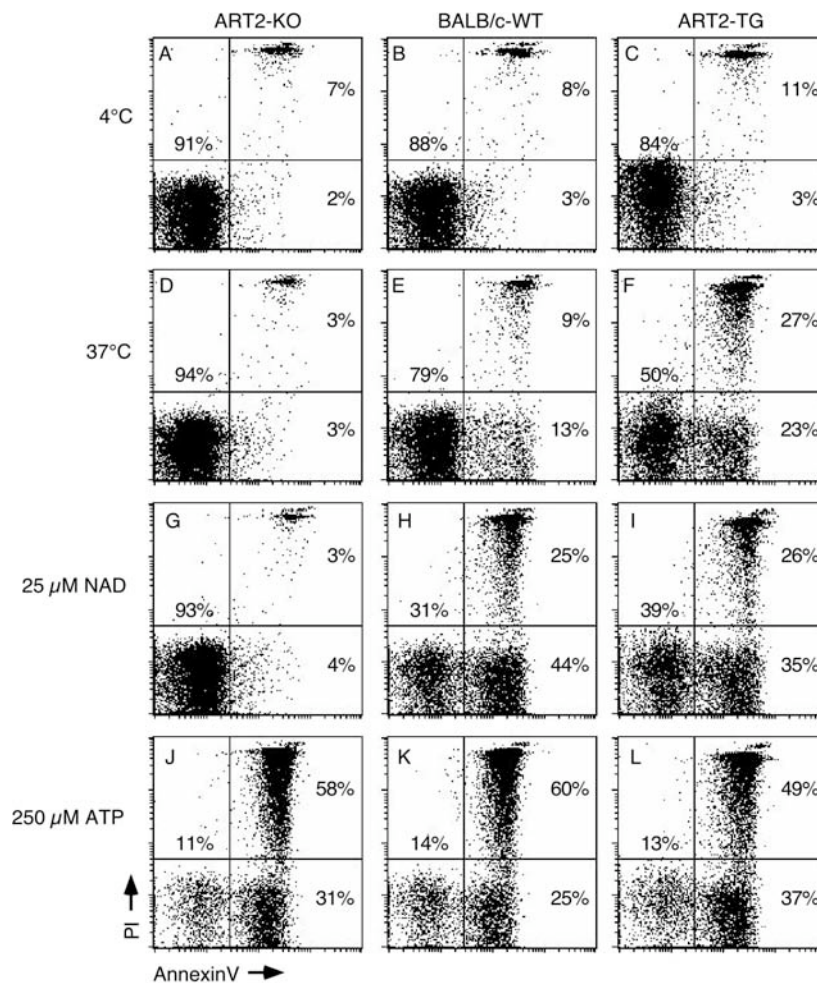


Abb. 32: Flashen von Phosphatidylserin und Propidiumjodidaufnahme nach Behandlung von T Zellen mit NAD oder ATP. Aufgereinigte T Zellen aus den Lymphknoten einer ART2-KO, BALB/C-WT und ART2.2-TG Maus wurden für 30 Minuten bei 4°C, 37°C allein und bei 37°C mit 25μM NAD oder 250μM ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl₂ gewaschen und mit AnnexinV-APC und Propidiumjodid gefärbt. Die Zellen wurden im FACS analysiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten.

Die Ergebnisse zeigen, dass Zellen, die bei 4°C ohne NAD oder ATP Zugabe gehalten wurden, ca. 2-3% AnnexinV einzelpositive und ca. 7-11% AnnexinV-PI-doppelpositive Zellen (**Abb. 32**, Panel A-C) enthalten. Bei Erwärmung auf 37°C kommt es bei ART2 exprimierenden Zellen (BALB/c-WT, ART2.2-TG, Panel E, F) zu einer Zunahme der PS-flashenden und PI-positiven Zellen, nicht aber bei ART2-defizienten Zellen (Panel D). Nach Inkubation mit exogenem NAD reagierten ebenfalls Zellen der Wildtyp und ART2.2-transgenen Mäuse deutlich, (Panel H, I) während ART2-defiziente T Zellen keine Reaktion zeigten (Panel G). Die Inkubation mit ATP hingegen führte zum Tod von Zellen aller Mausstämmen (Panel J-L). Die beobachteten apoptotischen Reaktionen konnten durch Ko-Inkubation der Zellen mit dem P2X7-Antagonisten KN62 reduziert werden (nicht gezeigt).

Zusammengenommen weisen die Experimente daraufhin, dass die Überexpression der ART2.2 auf primären T Zellen die Empfindlichkeit gegenüber dem NICD stark erhöht und dass dieser Effekt P2X7 vermittelt auftritt. Die Ergebnisse deuten ferner an, dass schon bei der Präparation der Zellen NAD freiwird, welches ART2 vermittelt den P2X7 Rezeptor aktivieren.

4.2.8 Verstärktes Shedding von CD62L und ART2.2 durch transgene T-Zellen

Eine weitere bekannte Folge der Aktivierung des P2X7-Purinozeptors ist das Abstoßen (Shedding) von CD62L (L-Selectin) von der Zelloberfläche (Gu et al., 1998). Die Untersuchungen an transfizierten HEK-T Zellen (siehe Kapitel 4.1.3.5) hatten weiterhin angedeutet, dass ART2.2 ebenfalls nach der Aktivierung des P2X7-Purinozeptors gesheddet wird. Es sollte nun überprüft werden, inwieweit das CD62L-Shedding und die Modulation der ART2-Zelloberflächen-Expression auf primären T Zellen durch die ART2.2 Überexpression beeinflusst wird. Hierzu wurden aufgereinigte T Zellen von ART2-KO, BALB/c-WT und ART2.2-transgenen Mäusen wie zuvor bei 4°C und bei 37°C in Ab- und Anwesenheit von exogenem NAD oder ATP inkubiert und anschließend im FACS auf Zelloberflächen-Expression von ART2.2 und CD62L untersucht. Die Ergebnisse bestätigen, dass CD62L und ART2.2 nach Aktivierung des P2X7-Purinozeptors von der Zelloberfläche verschwinden (**Abb. 33**). Während >90% der bei 4°C inkubierten Zellen aller drei Mausstämme CD62L positiv waren (Panel A-C), führte die Inkubation bei 37°C bei ART2-exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Reduktion des auf der Zelloberfläche nachweisbaren CD62L (Panel E, F). ART2-defiziente Zellen jedoch zeigten auch bei 37°C eine unverändert hohe CD62L Expression (vergleiche Panel A und D). Die Inkubation bei 37°C führte ebenfalls zu einer reduzierten Anfärbbarkeit der ART2, besonders gut lässt sich dies bei ART2.2 überexprimierenden T Zellen beobachten (vergleiche Panel C und F). Dieser Temperatur-abhängige Verlust von CD62L liess sich durch Inkubation mit dem P2X7-Antagonisten KN62 unterdrücken (nicht gezeigt). Die Inkubation mit exogenem NAD führte nur bei ART2-exprimierenden Zellen zu einem deutlich gesteigerten Verlust von CD62L (Panel H, I), nicht aber bei ART2-defizienten T Zellen (Panel G). Die Inkubation der Zellen mit ATP führte bei allen T Zellen (KO, WT, TG) zum nahezu

vollständigen Verlust des CD62L, und im Falle der ART2 exprimierenden Zellen (WT, TG) zum vollständigen Verlust der ART2 (Panel J-L). Auch diese Ergebnisse deuten an, dass bei der Präparation der Zellen freigesetztes NAD zu einer ART2.2-vermittelten partiellen Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt.

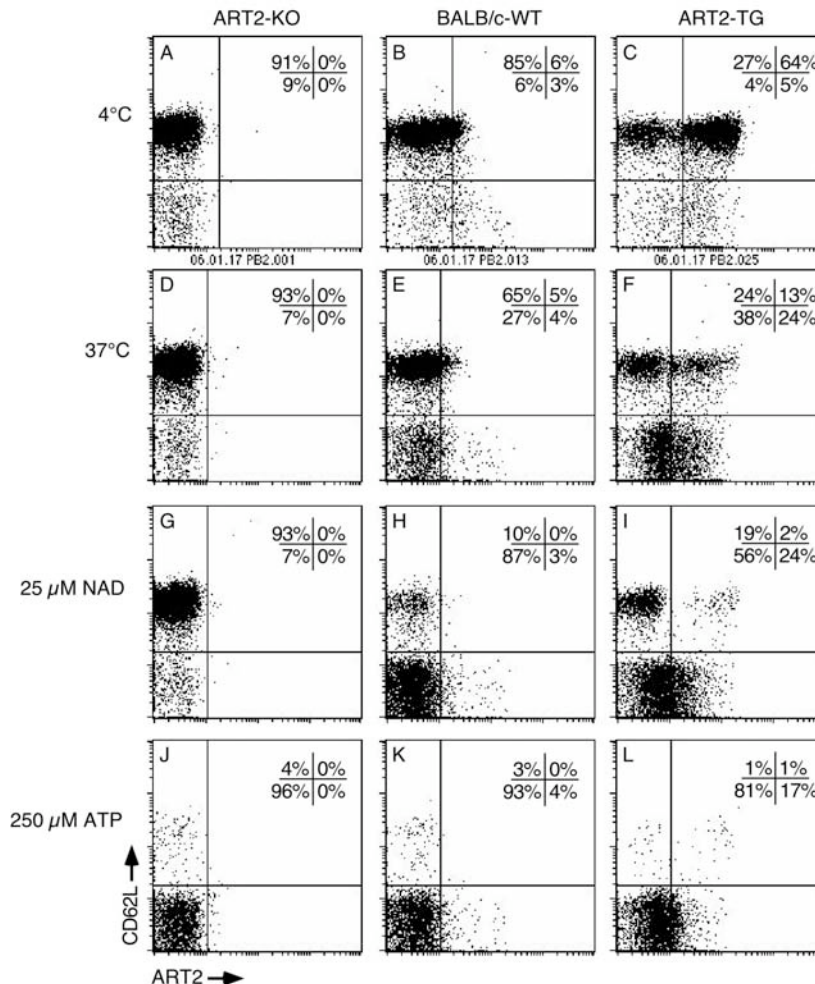


Abb. 33: Shedding von ART2.2 und CD62L nach Behandlung von T Zellen mit NAD oder ATP. Aufgereinigte T Zellen aus den Lymphknoten von ART2-KO, BALB/C-WT und ART2.2-TG Mäusen wurden für 30 Minuten bei 4°C, 37°C allein, oder bei 37°C und 25μM NAD oder 250μM ATP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PE-konjugierten anti-CD62L mAb und Alexa-488-konjugiertem anti-ART2 mAb gefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten.

Um die für die Auslösung von PS-Flashen und CD62L Shedding notwendigen NAD und ATP Konzentrationen näher zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungsanalysen mit NAD und ATP bei 37°C durchgeführt (Abb. 34). Da die oben geschilderten Versuche gezeigt hatten, dass die alleinige Inkubation bei 37°C schon durch endogenes NAD ausgelöste Effekt zeigt, wurden jeweils Kontrollanfärbung bei 37°C und bei 4°C ohne Zugabe von exogenem NAD und ATP durchgeführt. Bei der dargestellten Ergebnisauswertung wurden die bei 4°C

gemessenen Kontrollwerte durch eine gestrichelte Linie mit den bei 37°C gemessenen Kontrollwerten verbunden. Der Abstand dieser Kontrollwerte wurde durch Extrapolation des Kurvenverlaufs bestimmt. Dieser Teil der Graphen entspricht den durch endogen freigesetztes NAD bewirkten Effekten.

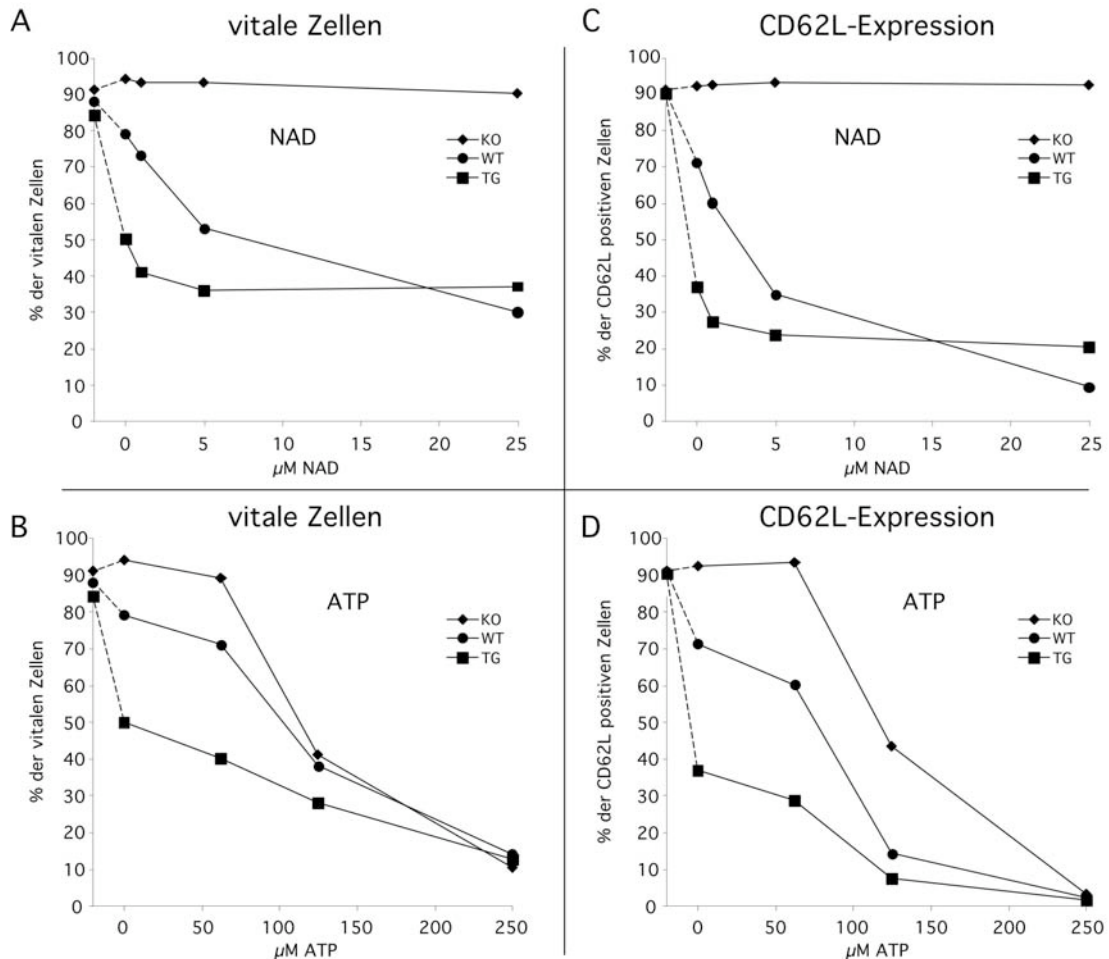


Abb. 34: Dosis-Wirkungsanalysen des NAD und ATP induzierten Apoptose und Shedding von CD62L. Aufgereinigte T Zellen aus ART2-KO, BALB/C-WT und ART2.2-TG Mäusen wurden für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C mit steigenden Konzentrationen von exogenem NAD (A, C) oder ATP (B, D) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2mM CaCl_2 gewaschen und mit AnnexinV-APC und Propidiumjodid gefärbt (A, B) oder mit PE-konjugiertem anti-CD62L mAb gefärbt (C, D). Die Zellen wurden im FACS analysiert. Aufgetragen sind die Prozentzahlen der vitalen (AnnexinV und PI doppelnegativen) Zellen (A, B) und der CD62L positiven Zellen (C, D). Die bei 4°C und 37°C ohne exogenes NAD oder ATP erhobenen Kontrollwerte sind durch eine gestrichelte Linie verbunden.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Resistenz von ART2-defizienten Zellen auf endogenes und exogenes NAD (Abb. 34A, C). Bei ART2-transgenen Zellen reicht offensichtlich das bei der Präparation freiwerdende NAD, um fast die maximal durch exogenes NAD auslös-baren Effekte zu erreichen (Abb. 34A, C). Deutlich zu erkennen ist ferner, dass T Zellen aus allen drei untersuchten Mausstämmen auf ATP reagieren (Abb. 34B, D). Ferner ist zu

vermerken, dass der Verlust von CD62L eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve zeigt wie der Verlust der Zellvitalität, und zwar sowohl für NAD (vergleiche Abb. 10A und C) als auch für ATP (vergleiche Abb. 10 B und D). Die EC₅₀ Werte für ATP (70-120 μ M) liegen deutlich höher als die für NAD (1-3 μ M). Letztere lassen sich nur nach Extrapolation der Kurven abschätzen.

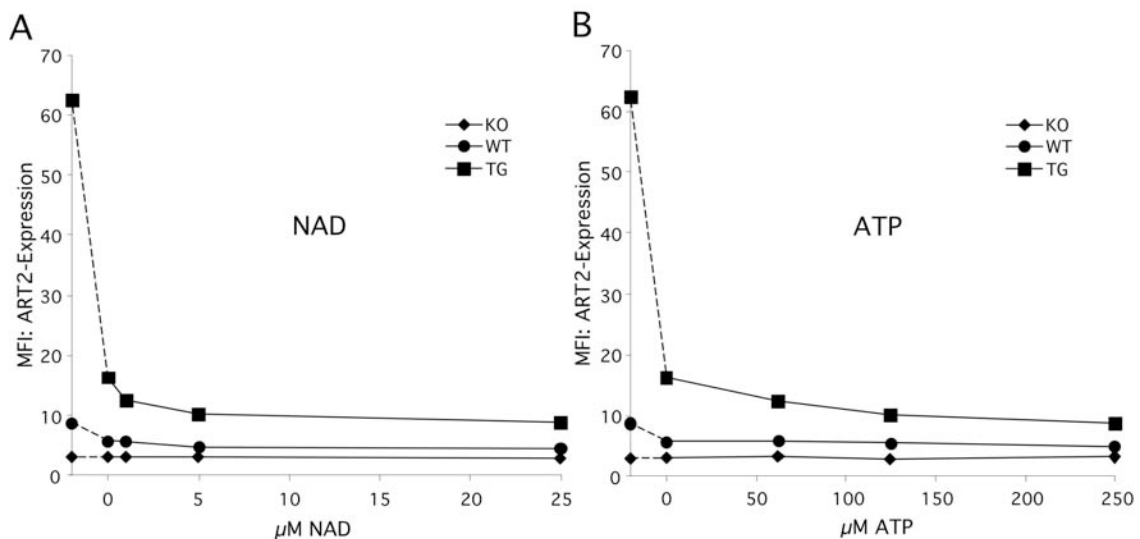


Abb. 35: NAD und ATP Titration des ART2 Sheddings. Aufgereinigte T Zellen aus den Lymphknoten einer ART2-KO, BALB/C-WT und ART2.2-TG Maus wurden untersucht. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C, 37°C allein oder 37°C und den angegebenen Konzentrationen von NAD (A) oder ATP (B) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit Alexa-488-konjugiertem anti-ART2 mAb gefärbt und anschließend im FACS analysiert. Aufgetragen ist die MFI der ART2-Expression. Der Wert auf der Y-Achse zeigt die Anfärbung bei 4°C, und ist mit dem Nullwert (37°C allein) durch eine gestrichelte Linie verbunden. Alle weiteren Inkubationen fanden bei 37°C statt.

Die Analyse der ART2-Oberflächenexpression zeigt eine ähnliche Dosiswirkungsbeziehung wie die des CD62L (Abb. 35A, B). Am deutlichsten ist der ART2-Verlust bei den stark ART2.2 exprimierenden Zellen der transgenen Mäuse zu erkennen. Auch hier wird bereits ein Großteil des maximalen ART2 Verlustes bereits durch endogenes, bei der Präparation frei werdende, NAD vermittelt.

Die Versuche bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen an P2X7/ART2 ko-transfizierten HEK Zellen und zeigen zusätzlich, dass schon geringe Mengen von bei der Präparation der Zellen freigesetztem NAD zu einer ART2.2-abhängigen Aktivierung des P2X7-Purinozeptors führen.

4.2.9 ART2.2 wird als aktives Enzym gesheddet

In diesem Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob die nach P2X7 Aktivierung nicht mehr auf der T Zelloberfläche nachweisbare ART2 endozytiert oder als aktives Enzym gesheddet wird. Die auf T Zellen exprimierte ART2.2 kann neben Arginin-Resten in Zielproteinen auch die Aminosäure Agmatin ADP-ribosylieren. Dieses kann durch die Verwendung von radioaktiv markierten NAD (^{32}P -NAD) in einer Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Um die Aktivität der geshedderten ART2.2 zu untersuchen, wurden T Zellen aus einer ART2.2-transgenen Maus präpariert und für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Aliquot der Zellen abgenommen und die Expression der ART2.2 im FACS gemessen (**Abb. 36A**). Durch Zentrifugation wurden die Zell-Überstände der bei 4°C oder 37°C inkubierten Zellen gewonnen, die Zellen gewaschen und mit 1% TX-100 lysiert. Aus den Überständen und den Zell-Lysaten wurde die ART2.2 jeweils mit Hilfe eines immobilisierten ART2.2-spezifischen Antikörpers präzipitiert und anschließend für 30 Minuten mit ^{32}P -NAD in Gegenwart von Agmatin inkubiert.

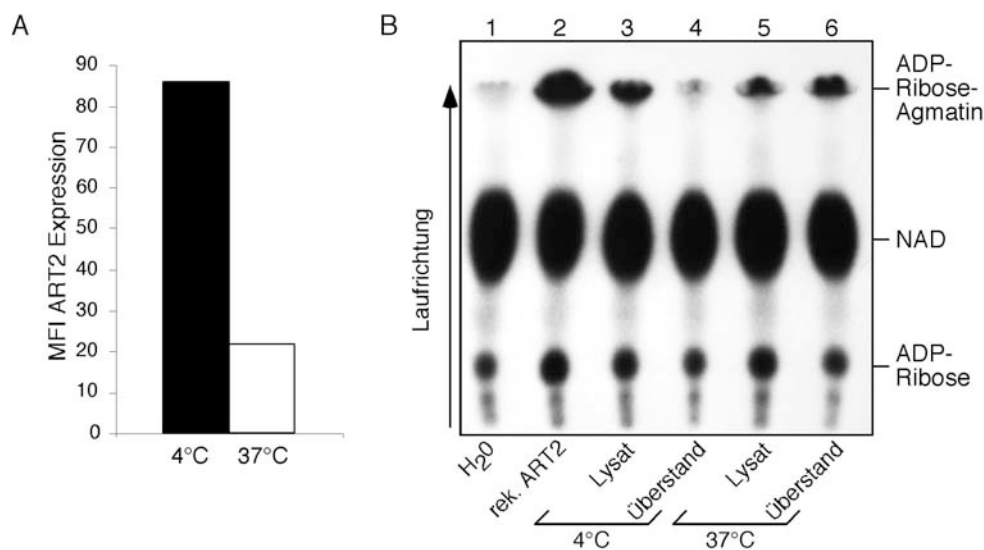


Abb. 36: Analyse der Aktivität der von T Zellen geshedderten ART2.2. Aufgereinigte T Zellen aus den Lymphknoten einer ART2.2-TG Maus wurden für 30 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. **(A)** Nach der Inkubation wurde je ein Aliquot der Zellen abgenommen. Die Menge an gesheddeter ART2.2 wurde durch Färbung mit Alexa-488-konjugiertem anti-ART2.2 mAb und anschließender FACS-Analyse bestimmt. **(B)** Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, die Überstände abgenommen und die Pellets mit 1% TX-100 lysiert. Mit an Protein-G-Sepharose immobilisierten anti-ART2.2 mAb Ali53 wurde ART2.2 aus den Überständen und Lysaten präzipitiert. Danach wurde die aufgereinigte ART2.2 für 30 Minuten mit 2 μM NAD (2 μCi ^{32}P -NAD) in Gegenwart von 4mM Agmatin weiterinkubiert. Als Kontrollen wurden Wasser (H₂O) und rekombinante ART2.2 eingesetzt. Je 1 μl der Inkubationsüberstände wurde für eine Dünnschichtchromatographie verwendet. Die getrocknete Trägerfolie wurde einer Autoradiographie unterzogen.

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie auf Umsatz von NAD zu Agmatin-ADP-Ribose analysiert (**Abb. 36B**). Als Negativ- und Positiv Kontrollen wurde Ansätze ohne (H_2O) und mit rekombinanter ART2.2 (rek. ART2.2) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die ART-Aktivität nach Inkubation von Zellen bei $4^{\circ}C$ nahezu vollständig zellassoziiert (im Lysat befindlich) ist (Spur 3), während der Großteil der ART-Aktivität nach Inkubation von Zellen bei $37^{\circ}C$ im Zellüberstände wiederzufinden ist (Spur 6). Offenbar wird ART2.2 also nach Inkubation bei $37^{\circ}C$ in enzymatisch aktiver Form von der Zelloberfläche gesheddet.

4.3 Assoziation von ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen

In diesem Abschnitt wird untersucht, inwieweit Membran-Mikrodomänen, so genannte „Lipid Rafts“, die Aktivität und Spezifität der ART2.2 beeinflussen. Diese Membran-Mikrodomänen, auch DIGs (Detergent Insoluble Glycosphingolipid-enriched membranes) genannt, sind Bereiche der Zellmembran, die aus bestimmten Lipiden und damit assoziierten Proteinen zusammengesetzt sind. Offenbar nimmt die laterale Segregation der Proteine durch die Rafts einen regulatorischen Einfluss auf deren Funktion. Zu den häufig damit assoziierten Proteinen zählen auch die GPI-verankerten Proteine. (Horejsi et al., 2004; Pike, 2004; Simons and Toomre, 2000). Da es sich bei der ART2.2 um ein GPI-verankertes Molekül handelt, sollte untersucht werden, ob sie ebenfalls mit den Lipid Rafts assoziiert ist, und welchen Einfluss diese Assoziation auf die Aktivität der ART2.2 hat. Die Untersuchungen wurden mit Lymphomzellen durchgeführt, die für vergleichende Untersuchungen einerseits mit einer GPI-verankerten (ART2.2-GPI) und andererseits mit einer transmembran verankerten ART2.2 (ART2.2-Tm) stabil transfiziert wurden.

4.3.1 Konstruktion & Expression von ART2.2-GPI und ART2.2-Tm

DC27.10 Maus-Lymphomzellen, die selbst keine detektierbare ART2.2-Expression aufweisen, wurden stabil mit cDNA transfiziert die einerseits für eine GPI-verankerte ART2.2 kodiert und andererseits mit cDNA, bei der die GPI-Anker-Signalsequenz durch die transmembran und zytosolische Domäne des CD8 Moleküls ersetzt wurde (**Abb. 37A**). Beide Konstrukte wurden am N-Terminus mit einem Flag-Tag versehen. FACS-Analysen mit dem ART2.2-spezifischen monoklonalen AliA53 und dem FLAG-Tag spezifischen M2 Antikörper konnten die Zelloberflächen-Expression beider Konstrukte nachweisen. Stabile Transfektanten wurden durch Selektion mit G418 selektioniert und durch limitierende Verdünnung subkloniert. Die Subklone wurden hinsichtlich ihrer ART2.2-Expression im FACS analysiert und Klone mit intermediären aber gleich hohen Expressionsniveau wurden für die weiteren Versuche ausgewählt (**Abb. 37B**).

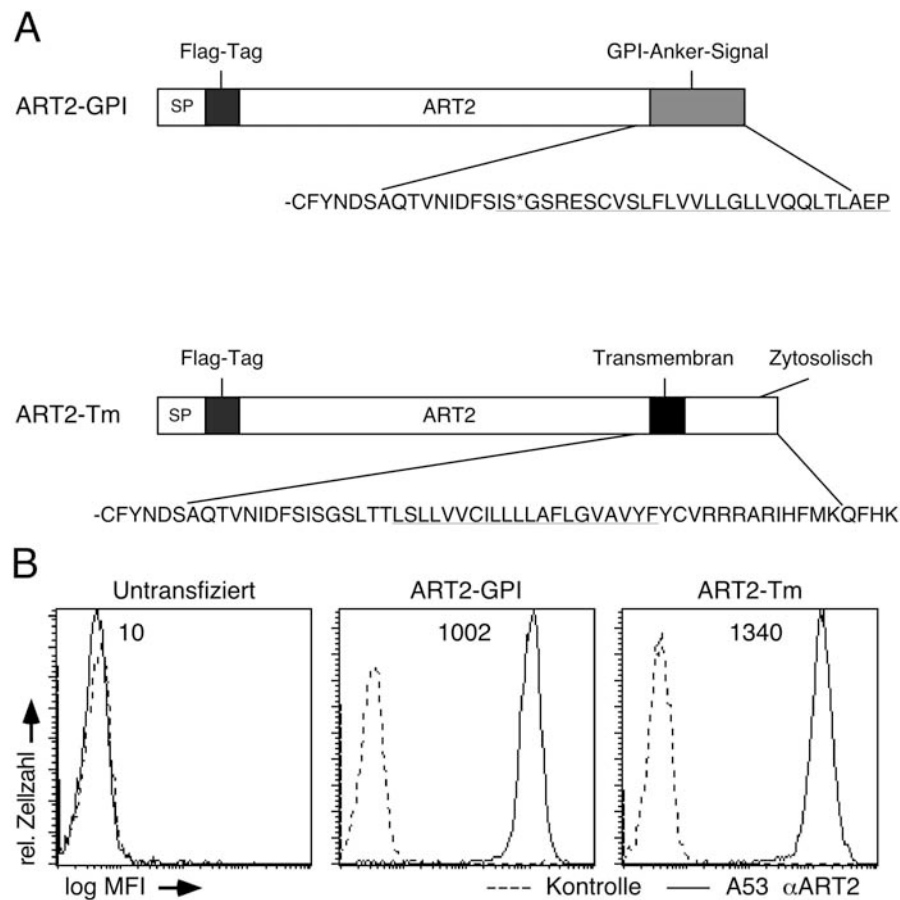


Abb. 37: Schematische Darstellung von ART2.2-GPI und ART2.2-Tm und stabile Expression der beiden Konstrukte in DC27.10 Lymphomzellen. (A) Dargestellt sind die Strukturdomänen der GPI-verankerten ART2.2 (ART2.2-GPI) und der transmembran-verankerten ART2.2 (ART2.2-Tm). Das N-terminale Signalpeptid von ART2.2 wurde durch das Signalpeptid von CD8 (SP) ersetzt, gefolgt von einem FLAG-Tag. Die wildtyp GPI-Anker-Signalsequenz der ART2.2-GPI ist unterstrichen und die vorhergesagte GPI-Anker Befestigungsstelle ist mit einem Stern markiert. Im ART2.2-Tm Konstrukt wurde die GPI-Anker-Signalsequenz durch die 21 Aminosäuren der transmembran Domäne von CD8 (unterstrichen) und die flankierenden 5 extrazellulären bzw. 17 zytosolischen Aminosäuren ersetzt. (B) DC27.10 Lymphomzellen wurden mit den ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm Konstrukten transfiziert. Stabile Transfektanten wurden mit G418 selektioniert und durch limitierende Verdünnung subkloniert. Die ART2.2 Expression wurde im FACS analysiert, die durchgezogenen Linien zeigen die ART2.2 Expression auf untransfizierten bzw. ART2.2 transfizierten Zellen an. Die Zellen wurden mit Alexa-488-konjugiertem ART2.2-spezifischem mAb Ali53 gefärbt, gestrichelte Linien zeigen Zellen, die mit einer Alexa-488-konjugierten Isotyp-Kontrolle gefärbt wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der ART2.2-Färbung ist angegeben.

4.3.2 Unterschiedliche PI-PLC- und TX-100-Sensitivität

GPI-verankerte Proteine können von der Zelloberfläche mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) gelöst werden, transmembranär verankerte Proteine dagegen sind resistent gegenüber einer solchen Behandlung (Stiernberg et al., 1987). Umgekehrt können die meisten transmembranären Proteine durch eine Behandlung mit dem

nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 (TX-100) von der Zelloberfläche gelöst werden, wogegen GPI-verankerte Proteine resistent gegenüber einer solchen Behandlung sind (Filatov et al., 2003).

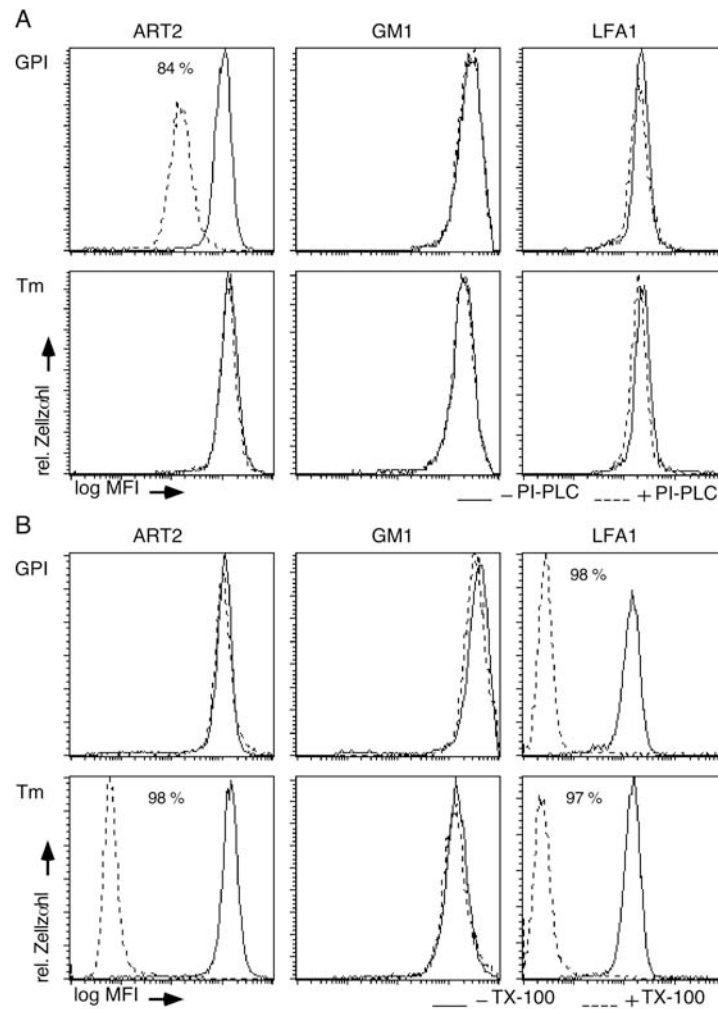


Abb. 38: FACS-Analyse von PI-PLC bzw. TX-100 behandelten ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierten Zellen. (A) Stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 60 Minuten bei 37°C mit (gestrichelte Linie) oder ohne (durchgezogene Linie) PI-PLC behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Zelloberflächenexpression von ART2.2, GM1 und LFA1 im FACS analysiert. Angegeben ist der prozentuale Rückgang der mittleren Fluoreszenzintensität von PI-PLC behandelten ART2.2-GPI Transfektanten. (B) Stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden mit Markern für ART2.2, GM 1 und LFA1 gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 4°C mit oder ohne 1% TX-100 behandelt, fixiert und im FACS untersucht. Die Zahlen geben den prozentualen Rückgang der mittleren Fluoreszenzintensität von TX-100 behandelten Zellen an.

Um die Membranverankerung der Konstrukte zu überprüfen, wurden die ART2.2-transfizierten Zellen mit PI-PLC oder TX-100 behandelt und anschließend im FACS mit dem ART2.2-spezifischen monoklonalen Antikörper AliA53 untersucht. Als Kontrollen wurden die Zellen zusätzlich auf die Zelloberflächen-Expression des Typ 1-transmembran

Proteins LFA1 und des Raft Markers GM1 überprüft (**Abb. 38**). Die Behandlung der Zellen mit PI-PLC resultierte in einem Rückgang der Zelloberflächen-Färbung für ART2.2-GPI um 84% (**Abb. 38A**). Die Anfärbung von ART2.2-Tm, LFA1, und GM1 wurde durch die PI-PLC Behandlung nicht beeinflusst.

Immunoblot-Analysen der Überstände der PI-PLC behandelten Zellen betätigten dass der Großteil der ART2.2-GPI, nicht aber die ART2.2-Tm in den Überstand abgegeben wird (**Abb. 40B**, Spuren 4-5). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Zellen mit TX-100 bei 4°C zu einem dramatischen Rückgang der Färbung von ART2.2-Tm und LFA1 (97-98%) (**Abb. 38B**).

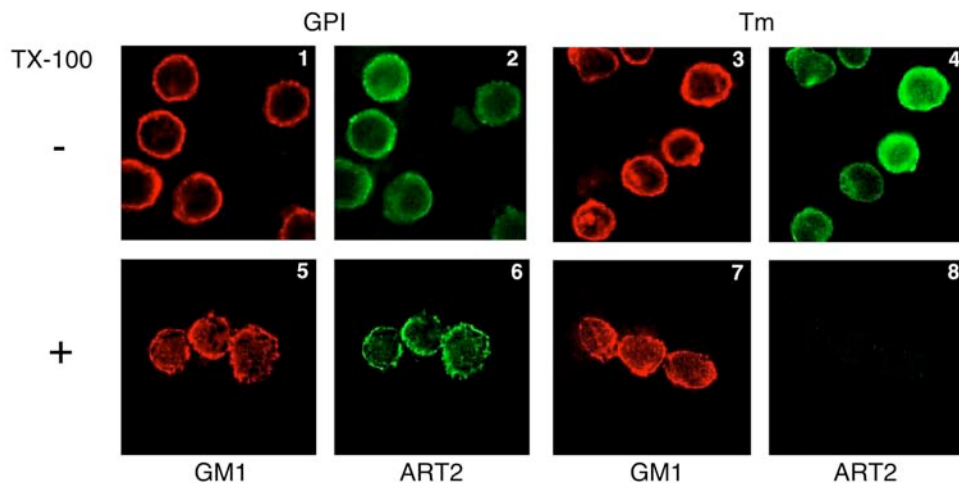


Abb. 39: Mikroskopische Analyse von TX-100 behandelten ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierten Zellen. Stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte Zellen wurden mit Markern für die Zelloberflächenexpression von GM1 und ART2.2 gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 4°C mit (+) oder ohne (-) 1% TX-100 behandelt, fixiert und mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops analysiert.

Die Ergebnisse konnten durch Untersuchungen mit einem konfokalen Mikroskop in der Immunfluoreszenz bestätigt werden (**Abb. 39**). Wurden die Zellen vor der Fixation mit TX-100 bei 4°C behandelt, wurde die Fluoreszenz der ART2.2-Tm dramatisch reduziert (Vergleiche Panel 4, 8), konsistent mit der Annahme dass das transmembran-verankerte Konstrukt der ART2.2 in Detergent-solublen Regionen der Plasmamembran lokalisiert ist. Im Kontrast dazu waren der Raft-Marker GM1 und die GPI-verankerte ART2.2 resistent gegenüber der TX-100-Behandlung und behielten ihr punktiertes Fluoreszenz-Muster (**Abb. 39**, Panel 1-3 und 5-7), einem weiteren Hinweis darauf, dass ART2.2-GPI mit den Detergenz-resistenten Membran-Mikrodomänen assoziiert.

4.3.3 Unterschiedliche Segregation der ART2.2 nach 2-Schritt-Lyse

GPI-verankerte Proteine sind zwar Resistent gegenüber einer Behandlung mit TX-100 bei 4°C, lassen sich aber durch eine Erhöhung der Temperatur bei der Lyse auf 37°C ebenfalls in Lösung bringen (Cain et al., 1995; Thiele et al., 1986a).

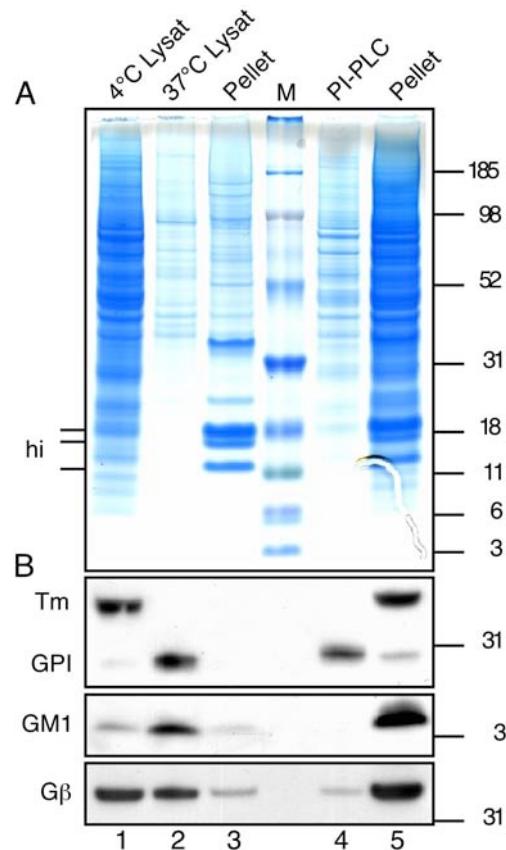


Abb. 40: Temperaturabhängigkeit der Solubilisierung von ART2.2-GPI und ART2.2-Tm. Stabil ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden gepoolt (1×10^6 Zellen je Zelltyp), und für 10 Minuten bei 4°C mit 1% TX-100 lysiert (Spur 1). Das insoluble Material wurde durch Zentrifugation pelletiert und noch mal 20 Minuten bei 37°C mit 1% TX-100 lysiert (Spur 2). Insolubles Material wurde wieder pelletiert und in 2% SDS mittels Ultraschall solubilisiert (Spur 3). Ein separates Aliquot der gepoolten Zellen wurde für 60 Minuten mit PI-PLC inkubiert. PI-PLC behandelte Zellen wurden pelletiert, der Überstand abgenommen (Spur 4). Das Pellet wurde direkt in SDS durch Ultraschallbehandlung lysiert (Spur 5). Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (**A**). Histon-Banden in Spur 3 sind gekennzeichnet (hi). Von einem identischen Gel wurde ein Immunoblot durchgeführt (**B**). Die Immunodetektion wurde sequenziell durchgeführt, erst wurde PO-konjugiertes Cholera toxin (GM1) eingesetzt, dann PO-konjugierter Anti-FLAG mAb M2 (ART2.2-Tm, ART2.2-GPI) und Kaninchen Antiserum T20 mit PO-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (Gβ).

Um die Solubilität durch Behandlung der beiden ART2.2-Konstrukte mit TX-100 zu testen, wurden die Zellen einer 2-Schritt-Lyse zugeführt (**Abb. 40**). Zuerst wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C mit TX-100 lysiert, das insoluble Material wurde pelletiert, der Überstand zur weiteren Analyse abgenommen (**Abb. 40**, Spur 1) und das Pellet in vorge-

wärmten TX-100-Lyse-Puffer bei 37°C für weitere 20 Minuten lysiert. Erneut wurde das insoluble Material pelletiert, der Überstand abgenommen (Spur 2) und das TX-100 resistente Pellet durch Ultraschall-Behandlung in SDS lysiert (Spur 3). Die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE und Analyse des gesamten Protein-Gehaltes (**Abb. 40A**), zeigt dass das 4°C-Lysat fast die gesamte Proteinmenge enthält (mehr als 80%), dagegen wurde durch die zweite Lyse bei 37°C (Spur 2) nur 5% zusätzlicher Proteine in Lösung gebracht. Histone sind als prominent Banden lediglich in der TX-100-resistenten Fraktion zu finden (Spur 3). Immunoblot-Analysen (**Abb. 40B**) der Lysate zeigen dass fast die gesamte Menge der ART2.2-Tm bei 4°C solubilisiert wird, wogegen nur eine minimale Fraktion der ART2.2-GPI im 4°C-Lysat zu finden ist (Spur 1). Tatsächlich ließ ART2.2-GPI aber bei 37°C vollständig solubilisieren (Spur 2). Der traditionelle Raft-Marker GM1 verhielt sich wie die ART2.2-GPI: nur eine minimale Fraktion ist im 4°C-Lysat zu finden, im 37°C dagegen findet sich eine prominente Bande. Die β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine ($G\beta$) war teilweise im 4°C- als auch im 37°C-Lysat vertreten. Durch Behandlung der Zellen mit PI-PLC wurde der Großteil von ART2.2-GPI in den Zellüberstand abgegeben (Spur 4), ART2.2-Tm, GM1 und $G\beta$ waren Resistent gegen diese Behandlung (Spur 5).

4.3.4 ART2.2-GPI aber nicht ART2.2-Tm ist mit Lipid Rafts assoziiert

Um zu Bestimmen ob ART2.2-GPI mit Lipid Rafts assoziiert ist, wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung bei 4°C in TX-100 lysiert und die Membran-Mikrodomänen wurden durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation isoliert. Die Rafts waren schon makroskopisch als „Schleier“ an der Grenzfläche zwischen 5%iger und 30%iger Sucrose zu sehen, dies entspricht in **Abb. 41** der Fraktion 4, und wurden durch einen Immunoblot mit GM1 detektiert (**Abb. 41A, B**).

Nur eine kleine Fraktion des solubilisierten Gesamt-Proteins war in der Raft-Fraktion 4 zu finden, der Großteil der Proteine war in der Fraktion 12 und dem Pellet (P) des Sucrose-Gradienten zu finden (**Abb. 40C**). ART2.2-GPI verhielt sich wie GM1 und war fast ausschließlich in der Raft-Fraktion 4 vorhanden, ART2.2-Tm dagegen verhielt sich wie $G\beta$ und nur ein kleiner Teil war in der Fraktion 4 zu finden (**Abb. 41A, B**). Die Resultate stützen die Aussage dass es sich bei der GPI-verankerten ART2.2, im Gegensatz zur ART2.2-Tm, um ein Raft-assoziiertes Protein handelt.

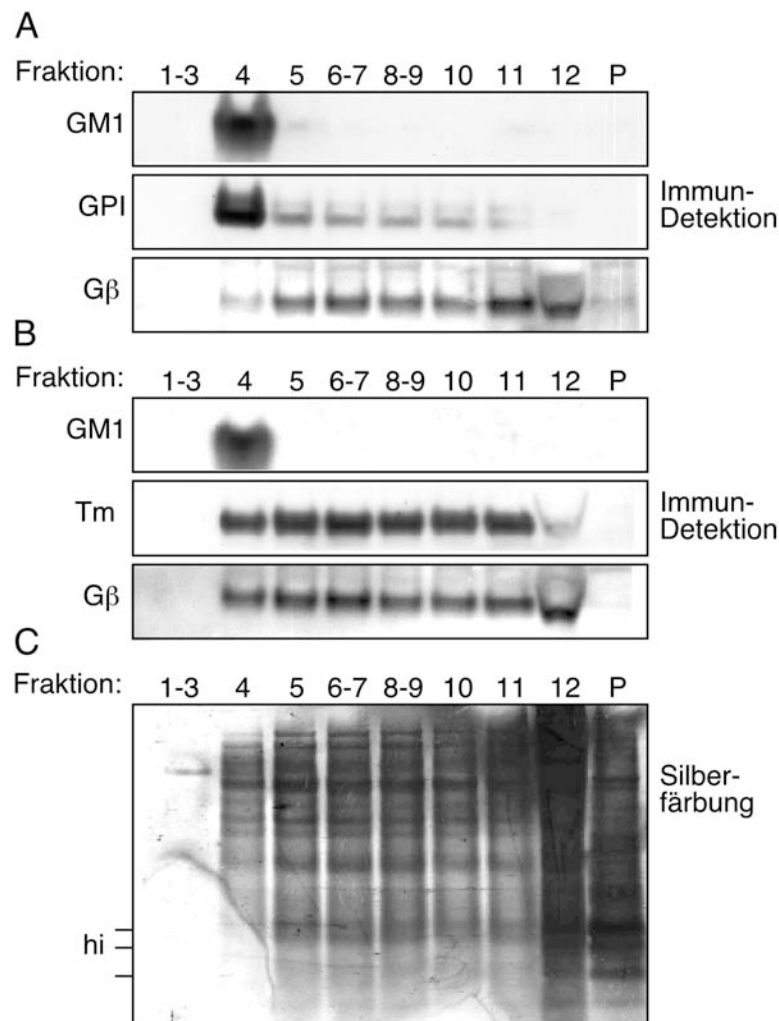


Abb. 41: Isolierung der Lipid Raft-Fraktion mittels Sucrose Gradienten Zentrifugation. Stabil mit ART2.2-GPI (A) oder ART2.2-Tm (B) transfizierte DC27.10 Zellen wurden bei 4°C in 1% TX-100 durch Ultraschallbehandlung solubilisiert. Die Lysate wurden einer Sucrose Gradienten Zentrifugation zugeführt. Die Ultrazentrifugation wurde 14 Stunden mit 200 000g bei 4°C durchgeführt und hinterher zwölf Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 1-3, 6-7 und 8-9 wurden gepoolt. Fraktion 4 enthielt einen sichtbaren „Schleier“ an der Grenzfläche zwischen 5%iger und 30%iger Sucrose. Das Pellet am Boden des Tubes wurde mittels Ultraschall in 2% SDS solubilisiert. Die Proteine in den Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE Analyse mit anschließendem Immunoblot analysiert. Zur Detektion wurden anti-ART2.2 mAbs 9-13/ 10-6, anti Gβ, T20 und CT benutzt. Die Gesamtproteinmenge in den Fraktionen wurde durch eine Silberfärbung visualisiert (C).

4.3.5 ART2.2-GPI besitzt eine höhere Enzymaktivität als ART2.2-Tm

Mit etheno-NAD (eNAD) als Substrat und mit dem etheno-Adenosin spezifischen 1G4-Antikörper können etheno-ADP-ribosylierte Zelloberflächen-Proteine im FACS detektiert werden (Krebs et al., 2003). ART2.2-GPI und ART2.2-Tm Transfektanten wurden für 10 Minuten mit 50µM eNAD inkubiert, und im FACS mit 1G4-Antikörper analysiert (Abb. 42).

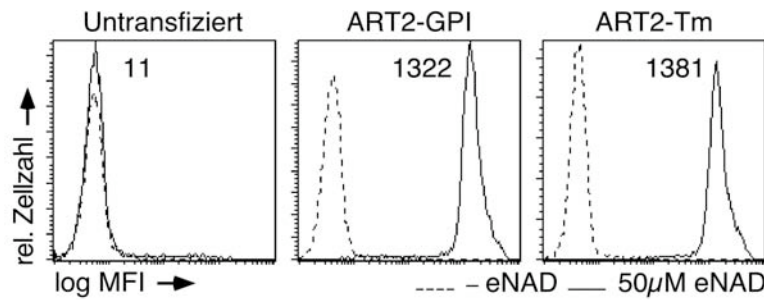


Abb. 42: Nachweis der ART2.2 Aktivität mit Hilfe des 1G4-Assays im FACS. Untransfizierte, ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 10 Minuten in Anwesenheit (durchgezogene Linie) oder Abwesenheit (gestrichelte Linie) von 50µM eNAD inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit Alexa-488-konjugiertem mAb 1G4 gefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit eNAD inkubierten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Konstrukte enzymatische Aktivität aufweisen und Zelloberflächen-Proteine eADP-ribosylieren können, untransfizierte Zellen zeigen keinerlei Reaktion mit dem 1G4-Antikörper, dies zeigt dass die ART2.2 für die Zelloberflächen ADP-Ribosylierung verantwortlich ist. Die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) ist angegeben. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität bei niedrigeren Konzentration im Rahmen einer Titration zeigte eine stärkere Inkorporation von eNAD im Falle der GPI-verankerten ART2.2 als im Falle der ART2.2-Tm (**Abb. 43A**), halbmaximale Anfärbung wurde mit der ART2.2-GPI bereits mit 1µM eNAD erreicht, verglichen mit 20 µM eNAD im Falle der ART2.2-Tm. Ähnlich verhielten sich Kinetische Untersuchungen, hierfür wurden die Zellen unterschiedlich lang mit 1 µM eNAD inkubiert und im FACS gemessen (**Abb. 43B**). ART2.2-GPI Transfektanten zeigen eine schnellere ADP-Ribosylierung ihrer Zelloberflächen-Proteine als die Zellen die eine transmembran-verankerte ART2.2 tragen. Die ART2.2-GPI-Zellen waren bereits nach 1 Minute halbmaximal markiert, während die Tm-Zellen hierfür etwa 20 Minuten benötigten. Selbst nach einer halbstündigen Inkubation mit 1 µM eNAD erreichten sie nicht den Grad der eADP-Ribosylierung wie ART2.2-GPI Zellen (**Abb. 43B**).

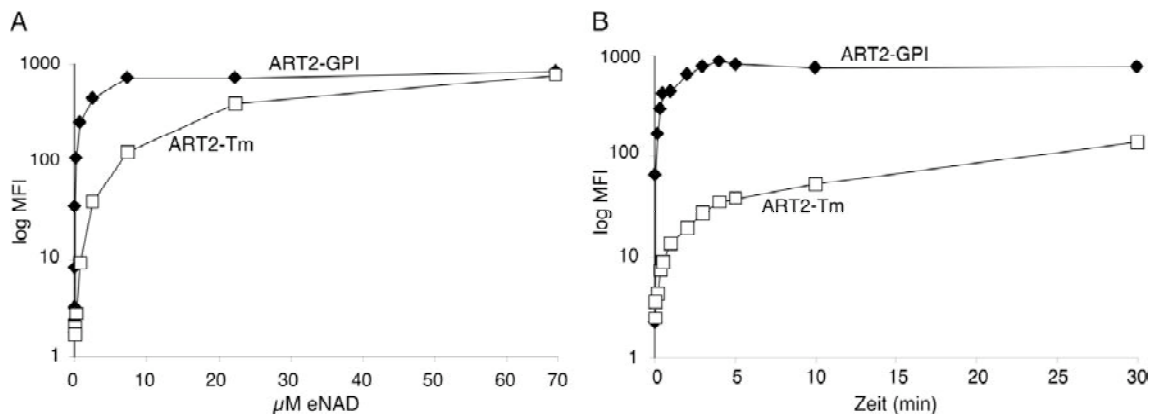


Abb. 43: Titration und Kinetik der eADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierten Zellen. (A) ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte Zellen wurden für 3 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen von eNAD inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, mit Alexa-488-konjugiertem mAb 1G4 gefärbt und im FACS analysiert. (B) ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M eNAD inkubiert und anschließend wie in Panel A im FACS untersucht. Aufgetragen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit eNAD inkubierten Zellen.

4.3.6 Lipid Rafts beeinflussen die ART2.2-Aktivität und Spezifität

Um den Einfluss der Raft-Assoziation auf die ART2.2-Aktivität weiter zu untersuchen, wurde ein etabliertes Verfahren zur Zerstörung der Lipid Rafts auf lebenden Zellen durch Cholesterol-Depletion mittels Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) eingesetzt (Cherukuri et al., 2001). Zuerst wurde der Effekt des MCD auf die Solubilität der Proteine in TX-100 analysiert. Hierzu wurden die ART2.2-GPI und ART2.2-Tm Transfektanten mit 5 bzw. 10 mM MCD vorbehandelt und anschließend dem 2-Schritt-Lyse-Protokoll in TX-100 wie in **Abb. 40** beschrieben zugeführt. Von den erhaltenen Lysaten wurde ein Immunoblot (**Abb. 44B**) und zur Analyse des Gesamtprotein-Gehalts eine Silberfärbung (**Abb. 44A**) durchgeführt. Die Behandlung mit MCD führt zur einer verstärkten Solubilisierung von ART2.2-GPI, GM1 und G β in TX-100 bei 4°C die Konzentrations-abhängig ist (**Abb. 44B**), und mit der Zerstörung der Membran-Mikrodomänen durch MCD im Einklang steht. Densitometrische Analysen haben gezeigt dass sich bei unbehandelten Zellen ca. 14% der ART2.2-GPI im 4°C Lysat (**Abb. 44B**, Spur 1) befinden, wohingegen fast 50% in dieser Fraktion zu finden sind, wenn die Zellen mit 10 mM MCD vorbehandelt wurden (**Abb. 44B**, Spur 7).

Als nächstes sollte der Effekt des MCDs auf die Aktivität und Spezifität der ART2.2 untersucht werden. Hierfür wurden die ART2.2-GPI und ART2.2-Tm Zellen mit 10 mM MCD vorbehandelt und anschließend eine Kinetik mit 1 μ M eNAD wie in **Abb. 43B** durchge-

führt und die Zellen im FACS analysiert (**Abb. 45A**). Es ist deutlich zu erkennen dass die Aktivität des GPI-verankerten Moleküls durch die Vorbehandlung mit MCD stark reduziert wird, vergleiche „GPI-Kontrolle“ und „GPI 10 mM CD“ in **Abb. 45A**. Das MCD scheint keinen Einfluss auf die vorher schon geringe Aktivität der ART2.2-Tm zu haben, die Graphen von behandelten und unbehandelten Zellen kommen auf einander zu liegen (**Abb. 45A**, vergleiche „Tm-Kontrolle“ mit „Tm 10 mM CD“).

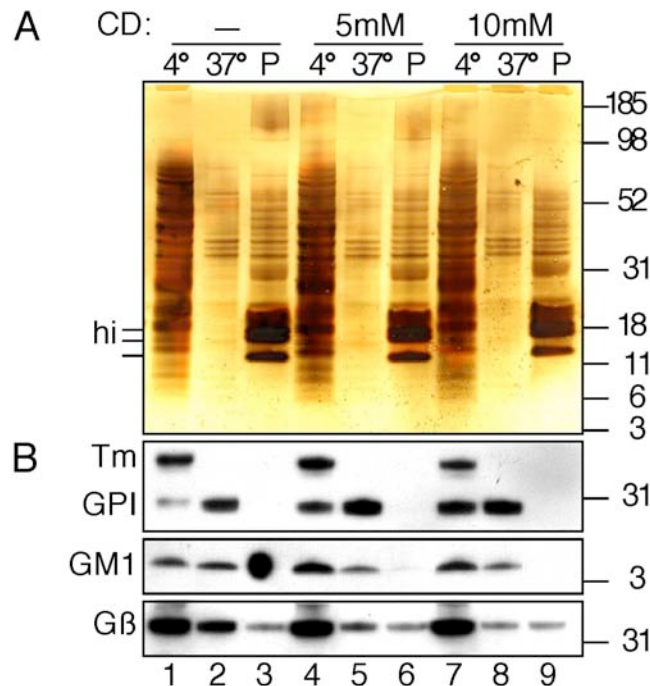


Abb. 44: Zerstörung der Lipid Rafts durch β -MCD. Stabil mit ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden gepoolt (1×10^6 Zellen je Zelltyp), und für 60 Minuten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 5 mM bzw. 10 mM β -MCD (CD) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in zwei Schritten mit 1% TX-100 lysiert. Die Gesamtproteinmenge in den Lysaten wurde durch eine Silberfärbung visualisiert (**A**) und die Proteine wie in **Abb. 40** im Immunoblot analysiert (**B**).

Um die Spezifität der ADP-Ribosylierung nach MCD-Behandlung zu analysieren, wurde der 1G4-Assay im Immunoblot eingesetzt (**Abb. 45B**). ART2.2-GPI Transfektanten wurden mit 10 mM MCD vorbehandelt und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ eNAD inkubiert. Die Zellen wurden mit der oben vorgestellten 2-Schritt-Lyse fraktioniert und der daraus angefertigte Immunoblot mit dem 1G4-Antikörper beprobt. Die Ergebnisse zeigen das unbehandelte Zellen ein spezifisches Target-Protein-Spektrum, vor allem in der Non-Raft (Spur 1)- aber auch in der Raft-Fraktion (Spur 2) aufweisen, einige Proteine fallen als prominentere Targets auf. Die Behandlung mit MCD hat zwei Effekte, die modifizierten Proteine sind allesamt in der 4°C -Fraktion zu finden, und es werden offenbar neue zusätz-

liche Proteine modifiziert und andere, vorher prominente Targets werden nicht mehr oder schwächer ADP-ribosyliert, vergleiche **Abb. 45B** Spuren 1 und 4. Alles in allem werden die Proteine insgesamt nach MCD-Behandlung weniger stark modifiziert und das Spektrum der Zielproteine ist diffuser.

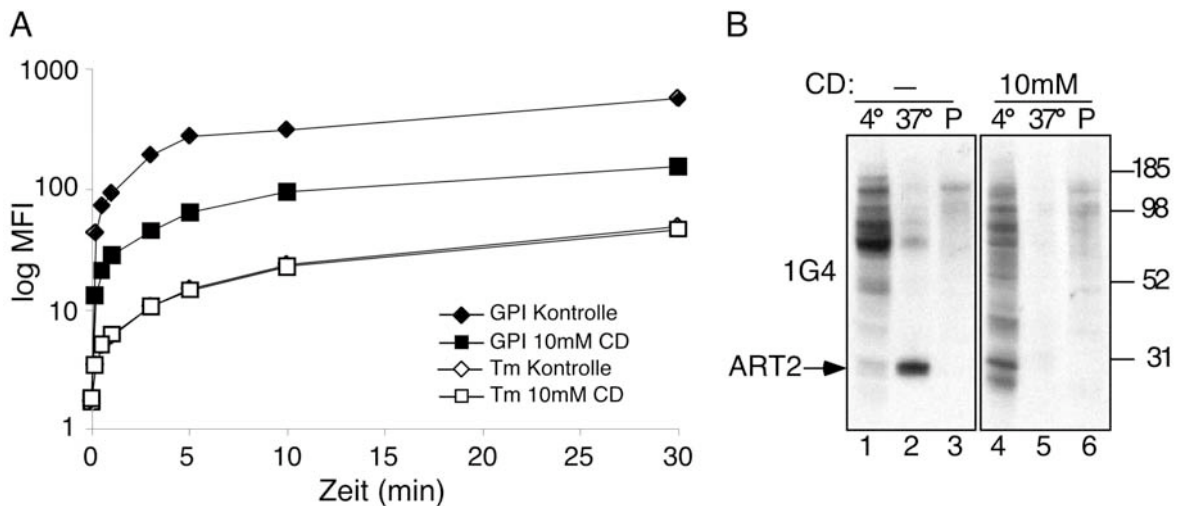


Abb. 45: Einfluss von β -MCD auf die Aktivität und Spezifität von ART2.2. (A) Stabil mit ART2.2-GPI oder ART2.2-Tm transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 60 Minuten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 mM β -MCD inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M eNAD inkubiert. Die Zelloberflächen Protein-ADP-Ribosylierung wurde im FACS mit dem Alexa-488-konjugierten mAb 1G4 analysiert. (B) Stabil mit ART2.2-GPI transfizierte DC27.10 Zellen wurden für 60 Minuten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 mM β -MCD inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für 10 Minuten mit 1 μ M eNAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in zwei Schritten mit 1% TX-100 lysiert und die Lysate wie in **Abb. 40** im Immunoblot analysiert. eADP-ribosylierte Proteine wurden mit dem 1G4-Antikörper und einem PO-konjugierten anti-Maus Sekundär-Antikörper detektiert. Gebundener Antikörper wurde mit dem ECL-System detektiert. Auto-ADP-ribosylierte ART2.2 ist gekennzeichnet.

Weiterhin wird deutlich, dass die ART2.2 selbst ein Zielprotein ist, es findet offenbar eine Auto-ADP-Ribosylierung statt: Die prominente 29 kD große Bande in Spur 2 (**Abb. 45B**) entspricht der GPI-verankerten ART2.2 im 37°-Lysat. Immunpräzipitations-Analysen haben gezeigt, dass es sich bei dieser Bande um etheno-ADP-ribosylierte ART2.2 handelt (nicht gezeigt). Diese Bande ist nicht im 37°-Lysat MCD behandelter Zellen zu sehen, vielmehr findet man eine schwächere Bande auf gleicher Höhe im 4°C-Lysat, vergleiche Spuren 1, 2 und Spuren 4, 5. Offenbar führt die MCD-Behandlung zu einer höheren Löslichkeit der ART2.2 (siehe auch **Abb. 44**) und einer schwächeren Auto-Modifikation. Dies deutet auf eine trans-ADP-Ribosylierung der ART2.2-GPI hin, die in intakten Rafts stattfindet, aber nicht nach deren Zerstörung durch MCD.

4.3.7 Membran-Assoziation beeinflusst die Spezifität der ART2.2

Um die bisherigen Ergebnisse zu vervollständigen wurden vergleichende Untersuchungen an untransfizierten, ART2.2-GPI und ART2.2-Tm transfizierten DC27.10 Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen einmal mit niedrigen (1 μ M) Konzentrationen (**Abb. 46A**) und einmal mit hohen Dosen (50 μ M) (**Abb. 46B**) eNAD inkubiert.

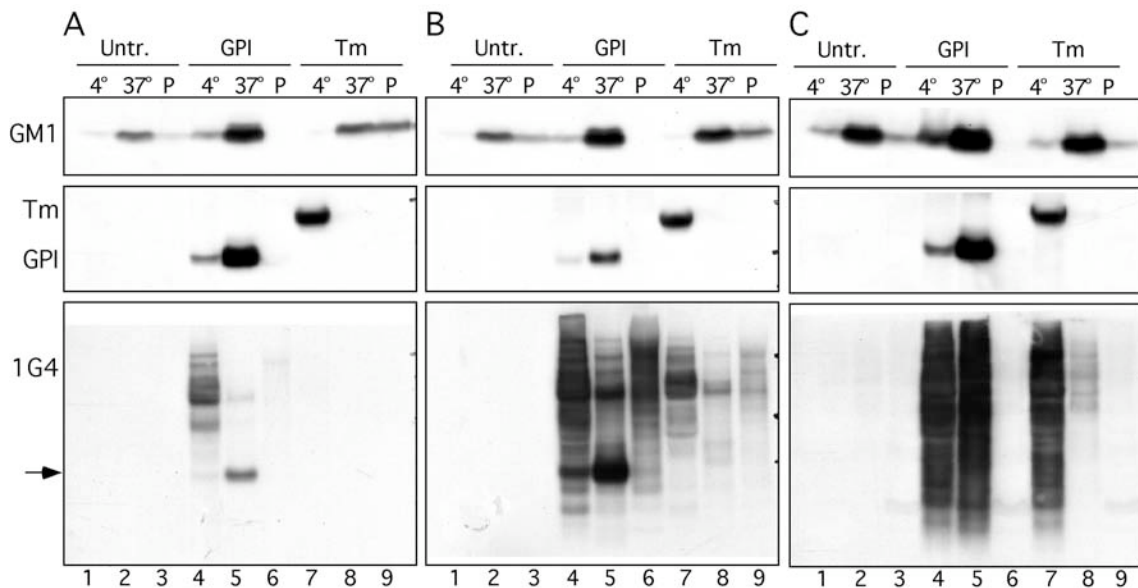


Abb. 46: Membrankompartimentalisierung schränkt das Zielprotein-Spektrum der ART2.2 ein. (A, B) Untransfizierte (Untr.), ART2.2-GPI (GPI) und ART2.2-Tm (Tm) transfizierten DC27.10 Zellen wurden für 10 min in der Gegenwart von 1 μ M (A) bzw. 50 μ M eNAD (B) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und dann in zwei Schritten mit 1% TX-100 lysiert wie in **Abb. 40**. TX-100 resistente Pellets wurden in 2% SDS mittels Ultraschall solubilisiert. Die Proteine der Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion wurde wie in **Abb. 45** durchgeführt. (C) Die Zellen wurden wie in Panel A in TX-100 und SDS lysiert. Dann wurden die einzelnen Lysate für 10 Minuten mit 1 μ M eNAD inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Aceton gestoppt und die Proteine wurden im Immunoblot wie in Panel A analysiert. Auto-ADP-ribosylierte ART2.2-GPI ist mit einem Pfeil markiert.

Um das TX-100 Solubilisierungs-Verhalten beobachten zu können wurden die Zellen anschließend dem 2-Schritt-Lyse-Protokoll zugeführt. Die Kontroll-Proteinfärbung (nicht gezeigt) und die Immunoblot-Analyse mit CT (GM1) und M2 (Tm, GPI) zeigt dass die Typ-1 Membranproteine in den 4°C-Lysaten und GM1 und GPI-verankerte Proteine in den 37°C-Lysaten zu finden sind. Nukleäre Proteine, wie Histone wurden in dem TX-100 resistenten Pellet (P) identifiziert. Im Einklang mit den FACS-Analysen die in **Abb. 43** dargestellt sind, zeigt das GPI-verankerte Enzym wieder eine effizientere ADP-Ribosylierung der Zielproteine als die transmembran-verankerte Variante. Es ist zu Beachten, dass die bei

ART2.2-GPI auftretende Auto-ADP-Ribosylierung (**Abb. 46A, B**, Spur 5, siehe auch Pfeil) bei der ART2.2-Tm wenig, wenn überhaupt zu beobachten ist (**Abb. 46A, B**, Spur 7).

Untransfizierte Zellen zeigen selbst bei Einsatz von 50 μM eNAD (**Abb. 46B**, Spuren 1-3) keine Protein-Markierung, dies bestätigt die FACS-Untersuchungen die in **Abb. 42** dargestellt sind: Die ADP-Ribosylierung setzt die Expression der ART2.2 voraus.

Der Vergleich der Muster der modifizierten Proteine bei 1 μM und 50 μM eNAD zeigt, dass sich bei dem Einsatz von hohen eNAD Konzentrationen das Spektrum der modifizierten Proteine erheblich erweitert (vergleiche **Abb. 46A** und **B**). Auffällig ist außerdem, dass bei diesen Bedingungen Proteine modifiziert werden, die sich in der TX-100 resistenten Fraktion (P) befinden (**Abb. 46B**, Spuren 6 und 9).

Um zu Überprüfen inwieweit das Target-Spektrum von der Assoziation mit der Zellmembran abhängt wurde die ADP-Ribosylierung von intakten Zellen mit der von lysierten Zellen verglichen (**Abb. 46C**). Die Zellen wurden in diesem Falle erst der 2-Schritt-Lyse zugeführt und die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit 1 μM eNAD inkubiert. Das Ergebnis ist in **Abb. 46C** zu sehen: Die Aktivität der ART2.2-GPI und ART2.2-Tm ist um das fünfzigfache erhöht, und es werden offenbar selbst bei dieser niedrigen eNAD Konzentration wahllos Proteine aller Art ADP-ribosyliert, (vergleiche Panel A und C in **Abb. 46**). Dies zeigt, dass die Membran-Assoziation die ART2.2 auf bestimmte Zielprotein fokussiert.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Mechanismen, über die ART2.2 zur Feinsteuerung des Immunsystems beiträgt, weiter aufklären. Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie neue Zielproteine der ART2.2 identifiziert. Für das bekannte ART2.2-Zielprotein P2X7 wurden die Arginine 125 und 133 als Ziele der ADP-Ribosylierung ermittelt, und nachgewiesen, dass allein die Modifizierung von R125 zur Aktivierung des P2X7 führt. Im zweiten Abschnitt wurde mit Hilfe erfolgreich generierter ART2.2-überexprimierender transgener Mäuse gezeigt, dass Zellen NAD in ausreichenden Mengen freisetzen können, um die ART2.2-katalysierte Aktivierung von P2X7 auszulösen. Interessanterweise führt dies zum Shedding von enzymatisch aktiver ART2.2. Im dritten Abschnitt wurde ein Zellkulturmodell etabliert, bei dem der natürliche GPI-Anker der ART2.2 mit einer Transmembran-Domäne ausgetauscht worden war. Mit diesem Modell wurde nachgewiesen, dass die Aktivität und Spezifität der ART2.2 durch ihre Assoziation mit Lipid Rafts bestimmt wird. In der folgenden Diskussion der Ergebnisse wird diese Gliederung beibehalten.

5.1 Nachweis und Charakterisierung von ART2.2-Zielproteinen

Die Versuche in diesem Kapitel geben einen Einblick über ADP-Ribosyltransferasen und über Mechanismen zum Nachweis ihrer Aktivität. Für die von murinen T Zellen exprimierte ADP-Ribosyltransferase ART2.2 wurden neue Targetproteine identifiziert und eines der bereits bekannten Zielproteine, der P2X7-Purinozeptor, genauer untersucht.

Für drei humane und fünf murine ADP-Ribosyltransferasen waren in unserem Labor bereits stabil transfizierte DC27.10-Lymphomzellen etabliert worden (**Abb. 10**) (Koch-Nolte et al., 2005). Die vorhergesagte Membran-Verankerung dieser ARTs über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) wurde durch die Spaltung der ARTs von ihrer Membranverankerung mit dem GPI-spezifischen Enzym PI-PLC bestätigt (**Abb. 10, 11**). Unter Verwendung des 1G4-Antikörpers und eNAD als Substrat wurde die Aktivität der ADP-Ribosyltransferasen auf der Zelloberfläche untersucht (**Abb. 11**). Die Ergebnisse bestätigen eine promiskuitive ART-Aktivität von mART1, hART1, mART2.1 und mART2.2. Diese

ARTs zeigten ein ähnliches Spektrum an modifizierten Zielproteinen (**Abb. 11**). Eine prominente zusätzliche ADP-ribosylierte Bande auf Höhe der jeweiligen ART deutet auf eine Auto-Modifikation der entsprechenden ART. mART3 zeigte neben einer Automodifikation keine weiteren Targetproteine. Drei weitere ARTs (hART3, mART4 und hART4) zeigten keine detektierbare ART-Aktivität auf den transfizierten Lymphomzellen. Mögliche Erklärungen für die fehlende Aktivität dieser ARTs in diesem System könnten sein: 1) das Fehlen von relevanten Targetproteinen auf diesen Zellen, 2) das Fehlen eines für die Aktivierung der ARTs benötigten Ko-Faktors oder 3) ein Verlust der ART-Aktivität aufgrund von Mutationen im aktiven Zentrum (Glowacki et al., 2002).

Für die ART2.2 gelang durch Verwendung von ^{32}P -NAD bei DC27.10-Transfektanten, Yac-1-Lymphomzellen und primären T Zellen der Nachweis der ADP-Ribosylierung der bekannten Zielproteine LFA1, P2X7 und des p80 (**Abb. 12**) (Koestner, 2007; Nemoto et al., 1996b; Seman et al., 2003a). Unterschiede in der Gesamtaktivität sind am ehesten durch Unterschiede im Expressionsniveau der ART2.2 zu erklären (Koch-Nolte et al., 1999), Unterschiede in der relativen Modifikation der drei untersuchten Zielproteine durch Unterschiede in dem jeweiligen Expressionsniveau dieser Zielproteine und/oder in ihrer unterschiedlichen Assoziation mit Lipid Rafts (Bannas et al., 2005) (s.u.).

Die Untersuchungen von T Zellen mit ^{32}P -NAD oder eNAD hatten ein breites Spektrum an weiteren ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteinen gezeigt (**Abb. 11, 12**). Um neben den bereits bekannten Zielproteinen (CD8, CD11a, CD18, CD27, CD43, CD44, CD45, P2X7, ART2.2) (Okamoto et al., 1998a) (Nemoto et al., 1996b; Seman et al., 2003a) weitere zu identifizieren, wurden Lymphomzellen mit eNAD inkubiert, lysiert und aus dem Zelllysate die eADP-ribosylierten Proteine mit Hilfe des 1G4 Antikörpers aufgereinigt (**Abb. 15**). Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Trypsinverdau durch MALDI-TOF- und LC-MS/MS-Analysen analysiert. Die Ergebnisse der Datenbank Recherchen (**Abb. 16-18**) zeigten sowohl bereits bekannte als auch bisher nicht als ART Targets bekannte Proteine. Sämtliche Proteine, für die Antikörper verfügbar waren, wurden nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P -NAD mittels Immunpräzipitation und SDS-PAGE Autoradiographie als ART2.2 Targets überprüft (**Abb. 20**). Dabei konnten folgende bekannte Zielproteine bestätigt werden: CD11a, CD18, CD44, CD45 und ART2.2. Lediglich CD43 konnte nicht als ART2.2 Target bestätigt werden (Okamoto et al., 1998a). Dies könnte an einer zu schwachen ADP-Ribosylierung auf der verwendeten Zelllinie oder aber einer inef-

fizienten Immunpräzipitation durch den verwendeten Antikörper bedingt sein. Ferner wurden folgende neue ART2.2-Targets bestätigt: CD31, CD98, CD100, CD205 und CD229. Interessanterweise handelt es sich bei diesen Proteinen ausschließlich um Zell-Adhäsionsmoleküle bzw. Zell-Zell-Interaktionsmoleküle. Folgende massenspektrometrisch identifizierten Proteine in diesem System nicht als ART Target bestätigt werden: CD30, CD49f, CD51, CD71 und CD90. Es könnte sich bei diesen um tatsächlich nicht ADP-ribosylierte Proteine handeln, die aufgrund einer Assoziation mit etheno-ADP-ribosylierten Proteinen ko-aufgereinigt wurden, oder aber um ART-Targets, die mit den verwendeten Antikörpern ineffizient immunpräzipitiert worden waren. Insgesamt konnten also von 13 ausgewählten, per MALDI-TOF und LC-MS/MS identifizierten Proteinen acht als ART2.2-Zielproteine bestätigt werden. Diese Ergebnisse untermauern die Eignung des eNAD-1G4-Assays in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen zur Identifizierung von ART2.2 Targetproteinen. Die identifizierten Proteine sind interessante Kandidaten für weiterführende funktionelle Untersuchungen.

Ein bekanntes Target Protein, der P2X7 Purinozeptor, wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Die Aktivierung von P2X7 durch ATP oder durch ADP-Ribosylierung führt zum Zelltod. Bisher war jedoch nicht bekannt, ob P2X7 direkt durch ADP-Ribosylierung oder aber durch ADP-ribosylierte Nachbarproteine aktiviert wird (Scheuplein et al., 2003b; Seman et al., 2003a); (Kawamura et al., 2005). Um diese Frage zu klären, sollte im P2X7-Rezeptor das Target-Arginin für die ADP-Ribosylierung identifiziert werden. Dazu wurden durch zielgerichtete Mutagenese Arginin-Reste im extrazellulären Teil des P2X7 gegen Lysin-Reste ausgetauscht und diese Mutanten hinsichtlich ihrer ADP-Ribosylierbarkeit nach Ko-Transfektion mit ART2.2 in HEK Zellen untersucht (**Abb. 21B**).

Die Ergebnisse zeigen, dass zwei Arginin-Reste, R125 und R133, in einer Cystein-reichen Region des P2X7 durch ART2.2 ADP-ribosyliert werden können (**Abb. 22**). Das konservierte R125 dient auch bei P2X7 aus Ratte und Mensch als Target (Ergebnisse nicht gezeigt). Der andere Arginin-Rest, R133, dient bei P2X7 aus Maus und Mensch als Target (nicht gezeigt), während P2X7 der Ratte an dieser Position ein nicht-ADP-ribosylierbares Glutamin (Q133) enthält. Die Mutation beider Arginine an den Positionen R125 und R133 führt zu einem vollständigen Verlust der ADP-Ribosylierung bei Maus-P2X7 (**Abb. 22**) und bei human-P2X7 (nicht gezeigt). Interessanterweise werden die direkt benachbarten

Arginine an den Positionen R124 und R134 im Maus P2X7 nicht von ART2.2 modifiziert (**Abb. 22**).

Im Weiteren sollte die Rolle der Target Arginine R125 und R133 im Maus-P2X7 bei der Aktivierung des Purinozeptors durch NAD und ATP in transfizierten HEK Zellen untersucht werden. Hierfür wurden die Mutationen R125K und R133K, einzeln oder kombiniert, in den R276K-„Super“-P2X7 eingebracht (**Abb. 23-25, 48A**), da dieser im Vergleich zu Wildtyp P2X7 im HEK-Zellsystem empfindlicher gegenüber der Aktivierung durch ATP und ADP-Ribosylierung ist. Wildtyp P2X7 und die Defekt-Mutante R294K wurden vergleichend mit untersucht.

Die Aktivierung des P2X7 führt auf T Zellen zu Calciumflux und in Folge zum Flashen von Phosphatidylserin (PS) und zur Porenformation in der Zellmembran (Seman et al., 2003a). Die Ergebnisse der Untersuchungen zum PS-Flashen und Porenformation nach Inkubation von ART2.2/P2X7 ko-transfizierten HEK Zellen mit NAD oder ATP (**Abb. 23**) zeigen, dass der Wildtyp nur schwach, die R294K-Mutante gar nicht auf diese Substrate reagierte. Die vier R276K-„Super“-Konstrukte reagierten stark auf ATP, was zeigt, dass weder der Austausch des Arginins R125 noch der des R133 zu Lysin die Ligandenbindung beeinträchtigt. Im Gegensatz hierzu unterschieden sich diese Mutanten auffällig in ihrer Reaktion auf NAD: einerseits reagierte die R133K Mutante unvermindert stark auf NAD, wohingegen die R125K Einzelmutante und die R125K+R133K Doppelmutante keinerlei Reaktion auf NAD zeigten (**Abb. 47B**). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die ADP-Ribosylierung an Position R125 notwendig und ausreichend für die Aktivierung des P2X7 Rezeptors durch gebundene ADP-Ribose ist. Gleichzeitig schließen diese Ergebnisse die von der AG Dennert formulierte Alternativhypothese aus, der zufolge P2X7 durch benachbarte ADP-ribosylierte Zielproteine aktiviert wird (Kawamura et al., 2005).

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass Zellen, die mit ART2.2 und bestimmten Super-P2X7 Konstrukten ko-transfiziert worden waren, auch ohne Zugabe von exogenem NAD oder ATP Zeichen einer "spontanen" P2X7 Aktivierung (YO-PRO/AnnexinV Anfärbungen) aufwiesen (**Abb. 23**). Interessanterweise waren dabei alle mit ART2.2 ko-transfizierten Super-P2X7 Konstrukte "spontan" aktiviert, mit Ausnahme derjenigen Konstrukte, bei denen Arginin an Position 125 ausgetauscht war. Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten durch die Annahme erklären, dass Zellen endogenes NAD als Substrat für die ART2.2 freisetzen, und diese P2X7 über die ADP-Ribosylierung "spontan"

Die Schlussfolgerung, dass transfizierte HEK-Zellen NAD freisetzen, wird ferner durch Untersuchungen zur Zelloberflächen-Expression von ART2.2 und P2X7 unterstützt (**Abb. 24**). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von P2X7 durch exogenes ATP oder NAD zu einer deutlichen Verminderung der Zelloberflächenexpression von ART2.2 und P2X7 führt. Zudem zeigen dieselben Zellen, die eine "spontane" Anfärbung mit YO-PRO und AnnexinV zeigten, eine "spontane" Verminderung von ART2.2 und P2X7 auf der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse lassen sich wiederum am ehesten durch die Annahme erklären, dass Zellen endogenes NAD als Substrat für die ART2.2 freisetzen und die durch ADP-Ribosylierung ausgelöste "spontane" Aktivierung des Super-P2X7 die Abstoßung und/oder Endozytose von ART2.2 und Super-P2X7 auslöst. Im Einklang mit dieser Schlussfolgerung ist die Beobachtung, dass alle der mit ART2.2 und P2X7 WT Konstrukten ko-transfizierten Zellen normale Expressionsniveaus von ART2.2 und P2X7 zeigen (**Abb. 25**), da WT-P2X7 im Gegensatz zum Super-P2X7 in diesem System nicht durch ADP-Ribosylierung aktiviert werden kann. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den im folgenden Kapitel diskutierten, an transgen ART2.2 überexprimierenden T-Zellen erhobenen Untersuchungen (**Abb. 34, 36**). Bei ART2.2-exprimierenden Zellen sind Zellmembranproteine offensichtlich zu einem Teil bereits vor-ADP-ribosyliert - vermutlich aufgrund von NAD, das von Zellen bei der Ernte freigesetzt wird. Im Falle von ART2.2-P2X7 ko-exprimierenden Zellen führt dies zur Aktivierung des P2X7-Rezeptors und zum Shedding der ART2.2.

Die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen tragen zur Aufklärung des Aktivierungs-Mechanismus des P2X7 bei. Sie unterstützen die Hypothese, dass die kovalent an R125 gebundene ADP-Ribose als Agonist in der Liganden-Bindungstasche des P2X7 wirkt (**Abb. 48C**). Die Mutation dieses Arginins zu Lysin verhindert die ADP-Ribosylierung an dieser Position. Diese R125K Mutante lässt sich unvermindert durch ATP aktivieren (**Abb. 48B**), kann aber weder durch ADP-Ribosylierung an R133 noch durch ADP-Ribose-Gruppen an anderen Proteinen aktiviert werden. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Nagel für den Sarg der Theorie der AG Dennert über ein zweites, bisher unbekanntes ADP-ribosyliertes Protein, das zur Aktivierung des P2X7 führen sollte (Kawamura et al., 2005). Auch eine dritte Hypothese, dass die ADP-Ribosylierung direkt eine Änderung der Konformation auslöst, ist unwahrscheinlich, da P2X7 zwar durch ART2.2 etheno-ADP-ribosyliert wird, dieses aber nicht zur Aktivierung führt (Seman et al., 2003a) (**Abb. 48D**).

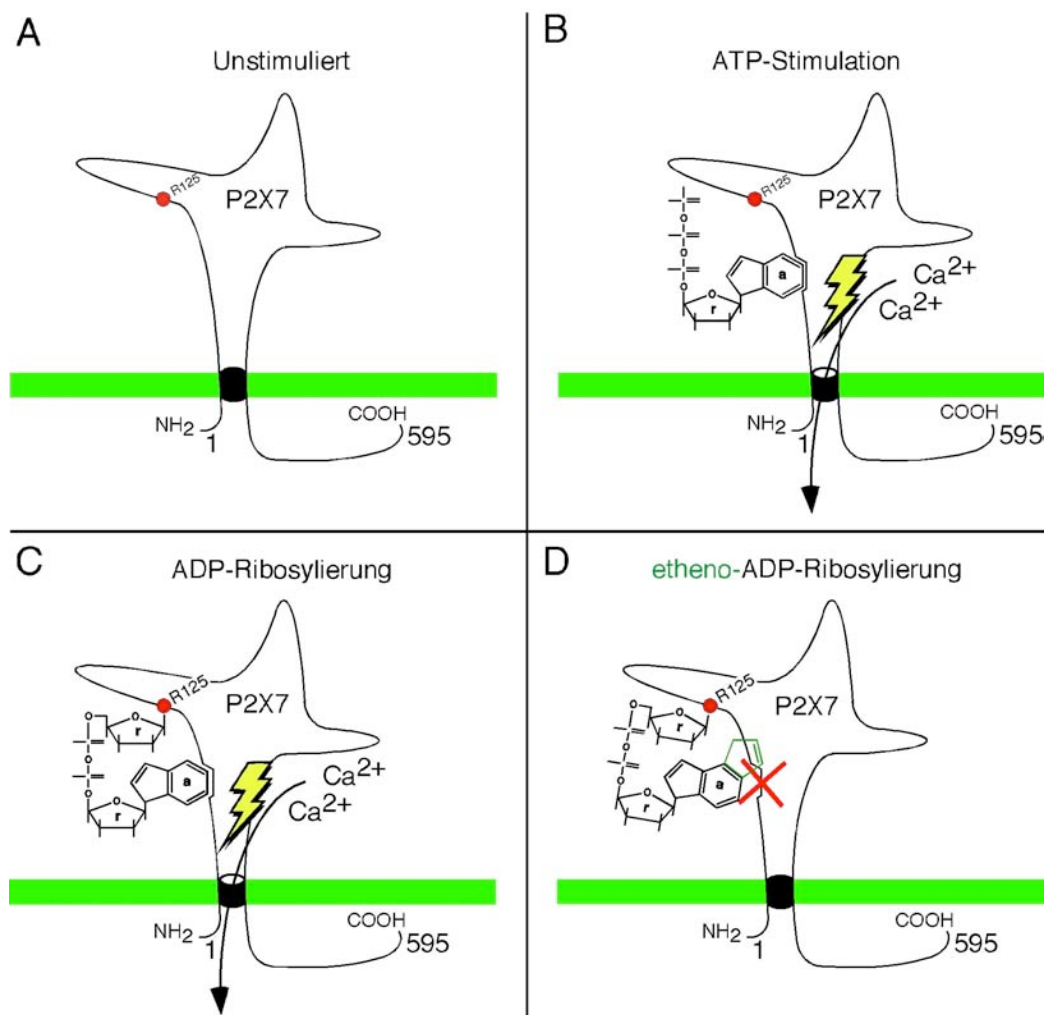


Abb. 48: Schematische Darstellung der Aktivierungsmöglichkeiten des P2X7. (A) Der Purinozeptor im unstimulierten Zustand. (B) Durch Bindung des löslichen Liganden ATP öffnet sich der Rezeptor zu einem Ionenkanal und es kommt zum Calciumflux. (C) Nach Inkubation mit NAD kommt es auf Zellen, die ART2.2 ko-exprimieren, zur ADP-Ribosylierung des P2X7 an Arginin 125 und R133. Die ADP-Ribosylierung an Arginin 125 führt zur dauerhaften Stimulation des Rezeptors und zum Calciumflux. (D) Die Inkubation mit etheno-NAD führt zur (etheno)ADP-Ribosylierung des Rezeptors an Arginin R125, dies führt aber nicht zur Aktivierung des P2X7, da die etheno-Adenosin-Gruppe nicht in die Liganden-Bindungstasche passt.

Einen Vergleich der Strukturformeln von ATP, NAD und etheno-NAD zeigt **Abb. 49**. Eine nahe liegende Erklärung für die Aktivierung des P2X7 durch ADP-Ribosylierung ist die dem ATP und der ADP-Ribose gemeinsame ADP-Gruppe. Die gebundene ADP-Ribose unterscheidet sich von ATP nur dadurch, dass die γ -Phosphat-Gruppe durch Ribose ersetzt ist. Die Aktivierung des P2X7 durch ADP-Ribosylierung könnte zur kovalenten Bindung eines Liganden in der Nähe der ATP-Bindungsstelle führen. Dabei könnte die ADP-Gruppe mit den gleichen Aminosäure-Resten in der Ligandenbindungs-Tasche binden wie die ADP-Gruppe des ATP (**Abb. 48B, C**). Hierbei ist wichtig festzustellen, dass nur eine kovalent gebundene ADP-Ribosegruppe den P2X7-Rezeptor zu aktivieren vermag, lösliche

ADP-Ribose führt ebenso wenig wie lösliches ADP zur Aktivierung (Seman et al., 2003a). Die Tatsache das etheno-ADP-Ribosylierung nicht zur Aktivierung des Rezeptors führt und ferner die Aktivierung durch NAD, nicht aber die durch ATP blockiert (Seman et al., 2003a), ist am ehesten durch den zusätzlichen Etheno-Ring des eNAD (**Abb. 49**) bedingt: die dem ATP und ADP-Ribose gemeinsame Adenosin-Gruppe ist modifiziert und passt folglich nicht in die Liganden-Bindungstasche und kann deshalb nicht zur Aktivierung von P2X7 führen (**Abb. 48D**).

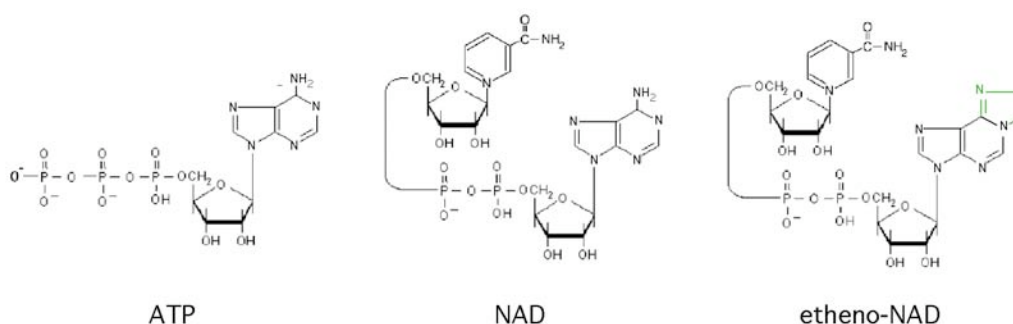


Abb. 49: Strukturformeln von ATP, NAD und etheno-NAD. ATP ist ein Agonist für den P2X7 Purinozeptor. NAD und 6'-etheno-NAD dienen beide als Substrat für ADP-Ribosyltransferasen. Sowohl NAD als auch etheno-NAD können den P2X7-Purinozeptor markieren, allerdings führt nur die ADP-Ribosylierung durch NAD zur Aktivierung. Allen Strukturen gemeinsam ist die ADP-Ribosegruppe, allerdings ist diese beim etheno-NAD mit einem zusätzlichen Ring (grün dargestellt) versehen.

Die freie Bindungstasche am etheno-ADP-ribosylierten P2X7 kann weiterhin durch ATP besetzt werden, nicht aber durch ADP-Ribose, da das Target Arginin bereits etheno-ADP-ribosyliert ist. Die fehlende Aktivierung des P2X7 durch ADP-Ribosylierung an R133 ist erklärbar durch die Annahme, dass die ADP-Ribosegruppe an dieser Stelle außer Reichweite der Ligandenbindungs-Tasche positioniert ist.

Schließlich unterstützen die hier vorgestellten Ergebnisse die Hypothese, dass die Ligandenbindung durch zwei benachbarte P2X Rezeptoren im homo-trimeren Rezeptorkomplex erfolgt (Jiang et al., 2003; Vial et al., 2004). Die AG Hume konnte kürzlich zeigen, dass die zu R125 homologe Aminosäure im P2X1, H120, an der Interaktionsfläche zwischen zwei benachbarten Rezeptoren liegt (Nagaya et al., 2005). Die Substitution von H120 und H230 durch Cysteine führte zur Ausprägung einer Disulfidbrücke zwischen benachbarten P2X1 Molekülen. Folglich ist anzunehmen, dass auch R125 an der Interaktionsfläche zwischen benachbarten P2X7 Molekülen liegt. Damit eröffnet sich die interessante Hypothese, dass die an R125 gebundenen ADP-Ribosegruppe in die aus zwei benachbarten P2X7

Molekülen geformte Liganden-Bindungstasche passt und dass der trimere Rezeptorkomplex durch drei solche ADP-Ribosegruppen aktiviert wird.

5.2 Charakterisierung ART2.2 transgener Mäuse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse von Untersuchungen zur Generierung und Charakterisierung ART2.2-transgener Mäuse diskutiert, die für vergleichende Versuche mit Wildtyp- und bereits etablierten ART2-KO-Mäusen eingesetzt wurden (Ohlrogge et al., 2002a). Die erhaltenen transgen ART2.2-exprimierenden Tiere wurden mit den bereits vorhandenen ART2-KO Tieren rückgekreuzt, um Mäuse zu erhalten, die nur die transgene ART2.2 exprimieren (**Abb. 28**). ART2.2 transgene Tiere waren vital und fertil und zeigten eine weit gehend normale Entwicklung der Lymphozyten Subpopulationen (**Abb. 29**). Expressionsanalysen zeigten, dass die gewählte Steuerung des Transgens über den H-2Kb-Promotor und den IgH-Enhancer (**Abb. 26**) zu einer starken Überexpression der ART2.2 auf T Zellen führt. Darüber hinaus zeigten ART2.2 transgene Tiere im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren eine ART2.2-Expression auf Thymus Lymphozyten (**Abb. 30**).

Interessanterweise reagierten T Zellen der ART2.2-transgenen Mäuse deutlich empfindlicher als T-Zellen von Wildtyp Mäusen auf die Behandlung mit exogenem NAD. Vorherige Studien hatten gezeigt, dass die Behandlung von murinen T Zellen mit NAD wichtige T Zell-Funktionen supprimiert und dass diese Effekte durch die ART2.2 katalysiert werden (Adriouch et al., 2001; Ohlrogge et al., 2002a; Okamoto et al., 1998a; Seman et al., 2003a; Wang et al., 1996). Diese supprimierenden Effekte auf T Zell-Funktionen durch exogenes NAD werden offenbar durch Aktivierung des P2X7-Purinozeptors ausgelöst. Die hier erhobenen Ergebnisse an ART2.2-überexprimierenden Zellen stützen diese Theorie. So wurden bekannte Folgen der P2X7-Aktivierung, wie das Flashen von Phosphatidylserin (PS), die Aufnahme von Propidiumjodid (PI), und das Shedding von CD62L bei ART2.2-transgenen T-Zellen schon bei wesentlich niedrigeren NAD-Konzentrationen ausgelöst als bei Wildtyp T-Zellen. Hingegen konnten selbst hohe NAD-Konzentrationen keine dieser Reaktionen bei ART2-defizienten Zellen auslösen (**Abb. 32-35**). Bei Untersuchungen der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierungs-Aktivität zeigten ART2.2-transgene Zellen eine deutlich stärkere Inkorporation von etheno-ADP-Ribose in Zelloberflächenproteine als

Wildtyp Zellen, wohingegen ART2-KO Zellen keine messbare Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung zeigten (**Abb. 31**).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützen ferner die schon an transfizierten HEK Zellen erhobene Hypothese (**Abb. 25**) einer „spontanen“ Aktivierung von P2X7 durch ART2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung nach Freisetzung von NAD während der Präparation von Zellen. So wurden bei T-Zellen aus ART2.2-transgenen Tieren, verstärkt "spontanes" PS-Flashing, PI-Aufnahme und CD62L-Shedding beobachtet (**Abb. 34-36**). Diese Phänomene benötigten die Ko-Expression von P2X7 und ART2.2: Sie konnten durch den P2X7 Antagonisten KN62 blockiert werden (nicht gezeigt) und waren bei ART2-KO Zellen nicht zu beobachten (**Abb. 34-36**). Die Tatsache, dass bei ART2-KO-Zellen keine „spontane“ Aktivierung des P2X7 nachweisbar ist, zeigt, dass NAD (über ADP-Ribosylierung) und nicht ATP für die spontane Aktivierung des P2X7 verantwortlich ist.

Eine mögliche Quelle des NAD ist die Freisetzung aus Zellen bei deren Präparation aus lymphatischen Organen. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Untersuchungen zum CD62L Shedding unterstützt: Zellen, die konsequent bei 4°C präpariert wurden, zeigten unverändert CD62L auf der Zelloberfläche. Erst die folgende Weiterinkubation der Zellen bei 37°C führte zum Verlust des CD62L von der Zelloberfläche (**Abb. 34**). Da die ADP-Ribosylierung effizient sowohl bei 4°C wie bei 37°C stattfindet und das Shedding von CD62L nur bei 37°C erfolgt und irreversibel ist (**Abb. 31**), kann die ADP-Ribosylierung des P2X7 nicht schon vor der Zellpräparation *in vivo* bei 37°C erfolgt sein, da sonst CD62L bereits vor der Zellpräparation hätte abgestoßen werden müssen. P2X7 wird also offensichtlich erst während der Präparation durch ART2.2 ADP-ribosyliert, am wahrscheinlichsten in Folge von NAD-Freisetzung aus Zellen während der Präparation.

Die Dosis-Wirkungs-Analysen mit exogen zugegebenem NAD (**Abb. 35**) lassen eine ungefähre Bestimmung der bei der Präparation wirksamen lokalen NAD-Konzentration zu. Die Dosis-Wirkungskurven von ART2.2-transgenen, und Wildtyp Zellen lassen sich durch Verlängerung der X-Achse extrapolieren (**Abb. 35**). Die aus den Kurven abgeleiteten EC50 Werte betragen für ART2.2 transgene Zellen ca. 1 µM NAD und für Wildtyp Zellen ca. 3 µM. Die wirksame NAD Konzentration sollte bei korrekter Extrapolation dem Abstand zur Y-Achse entsprechen und liegt bei ca. 1.5 µM. Diese Schlussfolgerung wird durch das relative Maß des "spontanen" PS-Flashings und CD62L-Sheddings unterstützt: >50% der

maximalen Reaktionswerte bei ART2-transgenen und <50% der maximalen Reaktionswerte bei WT Zellen.

Die Dosis-Wirkungs-Analysen mit ATP bestätigten einerseits frühere Beobachtungen (Seman et al., 2003a), dass wesentlich höhere Konzentrationen ATP als NAD für eine vergleichbare Aktivierung des P2X7-Rezeptors erforderlich sind (**Abb. 35**). Die EC₅₀ Werte betrugen für ART2KO-Zellen, deren P2X7 Rezeptoren nicht vor-ADP-ribosyliert werden können, ca. 120 µM. Die EC₅₀ Werte liegen für Wildtyp und ART2-transgene Zellen etwas niedriger (ca. 90 bzw. 70 µM). Dies deutet an, dass die ADP-Ribosylierung durch endogen freigesetztes NAD einerseits selbst bereits zu einer beträchtlichen, aber submaximalen Aktivierung des P2X7 führt, und andererseits die Empfindlichkeit von P2X7 gegenüber ATP geringfügig steigert. Diese Ergebnisse sind generell für Untersuchungen mit primären T-Zellen aus Wildtyp Mäusen relevant. Es ist davon auszugehen, dass P2X7 bei diesen Zellen bereits zu einem gewissen Grad durch die Zell-Präparation bedingt aktiviert ist und die Funktion der Zellen dadurch beeinflusst wird.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass ART2.2 nach T Zell Aktivierung gesheddet wird, katalysiert durch eine Metalloprotease-vermittelte proteolytische Spaltung in Nähe ihrer C-terminalen Membranverankerung (Kahl et al., 2000a). Dass es auch nach Aktivierung des P2X7 Rezeptors zum Shedding der ART2.2 von der Oberfläche primärer T Zellen kommt, konnte an den ART2.2 überexprimierenden T Zellen der ART2.2-transgenen Tiere erstmals gezeigt werden (**Abb. 34, 36**). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit an transfizierten HEK Zellen erhoben wurden (**Abb. 24**). Das Shedding der ART2.2 ist ebenso wie das Shedding von CD62L in Folge der P2X7-Aktivierung Temperatur-abhängig und ebenfalls durch bei der Präparation freiwerdendes NAD auslösbar (**Abb. 36**).

Die von aktivierten T-Zellen freigesetzte ART2.2 ist enzymatisch aktiv (Kahl et al., 2000a). Die Frage, ob die durch P2X7-Aktivierung gesheddete ART2.2 ebenfalls enzymatisch aktiv ist, konnte durch den Nachweis der ADP-Ribosylierung von Agmatin *in vitro* mit aus dem Zellüberstand aufgereinigter ART2.2 bestätigt werden (**Abb. 32**). Durch die Modifikation von Zytokinen und anderen löslichen Proteinen oder Membran-ständigen Proteinen könnte die gesheddete ART2.2 zusätzliche immuno-regulatorische Funktion als sekretiertes interzelluläres Signalmolekül ausüben.

5.3 Assoziation der ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen

Membran-Mikrodomänen wird eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Signal-Transduktion durch die Zellmembran zugeschrieben. Verschiedene Ekto-Enzyme der Lymphozyten, wie die Alkalische Phosphatase, 5' Nukleotidase und ADP-Ribosyltransferasen sind GPI-verankert (Goding and Howard, 1998). Es wird angenommen, dass der GPI-Anker bei diesen Proteinen eine Assoziation mit Rafts vermittelt, und dadurch einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität ausübt. Durch das Ersetzen des nativen GPI-Ankers der ART2.2 mit einem klassischen Typ I Transmembran-Anker sollte diese Hypothese überprüft werden. Die transmembran verankerte ART2.2 ließ sich im Gegensatz zur ART2.2-GPI nicht durch PI-PLC von der Zellmembran lösen (**Abb. 39**). Darüber hinaus war die ART2.2-Tm, im Gegensatz zur ART2.2-GPI schon bei 4°C durch das Detergenz TX-100 solubilisierbar (**Abb. 39-41**) und zeigte bei der Dichtegradienten-Zentrifugation keine oder nur schwache Assoziation mit Membran-Mikrodomänen (**Abb. 42**). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die GPI-verankerte ART2.2 mit Lipid Rafts assoziiert ist, während die ART2.2-Tm nicht mit diesen assoziiert ist und in einem anderen Bereich der Zellmembran lokalisiert ist.

Die Resistenz der ART2.2-GPI und des Raft-Markers GM1 gegenüber der Detergenz-Solubilisierung bei niedrigen Temperaturen ist im Einklang mit früheren Untersuchungen (Cain et al., 1995; Filatov et al., 2003; Thiele et al., 1986b). Durch Erhöhung der Temperatur auf 37°C konnten ART2.2-GPI und GM1 mit TX-100 solubilisiert werden (**Abb. 41**). Tatsächlich ließen sich durch sequenzielle Lyse, erst bei 4°C und dann bei 37°C, die transmembran verankerten Proteine von den GPI-verankerten Proteinen und GM1 trennen (**Abb. 41**). Somit stellt die differentielle Lyse ein schnelles und bequemes Mittel dar, um eine mögliche Raft-Assoziation von Membranproteinen und Glykolipiden zu untersuchen.

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse von Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen, dass die Aktivität der ART2.2 offenbar durch laterale Segregation in der Zellmembran beeinflusst wird. Zwar konnten sowohl ART2.2-GPI als auch ART2.2-Tm Zelloberflächen-Proteine modifizieren (**Abb. 43**), allerdings erfolgte die ADP-Ribosylierung durch die GPI-verankerte ART2.2 wesentlich schneller und effizienter als die durch das transmembran verankerte Molekül (**Abb. 44**). Dies zeigte sich vor allem bei der Inkubation mit geringen eNAD Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten. Nur

bei längeren Inkubationszeiten und hohen Substrat-Konzentrationen konnte bei der transmembran verankerten ART2.2 eine effiziente Oberflächen-ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden (**Abb. 44**).

Die extrazelluläre Konzentration von NAD liegt im submikromolaren Bereich, intrazellulär herrschen Konzentration zwischen 200 und 500 μM NAD (Ziegler, 2000). Durch Lyse von Zellen, z.B. bei mechanischer Gewebeerstörung, Hypoxie oder Endzündungsprozessen, kann die lokale NAD Konzentration kurzfristig deutlich ansteigen. Darüber hinaus kann NAD durch nicht-lytische Mechanismen über Connexin-43-Hemi-Kanäle aus der Zelle freigesetzt werden (Bruzzone et al., 2001). Extrazelluläres NAD wird allerdings schnell durch ecto-NADasen und ecto-Phosphodiesterasen metabolisiert (Goding and Howard, 1998; Krebs, 2005). Daher ist anzunehmen, dass extrazelluläre NAD Konzentrationen und Expositions-Zeiten in dem Bereich liegen, in dem die GPI-verankerte ART2.2 eine mehr als zehnfach höhere Aktivität aufweist als ihr transmembran verankertes Pendant ($< 10 \mu\text{M}$ NAD, < 20 Minuten) (**Abb. 44**).

Auffälligerweise wurde das Zielprotein-Spektrum beider ARTs durch die Lösung der Enzyme aus dem Membran-Verband dramatisch erhöht (**Abb. 47**), in Einklang mit früheren Berichten über die Modifikation von nicht-physiologischen Proteinen wie Histonen, Antikörpern und freiem Arginin durch lösliche rekombinante ART2.2 (Koch-Nolte et al., 1996a). Diese Beobachtungen deuten an, dass ART2.2 durch die Membran-Verankerung auf bestimmte Targets fokussiert wird, bzw. dadurch nur bestimmte Proteine erreichbar sind. Darüber hinaus wird das Targetspektrum durch die Segregation in bestimmten Membran-Bereichen weiter eingegrenzt. Diese Interpretation wird durch die Versuche mit dem Raft zerstörenden Agens MCD untermauert. Die Behandlung der Zellen mit MCD führt zu einer deutlichen Erweiterung des Targetspektrums der GPI-verankerten ART2.2 (**Abb. 46B**).

Da viele Untersuchungen von Membran-Mikrodomänen auf biochemischen Analysen nach Detergenz-Behandlung beruhen (Shogomori and Brown, 2003), wird die Frage nach der Existenz und Größe der Lipid Rafts auf lebenden Zellen beständig diskutiert (Horejsi et al., 2004; Munro, 2003; Pike, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen leisten hierzu einen Beitrag, denn sie weisen auf die Existenz von Membran-Mikrodomänen auf lebenden Zellen hin, weil Aktivität und Spezifität der ART2.2 auf lebenden Zellen offen-

sichtlich sowohl von der Natur der Membranverankerung (**Abb. 44**) als auch von dem Cholesterol-Gehalt der Zellmembran (**Abb. 46**) abhängen.

Eine weitere hier erhobene Beobachtung weist auf die Existenz der Rafts in lebenden Zellen hin und lässt darüber hinaus den Schluss zu, dass Rafts eine minimale Größe besitzen: Auf lebenden Zellen stellte die ART2.2-GPI nicht aber die ART2.2-Tm selbst ein prominentes ADP-Ribosylierungs-Ziel dar. Diese trans-ADP-Ribosylierung der ART2-GPI war nach Zerstörung der Lipid Rafts durch MCD jedoch nicht mehr zu beobachten (**Abb. 46, 47**). Die trans-ADP-Ribosylierung der ART2.2-GPI deutet an, dass einzelne Mikrodomänen mindestens zwei oder mehr ART2.2 Moleküle beherbergen (**Abb. 50**). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Rafts als eine Art Plattform existieren, zu der bestimmte Proteine Zugang haben und von der andere Moleküle ausgeschlossen sind.

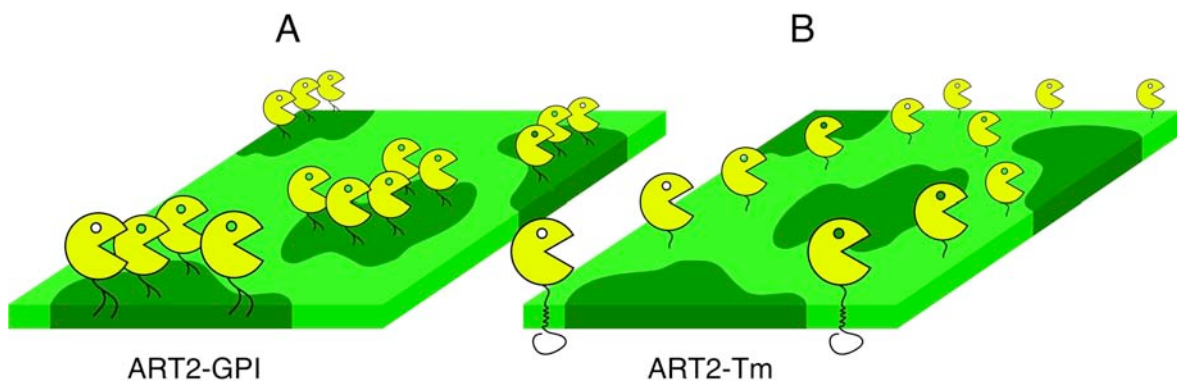


Abb. 50: Schematische Darstellung der Assoziation von ART2.2-GPI und ART2.2-Tm mit Membranmikrodomänen. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Zellmembran von mit ART2.2-GPI (**A**) bzw. ART2.2-Tm (**B**) transfizierten DC27.10 Zellen. Die Membranmikrodomänen sind dunkelgrün dargestellt und beherbergen die GPI-verankerte ART2.2 (**A**). Die transmembran-verankerte ART2.2 (**B**) ist nicht mit diesen Membranmikrodomänen assoziiert.

LFA1 und P2X7 sind bei milderer Lyse-Bedingungen resistent gegenüber der Solubilisierung bei 4°C, können aber durch die Erhöhung der Temperatur auf 37°C ebenfalls in Lyse gebracht werden, wurde die 2-Schritt-Lyse aber unter Standard Bedingungen wie in den anderen Versuchen durchgeführt, wurden LFA1 und P2X7 bereits vollständig bei 4°C solubilisiert (Bannas et al., 2005). Es stellt sich die Frage wie Untersuchungen bei denen Detergenz-Konzentrationen von unter 0,1% eingesetzt werden zu bewerten sind. Auch von dem Einsatz verschiedener Detergenzien hängen die Proteine und Lipide die mit den Membran-Mikrodomänen aufgereinigt werden ab (Man et al., 2005; Pompach et al., 2004). Die früheren Untersuchungen und die vorliegenden Ergebnisse sprechen für die Idee von so genannten „Kern-Rafts“ und „Transienten-Rafts“: In den Kern-Rafts befinden sich Li-

pide und Proteine, die sehr stark mit den Rafts assoziiert sind, wie z.B. GPI-verankerte Proteine, um diese herum befinden sich andere Lipide oder Lipid-Kompositionen mit anderen Proteinen, diese sind eher lose mit den Rafts assoziiert oder werden erst nach ihrer Aktivierung in die Membran-Mikrodomänen aufgenommen (Ilangumaran et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die GPI-verankerte ART2.2 mit Membran-Mikrodomänen assoziiert ist, diese bewirkt offenbar eine topologische Isolation des Enzyms, die es auf bestimmte Membranproteine fokussiert. Diese sind entweder ebenfalls in den Rafts enthalten oder lose mit ihnen assoziiert, es werden aber auch spezifisch Proteine ADP-ribosyliert, die nicht mit den Rafts assoziiert sind. Es ist bekannt, dass die Membran-Mikrodomänen eine große Rolle bei der T Zell-Aktivierung spielen, man geht davon aus, dass sich die mit den Mikrodomänen assoziierten Proteine zu einem großen Raft, und somit zu einer Signalplattform, zusammenlagern (Hoessli et al., 2000). Dies wurde sowohl auf der Seite der T Zelle als auch der Antigen-Präsentierenden-Zelle beobachtet. Möglich wäre, dass die ART2.2 in dieser Umgebung durch freigesetztes NAD aus Antigen-Präsentierenden-Zellen oder lysierten Zellen in einem Entzündungsgebiet aktiviert wird, und so die Funktion und Lokalisation von Raft-assoziierten Zielproteinen beeinflusst.

Perspektiven für weiterführende Untersuchungen

Das in dieser Arbeit erfolgreich zur Identifizierung von Target-Proteinen der ART2.2 auf Lymphomzellen eingesetzte Verfahren kann künftig sowohl für den Nachweis von Targets auf anderen Zellen als auch für die Identifizierung von Targetproteinen anderer ARTs (z.B. der humanen ART1) eingesetzt werden. Denkbar ist ferner, dass der anti-etheno-Adenosin 1G4-Antikörper für das in-vivo Imaging von ADP-ribosylierten Proteinen einsetzbar wäre, z.B. nach intravenöser Verabreichung von etheno-NAD und anschließender Injektion von 1G4-konjugierten paramagnetischen Partikeln.

Für die in dieser Arbeit mittels Massenspektrometrie bestätigten und neu identifizierten ART2.2-Zielproteinen stellt sich die spannende Frage, inwieweit die Funktion dieser Proteine durch die ADP-Ribosylierung beeinflusst wird. Im Falle der Adhäsionsmoleküle CD11a/CD18, CD31, CD44, CD98, CD100, CD205 und CD229 ist denkbar, dass die ADP-Ribosylierung die Liganden-Bindung hemmt oder steigert. Für einige dieser Targets ist bekannt, dass sie nach T-Zell-Aktivierung mit Lipid Rafts assoziieren bzw. in die so genannte Immunologische Synapse zwischen T-Zelle und APC lokalisieren. Da die ART2.2, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, dank ihres GPI-Ankers konstitutiv mit Lipid-Rafts-assoziert ist, stellt sich die Frage, ob die ADP-Ribosylierung der o.g. Zielproteine die Ausprägung der Immunologischen Synapse beeinflusst. Ein neues Modellsystem für diese Untersuchung stellen ART2-überexprimierende Zellen aus den in dieser Arbeit erfolgreich etablierten ART2.2-transgenen Mäusen dar. Wichtige Hinweise auf mögliche funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung könnte die Identifizierung der Ziel-aminosäuren in diesen Proteinen liefern. Ein wertvolles Werkzeug dafür bietet die in dieser Arbeit eingesetzte Methodik der zielgerichteten Mutagenese und Kotransfektion zur Identifizierung der Ziel-Aminosäuren im P2X7 Ionen Kanal.

Mit den hier etablierten ART2-transgenen Mäusen eröffnet sich die interessante Perspektive, die Rolle der ADP-Ribosylierung in vivo im Kontext des Immunsystems näher zu untersuchen, z.B. nach Herausforderung des Immun-Systems mittels Immunisierung und Infektionen.

Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M.P. and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.*, **64**, 445-475.
- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F. and Seman, M. (2001) Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J. Immunol.*, **167**, 196-203.
- Aktories, K. (1991) *ADP-ribosylating toxins*. Springer Verlag, Berlin.
- Aktories, K. and Just, I. (2000) *Bacterial Protein Toxins*. Springer Verlag, Berlin.
- Bannas, P., Adriouch, S., Kahl, S., Braasch, F., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2005) Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood*, **105**, 3663-3670.
- Baricordi, O.R., Ferrari, D., Melchiorri, L., Chiozzi, P., Hanau, S., Chiari, E., Rubini, M. and Di Virgilio, F. (1996) An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood*, Vol. 87, pp. 682-690.
- Bazan, J.F. and Koch, N.F. (1997) Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families. *Adv Exp Med Biol*, **419**, 99-107.
- Bossy-Wetzel, E. and Green, D.R. (2000) Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods. Enzymol.*, **322**, 15-18.
- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*, **19**, 375-396.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. and De Flora, A. (2001) Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb. J.*, **15**, 10-12.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, Vol. 112, pp. 195-203.
- Butcher, E., Howard, J., DeWitt, C.W., Guttmann, R.D., Kunz, H., Gill III, T.J., Cramer, D., Greiner, D.L., Lubaroff, D., Wonigeit, K. and Günther, E. (1979) Second international workshop on alloantigenic systems in the rat: combined report on reference testing of anti-T-lymphocyte alloantisera. *Transpl. Proc.*, Vol. XI, pp. 1648-1649.
- Cain, T.J., Liu, Y., Takizawa, T. and Robinson, J.M. (1995) Solubilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in quiescent and stimulated neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, **1235**, 69-78.
- Cherukuri, A., Dykstra, M. and Pierce, S.K. (2001) Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity*, **14**, 657-660.
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J. and Eisenberg, D. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, **357**, 216-222.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R.A. and Buell, G. (1997) Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology*, Vol. 36, pp. 1277-1283.

- Davis, R.E., Mysore, V., Browning, J.C., Hsieh, J.C., Lu, Q.A. and Katsikis, P.D. (1998) In situ staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue. *J Histochem Cytochem*, Vol. 46, pp. 1279-1289.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000a) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, **343**, 37-49.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000b) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, **343**, 108-117.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J.M., Venketaraman, V. and Baricordi, O.R. (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ*, Vol. 5, pp. 191-199.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G. and Baricordi, O.R. (2001a) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, **97**, 587-600.
- Domenighini, M. and Rappuoli, R. (1996) Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol Microbiol*, **21**, 667-674.
- Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M. and Bratton, D.L. (2001) Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 1071-1077.
- Ferrari, D., La Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., Idzko, M., Dichmann, S., Norgauer, J. and Di Virgilio, F. (2000) The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *Faseb J*, Vol. 14, pp. 2466-2476.
- Filatov, A.V., Shmigol, I.B., Kuzin, II, Sharonov, G.V. and Feofanov, A.V. (2003) Resistance of cellular membrane antigens to solubilization with Triton X-100 as a marker of their association with lipid rafts--analysis by flow cytometry. *J Immunol Methods*, **278**, 211-219.
- Giovane, A., Balestrieri, C., Quagliuolo, L. and Servillo, L. (1985) 1-N⁶-Etheno-ADP-ribosylation of elongation factor-2 by diphtheria toxin. *FEBS Lett*, **191**, 191-194.
- Glenney, J.R., Jr., Zokas, L. and Kamps, M.P. (1988) Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J Immunol Methods*, **109**, 277-285.
- Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kuhl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2002) The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci.*, **11**, 1657-1670.
- Goding, J.W. and Howard, M.C. (1998) Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol. Rev.*, **161**, 5-10.
- Gu, B., Bendall, L.J. and Wiley, J.S. (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, **92**, 946-951.
- Haag, F., Andresen, V., Karsten, S., Koch-Nolte, F. and Thiele, H. (1995) Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur. J. Immunol.*, Vol. 25, pp. 2355-2361.

- Haag, F., Koch, F. and Thiele, H.G. (1990) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat T-cell alloantigen RT6.1. *Nucleic Acids Res*, **18**, 1047.
- Haag, F. and Koch-Nolte, F. (1997) *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes*. Plenum Press, New York.
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Kuhl, M., Lorenzen, S. and Thiele, H.G. (1994) Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol*, Vol. 243, pp. 537-546.
- Hauschildt, S., Scheipers, P. and Bessler, W.G. (1994) Lipopolysaccharide-induced change of ADP-ribosylation of a cytosolic protein in bone-marrow derived macrophages. *Biochem. J.*, **297**, 17-20.
- Hoessli, D.C., Ilangumaran, S., Soltermann, A., Robinson, P.J., Borisch, B. and Nasir Ud, D. (2000) Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconj J*, **17**, 191-197.
- Hogan, B.B., R. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Hollmann, C., Haag, F., Schlott, M., Damaske, A., Bertuleit, H., Matthes, M., Kuhl, M., Thiele, H.G. and Koch-Nolte, F. (1996a) Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol. Immunol.*, Vol. 33, pp. 807-817.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. and Kato, I. (1968a) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, Vol. 243, pp. 3553-3555.
- Horejsi, V. (2003) The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev*, **191**, 148-164.
- Horejsi, V., Zhang, W. and Schraven, B. (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 603-616.
- Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B. and Hoessli, D.C. (1999) Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell*, **10**, 891-905.
- Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (1989) *ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and Biological Significance*. Springer Verlag, New York.
- Janeway, C., Travis, P., M., W. and M., S. (2005) *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
- Jiang, L.H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A. and North, R.A. (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci*, **23**, 8903-8910.
- Joyner, A.L. (1993) *Gene targeting. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E.H., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2000a) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J. Immunol.*, **165**, 4463-4469.
- Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Malone, K., Kaslow, H., Koch-Nolte, F., Schott, W.H., Leiter, E.H. and Dennert, G. (2005) P2X7 receptor-dependent and -

- independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol*, **174**, 1971-1979.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.*, **182**, 1777-1783.
- Koch-Nolte, F., Adriouch, S., Bannas, P., Krebs, C., Scheuplein, F., Seman, M. and Haag, F. (2006) ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Ann Med*, **38**, 188-199.
- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Ablamunits, V., Haag, F. and Leiter, E.H. (1999) A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol*, Vol. 163, pp. 6014-6022.
- Koch-Nolte, F., Glowacki, G., Bannas, P., Braasch, F., Dubberke, G., Ortolan, E., Funaro, A., Malavasi, F. and Haag, F. (2005) Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell Immunol*, **236**, 66-71.
- Koch-Nolte, F., Haag, F., Kuhl, M., van Heyningen, V., Hoovers, J., Grzeschik, K.H., Singh, S. and Thiele, H.G. (1993) Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Genomics*, Vol. 18, pp. 404-406.
- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastlein, R., Bazan, F. and Thiele, H.G. (1996a) Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADP-ribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7686-7693.
- Koch-Nolte, F., Reche, P., Haag, F. and Bazan, F. (2001) ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *J Biotechnol*, **92**, 81-87.
- Koestner, W. (2007) Identifizierung und molekulare Charakterisierung der Zielproteine von mono-ADP-Ribosyltransferasen.
- Krebs, C., Koestner, W., Nissen, M., Welge, V., Parusel, I., Malavasi, F., Leiter, E.H., Santella, R.M., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2003) Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal. Biochem.*, **314**, 108-115.
- Krebs, C.A., S.; Braasch, F.; Koestner, W.; Leiter, E.H.; Lund, F.; Oppenheimer, N.; Seman M.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. (2005) CD38 controls ART2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *JI accepted for publication*.
- Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J.M. and Martinez, M.C. (2002) Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem*, **277**, 19876-19881.
- Ludden, P.W. (1994) Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. *Mol Cell Biochem*, Vol. 138, pp. 123-129.
- Lund, F.E., Cockayne, D.A., Randall, T.D., Solvason, N., Schuber, F. and Howard, M.C. (1998) CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev*, **161**, 79-93.

- Man, P., Novak, P., Cebecauer, M., Horvath, O., Fiserova, A., Havlicek, V. and Bezouska, K. (2005) Mass spectrometric analysis of the glycosphingolipid-enriched microdomains of rat natural killer cells. *Proteomics*, **5**, 113-122.
- Millan, J., Qaidi, M. and Alonso, M.A. (2001) Segregation of co-stimulatory components into specific T cell surface lipid rafts. *Eur J Immunol*, **31**, 467-473.
- Moller, E., Bohme, J., Valuggeri, M.A., Ridderstad, A. and Olerup, O. (1990) Speculations on mechanisms of HLA associations with autoimmune diseases and the specificity of "autoreactive" T lymphocytes. *Immunol Rev*, Vol. 118, pp. 5-19.
- Moss, J. and Vaughan, M. (1990) *ADP-ribosylating toxins and G proteins: Insights into signal transduction*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Moss, J., Zolkiewska, A. and Okazaki, I. (1997) ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles. *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol. 419, pp. 25-33.
- Mueller-Dieckmann, C., Scheuermann, T., Wursthorn, K., Schroder, J., Haag, F., Schulz, G.E. and Koch-Nolte, F. (2002) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rat ecto-ADP-ribosyltransferase 2 (ART2.2). *Acta Crystallogr.*, **58**, 1211-1213.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Nagaya, N., Tittle, R.K., Saar, N., Dellal, S.S. and Hume, R.I. (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem*, **280**, 25982-25993.
- Nemoto, E., Yu, Y. and Dennert, G. (1996a) Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function- associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol*, Vol. 157, pp. 3341-3349.
- Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J*, Vol. 17, pp. 3016-3028.
- North, R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, Vol. 82, pp. 1013-1067.
- Ohlrogge, W., Haag, F., Lohler, J., Seman, M., Littman, D.R., Killeen, N. and Koch-Nolte, F. (2002a) Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 7535-7542.
- Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y., Russo, E. and Dennert, G. (1998a) Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J. Immunol.*, **160**, 4190-4198.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J*, **25**, 5071-5082.
- Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. and Drapier, J.C. (1994) Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem J*.
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, **378**, 281-292.
- Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1989) Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*, **342**, 559-561.
- Pompach, P., Man, P., Novak, P., Havlicek, V., Fiserova, A. and Bezouska, K. (2004) Mass spectrometry is a powerful tool for identification of proteins associated with lipid rafts of Jurkat T-cell line. *Biochem Soc Trans*, **32**, 777-779.

- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, **50**, 413-492.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. and Takahashi, T. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*, Vol. 182, pp. 18-32.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J. and Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol*, Vol. 143, pp. 161-178.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. and Haslett, C. (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, **2**, 965-975.
- Scheuplein, F. (2006) Molekulare Mechanismen und Funktion der durch die ADP-Ribosyltransferase ART2 vermittelten Apoptose muriner T Zellen.
- Scheuplein, F., Adriouch, S., Glowacki, G., Haag, F., Seman, M. and Koch-Nolte, F. (2003a) Triggering of T-cell apoptosis by toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase ART2. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 1010, pp. 296-299.
- Seman, M., Adriouch, S., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem*, **11**, 857-872.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2003a) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*, **19**, 571-582.
- Shogomori, H. and Brown, D.A. (2003) Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem*, **384**, 1259-1263.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., van Zanten, B.A., Witholt, B. and Hol, W.G. (1991) Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, **351**, 371-377.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, Vol. 98, pp. 503-517.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H. and Read, R.J. (1994) The crystal structure of pertussis toxin. *Structure*, **2**, 45-57.
- Steinberg, T.H., Newman, A.S., Swanson, J.A. and Silverstein, S.C. (1987) ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem*, Vol. 262, pp. 8884-8888.
- Stiernberg, J., Low, M.G., Flaherty, L. and Kincade, P.W. (1987) Removal of lymphocyte surface molecules with phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on mitogen responses and evidence that ThB and certain Qa antigens are membrane-anchored via phosphatidylinositol. *J Immunol*, **138**, 3877-3884.
- Stojilkovic, S.S., Tomic, M., He, M.L., Yan, Z., Koshimizu, T.A. and Zemkova, H. (2005) Molecular Dissection of Purinergic P2X Receptor Channels. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 1048, pp. 116-130.

- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A. and Buell, G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, Vol. 272, pp. 735-738.
- Thiele, H.G., Haag, F., Nolte, F., Lischke, C. and Bauschus, S. (1997) Expression profiles of RT6 and other T lymphocyte surface markers in the black rat (*Rattus rattus*). *Transplant. Proc.*, Vol. 29, pp. 1697-1698.
- Thiele, H.G., Koch, F., Hamann, A. and Arndt, R. (1986a) Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT6.2. *Immunol.*, **59**, 195-201.
- Tsuchiya, M., Hara, N., Yamada, K., Osago, H. and Shimoyama, M. (1994) Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells. *J Biol Chem*, **269**, 27451-27457.
- Vial, C., Roberts, J.A. and Evans, R.J. (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 487-493.
- Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J.W., Sano, K., Servos, J. and Zimmermann, H. (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem*, Vol. 270, pp. 2971-2978.
- Wang, J., Nemoto, E. and Dennert, G. (1996) Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. *J. Immunol.*, **156**, 2819-2827.
- Wang, J., Nemoto, E. and Dennert, G. (1997) Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP- ribosyltransferase. *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol. 419, pp. 191-201.
- Wilson, H.L., Wilson, S.A., Surprenant, A. and North, R.A. (2002) Epithelial Membrane Proteins Induce Membrane Blebbing and Interact with the P2X7 Receptor C Terminus. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34017-34023.
- Wolenski, M., Cramer, S.O., Ehrlich, S., Steeg, C., Grossschupff, G., Tenner-Racz, K., Racz, P., Fleischer, B. and von Bonin, A. (2003) Expression of CD83 in the murine immune system. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **192**, 189-192.
- Young, T.L. and Santella, R.M. (1988a) Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine. *Carcinogenesis*, Vol. 9, pp. 589-592.
- Ziegler, M. (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1550-1564.
- Zolkiewska, A. and Moss, J. (1997) The alpha 7 integrin as a target protein for cell surface mono-ADP-ribosylation in muscle cells. *Adv Exp Med Biol*, Vol. 419, pp. 297-303.
- Zolkiewska, A., Nightingale, M.S. and Moss, J. (1992) Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11352-11356.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte. Ich danke ihm für die Überlassung des spannenden Themas, seine fürsorgliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit und vor allem für seine Anleitung zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Frau Fenja Braasch danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die angewandten Techniken und die praktische Unterstützung bei meiner Arbeit. Für die Hilfestellung bei der Durchführung von Experimenten möchte ich mich bei Frau Fabienne Seyfried, Frau Gudrun Dubberke und Frau Vivienne Welge bedanken. Mein Dank gilt ferner den BTA-Schülerinnen Frau Andrea Brunngartner und Frau Valéa Schumacher für ihre außerordentliche Unterstützung meiner Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, Herrn Dr. Christian Krebs, Herrn Stefan Kernstock, Herrn Jan Reyelt, Frau Anette Brass, Frau Nicole Schwarz und Herrn Dr. Stefan Rothenburg danke ich für ihre Ratschläge und freundliche Unterstützung, sowie für den permanenten kritischen Gedankenaustausch.

Herrn Dr. Felix Scheuplein und Herrn Dr. Sahil Adriouch danke ich für die exzellente Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Projekten.

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

Herrn Prof. Václav Horejsí danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine immense Unterstützung im Institut für Molekulare Genetik an der Akademie der Wissenschaften in Prag.

Weiterhin möchte ich meinen Mitbewohnern aus dem Kalkhof 1, Dorothea Eckert, Oliver Eckert und Fabian Daub für ihre Unterstützung und Geduld danken.

Für ihre Unterstützung und die Ermunterung zur wissenschaftlichen Arbeit danke ich meinen Eltern Stanislava Bannasova, Jaroslav Vancura und Peter Bannas senior.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Promotionsarbeit möchte ich der Werner Otto Stiftung danken.

Lebenslauf

Name	Peter Bannas
Geburtstag, Ort	12.01.1977, Prag
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Fettstraße 33a, 20357 Hamburg
Tel.	0172-513 92 94
E-mail	p.bannas@uke.de

Schulbildung

1996	Abitur, Schwerpunkte: Mathematik, Englisch, in Osnabrück
------	--

Zivildienst

1996-1997	Pflegedienst, Innere Medizin, St.Antonius-Krankenhaus, Köln
-----------	---

Medizinisches Studium

1998-2000	Martin-Luther-Universität, Halle an der Saale
2000	Physikum: Note: 2,3
2000-2001	Universität Henry-Poincaré, Nancy, Frankreich
2001-2007	Universität Hamburg
2002	Staatsexamen 1: Note: 2,0
2005	Staatsexamen 2: Note: 1,7
2007	Staatsexamen 3: Note: 1,0
2007	Studienabschluss mit der Gesamtnote: sehr gut (1,49)

Wissenschaftliche Tätigkeit

2003-2005	Vollzeit Labortätigkeit im Rahmen eines 2-jährigen Promotionsstipendiums
-----------	--

Volontariate, Famulaturen und Praktisches Jahr

1999 1 Monat	Chirurgie, Virchow Klinikum, Charité, Berlin
2000 1 Monat	Radiologie, Röntgen-Nuklear-Institut, Osnabrück
2001 1 Monat	Innere Medizin, AK-Altona, Hamburg
2001 1 Monat	Immunologie, Institut für Immunologie, UKE, Hamburg
2003 1 Monat	Pädiatrische Kardiologie/Chirurgie, FN Motol, Prag
2004 1 Monat	Innere Medizin, AK-St.Georg, Hamburg
2006 4 Monate	Innere Medizin, AK-St.Georg, Hamburg
2006 4 Monate	Chirurgie, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spanien
2007 4 Monate	Radiologie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg

Fortbildungen

2001	EKG-Kurs, Abt. für Kardiologie, UKE, Hamburg
2001	Echokardiographie Kurs, Pädiatrische Kardiologie, UKE
2002	Aktivkurs Sonographie, Abteilung für Chirurgie, UKE
2003	"Database mining", Institut für Immunologie, UKE
2004	"Scientific Flowcytometry", Becton Dickinson, Heidelberg
2004	Chirurgischer Nahtkurs, Abt. für Chirurgie, UKE
2005	Sprachkurs "Spanisch für Mediziner", Universität Hamburg
2006	Reanimationskurs, Hospital Marqués de Valdecilla, Spanien

Promotion

2002-2007	Am Institut für Immunologie bei Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte in Hamburg mit dem Thema: "Untersuchungen zur ADP-Ribosyltransferase ART2 und ihren Zielproteinen"
2005	Forschungsaufenthalt bei Prof. Vaclav Horejsi, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, Prag

Stipendien

2003-2005	Promotionsstipendium (2 Jahre), Werner-Otto-Stiftung, Hamburg
2004	EFIS-Travel award: 12 th International Congress of Immunology, Montreal

Auslandsaufenthalte

1994	4 Wochen Englisch Sprachkurs in Orpington, England
1999	4 Wochen Spanisch Sprachkurs in Tarifa, Spanien
2000	7 Monate Medizinstudium in Nancy, Frankreich
2005	4 Wochen Forschungsaufenthalt, Institute of Molecular Genetics, Prag
2006	4 Monate PJ in Santander, Spanien

Sprachkenntnisse

Deutsch, Tschechisch	Muttersprachen
Englisch	Fließend (sehr gut)
Französisch, Spanisch	Fließend (gut)

Weitere Qualifikationen

Betreuung und Ausbildung von drei BTA-Schülern (jew. 4 Monate), Institut für Immunologie
Betreuung der Projektstudie einer Biologie-Studentin (6 Wochen), Institut für Immunologie
Betreuung der Apple-Rechner und des Netzwerks am Institut für Immunologie (2002-2007)
EDV-Kenntnisse: MS-Office, Photoshop, DNA-Star, CellQuest, Canvas, Endnote (PC und Apple)
Übersetzertätigkeit bei der FIFA-Fußballweltmeisterschaft 2006

Interessen

Sport	Rudern, Basketball, Klettern, Wellenreiten
Kunst	S/W-Photographie (photographieren und entwickeln)

Publikationen

Originalarbeiten

- 2005 “Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts”
Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F
Blood 105(9):3663-70 (2005)
- “Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation”
Koch-Nolte F, Glowacki G, **Bannas P**, Braasch F, Dubberke G, Ortolan E, Funaro A, Malavasi F, Haag F
Cellular Immunology 236(1-2):66-71 (2005)

Übersichtsarbeiten

- 2007 “Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation”
Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, **Bannas P**, Seman M, Koch-Nolte F
Purinergic Signalling in press (2007) Review
- 2006 “ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells”
Koch-Nolte F, Adriouch S, **Bannas P**, Krebs C, Scheuplein F, Seman M, Haag F
Annals of Medicine 38(3):188-99 (2006) Review

Abstracts und Kongressbeiträge

- 2006 Congress of ECI – European Congress of Immunology, Paris
Bannas P, Scheuplein F, Bormans-Meyer I, Adriouch S, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F
“Transgenic overexpression of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2 sensitizes T cells to activation by NAD”
- Congress of ECI – European Congress of Immunology, Paris
Bannas P, Man P, Novak P, Köstner W, Angelisova P, Buck F, Haag F, Koch-Nolte F
“Mass spectrometric analysis of raft and non-raft associated targets of ADP-ribosyltransferase ART2 on T cells”
- Congress of ECI – European Congress of Immunology, Paris
Adriouch S, **Bannas P**, Braasch F, Schwarz N, Wiegert R, Guse A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F
“Probing the role of conserved Arginine residues in the ligand binding domain of P2X7 purinoceptor by site directed mutagenesis”

- 2005 Congress of DGfI, Kiel
Scheuplein F, Krebs C, Adriouch S, **Bannas P**, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F
“Activation of the P2X7 purinoceptor on murine T cells by NAD and ATP released from injured cells“
- Congress of DGfI, Kiel
Laing S, **Bannas P**, Adriouch S, Scheuplein F, Haag F, Koch-Nolte F
“Painting cells with ARTs: transfer of ADP-ribosyltransferase (ART) activity to ART-negative cells“
- 2004 Congress of IUIS/FOCIS, Montreal, Canada
Bannas P, Kahl S, Haag F, Koch-Nolte F
“Association with lipid rafts controls the substrate specificity of toxin-related T cell ADP-Ribosyltransferase ART2.2”
- Keystone Symposium: Molecular Cell Biology of Lipid Domains, Vancouver, Canada
Haag F, **Bannas P**, Scheuplein F, Koch-Nolte F
“Association with lipid rafts controls the substrate specificity of toxin-related T cell ADP-Ribosyltransferase ART2”
- 2003 Congress of GBM/ELSO, Dresden
Bannas P, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F
“Association with lipid rafts affects the solubilisation of toxin-related mouse ADP-ribosyltransferase ART2 by Triton X-100 and modulates its enzymatic activity”
- Congress of Signal Transduction Society (STS), Weimar
Bannas P, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F
“Activity and specificity of toxin-related mouse ADP-ribosyltransferase-ART2 is controlled by its association with lipid rafts”
- 2002 Congress of Signal Transduction Society (STS), Weimar
Bannas P, Koestner W, Haag F, Koch-Nolte F
“Cell Surface ADP-Ribosyltransferases (ARTs) are contained in glycosphingolipid-enriched microdomains (lipid rafts)“

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift